

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292745 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.16(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.03.30

(54) СПОСОБЫ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МАЛОМ КОЛИЧЕСТВЕ

(31) 63/001,690; 63/031,336

(32) 2020.03.30; 2020.05.28

(33) US

(86) PCT/US2021/024919

(87) WO 2021/202554 2021.10.07

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

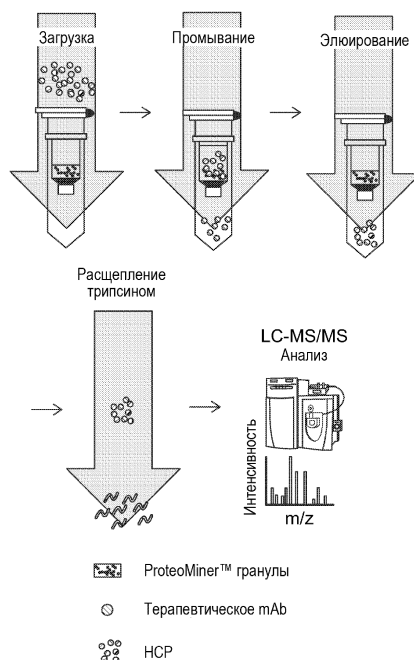
(72) Изобретатель:

Чэнь И-Хсуань, Сяо Хой, Ли Нин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предлагаются способы и системы для идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСП) в образце, содержащем белки в большом количестве. Примеси НСП можно обогатить, применяя взаимодействующие пептидные лиганды, прикрепленные к твердой подложке. Примеси НСП можно элюировать с твердой подложки с помощью раствора, содержащего поверхностно-активные вещества фазового переноса. Выделенные примеси НСП можно расщепить для получения компонентов выделенных примесей НСП, которые впоследствии можно идентифицировать с помощью масс-спектрометра.



202292745

A1

A1

202292745

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575851EA/022

СПОСОБЫ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МАЛОМ КОЛИЧЕСТВЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к способам и системам для идентификации и количественного определения белков клетки-хозяина, содержащихся в малом количестве (НСР), для мониторинга и контроля примесей в биофармацевтических продуктах.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Технология рекомбинантной ДНК широко применяется для изготовления биофармацевтических продуктов в клетках-хозяевах. Биофармацевтические продукты 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. Остаточные примеси должны быть на приемлемо низком уровне до проведения клинических исследований. 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. Иногда даже следовые количества НСР могут вызывать иммуногенный ответ.

Для мониторинга удаления НСР проводили иммуноанализы с применением поликлональных антител анти-НСР. Иммуноанализы могут обеспечить полуколичественное определение общего уровня НСР с высокой пропускной способностью, но они могут быть неэффективны для быстрого количественного определения отдельных НСР. С недавнего времени для мониторинга удаления НСР начали применять жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (LC-MS). Однако огромные динамические диапазоны концентраций НСР в присутствии высокой концентрации очищенных антител могут стать проблемой при разработке метода LC-MS для мониторинга удаления НСР.

Следует понимать, что существует потребность в способах и системах для идентификации и количественного определения НСР для мониторинга и контроля остаточных НСР в лекарственной субстанции с целью снижения рисков для безопасности.

Сущность изобретения

При идентификации примесей НСР в биофармацевтических продуктах сталкиваются с проблемами, связанными с широким динамическим диапазоном концентраций белка из-за очень высокой сложности образца. В настоящей заявке предлагаются способы и системы для идентификации примесей НСР в образце, содержащем белки в большом количестве, включая способ обогащения для

удовлетворения потребности в обогащении НСР, содержащихся в малом количестве в терапевтических лекарственных продуктах.

В настоящем изобретении предлагается способ идентификации и/или количественного определения примесей НСР в образце. В одном типовом варианте осуществления способ идентификации и/или количественного определения примесей НСР в образце включает: приведение образца в контакт с твердой подложкой, при этом взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к твердой подложке, и примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами; промывание твердой подложки раствором, содержащим поверхностно-активное вещество, для выделения примесей НСР и получения элюента; подвергание элюента реакции ферментативного расщепления для получения компонентов выделенных примесей НСР; и идентификацию компонентов выделенных примесей НСР с помощью масс-спектрометра; при этом образец содержит по меньшей мере один пептид или белок в большом количестве. В одном аспекте поверхностно-активное вещество в способе по настоящей заявке представляет собой поверхностно-активное вещество фазового переноса, ионогенное поверхностно-активное вещество, анионогенное поверхностно-активное вещество, катионогенное поверхностно-активное вещество или их комбинации. В другом аспекте поверхностно-активное вещество в способе по настоящей заявке представляет собой дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия или додецилбензолсульфонат натрия.

В одном аспекте концентрация по меньшей мере одного пептида или белка, содержащегося в большом количестве, в способе по настоящей заявке по меньшей мере в около 1000 раз, в около 10 000 раз, в около 100 000 раз или в около 1 000 000 раз выше, чем концентрация каждой примеси НСР. В одном аспекте взаимодействующие пептидные лиганды в способе по настоящей заявке представляют собой библиотеку комбинаторных гексапептидных лигандов. В другом аспекте примеси НСР в способе по настоящей заявке количественно определяют с помощью масс-спектрометра, при этом предел обнаружения каждой примеси НСР составляет около 0,05-0,1 ppm. В другом аспекте по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве, в способе по настоящей заявке представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат «антитело-лекарственное средство», слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство. В одном аспекте фермент реакции ферментативного расщепления в способе по настоящей заявке представляет собой трипсин.

В еще одном аспекте масс-спектрометр в способе по настоящей заявке представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполем, при этом масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте масс-спектрометр способен выполнять анализы LC-MS (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) или LC-MRM-MS (жидкостная хроматография-мониторинг множественных реакций-масс-спектрометрия).

В этом изобретении, по меньшей мере частично, представлена система для идентификации примесей НСР в образце. В одном типовом варианте осуществления система для идентификации примесей НСР в образце включает: твердую подложку; взаимодействующие пептидные лиганды, при этом взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к твердой подложке таким образом, что примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами; раствор, содержащий поверхностно-активное вещество, способное промывать твердую подложку для выделения примесей НСР; раствор для ферментативного расщепления, способный генерировать компоненты из выделенных примесей НСР; и масс-спектрометр, способный идентифицировать или количественно определять компоненты из выделенных примесей НСР; при этом образец содержит по меньшей мере один пептид или белок в большом количестве.

В одном аспекте поверхностно-активное вещество в системе по настоящей заявке представляет собой поверхностно-активное вещество фазового переноса, ионогенное поверхностно-активное вещество, анионогенное поверхностно-активное вещество, катионогенное поверхностно-активное вещество или их комбинации. В одном аспекте поверхностно-активное вещество в системе по настоящей заявке представляет собой дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия или додецилбензолсульфонат натрия. В другом аспекте концентрация по меньшей мере одного пептида или белка, содержащегося в большом количестве, в системе по настоящей заявке по меньшей мере в около 1000 раз, в около 10 000 раз, в около 100 000 раз или в около 1 000 000 раз выше, чем концентрация каждой примеси НСР. В другом аспекте взаимодействующие пептидные лиганды в системе по настоящей заявке представляют собой библиотеку комбинаторных гексапептидных лигандов. В одном аспекте предел обнаружения каждой примеси НСР в системе по настоящей заявке составляет около 0,05-0,1 ppm. В другом аспекте по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве, в системе по настоящей заявке представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат «антитело-лекарственное средство», слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство. В еще одном аспекте ферментом раствора для ферментативного расщепления в системе по настоящей заявке является трипсин.

В одном аспекте масс-спектрометр в системе по настоящей заявке представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполом, при этом масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте масс-спектрометр в системе по настоящей заявке способен выполнять анализы LC-MS или LC-MRM-MS.

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, предлагается в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перестановки могут быть выполнены в пределах объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Патент или файл заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным графическим материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

Фиг. 1 демонстрирует общий рабочий процесс применения гранул ProteoMiner™ для обогащения НСР, включая этапы загрузки, промывки, элюирования, расщепления трипсином и анализа LC-MS/MS в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 2А демонстрирует изменения сигнала PRM одного пептида НСР, например, IYVASVHQDLSDDDIK, полученного из фактора поли-связывания-сплайсинга PUF60 в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 2В демонстрирует изменения сигнала PRM одного пептида НСР, например, TYFLKPSK, полученного из гомолога белка NipSnap 3В в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 3А демонстрирует оценку воспроизводимости способа обогащения НСР по настоящей заявке с помощью трехкратного эксперимента в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 3В демонстрирует результаты корреляционного анализа Пирсона для оценки воспроизводимости способа обогащения НСР по настоящей заявке в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 4 демонстрирует результаты применения способа обогащения НСР по настоящей заявке для идентификации НСР с использованием NISTmAb по сравнению с НСР, идентифицированными Doneanu et al. и Huang et al. в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 5А демонстрирует результаты обнаружения и идентификации НСР в образцах, содержащих mAb3 и 13, добавленных НСР, путем сравнения способов фильтрации (фильтрования) и ProteoMiner™ в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 5В демонстрирует результаты обнаружения и идентификации НСР в образцах, содержащих mAb4 и примеси НСР, путем сравнения способов фильтрации (фильтрования) и ProteoMiner™ в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 6 демонстрирует результаты тестирования воспроизводимости способа ProteoMiner™ по настоящей заявке для обогащения НСР с применением образцов, содержащих mAb4 и примеси НСР, в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 7 демонстрирует эффективность способов нативного расщепления и ProteoMiner™ для обогащения НСР с применением образцов, содержащих mAb5 и примеси НСР, в соответствии с типовым вариантом осуществления.

Фиг. 8 демонстрирует сравнение способов нативного расщепления и ProteoMiner™ для эффективности обогащения НСР в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для изготовления биофармацевтических продуктов важно получать биофармацевтические продукты высокой чистоты, поскольку остаточные НСР могут поставить под угрозу безопасность и стабильность продукта. Для получения рекомбинантных терапевтических антител на основе клеток, как правило, применяют иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), для мониторинга удаления (клиренса) НСР с применением поликлональных антител анти-НСР во время разработки процесса. ELISA может обеспечить полуколичественный анализ общего уровня НСР с высокой пропускной способностью. Однако, поскольку поликлональные антитела анти-НСР применяются в ELISA для захвата, обнаружения и количественного определения общего уровня НСР, они могут быть неэффективными для количественного определения отдельных НСР. В частности, некоторые неиммуногенные или слабоиммуногенные НСР могут не обнаруживаться с помощью ELISA.

Для идентификации и количественного определения НСР применили несколько дополнительных подходов для мониторинга НСР, таких как одномерный/двумерный (1D/2D) PAGE или жидкостная хроматография (LC) в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Однако огромные динамические диапазоны концентраций НСР в присутствии высокой концентрации очищенных антител стать серьезной проблемой при разработке методов LC-MS для мониторинга удаления примесей НСР. Сама по себе масс-спектрометрия (MS) не способна обнаруживать мишени, содержащиеся в малом количестве, такие как низкие уровни НСР в ppm, в присутствии высоких концентраций терапевтических антител из-за широких динамических диапазонов концентраций, которые могут превышать шесть порядков. Чтобы преодолеть эту проблему, одна из стратегий может состоять в том, чтобы выделить совместно элюирующиеся пептиды перед MS-анализом, добавив еще одно измерение разделения, такое как 2D-LC и/или подвижность ионов, в сочетании с сбором параметров, зависящим от данных, или сбором параметров, не зависящим от данных, для повышения эффективности разделения.

Huang et al. (Huang et al., A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, Anal Chem. 2017, May 16; 89 (10):5436-5444) описывает способ приготовления образца с применением трипсинового расщепления для протеомной характеристики примесей НСР в образце антитела. Способ приготовления образца, предложенный Huang, сохраняет антитела почти интактными, в то время как НСР расщепляются. Подход, предложенный Huang, может уменьшить динамический диапазон для обнаружения НСР с помощью масс-спектрометрии на один-два порядка по сравнению с традиционным приготовлением образцов путем трипсинового расщепления. Как показали эксперименты с добавлением НСР, подход, предложенный Huang, позволяет

обнаруживать 0,5 ppm HCP с молекулярной массой более 60 кДа, например, gPLBL2. Например, с помощью подхода, предложенного Huang, были обнаружены шестьдесят примесей HCP у мышей в RM 8670 (NISTmAb, стандарт моноклональных антител NIST, экспрессированный в мышинной клеточной линии, полученный из Национального института стандартов и технологий, Гейтерсберг, штат Мэриленд)

Doneanu et al. (Doneanu et al., Enhanced Detection of Low-Abundance Host Cell Protein Impurities in High-Purity Monoclonal Antibodies Down to 1 ppm Using Ion Mobility Mass Spectrometry Coupled with Multidimensional Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 2015 Oct 20; 87(20):10283-10291) сообщает об обнаружении примесей HCP, содержащихся в малом количестве, до 1 ppm, в образцах антител с помощью методов жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS). Подход, предложенный Doneanu, включает применение новой стационарной фазы C18 с модифицированной поверхностью заряда для облегчения проблем, связанных с насыщением колонки, включением разделения ионной подвижности на основе бегущей волны совместно элюирующихся пептидных прекурсоров и повышением эффективности фрагментации пептидов HCP, содержащихся в малых количествах, путем корреляции энергии столкновения, применяемой для фрагментации прекурсора, со временем дрейфа подвижности. Идентификация примесей HCP может быть обнаружена при 10-50 ppm с помощью 2D-HPLC (2D-высокоэффективная жидкостная хроматография) в сочетании с масс-спектрометрическим анализом ионной подвижности. Однако время цикла для 2D-LC или 2D-HPLC может быть очень большим. Кроме того, эти способы могут быть недостаточно чувствительными для анализа низких концентраций HCP, таких как менее чем 10 ppm. Другие подходы к выявлению примесей HCP включают приготовление образцов для обогащения HCP путем удаления антител из образца, например, с применением аффинной очистки или ограниченного расщепления для удаления антител. Кроме того, применением поликлональных антител для захвата HCP является еще одним распространенным подходом.

Аналитические методы, необходимые для идентификации примесей HCP, сталкиваются с проблемами, связанными с примерно в 1 миллион раз большим количеством молекул матрицы, чем количество аналитов, например, HCP или пептидов HCP, из-за очень высокой сложности образца. Исследование обогащения HCP для достижения уровней обнаружения осуществить непросто, поскольку примеси HCP чаще всего присутствуют на низких уровнях, таких как 1-100 ppm, в белковых биофармацевтических препаратах. Без знания особенностей и свойств HCP может быть очень сложно разработать общую процедуру приготовления образцов для обогащения HCP (или пептидов HCP) или удаления фона матрицы (Doneanu et al.).

В настоящей заявке предлагается способ обогащения HCP с применением взаимодействующих пептидных лигандов, таких как комбинаторная библиотека лигандов. В некоторых типовых вариантах осуществления для обогащения HCP применяют гранулы ProteoMiner™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния), например,

иммобилизованную на гранулах комбинаторную библиотеку гексапептидов. Когда гранулы, конъюгированные с пептидными лигандами, наносят на образец, содержащий различные виды белков, каждый вид белка может связываться со своими взаимодействующими пептидными лигандами. НСР связываются со своими взаимодействующими пептидными лигандами в основном за счет гидрофобной силы в сочетании с некоторыми силами слабого взаимодействия, такими как ионное взаимодействие и водородная связь.

Виды белков, которые представлены в большом количестве, могут насыщать свои взаимодействующие пептидные лиганды из-за наличия избыточного количества, поскольку существует ограниченное количество взаимодействующих пептидных лигандов, соответствующих каждому виду белков в комбинаторной библиотеке лигандов. Ограниченное количество соответствующих взаимодействующих пептидных лигандов может быть легко насыщено в присутствии избыточного количества белков с высоким содержанием. Избыточное количество белков с высоким содержанием, которые не могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами, можно смыть с гранул. Поскольку количество белков с низким содержанием в образце относительно низкое по сравнению с белками с высоким содержанием, белки с низким содержанием могут не насыщать свои соответствующие взаимодействующие пептидные лиганды. Следовательно, белки, содержащиеся в малом количестве, могут быть относительно обогащены по сравнению с белками, содержащимися в большом количестве. После проведения процесса обогащения широкий динамический диапазон концентраций белка может быть значительно уменьшен, что позволяет обнаруживать белки, содержащиеся в малом количестве. С помощью способа обогащения НСР по настоящей заявке можно обогащать и обнаруживать белки, содержащиеся в среднем и малом количестве, путем уменьшения количества белков, содержащихся в большом количестве. Способ обогащения НСР по настоящей заявке также удовлетворяет потребности в обогащении примесей НСР, содержащихся в малом количестве в терапевтическом лекарственном продукте.

В некоторых типовых вариантах осуществления образцы антител обрабатывают гранулами ProteoMiner™ для уменьшения уровня антител, которые присутствуют в большом количестве, и для обогащения примесей НСР, которые присутствуют в малом количестве. Образец, обогащенный НСР, затем подвергают протеомному анализу «дробовика». С помощью этой процедуры можно обогатить примеси НСР, содержащиеся в малом количестве, и одновременно снизить уровни антител. Эта процедура может успешно уменьшить диапазоны динамических концентраций среди НСР и препаратов на основе антител, что позволяет обнаруживать примеси НСР, содержащиеся в малом количестве. Предел обнаружения примесей НСР с помощью способа обогащения НСР по настоящей заявке составляет около 0,05-0,1 ppm.

В некоторых типовых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагается способ идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСР) в образце, включающий:

приведение образца в контакт с твердой подложкой, при этом взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к твердой подложке, и примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами; промывание твердой подложки раствором, содержащим поверхностно-активное вещество, для выделения примесей НСР и получения элюента; подвергание элюента реакции ферментативного расщепления для получения компонентов выделенных примесей НСР; и идентификацию компонентов выделенных примесей НСР с помощью масс-спектрометра; при этом образец содержит по меньшей мере один пептид или белок в большом количестве.

В некоторых типовых вариантах осуществления поверхностно-активные вещества фазового переноса (PTS), такие как дезоксихолат натрия (SDC) и лаурилсульфат натрия (SLS), применяют для элюирования НСР из гранул ProteoMiner™. SDC представляет собой ионный детергент, который особенно пригоден для разрушения и диссоциации белковых взаимодействий. Ионные детергенты имеют гидрофильную головную группу, которая заряжена и может быть заряжена как отрицательно (анионно), так и положительно (катионно). SLS является анионным поверхностно-активным веществом. Анионные детергенты, такие как SLS или додецилбензолсульфонат натрия, представляют собой натриевые соли сульфированных длинноцепочечных спиртов или углеводов.

В некоторых типовых вариантах осуществления элюирующий буфер для элюирования НСР из гранул ProteoMiner™ содержит ионные, анионные, катионные, поверхностно-активные вещества фазового переноса или их комбинации. В одном аспекте элюирующий буфер содержит SDC, SLS или додецилбензолсульфонат натрия. В другом аспекте элюирующий буфер содержит буфер PTS, содержащий 12 мМ SDC (дезоксихолат натрия), 12 мМ SLS (лауроилсаркозинат натрия), 10 мМ TCEP (трис(2-карбоксиил)фосфин, восстанавливающий агент) и 30 мМ CAA (хлорацетамид).

Следовые количества определенных НСР могут вызывать иммунный ответ или токсическую биологическую активность после инъекции препарата. Присутствие остаточных НСР в биофармацевтических продуктах вызывает озабоченность в контексте безопасности лекарственных средств, что привело к растущему спросу на разработку способов и систем для выявления и характеристики примесей НСР в биофармацевтических продуктах. Существуют неудовлетворенные потребности в идентификации и мониторинге отдельных НСР для оценки риска присутствия НСР в терапевтических белковых продуктах.

В настоящем изобретении предлагаются способы и системы для удовлетворения вышеупомянутых потребностей, при этом описаны способы и системы для идентификации и количественного определения НСР для мониторинга и контроля остаточных НСР в лекарственной субстанции с целью снижения рисков для безопасности. Типовые варианты осуществления, описанные в данном документе, соответствуют вышеупомянутым требованиям и удовлетворяют вышеупомянутые потребности.

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.

Подразумевается, что применяемые в данном документе термины «включают», «включает» и «включающий» являются неограничивающими и понимаются как имеющие значение «содержат», «содержит» и «содержащий» соответственно.

В некоторых типовых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагается способ идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСР) в образце, включающий: приведение образца в контакт с твердой подложкой, при этом взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к твердой подложке, и примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами; промывание твердой подложки раствором, содержащим поверхностно-активное вещество, для выделения примесей НСР и получения элюента; подвергание элюента реакции ферментативного расщепления для получения компонентов выделенных примесей НСР; и идентификацию компонентов выделенных примесей НСР с помощью масс-спектрометра; при этом образец содержит по меньшей мере

один пептид или белок в большом количестве.

В контексте данного документа термин «пептид» или «белок» включает любой аминокислотный полимер с ковалентно связанными амидными связями. Белки содержат одну или большее количество аминокислотных полимерных цепей, обычно известных в данной области техники как «пептиды» или «полипептиды». Белок может содержать один или множество полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. В некоторых типовых вариантах осуществления белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

В одном аспекте по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве, в способе по настоящей заявке представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат «антитело-лекарственное средство», слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство. В одном аспекте белок, содержащийся в большом количестве, представляет собой VEGF-ловушку (примеры которой описаны в патенте США №7279159). В предпочтительном аспекте белок, содержащийся в большом количестве, представляет собой афлиберцепт.

В контексте данного документа термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области

гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять 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 в себя обозначение как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя, помимо прочего, молекулы антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

В контексте данного документа 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 использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

В контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а ScFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых иллюстративных 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 иллюстративных вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с сопоставимой аффинностью с таковым 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 другой мишени (*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 переменные 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 κλ-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 настоящий 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 контексте данного документа 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 (*например*. биспецифические антитела, BsAb), антитела с дополнительной специфичностью, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть рассмотрены для применения в системе и способе, описанных в данном документе.

В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой

эукариотический, прокариотический или фаговый клон, посредством любых способов, доступных или известных в данной области. Моноклональные антитела, пригодные для 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 типовых вариантах осуществления белок 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 БНК, 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 I80, 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 GH₁, 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 без ограничения 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 цитруллинэмии, 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 контексте данного документа термин «белок клетки-хозяина» (HCP) 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: производные клеточного субстрата, производные клеточной культуры и производные дальнейшего процесса. Примеси, образованные из клеточного субстрата, включают в себя, помимо прочего, белки, полученные из организма хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки хозяина). Примеси, полученные из клеточной культуры, включают без ограничения индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. 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 иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина может иметь рI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном конкретном иллюстративном варианте осуществления 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 типов белков клетки-хозяина в композиции может быть по меньшей мере два.

В контексте данного документа термин «белковый фармацевтический продукт» или «биофармацевтический продукт» включает активный ингредиент, который может быть полностью или частично биологическим по своей природе. В одном аспекте белковый фармацевтический продукт может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, антиген, вакцину, конъюгат пептида с лекарственным средством, конъюгат антитела с лекарственным средством, конъюгат белка с лекарственным средством, клетки, ткани или их комбинации. В другом аспекте белковый фармацевтический продукт может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или укороченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, конъюгата пептида с лекарственным средством, конъюгата антитела с лекарственным средством, конъюгата белка с лекарственным средством, клеток, тканей или их комбинации.

В другом типовом варианте осуществления образец может быть получен 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, раствор лекарственного средства (DS) или лекарственный продукт (DP), содержащий конечный составленный продукт. В некоторых других конкретных типовых вариантах осуществления образец может быть выбран из любого этапа последующего процесса осветления, хроматографической очистки,

вирусной инаktivации или фильтрации. В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления лекарственный продукт может быть выбран из изготовленного лекарственного продукта в клинических условиях, при транспортировке, хранении или обращении.

В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды (или компоненты, как упоминается в настоящем документе) молекул и точное измерение их масс. Подразумевается, что указанный 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 аналита можно переносить в газовую фазу и ионизировать одновременно (как в ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в основном зависит от применения.

В одном аспекте масс-спектрометр в способе по настоящей заявке представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполом, при этом масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

В контексте данного документа термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к процессу ионизации распылением, в котором либо катионы, либо анионы в растворе переносятся в газовую фазу посредством образования и удаления растворителя при атмосферном давлении потока капель с высоким зарядом, возникающих вследствие применения разницы потенциалов между наконечником иглы для электрораспыления, содержащим раствор, и противозлектродом. Обычно существует три основных этапа продуцирования ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. Такими этапами являются следующие: (a) продуцирование заряженных капель в наконечнике для инфузии ES; (b) сокращение заряженных капель посредством выпаривания растворителя и повторного разложения капель, что обеспечивает получение небольших высокозаряженных капель, способных вырабатывать ионы газовой фазы; и (c) механизм, посредством которого ионы газовой фазы вырабатываются из небольших и высокозаряженных капель. Этапы (a) - (c) обычно осуществляются в области атмосферного давления устройства. В некоторых типовых вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В контексте данного документа термин «тройной квадрупольный масс-спектрометр» относится к тандемному масс-спектрометру, состоящему из двух последовательно соединенных квадрупольных масс-анализаторов с (немассовое разрешение) радиочастотой (RF), только квадруполь между ними действует как ячейка для диссоциации, индуцированной столкновением. В тройном квадрупольном масс-спектрометре образец пептида вводят в систему LC, соединенную с прибором MS.

Первый квадруполь можно использовать в качестве масс-фильтра для выделения пептидов с целевым значением m/z . Второй квадруполь служит ячейкой столкновений для разрыва пептида на фрагменты. Третий квадруполь служит вторым масс-фильтром для заданных фрагментов m/z первичного исходного пептида. В контексте данного документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора и разделения по массе. Обязательным условием является то, что образцы молекул могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии и что они могут быть индуцированы распадом некоторым прогнозируемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. 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. Тандемную MS успешно осуществляли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов тандемной MS представляют собой «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем 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 «тандем 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. Характеризация включает без ограничения секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение местоположения посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

В контексте данного документа термин «база данных» относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска

неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям (или компоненты, упомянутые в данном документе) в базе (базах) 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!тандемный (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

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

В контексте данного документа термин «жидкостная 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 в себя традиционную обращеннофазовую (RP), ионообменную (IEX) хроматографию, хроматографию со смешанным режимом и хроматографию с нормальными фазами (NP).

Типовые варианты осуществления данного изобретения

В вариантах осуществления, описанных в данном документе, предлагаются способы и системы для идентификации примесей НСР, содержащихся в образце в большом количестве.

В некоторых типовых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагается способ идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСР) в образце, включающий: приведение образца в контакт с твердой подложкой, при этом взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к твердой подложке, и примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами; промывание твердой подложки раствором, содержащим поверхностно-активное вещество для получения элюента; подвергание элюента реакции ферментативного расщепления для получения компонентов выделенных примесей НСР; и идентификацию компонентов выделенных примесей НСР с помощью масс-спектрометра; при этом образец содержит по меньшей мере один пептид или белок в большом количестве.

В одном аспекте твердая подложка в способе или системе по настоящей заявке может представлять собой гранулы, магнитные гранулы, хроматографические смолы, полимер или хроматографическую матрицу.

В одном аспекте поверхностно-активное вещество в способе по настоящей заявке представляет собой поверхностно-активное вещество фазового переноса, ионогенное

поверхностно-активное вещество, анионогенное поверхностно-активное вещество, катионогенное поверхностно-активное вещество или их комбинации. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество в способе по настоящей заявке представляет собой дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия или додецилбензолсульфонат натрия.

В одном аспекте концентрация по меньшей мере одного пептида или белка, содержащегося в большом количестве, в способе по настоящей заявке по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 100 раз, по меньшей мере в около 1000 раз, в около 10 000 раз, в около 100 000 раз или в около 1 000 000 раз выше, чем концентрация каждой примеси НСР. В одном аспекте примеси НСР в способе по настоящей заявке количественно определяют с помощью масс-спектрометра, при этом предел обнаружения каждой примеси НСР составляет около 0,05-0,1 ppm, около 0,01-0,5 ppm, около 0,02-0,5 ppm, около 0,03-0,5 ppm, около 0,04-0,5 ppm, около 0,02-0,4 ppm, около 0,03-0,4 ppm, около 0,04-0,4 ppm, около 0,02-0,3 ppm, около 0,03-0,3 ppm, около 0,04-0,3 ppm, около 0,02-0,2 ppm, около 0,03-0,2 ppm или около 0,04-0,2 ppm.

Следует понимать, что система не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых НСР, взаимодействующих пептидных лигандов, твердых подложек, биофармацевтических продуктов, пептидов, белков, антител, поверхностно-активных веществ, белковых фармацевтических продуктов или масс-спектрометра.

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. 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.

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

ПРИМЕРЫ

Материал и способы

1. Материал

Набор для обогащения белка ProteoMiner™ был приобретен у Bio-Rad Laboratories, Inc. (Геркулес, штат Калифорния). Технология ProteoMiner™ представляет собой инструмент приготовления образцов для сжатия динамического диапазона концентрации белка в биологических образцах. Большая библиотека комбинаторных гексапептидных лигандов была иммобилизована на гранулах для захвата различных белков. Спин-колонка

ProteoMiner™ содержала 500 мкл взвеси гранул (4% гранул, 20% об./об. водного этанола) с 20 мкл осевшего объема гранул. Отмывочный буфер набора содержит 50 мл PBS (фосфатно-солевой буфер, 150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4). Элюирующий буфер набора содержит лиофилизированную мочевины CHAPS (8 M мочевины, 2% CHAPS; детергент CHAPS представляет собой 3-((3-холамидопропил)диметиламмоний)-1-пропансульфонат). Регидратационный буфер набора содержит 5% уксусную кислоту.

Растворители для хроматографии, имеющие чистоту LC-MS, были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Уолтем, штат Массачусетс). Моноклональные антитела были произведены компанией Regeneron (Тэрритаун, штат Нью-Йорк). Белки СНО (яичники китайского хомяка), которые добавляли в качестве НСР, были произведены компанией Regeneron (Тэрритаун, штат Нью-Йорк). Дезоксихолат натрия (SDC), лауроилсаркозинат натрия (SLS) и хлорацетамид (CAA) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури). Трис-(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР) был приобретен у компании Thermo Fisher Scientific. RM 8670 (NISTmAb, стандарт моноклональных антител NIST, экспрессированный в мышинной клеточной линии) был получен из Национального института стандартов и технологий (NIST, Гейтерсбург, штат Мэриленд).

2. Обогащение белка с помощью набора для обогащения белка ProteoMiner™

Набор для обогащения белка ProteoMiner™ применяли для обогащения белков в образцах. Мелкомасштабный картридж ProteoMiner™ применяли в пяти экспериментах. Гранулы ProteoMiner™ дважды промывали 200 мкл промывочного буфера, входящего в набор. Гранулы ресуспендировали с 200 мкл воды и 40 мкл взвеси гранулы переносили в пробирку для проведения одного эксперимента. 8 мкг NISTmAb, 15 мкг mAb1 или 15 мкг mAb2 разбавляли водой до концентрации 50 мкг/мл с последующим доведением pH раствора до pH 6 с применением 25 mM ацетата натрия pH 4,0. Образец добавляли к суспензии гранул ProteoMiner™ для инкубации при комнатной температуре с вращением в течение 2 часов. Затем смесь образцов загружали в наконечник с фриттой. Супернатант удаляли центрифугированием при 1000 xg в течение 1 минуты. Затем гранулы промывали, добавляя 100 мкл промывочного буфера в наконечник с последующим центрифугированием при 200 xg в течение 1 минуты три раза. Наконец, обогащенные белки элюировали с применением 10 мкл буфера PTS (12 mM SDC, 12 mM SLS, 10 mM ТСЕР и 30 mM CAA) с последующим центрифугированием при 200xg в течение 1 минуты три раза. Собранный элюент, содержащий обогащенные белки, денатурировали, восстанавливали и алкилировали при 95 °C в течение 5 минут. Алкилированные белки разбавляли до 150 мкл и расщепляли с помощью 1 мкг трипсина при 37 °C в течение ночи с получением раствора, содержащего смесь пептидов. Раствор, содержащий смесь пептидов, подкисляли 10 мкл 10% TFA для осаждения SDC и SLS. Затем раствор, содержащий смесь пептидов, центрифугировали при 13200 об/мин в течение 5 минут. Затем надосадочную жидкость, содержащую смесь пептидов, обессоливали с помощью наконечника для обессоливания GL-Tip GC и сушили с помощью SpeedVac.

3. Прямое расщепление NISTmAb

Стандарт моноклонального антитела NIST, например, NISTmAb, расщепляли трипсином в качестве эталонного материала посредством следующих процедур: 20 мкг NISTmAb (RM8670) сушили с помощью SpeedVac с последующим восстановлением с 20 мкл буфера PTS; антитела (белки) денатурировали, восстанавливали и алкилировали при 95 °C в течение 5 минут; алкилированные белки разбавляли до 100 мкл и расщепляли с помощью 1 мкг трипсина при 37 °C в течение ночи с получением раствора, содержащего смесь пептидов; раствор, содержащий смесь пептидов, подкисляли с применением 10 мкл 10% TFA для осаждения SDC и SLS в кислой среде с последующим центрифугированием при 13200 об/мин в течение 5 минут; супернатант, содержащий пептидную смесь, затем обессоливали с помощью наконечника для обессоливания GL-Tip GC с последующей сушкой с помощью SpeedVac; высушенную смесь пептидов ресуспендировали в 40 мкл 0,1% FA; и 2 мкл ресуспендированного раствора применяли для прямой инъекции для анализа LC-MS/MS и анализа PRM.

4. Анализ LC-MS/MS

Обессоленную смесь пептидов, полученную при обогащении ProteoMiner™, высушивали и ресуспендировали в 40 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты (FA). 5 мкл раствора, содержащего смесь пептидов, вводили в низкотоковую систему жидкостной хроматографии, например систему UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific), соединенную с масс-спектрометром Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific). Пептиды разделяли на колонке C18, 25 см (внутренний диаметр 0,075 мм, 2,0 мкм, 100 Å, Thermo Fisher Scientific). Буфер подвижной фазы содержал 0,1% FA в сверхчистой воде (буфер А), а элюирующий буфер содержал 0,1% FA в 80% ацетонитриле (ACN) (буфер В). Пептиды элюировали с использованием 100-минутного линейного градиента от 2-25% буфера В при скорости потока 300 нл/мин. Масс-спектрометр работал в режиме зависимости от данных. Десять наиболее интенсивных ионов подвергались фрагментации столкновительной диссоциации с более высокой энергией (HCD) с нормализованной энергией столкновения (NCE) на уровне 27% для каждого полного сканирования MS с разрешением 120 000 (автоматическая регулировка усиления (AGC), цель 3e6, максимальное время инъекции 60 мс, m/z 375-1500), и явления MS/MS с разрешением 30 000 (цель AGC 1e5, максимальное время инъекции 60 мс, m/z 200-2000). Протеомные данные MS были депонированы в Консорциуме ProteomeXchange под номером доступа к проекту PXD016194 через репозиторий JPOST.

5. Анализ PRM

1 мкг образца прямого расщепления NISTmAb вводили в систему UltiMate™ 3000 RSLCnano, соединенную с масс-спектрометром Q-Exactive HFX. Расщепленные пептиды разделяли с помощью колонки C18, 25 см с внутренним диаметром 0,075 мм (2,0 мкм, 100 Å). Буфер подвижной фазы содержал 0,1% FA в воде (буфер А), а элюирующий буфер содержал 0,1% FA в 80% ACN (буфер В). Пептиды элюировали с использованием 100-минутного линейного градиента от 2-25% буфера В при скорости потока 300 нл/мин. Элюент из колонки вводили в масс-спектрометр через распылительный наконечник

эмиттера. Каждый образец анализировали в режиме мониторинга параллельных реакций (PRM) с окном выделения 2 m/z . Во всех экспериментах полный масс-спектр с разрешением 120 000 относительно m/z 200 (цель AGC $1e6$, максимальное время ввода 60 мс, m/z 350-2000) сопровождался запланированным по времени PRM-сканированием с разрешением 30 000 (мишень AGC $1e5$, максимальное время инъекции 100 мс). HCD применяли с 27% NCE.

Пример 1. Обогащение HCP с применением различных элюирующих буферов

Гранулы ProteoMiner™ применяли для обогащения HCP в образце, содержащем антитела и HCP. Общий рабочий процесс применения гранул ProteoMiner™ для обогащения HCP включал этапы загрузки, промывки, элюирования, триптического расщепления и анализа LC-MS/MS, как продемонстрировано на Фиг. 1. Было протестировано несколько буферов для элюирования белков из гранул ProteoMiner™, включая элюирующий буфер ProteoMiner™ и несколько MS-совместимых элюирующих буферов, например, буфер PTS, 8М мочевины в 5% уксусной кислоте (AA), 6М гуанидина и 0,1% TFA в 50% CAN (0,1%TFA/50%ACN). Элюирующий буфер, входящий в состав набора ProteoMiner™ Protein Enrichment, содержит 2% CHAPS, который был разработан для совместимости с 1D/2D гель-анализом. Поскольку CHAPS несовместим с масс-спектрометрическим (MS) анализом, для удаления CHAPS из элюента было протестировано осаждение ацетоном или FASP (подготовка образцов с помощью фильтра). FASP представляет собой способ, использующий одноразовые центробежные ультрафильтрационные установки для удаления детергентов и расщепления белков. Последовательное расщепление белков проводили с применением двух или трех протеаз для обеспечения возможности получения пептидных фракций.

Образец, содержащий mAb1 (10 мг) и HCP, обрабатывали с применением 20 мкл гранул ProteoMiner™ для обогащения HCP. Когда образец обрабатывали гранулами ProteoMiner™ и затем элюировали элюирующим буфером ProteoMiner™ в сочетании с этапом очистки, таким как осаждение ацетоном или FASP, было идентифицировано 11 или 8 эндогенных HCP, как продемонстрировано в Таблице 1. Напротив, применение 8М мочевины в 5% уксусной кислоте в качестве буфера для элюирования без этапа очистки было более эффективным для обогащения HCP из образца, а количество эндогенных HCP, идентифицированных с высокой степенью достоверности, увеличилось до 26, как продемонстрировано в Таблице 1. Полученные результаты показали, что добавление этапа очистки, например, этапа удаления CHAPS с осаждением ацетоном или FASP, может оказать негативное влияние на обогащение HCP, поскольку некоторые HCP удалялись на этапе очистки.

Таблица 1. Обогащение HCP с применением гранул ProteoMiner™

Количество гранул ProteoMiner™	Объем загрузки mAb1	Элюирующий буфер	Очистка перед расщеплением	Высокодостоверное количество белков (> 2 пептидов)
1 набор (емкость 10 мг)	10 мг	8 М мочевины в 5% уксусной кислоте	Н/Д	26
1 набор (емкость 10 мг)	10 мг	8 М мочевины, 2% CHAPS	Осаждение ацетоном	11
1 набор (емкость 10 мг)	10 мг	8 М мочевины, 2% CHAPS	FASP	8

Для того, чтобы оценить эффективность различных MS-совместимых элюирующих буферов, 13 очищенных НСР из клеток CHO (яичника китайского хомячка) в различных концентрациях в диапазоне от 0,1 ч/млн (0,1 нг НСР/мг mAb) до 200 ч/млн добавляли в 8 мг очищенного моноклонального антитела, например, mAb2. Очищенное mAb2 содержало очень низкий уровень эндогенных НСР. Элюирующий буфер PTS или 6М гуанидина продемонстрировал более высокую эффективность элюирования, что привело к более высоким количествам пептида (26,1 или 22,8 мкг соответственно) по сравнению с элюирующим буфером 8М мочевины в 5% уксусной кислоте или 0,1% TFA/50% ACN (11,35 или 14,25 мкг соответственно), как продемонстрировано в Таблице 2. С помощью буфера PTS получили 60 белков с высокой достоверностью, включая все 13 добавленных НСР. С помощью 8М мочевины получили 32 белка с высокой достоверностью, включая 12 добавленных НСР. С помощью 6М гуанидина получили 30 белков с высокой достоверностью, включая 12 добавленных НСР. С помощью 0,1%TFA/50% CAN получили 34 белка с высокой достоверностью, включая 12 добавленных НСР. Буфер PTS продемонстрировал наилучшую эффективность элюирования НСР. Следовательно, комбинация гранул ProteoMiner™ и элюирующего буфера PTS может значительно обогатить НСР в лекарственном веществе.

Таблица 2. Обогащение НСР с применением 8 мг очищенного mAb2 с добавлением НСР (0,1-200 ppm)

Количество образца (mAb2+0,1-200 ppm добавленных НСР)	Элюирующий буфер	Количество пептидов (мкг)	Общий идентификатор	Количество идентифицированных добавленных НСР	Высокая достоверность (>2 пептидов)	DS PSM (тяжелый /легкий)
8 мг	PTS	26,1	106	13	60	11464/4806
8 мг	8 М мочевины в	11,35	65	12	32	8667/3888

	5% уксусной кислоте					
8 мг	6 М гуанидина	22,8	64	12	30	12273/5283
8 мг	0,1% TFA/50% ACN	14,25	65	12	34	6860/2971

Пример 2. Обогащение НСР в средах с различным pH

Предыдущие исследования показали, что pH среды влияет на эффективность связывания ProteoMiner™ в различных образцах растений. Поскольку гранулы ProteoMiner™ ранее не применялись в анализе НСР, протестировали эффективность связывания терапевтических лекарственных препаратов с гранулами ProteoMiner™ в средах с различным pH. Результаты тестирования показали, что лекарственный препарат продемонстрировал предпочтительное связывание с гранулами ProteoMiner™ в щелочной среде, как приведено в Таблице 3. Число PSM (совпадение пептидного спектра) лекарственного препарата в щелочной среде было на 20% выше, чем в кислой среде. Значение PSM указывает на спектры пептидов, соответствующие белку. В щелочной среде было идентифицировано около 35 эндогенных НС (pH 9, Трис). В кислой среде было идентифицировано около 66 эндогенных БКХ были идентифицированы (pH 4, ацетат натрия).

Таблица 3. Обогащение НСР в средах с различным pH

pH среды	Количество пептидов	Общий идентификатор	Высокая достоверность	DS PSM
Вода (pH 6)	20,92	142	58	11079/4645
Ацетат натрия (pH 4)	16,64	154	66	10795/5018
Трис (pH 7,5)	29,44	102	36	12537/5297
Трис (pH 9)	36,72	101	35	12910/5431

Пример 3. Оптимизация соотношения образца и гранул ProteoMiner™

Соотношения образца и гранул ProteoMiner™ оптимизировали для проведения обогащения НСР. Каждый набор ProteoMiner™ содержал 20 мкл гранул. 20 мкл (1 набор) или 4 мкл (1/5 набора) гранул ProteoMiner™ тестировали на обогащение НСР. Соотношение образца и гранул при 10 мг mAb1 на 20 мкл гранул ProteoMiner™ и при 2 мг mAb1 на 4 мкл гранул ProteoMiner™ тестировали в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные результаты показали, что количество гранул ProteoMiner™ не влияло на эффективность обогащения, как продемонстрировано в Таблице 4. Таким

образом, 4 мкл гранул ProteoMiner™ были предпочтительными для тестирования обогащения НСР. Для достижения наилучшей чувствительности также был протестирован оптимальный объем загрузки образца. Как продемонстрировано в Таблице 5, 2 мг загружаемого образца показали чувствительность 0,5 ppm при применении образца с добавлением mAb2.

Таблица 4. Оптимизация соотношения образца и гранул ProteoMiner™ для проведения обогащения НСР

Количество гранул ProteoMiner™	Объем загрузки mAb1	Элюирующий буфер	Высокодостоверное количество белков (> 2 пептидов)
1/5 набора (4 мкл, емкость 2 мг)	2 мг	8 М мочевины в 5% уксусной кислоте	25
1 набор (20 мкл, емкость 10 мг)	10 мг	8 М мочевины в 5% уксусной кислоте	26

Таблица 5. Оптимизация количества загрузки образцов

Количество образца (mAb2+0,1-200 ppm добавленных НСР)	Элюирующий буфер	Предел обнаружения (ppm)	Количество идентифицированных добавленных НСР	Высокодостоверное количество белков (> 2 пептидов)	DS PSM	Совпадение с результатом IP (>2 пептидов)
2 мг	PTS	0,5	12	38	10582/4306	12
8 мг	PTS	0,1	13	58	9285/3842	16

Чтобы оценить оптимальное количество загрузки образца и предел обнаружения, 11 очищенных НСР из клеток CHO с различными концентрациями в диапазоне от 0,05 ppm до 0,5 ppm добавляли к различному количеству очищенного mAb2 для тестирования. Чтобы проверить систематическую ошибку предпочтения обогащения гранул ProteoMiner™, добавленные белки различали не только по концентрации, но и по размеру. Все 0,5 ppm добавленных НСР могут быть обнаружены при загрузке образца всего 4 мг. Большинство 0,1 ppm добавленных НСР можно обнаружить при загрузке образца 8 мг. Хотя большинство добавленных белков с концентрацией выше 0,1 ppm можно идентифицировать при загрузке образца 4 мг, загрузка образца 8 мг продемонстрировала лучшее покрытие большинства белков с низкими концентрациями. Когда загрузку образца дополнительно увеличили до 15 мг, предел обнаружения составил всего 0,05 ppm, как продемонстрировано в Таблицах 6 и 7. Результаты в трех повторностях приведены в Таблице 8. Когда количество загрузки увеличивали в 4 раза, с 2 мг до 8 мг, предел обнаружения увеличился до 0,1 ppm, как продемонстрировано в Таблице 9. Полученные результаты показали, что потенциальный предел обнаружения составляет 0,05 ppm при

загрузке образца 15 мг. Полученные результаты показали, что увеличение количества загружаемого образца может эффективно накапливать белки, содержащиеся в малом количестве, на гранулах ProteoMiner™, тем самым улучшая предел обнаружения. Результат тестирования также показал, что предел обнаружения гранул ProteoMiner™ в оптимальных условиях может достигать всего 0,05 ppm.

Таблица 6. Оценка оптимального количества загрузки образца

Количество образца (mAb2+0,05-0,5 ppm добавленных НСР)	Элюирующий буфер	Предел обнаружения (ppm)	Количество пептидов	Общий идентификатор	Количество идентифицированных добавленных НСР	Высокодостоверное количество белков (> 2 пептидов)	DS PSM (тяжелый/легкий)
4 мг	PTS	0,1	24,95	47	10	21	11362/ 4640
8 мг	PTS	0,1	22,5	65	11	27	11511/ 4776
15 мг	PTS	0,05	19,15	62	12	27	11777/ 4913

Таблица 7. Оценка оптимального предела обнаружения

Добавление в ppm	Название белка	Молекулярная масса	Молярная ppm	4 мг (уникальные пептиды)	8 мг (уникальные пептиды)	15 мг (уникальные пептиды)
0,5	Бета-гексозаминидаза	60,1k	1,25	5	9	11
0,5	hPLBD2	65k	1,15	5	9	8
0,5	Катепсин Z	34k	2,21	7	10	10
0,5	Ингибитор металлопротеиназы 1	22,4k	3,35	5	6	7
0,5	Транстиретин	17k	4,41	5	5	6
0,1	Карбоксипептидаза	54,2k	0,28	н/д	2	4
0,1	Катепсин D	44,1k	0,34	3	6	7
0,1	пептидилпролил-цис-трансизомераза	23,6	0,64	4	8	11
0,1	с-х-с мотив хемокин	11k	1,36	3	2	3
0,05	LAL (полудимер/мономер)	45,6k	0,11	н/д	н/д	1
0,05	Кислотная церамидаза	44,7k	0,17	2	4	12

Таблица 8. Повторы загрузки образца 15 мг.

Добавление в ppm	Название белка	Молекулярная масса	Молярная концентрация ppm	15 мг (Повтор 1)	15 мг (Повтор 2)	15 мг (Повтор 3)
0,5	Бета-гексозаминидаза	60,1k	1,25	8	10	9
0,5	hPLBD2	65k	1,15	9	9	9
0,5	Катепсин Z	34k	2,21	11	12	12
0,5	Ингибитор металлопротеиназы 1	22,4k	3,35	6	5	7
0,5	Транстиретин	17k	4,41	8	8	8
0,1	Катепсин D	44,1k	0,34	6	11	8
0,1	пептидилпролил цис- трансизомераза	23,6	0,64	8	8	9
0,1	с-х-с мотив хемокин	11k	1,36	2	3	3
0,05	LAL (полудимер/мономер)	45,6k	0,11	1	1	2
0,05	Кислотная церамидаза	44,7k	0,17	5	10	7

Таблица 9. Увеличение количества загружаемых образцов в 4 раза

Добавление	Название белка	2 мг (уникальные пептиды)	8 мг (уникальные пептиды)
200	Бета-гексозаминидаза	21	22
100	Карбоксипептидаза	28	30
50	hPLBD2	10	11
20	Катепсин Z	14	16
10	SIAE	13	15
10	Катепсин D	15	16
5	Ингибитор металлопротеиназы 1	7	8
5	пептидилпролилцис-трансизомераза	10	12
5	LAL (полудимер/мономер)	9	10
1	с-х-с мотив хемокин	3	3
1	Транстиретин	5	6
0,5	Кислотная церамидаза	10	12
0,1	Усилитель 1 эндопептидазы проколлагена С	х	2

Чтобы оценить уменьшение динамического диапазона, был выполнен анализ PRM, например, метод нацеливания MS, для расчета коэффициента обогащения HCP, полученного с помощью метода ProteoMiner™. Путем сравнения относительного содержания отдельных пептидов HCP по сравнению с пептидами антител до и после контакта с гранулами ProteoMiner™ можно рассчитать коэффициент обогащения HCP. Фиг. 2А демонстрирует изменения сигнала PRM одного пептида HCP, например, IYVASVHQDLSDDDIK, полученного из одного из известных HCP, например, фактора поли-связывания-сплайсинга PUF60. Фиг. 2В демонстрирует изменения сигнала PRM другого пептида HCP, например, TYFLKPSK, полученного из гомолога белка NipSnap 3В, который является недавно обнаруженным HCP в этом исследовании. Оба примерных пептида продемонстрировали более чем 200-кратное увеличение сигнала PRM после обработки гранулами ProteoMiner™. За счет обогащения HCP, содержащихся в малом количестве, динамический диапазон белка в образцах, обработанных ProteoMiner™, был значительно уменьшен, что привело к увеличению отношения сигнал/шум в последующем MS-анализе.

Пример 4. Оценка воспроизводимости способа

Стандарт NISTmAB применяли для оценки воспроизводимости способа обогащения HCP по настоящей заявке с применением гранул ProteoMiner™ и буфера PTS. Рабочий процесс способа обогащения HCP по настоящей заявке включал этап промывки гранул ProteoMiner™ в спин-колонке 200 мкл PBS с последующим центрифугированием при 1000 gcf в течение 30 секунд для удаления буфера и повторением того же этапа дважды. За этапом ресуспендирования гранул с 200 мкл PBS следовал перенос 40 мкл раствора суспензии гранул в пробирку. 15 мг образца в концентрации 50 мг/мл добавляли в пробирку для перемешивания с суспензией гранул при вращении в течение 2 часов при комнатной температуре. Смесь гранул и образца загружали в наконечник с фриттой с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 30 секунд. Затем супернатант удаляли из пробирки. После этого гранулы промывали 100 мкл PBS с последующим центрифугированием при 200 gcf в течение 1 минуты для удаления супернатанта. Гранулы снова промывали. Затем для элюирования белков из гранул применяли 10 мкл буфера PTS. Гранулы полностью ресуспендировали в буфере PTS с последующим центрифугированием при 200 gcf в течение 1 минуты для сбора элюента в супернатанте. Один и тот же этап повторяли дважды. Элюент нагревали при 95 °C в течение 5 минут. Затем элюент разбавляли в 5 раз буфером (100 mM Трис-HCl, pH 8,0). 1 мкг трипсина добавляли к разбавленному элюенту для расщепления в течение ночи с получением раствора, содержащего смесь пептидов. Затем к раствору смеси пептидов добавляли 10% TFA до конечной концентрации 0,1% TFA. Затем раствор смеси пептидов центрифугировали при 14000 gcf в течение 5 минут для получения осадка и супернатанта. На супернатанте проводили процесс обессоливания.

Был проведен трехкратный эксперимент с применением стандарта NISTmAb для оценки воспроизводимости способа обогащения HCP по настоящей заявке. Как

продемонстрировано на Фиг. 3А, всего за три прогона было идентифицировано 715 общих белков, что соответствует 89,4% всех белков, и 3310 общих пептидов, что соответствует 85,8% всех пептидов. Высокая воспроизводимость результатов свидетельствует о высокой достоверности идентификации белка, что имеет решающее значение для обогащения НСР. Кроме того, был проведен количественный анализ без метки для определения относительного количества каждого пептида во всех прогонах. Как продемонстрировано на Фиг. 3В, значение корреляционного анализа Пирсона было выше 0,97. Это указывало на то, что способ обогащения НСР по настоящей заявке с применением гранул ProteoMiner™ и буфера PTS был хорошо воспроизводим с небольшими вариациями.

С помощью способа ProteoMiner™ по настоящей заявке с высокой достоверностью были идентифицированы в общей сложности 527 НСР. Только 29 НСР были идентифицированы с помощью прямого расщепления. Как продемонстрировано на Фиг. 4, при сравнении способов ProteoMiner™ и ограниченного расщепления, обоими способами были идентифицированы 58 НСР. При сравнении способов ProteoMiner™ и фильтрации обоими способами были идентифицированы 140 НСР. Эти 140 НСР составляли около 84% от 166 НСР, которые были идентифицированы способом фильтрации.

Пример 5. Идентификация НСР с применением стандарта NISTmAb

Способ обогащения НСР по настоящей заявке (с использованием гранул ProteoMiner™ и буфера PTS) применяли для идентификации НСР с использованием стандарта NISTmAb, например, RM 8670. В общей сложности 527 НСР, например, белков мыши, были идентифицированы с высокой достоверностью (идентифицировано более 2 пептидов) с частотой ложноположительных результатов $\leq 0,01$, в то время как только 29 белков мыши были идентифицированы с помощью прямого расщепления, как продемонстрировано на Фиг. 4. Эти 527 белков мыши сравнивали с двумя предыдущими исследованиями, например, Doneanu et al. и Huang et al., 14 НСР и 59 НСР с высокой достоверностью были идентифицированы Doneanu et al. и Huang et al., соответственно, с применением стандарта NISTmAb (RM 8670). Как продемонстрировано на Фиг. 4, все 14 НСР, обнаруженных Doneanu et al., и 58 из 60 НСР, обнаруженных Huang et al., были идентифицированы с помощью способа обогащения НСР по настоящей заявке.

Атаксин-2, который не был обнаружен Doneanu et al. и Huang et al., действительно был обнаружен с помощью способа по настоящей заявке, но был идентифицирован только один пептид. Фосфоглицераткиназа 2 была идентифицирована с двумя пептидами в Huang et al. Фосфоглицераткиназа 1, имеющая 84% сходство последовательности с фосфоглицераткиназой 2, была идентифицирована с помощью способа по настоящей заявке с 17 уникальными пептидами. Таким образом, о 467 из 527 идентифицированных НСР мыши в стандарте NISTmAb не было сообщено Doneanu et al. and Huang et al. ранее. Среди этих 467 НСР мыши, 192 из этих 467 НСР мыши содержат более 5 уникальных пептидов, а 330 из этих 467 НСР мыши содержат больше или равно 3 уникальным пептидам.

Пример 6. Валидация идентифицированных НСР путем параллельного мониторинга реакций

Анализ параллельного мониторинга реакций (PRM) применяли для верификации идентичности НСР, которые были идентифицированы с помощью способа обогащения НСР по настоящей заявке (с применением гранул ProteoMiner™ и буфера PTS). 25 из 527 идентифицированных NISTmAb НСР были случайным образом выбраны для анализа PRM. Присутствие выбранных 25 НСР как в образцах, подвергнутых прямому расщеплению, так и в образцах, обработанных ProteoMiner™, было подтверждено путем сравнения пептидных сигналов этих НСР до и после обработки ProteoMiner™. Повышение эффективности способа ProteoMiner также было подтверждено валидацией PRM. Было обнаружено, что выбранные НСР были обогащены примерно в 13-1109 раз с помощью способа ProteoMiner™, как продемонстрировано в Таблицах 10 и 11. В таблице 10 перечислены НСР, которые были идентифицированы Doneanu et al. и Huang et al. Было измерено, что 82% выбранных НСР присутствуют в количестве выше 1 ppm в образце прямого расщепления, что согласуется с результатами Huang et al. В Таблице 11 приведены новые мишени НСР, которые были обнаружены и идентифицированы с помощью способа обогащения НСР по настоящей заявке.

Таблица 10. НСР, идентифицированные Doneanu et al. и Huang et al.

Номер доступа	Название белка	Прямое расщепление (ppm)	ProteoMiner™, обработка (ppm)	Оптимизированное обогащение (кратность)
P06745	Глюкозо-6-фосфат-изомеразы	56,66	2724,75	48,09
P08249	Малатдегидрогеназа, митохондриальная	1,97	2181,28	1109,53
P09041	Фосфоглицераткиназа 2	2,58	306,18	118,51
P40124	Белок 1, ассоциированный с аденилатциклазой	0,83	91,80	111,06
P40142	Транскетолаза	8,01	1631,28	203,62
P53996	Белок, связывающий клеточную нуклеиновую кислоту	3,28	132,11	40,28
Q3UEB3	Фактор поли(U)-связывания-сплайсинга PUF60	6,39	1341,02	209,76
Q60864	Стресс-индуцированный фосфопротеин 1	38,91	4870,95	125,20
Q6PGH2	Гомолог 2, ассоциированный с микротрубочками Юпитера	0,39	31,73	81,77
Q8BGD9	Эукариотический фактор инициации трансляции 4B	1,31	17,90	13,63
Q8BND5	Сульфгидрилоксидаза 1	4,45	205,21	46,14
Q8CGC7	Бифункциональная глутамат/пролин-тРНК лигаза	0,20	63,28	316,02

Q91YR9	Простагландинредуктаза 1	12,13	758,13	62,50
Q923D2	Флавинредуктаза (NADPH)	19,40	2372,69	122,28
Q99KN9	Клатриновый интерактор 1	77,54	2150,39	27,73
Q9CZ44	NSFL1 кофактор p47	30,46	1704,85	55,96
Q9DBP5	Киназа UMP-CMP	25,36	4039,94	159,30

Таблица 11. Выбранные новые мишени, идентифицированные методом обогащения HCP по настоящей заявке

Номер доступа	Название белка	Прямое расщепление (ppm)	ProteoMiner™, обработка (ppm)	Оптимизированное обогащение (кратность)
F6ZDS4	Нуклеопротеин TPR	1,81	283,73	156,69
P48678	Преламина-А/С	0,18	76,47	414,37
P50580	Белок, ассоциированный с пролиферацией	2,13	219,16	102,78
P56213	FAD-связанная сульфгидрилоксидаза	0,28	87,90	313,89
P62075	Митохондриальная импортная субъединица транслоказы внутренней мембраны Tim13	4,33	922,67	213,10
P97855	Белок 1, связывающий белок, активирующий Ras GTPазу	1,82	715,24	392,03
Q9CQE1	Гомолог белка NipSnap 3B	12,32	3093,73	251,12
Q9JIY5	Сериновая протеаза HTRA2, митохондриальная	3,68	366,36	99,60

Результаты показали существенно улучшенную чувствительность при применении способа ProteoMiner™ по настоящей заявке. Хотя до обработки по способу ProteoMiner™ большинство измеренных белков присутствовали на очень низком уровне, относительные концентрации тех же самых белков значительно увеличились после обработки ProteoMiner™. Чувствительность при обнаружении этих белков, содержащихся в малом количестве, была значительно улучшена, поскольку большинство HCP были обогащены более чем в 100 раз, как продемонстрировано в Таблицах 10 и 11. В частности, один выбранный HCP был обогащен более чем в 1000 раз, как продемонстрировано в Таблице 10. Способ ProteoMiner™ по настоящей заявке позволил значительно увеличить сигнал каждого HCP, чтобы уменьшить динамический диапазон концентраций белка в образце.

Пример 7. Сравнение способа фильтрации и способа ProteoMiner™

Эффективность обогащения HCP сравнивали между способом ProteoMiner™ и способом фильтрации (фильтрования) для обнаружения и идентификации HCP в образцах, содержащих антитела. 1,5 мг mAb3 и HCP диссоциировали в буфере для коктейлей SDC и SLS, после диссоциации HCP можно отделить от антител с помощью

фильтра 50K MWCO. Chen et al. Improved Host Cell Protein Analysis in Monoclonal Antibody Products through Molecular Weight Cutoff Enrichment. *Analytical Chemistry* **2020** 92 (5), 3751-3757). Количества НСР, которые были идентифицированы с помощью двух пептидов, приведены на Фиг. 5А и на Фиг 5В для способов фильтрации и ProteoMiner™ (Результат IP представляет собой объединенный результат всех различных партий mAb3 и mAb4). Результаты тестирования добавленных НСР представлены в Таблице 12. Тринадцать очищенных НСР из клеток СНО с различными концентрациями в диапазоне от 0,1 ppm до 200 ppm добавляли в образцы, содержащие очищенное mAb3, для тестирования. Как показано в Таблице 12, способ ProteoMiner™ продемонстрировал большее количество идентифицированных PSM и большее количество уникальных пептидов в целом.

Таблица 12. Сравнение способа фильтрации Filter и способа ProteoMiner™ для добавленных НСР

Добавление, конечный показатель ppm	Название белка	Молекулярная масса	Идентифицированный psm (фильтр)	Уникальные пептиды (фильтр)	Идентифицированный psm (ProteoMiner™)	Уникальные пептиды (ProteoMiner™)
200	Бета-гексозаминидаза	60,1k	64	10	116	22
100	Карбоксипептидаза	54,2k	240	25	268	30
50	hPLBD2	65k	8	3	362	11
20	Катепсин Z	34k	62	17	327	16
10	SIAE	61,4k	н/д	н/д	81	15
10	Катепсин D	44,1k	12	4	211	16
5	Ингибитор металлопротеиназы 1	22,4k	13	3	46	8
5	LAL (полудимер/монимер)	45,6k	н/д	н/д	99	10
5	пептидилпролил цис-трансизомераза	23,6k	96	11	108	12
1	с-х-с мотив хемокин	11k	31	4	26	3
1	Транстиретин	17k	34	4	36	6
0,5	Кислотная церамидаза	44,7k	н/д	н/д	52	12
0,1	Усилитель 1 эндопептидазы проколлагена С	55,2k	н/д	н/д	4	2

Пример 8. Тест на воспроизводимость

Воспроизводимость способа ProteoMiner™ по настоящей заявке для обогащения НСР тестировали с применением mAb4. 15 мг образцов, содержащих примеси mAb4 и

НСР, тестировали с применением 1/5 набора ProteoMiner™. Было проведено три повторения. Как показано в Таблице 13 и на Фиг. 6, результаты демонстрируют хорошую воспроизводимость на основании результатов совпадения с IP.

Таблица 13. Тесты на воспроизводимость способа ProteoMiner™ для обогащения НСР

	Количество образца	Количество пептидов	Общий идентификатор	Высокая достоверность (>2 пептидов)	DS PSM (тяжелый/легкий)	Совпадение с результатом IP (> 2 пепт) (всего 48 целей из IP)	Совпадение с результатом IP (включая 1 пепт) (всего 48 целей из IP)
1.	15 мг	21,7	142	73/(12)	9733 /4152	19	24
2.	15 мг	24,5	137	62/(10)	10580/4579	19	25
3.	15 мг	22,35	138	74/(9)	11264/4845	22	24

Пример 9. Сравнение способа ProteoMiner™ со способом ограниченного расщепления

Эффективность способов нативного расщепления и ProteoMiner™ для обогащения НСР тестировали и сопоставляли с применением mAb5, содержащих примеси НСР. Как продемонстрировано на Фиг. 7, с помощью способа ProteoMiner™ по настоящей заявке с высокой достоверностью были идентифицированы в общей сложности 63 НСР. С помощью способа нативного расщепления с высокой достоверностью были идентифицированы в общей сложности 25 НСР с высокой достоверностью. Как продемонстрировано на Фиг. 8, при сравнении способов ProteoMiner™ и нативного расщепления, обоими способами были идентифицированы 21 НСР. При сравнении способов ProteoMiner™ и ограниченного расщепления, обоими способами были идентифицированы 26 НСР. В таблице 14 приведены 63 НСР, которые были обнаружены в образце mAb5 с помощью способа ProteoMiner™ по настоящей заявке.

Таблица 14. НСР, обнаруженные в образце mAb5

Номер доступа	Название белка
G3I6T1	Предполагаемый белок 2, подобный фосфолипазе В
G3HХN7	Бета-гексозаминидаза
G3HLX3	Альфа-N-ацетилглюкозаминидаза
Q9JKY1	Пероксиредоксин-1
G3I4W7	Катепсин D
G3H892	Аминоацилаза-1А
G3I255	L-лактатдегидрогеназа
G3GZB2	Кислотная церамидаза
G3H533	Пептидилпролил-трансизомераза
G3IBF4	Сериновая протеаза HTRA1
G3I3N5	Субъединица С протонной АТФазы V-типа
G3I2K6	Гипокальциноподобный белок 1

Номер доступа	Название белка
G3GR64	Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H5
G3GRS9	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза
G3IBH0	Ингибитор металлопротеиназы 1
G3I3Y6	Глутатион-S-трансфераза Р
G3I1V3	Фибронектин
A0A061IFE2	Белок, подобный карбоксиэстеразе 1 печени
G3GUR1	Субкомпонент комплемента C1г-А
G3GXZ0	Белково-глутамин-гамма-глутамилтрансфераза 2
G3I8R9	Белок, регулируемый глюкозой, 78 кДа
G3HGW6	Субъединица ламинина альфа-5
G3I7U9	Сериновая протеаза HTRA2, митохондриальная
G3GVH3	Неохарактеризованный белок C17orf39
A0A061IQB8	Изоформа 2, подобная рибосомному белку L40 убиквитина-60S
G3IAQ0	Альфа-энолаза
G3IFA9	Полипептид 2 фактора элонгации транскрипции В
G3II12	Кальций-связывающий белок 39
G3I3K5	Рецептор 56, связанный с G-белком
G3I5N6	Белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста
G3HXL1	Поли(RC)-связывающий белок 1
G3HH30	Альдоза-редуктаза
Q9EPP7	Катепсин Z
Q9WV24	Бета-2 микроглобулин
A0A061HWZ7	Белок, подобный компоненту RRP46 экзосомного комплекса
A0A061II04	Белок S100
G3HI03	U4/U6 малый ядерный рибонуклеопротеин Prp4
A0A061IB69	Фруктозо-бисфосфатальдолаза
G3I5L3	Аннексин
A0A061IDC7	Белок ядерного тела Sp110
G3H935	Тирозин-тРНК лигаза
A0A061I0W7	Белок, подобный сериновой протеазе 4, специфичен для головного мозга
G3IEU2	Белок DJ-1
P22629	Стрептавидин
A0A061IMN7	Белок, подобный анионному трипсину-2
A0A061IK25	Белок-L-изоаспартат
A0A061INB9	C-X-C мотив хемокин
A0A061I4J0	Белок, подобный префолдиновой субъединице 2
G3IG05	Аннексин
A0A061II1Y4	Перилипин-4-подобный белок
A0A061IEQ5	Сфингомиелинфосфодиэстераза
A0A061IKI0	EF-HAND 2-содержащий белок
A0A061I523	Усилитель 1 эндопептидазы проколлагена С
G3HIM4	Белок, подобный белку 42, контролирующему клеточное деление
G3H2A5	Вакуолярный белок, ассоциированный с сортировкой белков 29

Номер доступа	Название белка
G3GV64	Белок 1, родственный эпендимину млекопитающих
G3HPZ5	Белок, покрывающий макрофаги
G3HD94	Десмоплакин
G3HAN8	Аденозилгомоцистеиназа
A0A061I2S4	Предполагаемый белок, подобный первому белку (фрагмент)
A0A061HYN7	Гельсолин
G3HN65	Белок-супрессор Ras 1
G3HN39	Коэффициент удлинения 1-альфа 1
G3IKC3 *	Глутатион-S-трансфераза Mu 6
G3GVW2 *	Предполагаемая гидролаза RBVP9
G3GTT2 *	С-С мотив хемокин
G3I4E8 *	Белок, связывающий жирные кислоты, адипоцит

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСР) в образце, включающий:

приведение образца в контакт с твердой подложкой,

при этом указанный образец включает по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве,

при этом взаимодействующие пептидные лиганды были присоединены к указанной твердой подложке, и

при этом указанные примеси НСР могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами;

промывание указанной твердой подложки раствором, содержащим поверхностно-активное вещество, обеспечивающим элюент;

обеспечение для указанного элюента условий ферментативного расщепления для получения компонентов выделенных примесей НСР; а также

идентификация компонентов выделенных примесей НСР с помощью масс-спектрометра.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество фазового переноса, ионогенное поверхностно-активное вещество, анионогенное поверхностно-активное вещество, катионогенное поверхностно-активное вещество или их комбинации.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия или додецилбензолсульфонат натрия.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация по меньшей мере одного пептида или белка, содержащегося в большом количестве, по меньшей мере в 1000, 10 000, 100 000 или 1 000 000 раз превышает концентрацию каждой примеси НСР.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что взаимодействующие пептидные лиганды представляют собой библиотеку комбинаторных гексапептидных лигандов.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что количество примесей НСР определяют с помощью масс-спектрометра, при этом предел обнаружения каждой примеси НСР составляет около 0,05-0,1 ppm.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве, представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат «антитело-лекарственное средство», слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фермент реакции ферментативного расщепления представляет собой трипсин.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией

наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполом, при этом масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр способен выполнять анализы LC-MS (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) или LC-MRM-MS (жидкостная хроматография-мониторинг множественных реакций-масс-спектрометрия).

11. Система идентификации примесей белка клетки-хозяина (НСП) в образце, содержащая:

твердую подложку;

взаимодействующие пептидные лиганды,

при этом указанные взаимодействующие пептидные лиганды присоединены к указанной твердой подложке, и

при этом указанные примеси НСП могут связываться с взаимодействующими пептидными лигандами;

раствор, содержащий поверхностно-активное вещество;

раствор для ферментативного расщепления, способный генерировать компоненты из указанных примесей НСП; а также

масс-спектрометр, способный идентифицировать или количественно определять указанные компоненты.

12. Система по п. 11, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество фазового переноса, ионогенное поверхностно-активное вещество, анионогенное поверхностно-активное вещество, катионогенное поверхностно-активное вещество или их комбинации.

13. Система по п. 11, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия или додецилбензолсульфонат натрия.

14. Система по п. 11, отличающаяся тем, что концентрация по меньшей мере одного пептида или белка, содержащегося в большом количестве, по меньшей мере в 1000, 10 000, 100 000 или 1 000 000 раз превышает концентрацию каждой примеси НСП.

15. Система по п. 11, отличающаяся тем, что взаимодействующие пептидные лиганды представляют собой библиотеку комбинаторных гексапептидных лигандов.

16. Система по п. 11, отличающаяся тем, что предел обнаружения каждой примеси НСП составляет около 0,05-0,1 ppm.

17. Система по п. 11, отличающаяся тем, что по меньшей мере один пептид или белок, содержащийся в большом количестве, представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат «антитело-лекарственное средство», слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

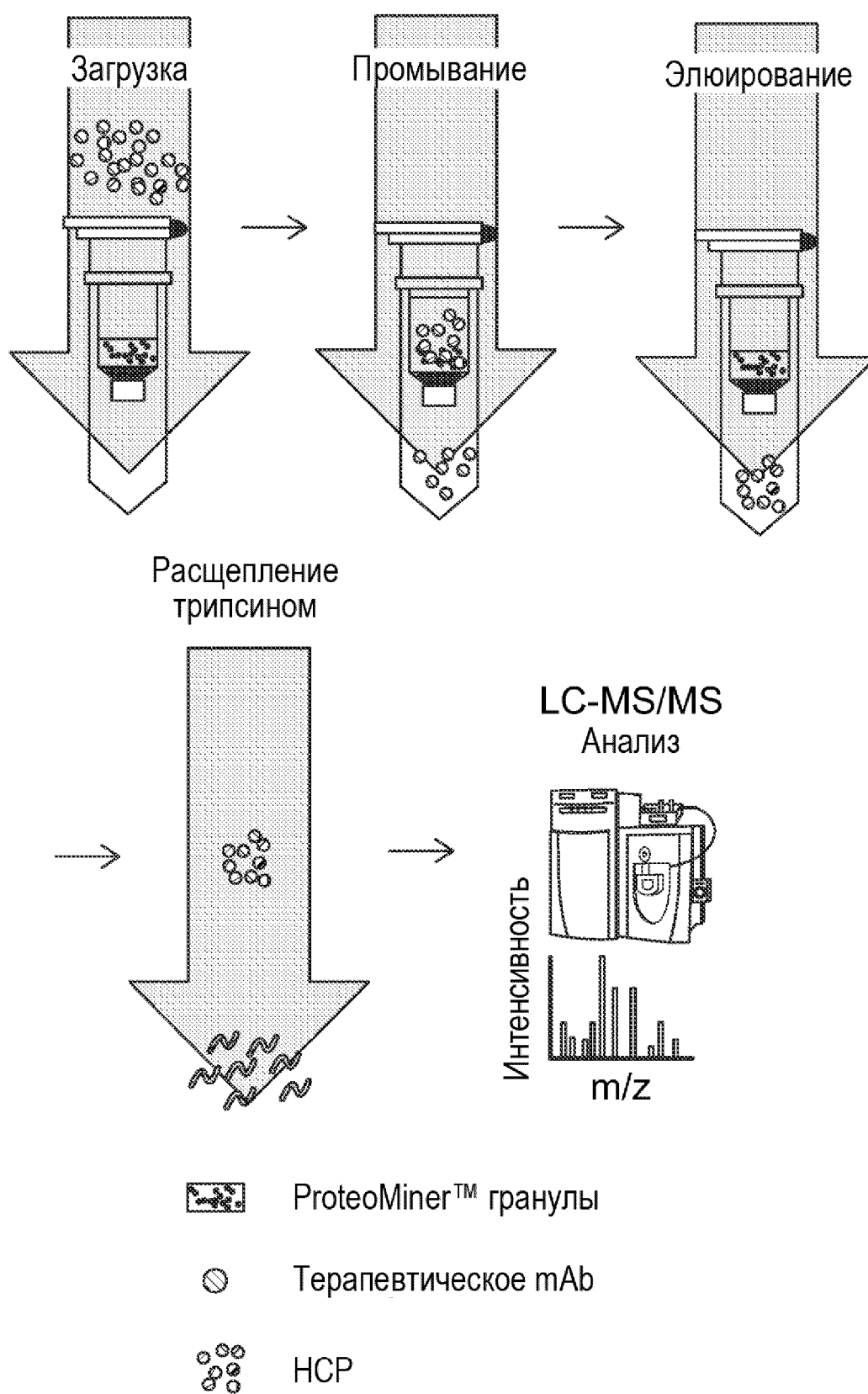
18. Система по п. 11, отличающаяся тем, что фермент раствора ферментативного расщепления представляет собой трипсин.

19. Система по п. 11, отличающаяся тем, что масс-спектрометр представляет собой

масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполом, при этом масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

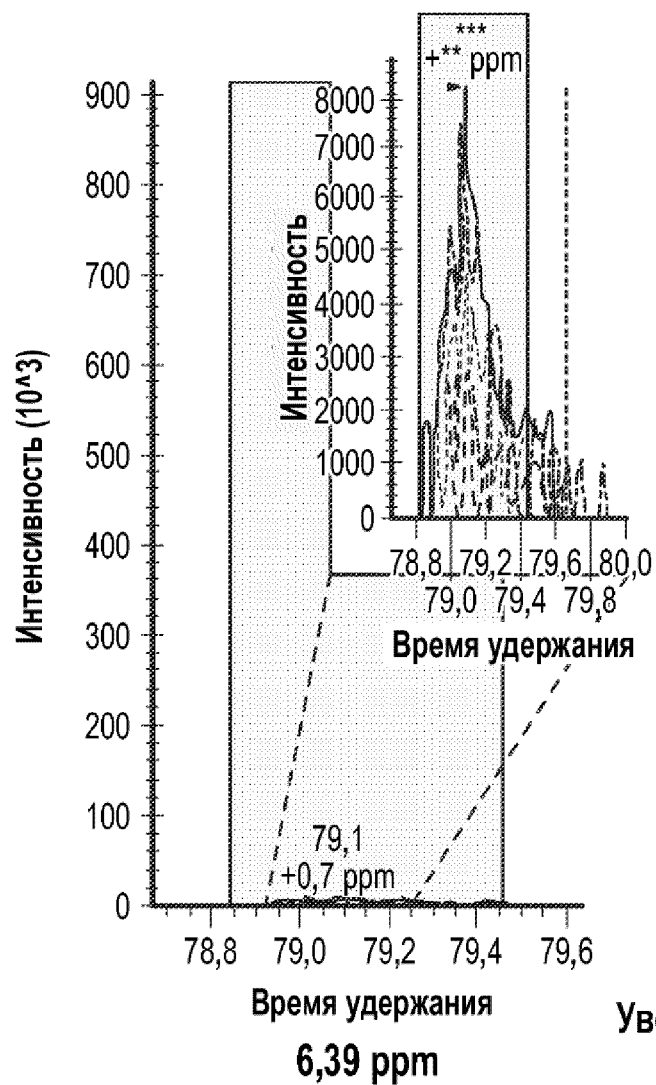
20. Система по п. 11, отличающаяся тем, что масс-спектрометр способен выполнять анализы LC-MS (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) или LC-MRM-MS (жидкостная хроматография-мониторинг множественных реакций-масс-спектрометрия).

По доверенности



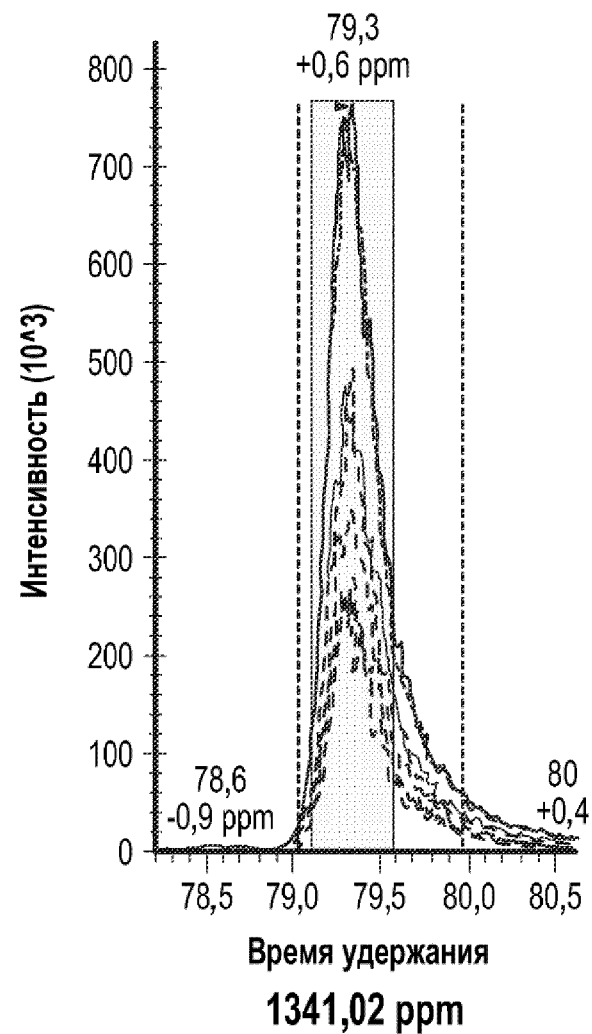
Фиг. 1

PUF60_IYVASVHQDLSDDDIK



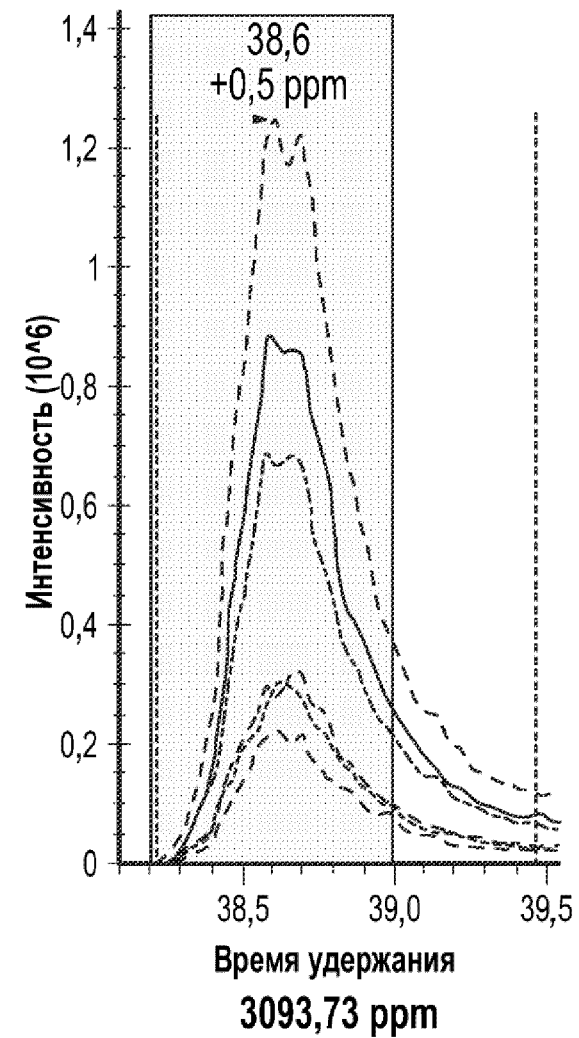
Увеличение в 209 раз

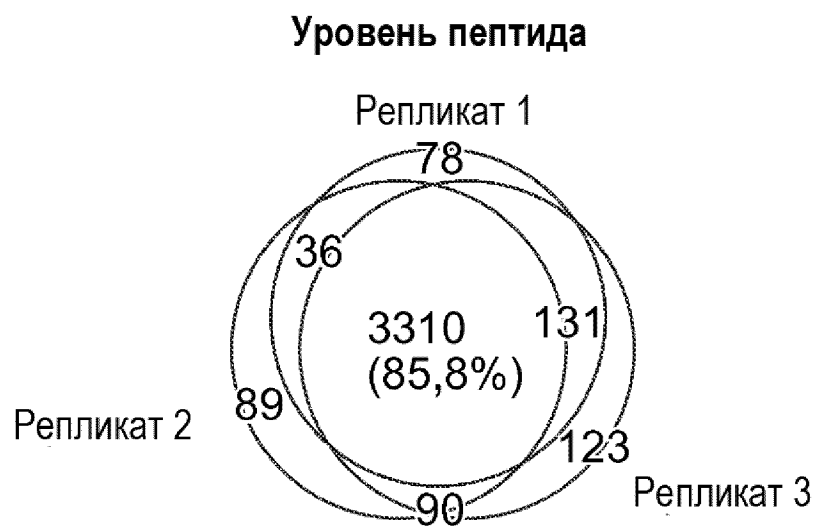
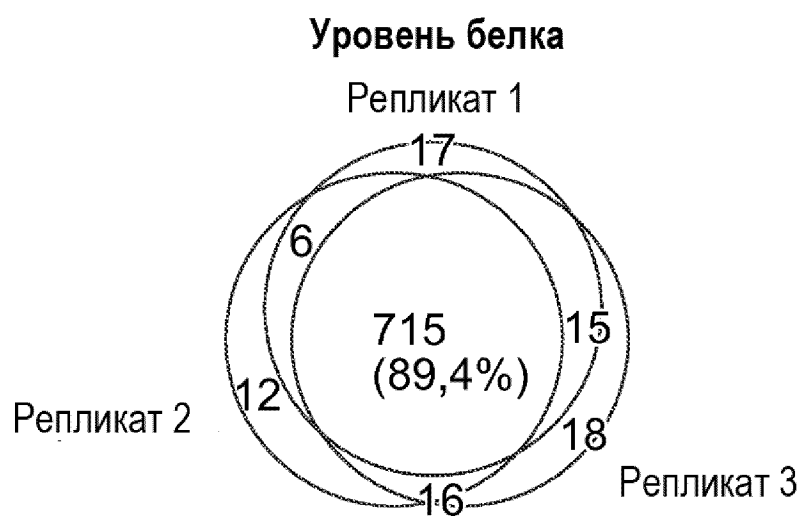
Фиг. 2А



Увеличение в 251 раз

Фиг. 2В

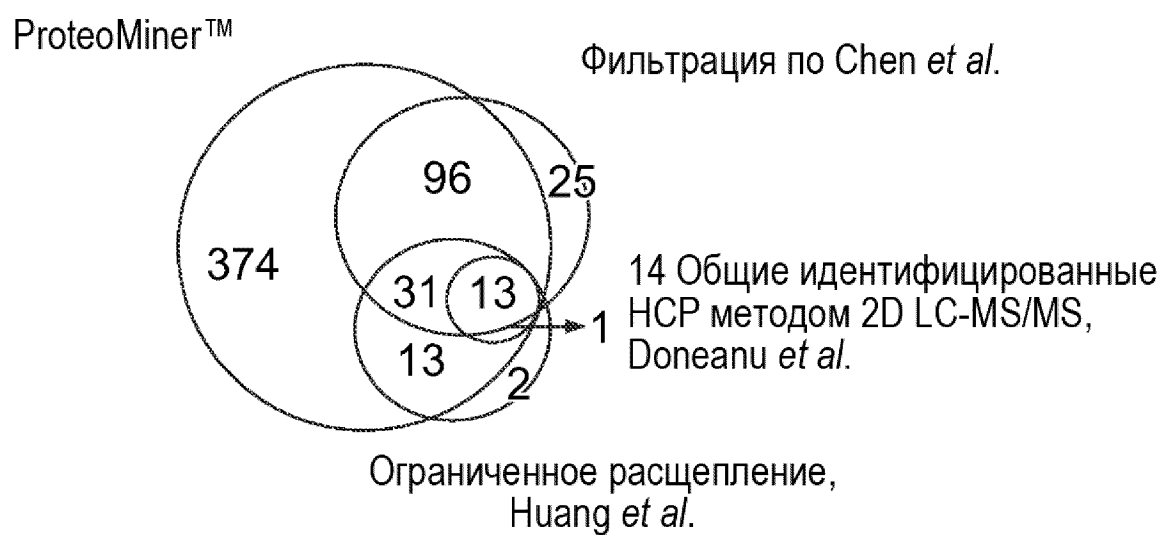
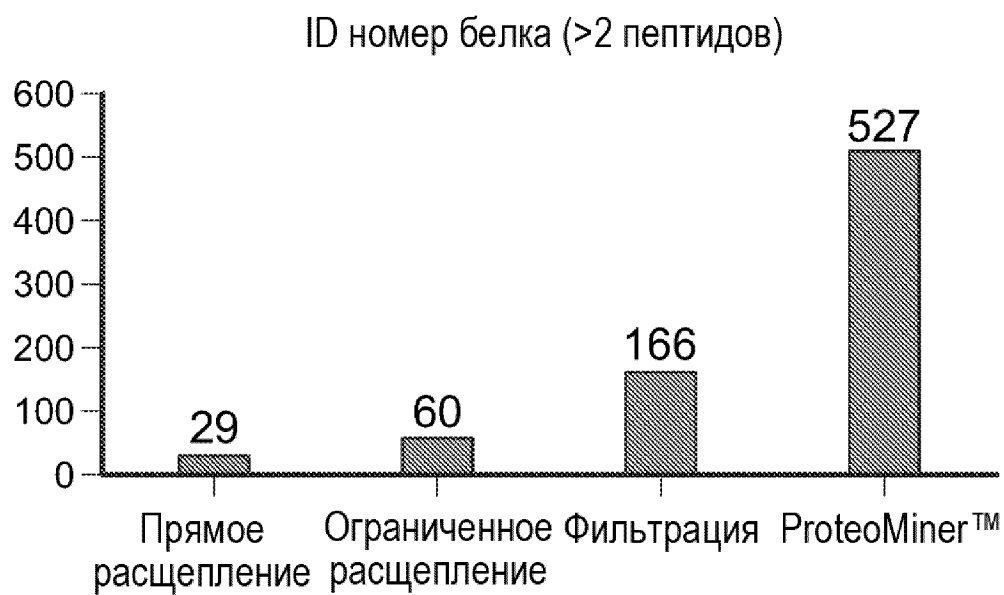




Фиг. 3А



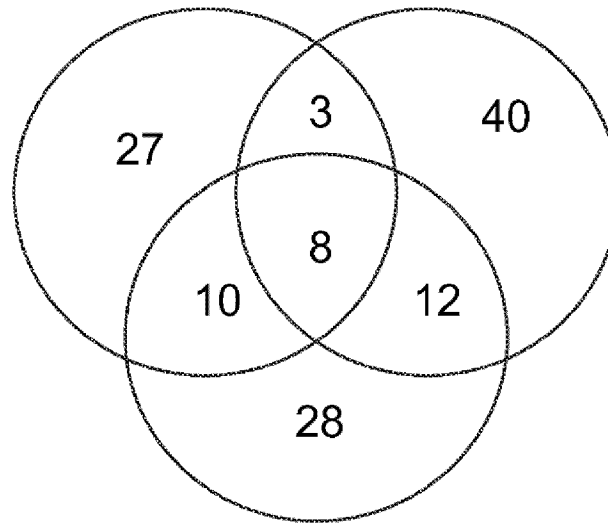
Фиг. 3В



Фиг. 4

Результат IP (все вместе)

Фильтр (>2 пептидов)

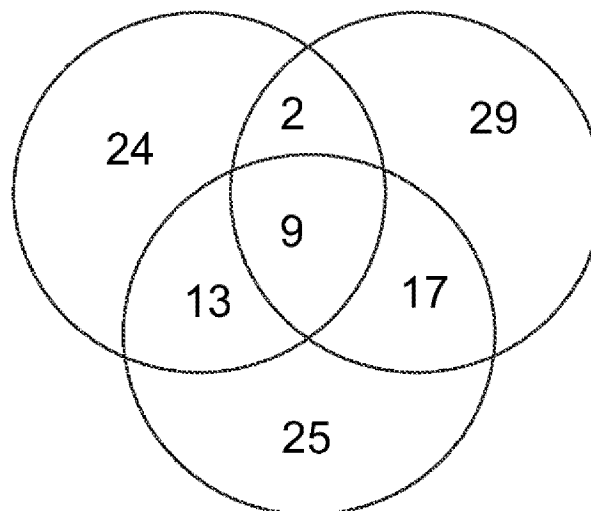


ProteoMiner™ (>2 пептидов)

Фиг. 5А

Результат IP

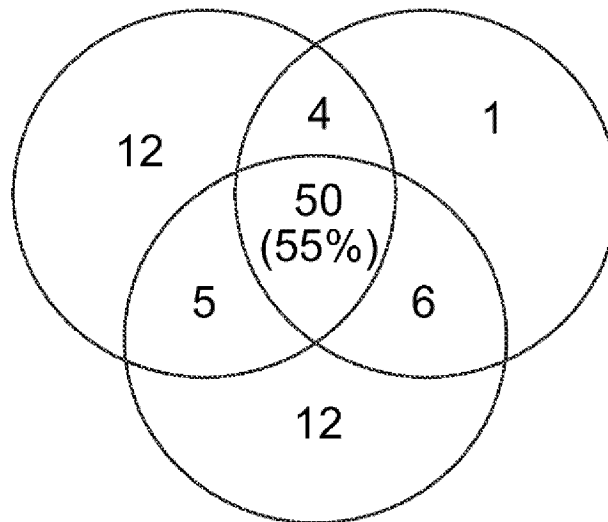
Фильтр (>2 пептидов)



ProteoMiner™ (>2 пептидов)

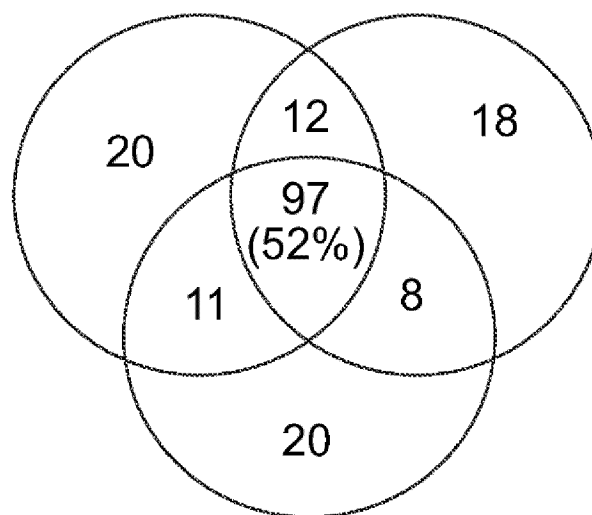
Фиг. 5В

Репликат 1 (> 2 пепт) Репликат 2 (> 2 пепт)



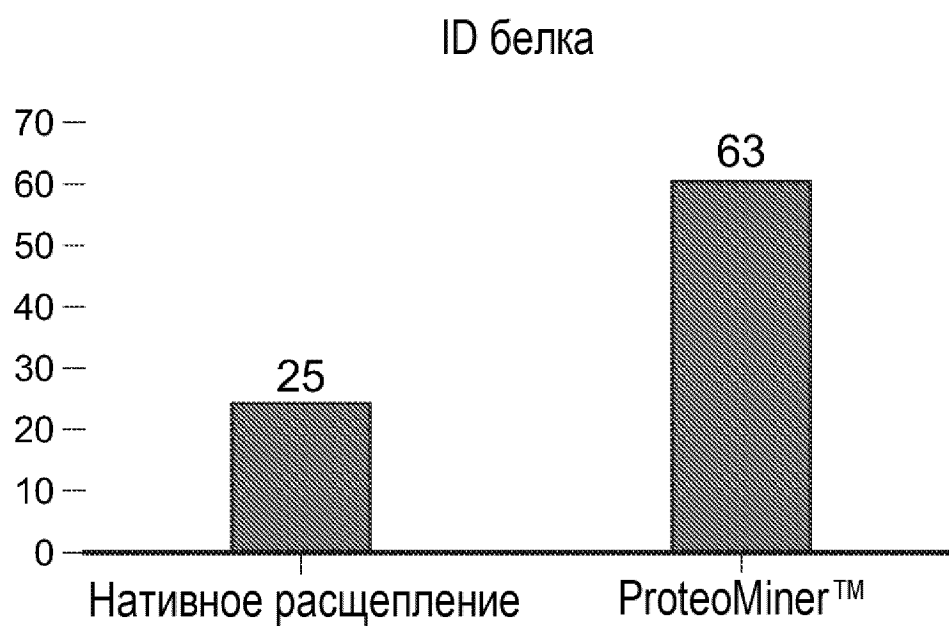
Репликат 3 (> 2 пепт)

Репликат 1 (> 1 пепт) Репликат 2 (> 1 пепт)

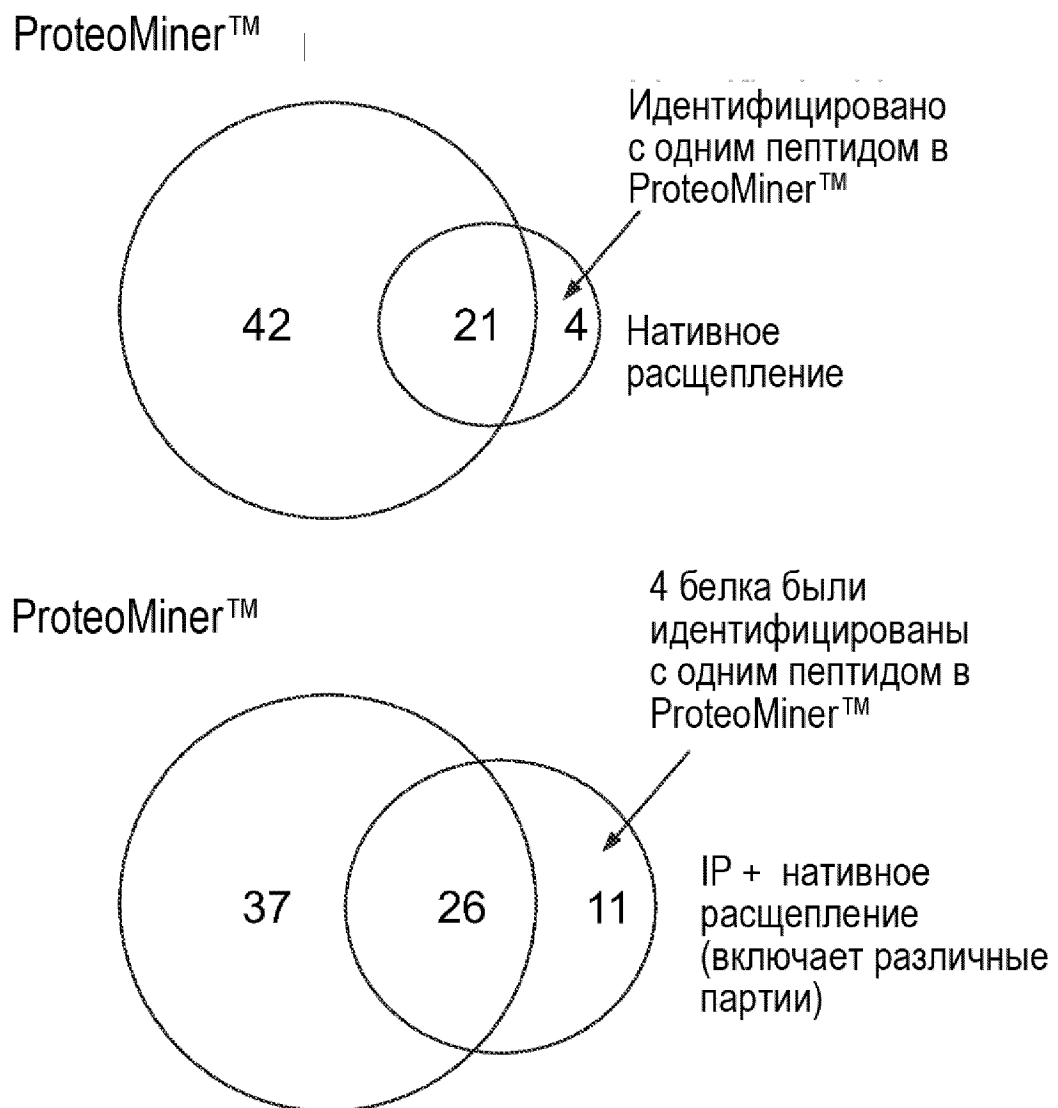


Репликат 3 (> 1 пепт)

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8