

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391812 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.04(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.12.17

(54) СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ СКРЕМБЛИРОВАННЫХ ДИСУЛЬФИДОВ В БИОМОЛЕКУЛАХ

(31) 63/128,146

(32) 2020.12.20

(33) US

(86) PCT/US2021/064116

(87) WO 2022/133262 2022.06.23

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

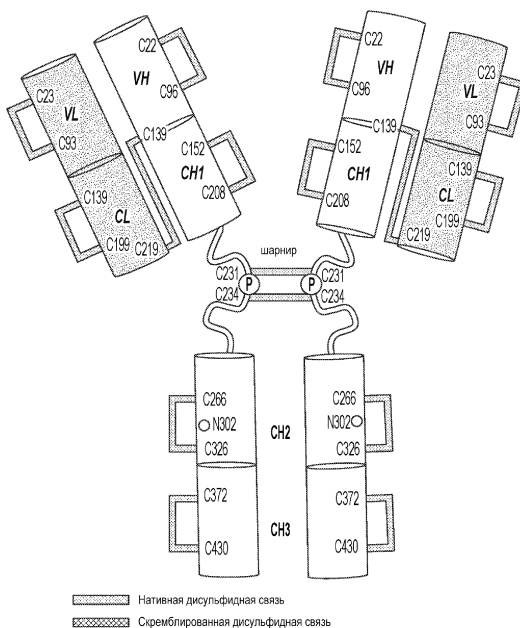
(72) Изобретатель:

Клейнберг Эндрю, Мао Юань (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны способы идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле (например, антителе). В примере способ включает в себя выполнение расщепления биомолекулы в невозстанавливающих условиях с получением образца, содержащего множество фрагментов биомолекулы, приведение образца в контакт с разделительной колонкой, нанесение первого градиента подвижной фазы, содержащего трифторуксусную кислоту (TFA) и низкомолекулярную добавку, на разделительную колонку, нанесение второго градиента подвижной фазы, содержащего TFA в ацетонитриле (ACN) и низкомолекулярную добавку, на разделительную колонку, выполнение процедуры частичного восстановления на элюированном образце, нанесение частично восстановленных элюированных компонентов образца на масс-спектрометр и выполнение масс-спектрометрического анализа частично восстановленных элюированных компонентов образца для идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле.



Нативная дисульфидная связь
Скремблированная дисульфидная связь

A1

202391812

202391812

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578419EA/042

СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ СКРЕМБЛИРОВАННЫХ ДИСУЛЬФИДОВ В БИОМОЛЕКУЛАХ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] В настоящую заявку путем ссылки включен перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10870WO01-Sequence, созданного 17 декабря 2021 г. и содержащего 12 466 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Варианты осуществления, описанные в настоящем документе, относятся к масс-спектральным анализам, а более конкретно к способам совершенствования возможности применения масс-спектрального анализа для выявления малочисленных скремблированных дисульфидов в биомолекулах.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Дисульфидные связи присутствуют в большом количестве белков (почти трети) эукариотического протеома. Образование дисульфидных связей предполагает реакцию между сульфгидрильными (SH) боковыми цепями двух цистеиновых остатков. Образование нативной дисульфидной связи стабилизирует белки, и дисульфидные связи важны для обеспечения эффективной функциональности белка.

[0004] Терапевтические моноклональные антитела могут связываться с конкретными эпитопами на рецепторах клеточной поверхности или других биологических мишенях, и эффективность и стабильность таких терапевтических антител зависит от надлежащего образования нативных дисульфидных связей. Альтернативно образование ненативных (например, скремблированных) дисульфидных связей в белках, включая, без ограничений, терапевтические моноклональные антитела, может приводить к дестабилизации, неправильному свертыванию, образованию агрегатов и неспособности конкретного белка к эффективному функционированию. Таким образом, большое значение имеет оценка присутствия скремблированных дисульфидов в белках, например терапевтических антителах. Актуальные проблемы с определением присутствия скремблирования дисульфидов в белках включают в себя малое количество и, следовательно, сложность обнаружения скремблирования дисульфидов при использовании таких методик, как масс-спектральные анализы. В настоящем документе описаны способы совершенствования возможности применения масс-спектрального анализа для выявления малочисленных скремблированных дисульфидов в биомолекулах, таких как терапевтические моноклональные антитела.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле. Способ включает в себя осуществление расщепления биомолекулы в невозстанавливающих условиях с получением образца, который включает в себя

множество фрагментов биомолекулы; приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с подложкой колонки; нанесение первого градиента подвижной фазы на разделительную колонку, причем первый градиент подвижной фазы содержит трифторуксусную кислоту (TFA) и низкомолекулярную добавку в концентрации примерно 1-2 мМ; нанесение второго градиента подвижной фазы на разделительную колонку, при этом второй градиент подвижной фазы содержит TFA в ацетонитриле (ACN) и низкомолекулярную добавку в концентрации примерно 1-2 мМ; выполнение процедуры частичного восстановления посредством обработки элюированных компонентов образца трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР) в концентрации 10-100 мкМ; введение частично восстановленных элюированных компонентов образца в масс-спектрометр и проведение масс-спектрометрического анализа частично восстановленных элюированных компонентов образца для идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле.

[0006] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин.

[0007] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет примерно 1 мМ.

[0008] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет примерно 2 мМ.

[0009] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет примерно 1 мМ.

[0010] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет примерно 2 мМ.

[0011] В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка в одной или более из первой подвижной фазы и второй подвижной фазы выбрана из аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина.

[0012] В некоторых вариантах осуществления концентрация TFA в первой подвижной фазе составляет от примерно 0,05% до 0,1% TFA в H₂O.

[0013] В некоторых вариантах осуществления концентрация TFA во второй подвижной фазе составляет примерно 0,05% TFA в 80% ACN и 20% H₂O или примерно 0,1% TFA в 80% ACN и 20% H₂O.

[0014] В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой моноклональное антитело с изотипом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или со смешанным изотипом.

[0015] В некоторых вариантах осуществления биомолекула получена рекомбинантным способом.

[0016] В некоторых вариантах осуществления процедуру частичного восстановления проводят в течение 500 мс-3 с.

[0017] В некоторых вариантах осуществления осуществление расщепления биомолекулы включает в себя проведение стадии денатурации и алкилирования с получением денатурированной алкилированной биомолекулы, проведение стадии предварительного расщепления денатурированной алкилированной биомолекулы с получением предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы и проведение стадии расщепления предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы после стадии предварительного расщепления с получением образца, который приводят в контакт с разделительной колонкой.

[0018] В некоторых вариантах осуществления стадия денатурации и алкилирования включает в себя денатурирование биомолекулы в 7-9 М растворе мочевины в присутствии алкилирующего агента при pH примерно 5,5-5,9. В некоторых случаях стадию денатурации и алкилирования проводят при температуре 45-55 °C. В некоторых случаях алкилирующий агент представляет собой N-этилmaleимид (NEM) в концентрации 5-15 mM. В некоторых случаях алкилирующий агент представляет собой йодацетамид (IAM) в концентрации примерно 0,5-5 mM. В некоторых случаях способ включает в себя проведение стадии денатурации и алкилирования в течение 20-40 минут.

[0019] В некоторых вариантах осуществления стадия предварительного расщепления включает в себя инкубирование денатурированной алкилированной биомолекулы в присутствии рекомбинантной протеазы Lys-C при pH 5-5,6. В некоторых случаях стадию предварительного расщепления проводят при температуре 35-40 °C. В некоторых случаях стадию предварительного расщепления проводят в течение периода от 30 минут до 90 минут. В некоторых случаях отношение рекомбинантной протеазы Lys-C к денатурированной алкилированной биомолекуле составляет от 1 : 5 до 1 : 20 соответственно.

[0020] В некоторых вариантах осуществления проведение стадии расщепления включает в себя инкубирование предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы в присутствии рекомбинантной протеазы Lys-C и протеазы трипсина при pH 5-5,6. В некоторых случаях отношение рекомбинантной протеазы Lys-C к предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекуле во время стадии расщепления составляет от 1 : 5 до 1 : 20 соответственно. В некоторых случаях отношение протеазы трипсина к предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекуле составляет от примерно 1 : 2 до примерно 1 : 10 соответственно. В некоторых случаях стадию расщепления проводят при температуре 35-40 °C. В некоторых случаях стадию расщепления проводят в течение 2-4 часов.

[0021] В некоторых вариантах осуществления частично восстановленные элюированные компоненты образца включают в себя один или более дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров. В некоторых случаях каждый из одного или более дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров поступают в масс-спектрометр одновременно. В некоторых случаях масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр, и выполнение масс-спектрометрического анализа включает в себя получение спектров MS1 и спектров MS2. В некоторых случаях составляют перечень включений для мониторинга параллельных реакций (PRM) с соответствующими восстановленными пептидами-партнерами. В некоторых случаях одному или более дисульфидным пептидам присваивают показатель достоверности идентификации на основе системы оценки достоверности.

[0022] В некоторых вариантах осуществления система оценки достоверности включает в себя стадии указания того, идентифицирована ли масса MS1 дисульфидного пептида посредством масс-спектрометрического анализа; указания того, идентифицирована ли масса MS1 первого восстановленного пептида-партнера, соответствующего дисульфидному пептиду, посредством масс-спектрометрического анализа; указания того, идентифицирована ли масса MS1 второго восстановленного пептида-партнера, соответствующего дисульфидному пептиду, посредством масс-спектрометрического анализа; указания того, идентифицирована ли масса MS2 первого восстановленного пептида-партнера с оценкой, которая выше заданного порогового значения; и/или указания того, идентифицирована ли масса MS2 второго восстановленного пептида-партнера с оценкой, которая выше заданного порогового значения; для каждой из стадий указания в системе оценки достоверности - присвоение одного балла, если соответствующий пептид идентифицирован, и нуля баллов, если соответствующий пептид не идентифицирован; суммирование единичных баллов; и назначение оценки достоверности идентификации дисульфида на основе суммы, причем чем больше сумма, тем выше достоверность.

[0023] В некоторых вариантах осуществления выполнение масс-спектрометрического анализа включает в себя определение процентной доли скремблирования дисульфидов для каждой из одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле. В примерах процентная доля скремблирования дисульфидов представляет собой отношение средней площади пика пептида, который включает в себя ненативную дисульфидную связь, к сумме средней площади пика пептида, который включает в себя ненативную дисульфидную связь, и средней площади другого пика двух пептидов, которые включают в себя нативные дисульфидные связи, соответствующие остаткам цистеина, участвующим в образовании ненативной дисульфидной связи.

[0024] В некоторых вариантах осуществления концентрация TCEP составляет от 20 мкМ до 80 мкМ.

[0025] В некоторых вариантах осуществления концентрация TCEP составляет

примерно 40 мкМ.

[0026] В различных вариантах осуществления любые из признаков или компонентов вариантов осуществления, описанных выше или в настоящем документе, можно комбинировать, и такие комбинации находятся в пределах объема настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в настоящем документе, может быть комбинировано с другим взаимосвязанным значением, обсуждаемым выше или далее в настоящем документе, для определения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны и все значения, входящие в такие диапазоны, включены в объем настоящего изобретения. Каждое из значений, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, может быть указано с отклонением в 1%, 5%, 10% или 20%. Например, концентрация 10 мМ может быть указана как $10 \text{ мМ} \pm 0,1 \text{ мМ}$ (отклонение в 1%), $10 \text{ мМ} \pm 0,5 \text{ мМ}$ (отклонение в 5%), $10 \text{ мМ} \pm 1 \text{ мМ}$ (отклонение в 10%) или $10 \text{ мМ} \pm 2 \text{ мМ}$ (отклонение в 20%). Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] Варианты осуществления будут понятны на основании представленного ниже подробного описания в сочетании с прилагаемыми графическими материалами и прилагаемой формулой изобретения. Варианты осуществления, представленные в настоящем документе, показаны на прилагаемых чертежах в качестве примера, а не в качестве ограничения.

[0028] На **ФИГ. 1А** представлен иллюстративный пример нативных дисульфидных связей и ненативных дисульфидных связей в биомолекуле (например, терапевтическом моноклональном антителе).

[0029] На **ФИГ. 1В** представлен иллюстративный пример схемы того, как происходит скремблирование дисульфидов в биомолекуле.

[0030] На **ФИГ. 2** представлен полный ионный ток (TIC) и экстракционная ионная хроматограмма (EIC) для дисульфида, образованного из GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и TYTCNVDHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), при анализе посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) и tandemного масс-спектрометрического анализа, иллюстрирующие возможность обнаружения пептидных фрагментов, соответствующих GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), но не TYTCNVDHKPSNTK (SEQ ID NO: 2).

[0031] На **ФИГ. 3** представлен иллюстративный анализ ЖХ-МС расщепленного трипсином моноклонального антитела (мАт), обработанного различными концентрациями трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР). мАт расщепляли трипсином в невозстанавливающих условиях для сохранения дисульфидных соединений после разделения посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на скорости потока 50 мкл/мин (0,02% TFA и 0,08% FA). После разделения элюенты колонки обрабатывали различными концентрациями ТСЕР (0 мМ, 0,4 мМ, 0,8 мМ, 2 мМ и 4 мМ) и

NH_4OH (конечная концентрация 0,12%), после чего анализировали посредством масс-спектрометрии. ТСЕР и NH_4OH добавляли к элюенту с применением Т-образного смесителя на скорости потока 2 мкл/мин. Данные представлены в виде зависимости величин от отношения массы к заряду (m/z). Показан дисульфидный и соответствующие восстановленные пептиды (R1 и R2) при различных концентрациях ТСЕР.

[0032] На **ФИГ. 4** представлен график, демонстрирующий сигнал МС пептидного фрагмента VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 3), соответствующего мАт1, в зависимости от концентрации ТСЕР, NH_4OH и глицина. Представлены пять вариантов условий, включая контроль (без ТСЕР, без NH_4OH , без глицина), образец 1 (2 мМ ТСЕР, 0,12% NH_4OH), образец 2 (2 мМ ТСЕР, 0,12% NH_4OH , 2 мМ глицина), образец 3 (2 мМ ТСЕР, 2 мМ глицина, без NH_4OH) и образец 4 (только 2 мМ глицина). По сравнению с контролем 2 мМ ТСЕР в присутствии 0,12% NH_4OH вызывает снижение сигнала МС (образец 1). Включение 2 мМ глицина в образцы, содержащие 2 мМ ТСЕР и 0,12% NH_4OH , обеспечивает незначительное улучшение (образец 2) по сравнению с образцом 1. 2 мМ ТСЕР и 2 мМ глицина в отсутствие NH_4OH (образец 3) аналогичным образом обеспечивает лишь незначительное улучшение по сравнению с условиями образца 1 и образца 2. Образцы, содержащие только 2 мМ глицина (образец 4), демонстрируют приблизительно 10-кратное усиление сигнала по сравнению с образцами, содержащими ТСЕР и глицин. Для каждого из образцов, представленных на **ФИГ. 4**, условия включали мАт1 в загрузочном количестве 0,1 мкг с 0,05% TFA в подвижной фазе.

[0033] На **ФИГ. 5А и 5В** представлен сигнал МС двух пептидных фрагментов VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 3) (**ФИГ. 5А**) и DTLMISR (SEQ ID NO: 4) (**ФИГ. 5В**), соответствующих мАт1, в зависимости от концентрации ТСЕР. Условия для образцов включали в себя мАт1 в загрузочном количестве 0,1 мкг, 0,05% TFA и 2 мМ глицина с обработкой различными концентрациями ТСЕР (0 мМ, 20 мМ, 40 мМ, 80 мМ, 200 мМ, 400 мМ, 800 мМ и 2000 мМ). Как представлено, сигнал МС уменьшается с увеличением концентраций ТСЕР.

[0034] На **ФИГ. 6А и 6В** представлен сигнал МС пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт1 трипсином в присутствии различных концентраций ТСЕР. На **ФИГ. 6А** представлен сигнал МС для дисульфида, соответствующего пептидам NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 5) и WQQGNVFSCSVMNEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 6), а на **ФИГ. 6В** представлен сигнал МС для соответствующих индивидуальных восстановленных пептидов. Условия для образцов включали в себя мАт1 в загрузочном количестве 1 мкг, 0,05% TFA и 2 мМ глицина, обработанные указанными концентрациями ТСЕР.

[0035] На **ФИГ. 7А и 7В** представлено относительное количество пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином без восстановления ТСЕР (**ФИГ. 7А**) и после частичного восстановления ТСЕР при 40 мМ (**ФИГ. 7В**). Для каждого из **ФИГ. 7А-7В** восстановленные пептиды соответствуют GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), которые в невосстановленной форме содержат

дисульфидный пептид. Элюент ВЭЖХ смешивали с 40 мкМ ТСЕР для индукции частичного восстановления дисульфидов, а также добавляли 2 мМ глицина для усиления сигнала МС в 10-20 раз по сравнению с образцами, не содержащими глицин. Методика частичного восстановления после элюирования приводит к тому, что дисульфидные пептиды попадают в масс-спектрометр одновременно с восстановленными пептидами-партнерами.

[0036] На **ФИГ. 8А, 8В, 8С, 8D, 8Е, 8F и 8G** представлено относительное количество пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином, иллюстрирующая сигнал МС дисульфидных пептидов и восстановленных пептидов-партнеров в зависимости от содержания низкомолекулярной добавки (например, глицина) и/или агентов для образования ионной пары (например, TFA или FA) в подвижной фазе. Для каждого из **ФИГ. 8А-8Е** восстановленные пептиды-партнеры соответствуют GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), которые в невосстановленной форме содержат дисульфидный пептид. Для каждого из **ФИГ. 8F-8G** восстановленные пептиды-партнеры соответствуют GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), которые в невосстановленной форме содержат дисульфид. Условия для образцов для каждого из **ФИГ. 8А-8G** включали в себя 5 мкг расщепленного мАт2 и 40 мкМ ТСЕР, где на **ФИГ. 8А** представлена 0,05% TFA без глицина, на **ФИГ. 8В** представлены 2 мМ глицина и 0,05% TFA, на **ФИГ. 8С** представлена 0,1% FA без глицина, на **ФИГ. 8D** представлена 0,1% FA без глицина, на **ФИГ. 8Е** представлены 2 мМ глицина и 0,1% FA, на **ФИГ. 8F** представлена 0,1% FA без глицина, а на **ФИГ. 8G** представлены 2 мМ глицина и 0,1% FA.

[0037] На **ФИГ. 9А и 9В** представлен сигнал МС для пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином. На **ФИГ. 9А-9В** показаны восстановленные пептиды-партнеры GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), которые в невосстановленной форме содержат дисульфидный пептид. Условия, представленные на каждом из **ФИГ. 9А-9В**, включают в себя следующие: 40 мкМ ТСЕР, 2 мМ глицина и 0,05% TFA; 2000 мкМ ТСЕР, 0,12% NH₄OH и 0,05% TFA; и 2000 мкМ ТСЕР, 0,12% NH₄OH и 0,1% FA. На **ФИГ. 9В** представлены те же данные, что и на **ФИГ. 9А**, с увеличением оси у для иллюстрации улучшения сигнала МС с 40 мкМ ТСЕР и 2 мМ глицина. Загрузочное количество мАт2 для каждого из **ФИГ. 9А-9В** составляло 5 мкг.

[0038] На **ФИГ. 10А и 10В** представлен сигнал МС для пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином. На **ФИГ. 10А-10В** представлены данные, соответствующие восстановленным пептидам-партнерам GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), обозначен как R1, и TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), обозначен как R2, которые в невосстановленной форме содержат, как показано, дисульфидный пептид. На **ФИГ. 10А** представлено относительное количество дисульфида и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров. На **ФИГ. 10В** представлено значение m/z для второй стадии масс-спектрометрии (MS2), в которой ионы из первой стадии (MS1)

избирательно фрагментируют для создания спектров MS2. Для ФИГ. 10А-10В условия для образцов включали в себя мАт2 в загрузочном количестве 5 мкг, 40 мкМ ТСЕР, 2 мМ глицина и 0,05% TFA.

[0039] На **ФИГ. 10С** представлен пример мАт, которое содержит 16 уникальных цистеиновых остатков.

[0040] На **ФИГ. 11** представлены спектры МС/МС дисульфида и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7). Пептидные фрагменты получали посредством расщепления мАт2 трипсином. Данные, представленные на **ФИГ. 11**, иллюстрируют, что спектры МС/МС дисульфидов имеют большую степень сложности по сравнению с соответствующими восстановленными пептидами-партнерами и что выполнение после прохождения через колонку частичного восстановления с 40 мкМ ТСЕР обеспечивает более простое определение характеристик любых обнаруживаемых скремблированных дисульфидов.

[0041] На **ФИГ. 12** представлены цистеинсодержащие пептиды, полученные посредством расщепления мАт2 трипсином. Для справки показан номер остатка цистеина и указание на то, где находится цистеин, - на тяжелой (H) или на легкой (L) цепи мАт2. К триптическим пептидам относятся LSCAGSGFTFR (SEQ ID NO: 8), AEDTAVYYCAK (SEQ ID NO: 9), GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), TYTCNVDHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10), CK, NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 37), WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 11), DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR (SEQ ID NO: 12), VEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTK (SEQ ID NO: 13), SGTASVVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 14), VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 15) и SFNRGEC (SEQ ID NO: 16).

[0042] На **ФИГ. 13** представлены все возможные скремблированные дисульфидные соединения из мАт2, за исключением пептида шарнирной области YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO: 46). Пептиды шарнирной области исключены из-за того, что такие пептиды содержат более одного цистеина (например, 2), образуя таким образом более одной дисульфидной связи, и, следовательно, можно ожидать, что скремблированная версия этого пептида будет очень большой и сложной. Тандемную масс-спектрометрию (МС/МС) с применением нацеленного подхода MS2, описанного в настоящем документе, применяли для идентификации скремблированных дисульфидных соединений. 5 мкг расщепленного трипсином мАт2 разделяли и частично восстанавливали с применением 40 мкМ ТСЕР. Для усиления сигнала МС применяли 2 мМ глицина. Каждое дисульфидное соединение кодировали в соответствии с уровнем достоверности определения (не обнаружен, низкая достоверность, средняя достоверность, высокая достоверность, сверхвысокая достоверность). 71,6% всех возможных скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с высокой или сверхвысокой достоверностью, 17% всех возможных скремблированных дисульфидных

соединений были идентифицированы со средней достоверностью, а 11,3% всех возможных скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с низкой достоверностью.

[0043] На **ФИГ. 14А, 14В и 14С** представлены различные протоколы расщепления трипсином, применяемые для образования пептидных фрагментов, содержащих дисульфидные пептиды и соответствующие восстановленные пептиды-партнеры для мАт2. Показаны три разных протокола, включая стандартную рабочую процедуру (SOP) для мАт2 (ФИГ. 14А), SOP для мАт3 (ФИГ. 14В) и применение набора для расщепления при низком pH (ФИГ. 14С). Следует отметить, что для формирования данных, представленных на ФИГ. 13, применяли SOP для мАт2.

[0044] На **ФИГ. 15А и 15В** представлены алкилирующие агенты йодацетамид (IAM) и N-этилмалеимид (NEM), применяемые в процедурах, представленных на ФИГ. 14, для мечения свободных цистеиновых остатков перед расщеплением трипсином.

[0045] На **ФИГ. 16** представлено наложение УФ-хроматограмм, соответствующих расщеплению мАт2 трипсином с применением каждой из процедур расщепления, иллюстративно представленных на ФИГ. 14А-14С, в частности SOP для мАт2, SOP для мАт3 и набор для расщепления при низком pH. Прогоны образцов для получения хроматограммы включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт2 (или трипсином вместе с устойчивой к низкому pH рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком pH) в присутствии 2 mM глицина.

[0046] На **ФИГ. 17А и 17В** представлены выбранные временные окна, соответствующие наложению УФ-хроматограмм, показанных на ФИГ. 16. На ФИГ. 17А представлено временное окно от примерно 14 минут до 30 минут, а на ФИГ. 17В представлено временное окно от примерно 34 минут до 49 минут.

[0047] На **ФИГ. 18** представлен график, представляющий сигнал MS для различных нативных дисульфидов, соответствующих мАт2, полученных при каждой из трех разных процедур расщепления, иллюстративно представленных на ФИГ. 14А-14С. К нативным дисульфидам относятся C152H-C208H, C139H-C219L, C139H-C219L (пропуск, связывается с неверным расщеплением), C22H-C96H, C372H-C430H, C266H-C326H, C139L-C199L, C23L-C93L, C231H-C231H и C234H3-C234H. Для каждого дисульфида условия, слева направо, включают в себя SOP для мАт2, SOP для мАт3 и процедуру с набором для расщепления при низком pH. Данные, представленные в виде сигнала MS, включают в себя все изотопные пики всех основных состояний заряда. Прогоны образцов для формирования данных на ФИГ. 18 включают в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт2 (или трипсином вместе с устойчивой к низкому pH рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком pH) в присутствии 2 mM глицина.

[0048] На **ФИГ. 19А, 19В, 19С и 19D** представлены площади пиков пептидов из различных доменов мАт (например, VH/VL, CH1, CL, CH2, CH3) гидролизатов мАт2. Было показано, что для каждого домена пептиды были получены с использованием SOP для мАт2, SOP для мАт3 или набора для расщепления при низком pH, иллюстративно

представленных на ФИГ. 14А-14С. На ФИГ. 19А представлен домен VH/VL, на ФИГ. 19В показан домен CH1/CL, на ФИГ. 19С представлен домен CH2, а на ФИГ. 19D представлен домен CH3. ФИГ. 19А включает в себя (вверху) пептид DYAMTWVR (SEQ ID NO: 17) и включает в себя (внизу) пептид SGQSPQLLIYLGSR (SEQ ID NO: 18). ФИГ. 19В включает в себя (вверху) пептид DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK (SEQ ID NO: 19) и включает в себя (внизу) пептид ADYEK (SEQ ID NO: 20). ФИГ. 19С включает в себя (вверху) пептид DTLMISR (SEQ ID NO: 39) и (внизу) VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 38). ФИГ. 19D включает в себя (вверху) пептид GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (SEQ ID NO: 21) и включает в себя (внизу) пептид TTPPVLDSDGSFFLYSR (SEQ ID NO: 22). Для каждого представленного пептида и соответствующего протокола расщепления условия для образца включали в себя 5 мкг расщепленного мАт2 и 2 мМ глицина.

[0049] На ФИГ. 20А, 20В и 20С представлены таблицы, демонстрирующие процент скремблирования дисульфидов для гидролизатов мАт2 в зависимости от различных протоколов расщепления. В частности, SOP для мАт2, SOP для мАт3 и набор для расщепления при низком рН индивидуально тестировали на мАт2 для определения того, зависит ли процент скремблирования дисульфидов от протокола расщепления. Показаны все возможные дисульфиды и соответствующий процент скремблирования в зависимости от применяемого протокола расщепления. Приведенные данные включают в себя все изотопные пики всех основных состояний заряда. Для каждого протокола расщепления, представленного на ФИГ. 20А-20С, условия для образцов включали в себя 5 мкг расщепленного мАт2 и 2 мМ глицина.

[0050] На ФИГ. 20D представлено уравнение для определения процента скремблирования дисульфидов, которое применяется для определения процента скремблирования в экспериментах, представленных в ФИГ. 20А-20С.

[0051] На ФИГ. 20Е представлен репрезентативный пример интерференции, соответствующей дисульфидному пептиду C208H-C93L, включенному в таблицу выше на ФИГ. 20А.

[0052] На ФИГ. 21А и 21В представлено относительное количество скремблированных дисульфидов с большой распространенностью, определенное количественным методом, показанным на ФИГ. 20А-20С. В частности, на ФИГ. 21А представлен пептид C152H-C139H, соответствующий дисульфиду соответствующих восстановленных пептидов-партнеров STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7) и GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1). На ФИГ. 21В представлен пептид C23L-C22H, соответствующий дисульфиду соответствующих восстановленных пептидов-партнеров DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR (SEQ ID NO: 12) и LSCAGSGFTFR (SEQ ID NO: 8). Для каждого из ФИГ. 21А-21В относительные количества показаны в зависимости от протокола расщепления (протокол для мАт2, протокол для мАт3 или протокол для расщепления при низком рН). Как проиллюстрировано на обоих из ФИГ. 21А-21В, хроматограммы позволяют легко различать дисульфиды с большой распространенностью

при проведении расщепления с помощью протокола для мАт2 и протокола для мАт3, но хроматограмма скремблированного дисульфида неотличима от фонового шума в условиях расщепления при низком рН. Для каждого условия образцы включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт2 (или трипсином с устойчивой к низкому рН рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком рН) и 2 мМ глицина.

[0053] На **ФИГ. 22** представлено наложение УФ-хроматограмм для скремблированного дисульфида с большой распространенностью (C152H-C139H), расщепленного с помощью каждой из трех различных методик, описанных выше на ФИГ. 14, а именно SOP для мАт2, SOP для мАт3 и процедуры с применением набора для расщепления при низком рН. Наложения УФ-хроматограмм иллюстрируют, что дисульфид C152H-C139H, соответствующий восстановленным пептидам-партнерам STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7) и GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), образуется посредством протокола расщепления для мАт2 и для мАт3, но не протокола расщепления при низком рН. Условия для образцов во всех трех процедурах расщепления включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт2 (или трипсином с устойчивой к низкому рН рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком рН) и 2 мМ глицина.

[0054] На **ФИГ. 23А, 23В и 23С** представлены различные протоколы расщепления трипсином, применяемые для получения фрагментов, содержащих дисульфидные пептиды и соответствующие восстановленные пептиды-партнеры для мАт 5. Указаны три разных протокола, включая протокол для мАт4 (ФИГ. 23А), протокол для мАт5 (ФИГ. 23В) и набор для расщепления при низком рН (ФИГ. 23С).

[0055] На **ФИГ. 24** представлено наложение УФ-хроматограмм, соответствующих расщеплению трипсином мАт5, с применением каждой из процедур расщепления, иллюстративно представленных на ФИГ. 23А-23С, в частности протокола для мАт4, протокола для мАт5 и набора для расщепления при низком рН. Прогоны образцов для получения хроматограммы включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт5 (или трипсином вместе с устойчивой к низкому рН рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком рН) в присутствии 2 мМ глицина.

[0056] На **ФИГ. 25А и 25В** представлены выбранные временные окна, соответствующие наложению УФ-хроматограмм, показанных на ФИГ. 24. На ФИГ. 25А представлено временное окно от примерно 15 минут до 33 минут, а на ФИГ. 25В представлено временное окно от примерно 35 минут до 67 минут.

[0057] На **ФИГ. 26** представлен график, представляющий сигнал МС для различных нативных дисульфидов, соответствующих мАт5, полученных при каждой из трех разных процедур расщепления, иллюстративно представленных на ФИГ. 23А-23С. К нативным дисульфидам относятся C22H-C96H, C145H-C201H, C221H-C213L, C221H-C213L (пропуск, связывается с неверным расщеплением), C227H-C227H, C230H-C230H, C262H-C322H, C368H-C426H, C23L-C88L и C133L-C193L. Для каждого дисульфида условия, слева направо, включают в себя протокол для мАт4, протокол для мАт5 и процедуру с применением набора для расщепления при низком рН. Данные,

представленные в виде сигнала МС, включают в себя все изотопные пики всех основных состояний заряда. Прогоны образцов для формирования данных на ФИГ. 26 включают в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт5 (или трипсином вместе с устойчивой к низкому рН рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком рН) в присутствии 2 мМ глицина.

[0058] На **ФИГ. 27А, 27В, 27С и 27D** представлены площади пиков пептидов из различных доменов мАт (например, VH/VL, CH1, CL, CH2, CH3) гидролизатов мАт5. Для каждого домена показанные пептиды были получены посредством протокола для мАт4, протокола для мАт5 или набора для расщепления при низком рН, как иллюстративно представлено на ФИГ. 23А-23С. На ФИГ. 27А представлен домен VH/VL, на ФИГ. 27В представлен домен CH1/CL, на ФИГ. 27С представлен домен CH2, а на ФИГ. 27D представлен домен CH3. ФИГ. 27А включает в себя (вверху) пептид EVQLVESGGGLVQPGGSLR (SEQ ID NO: 23) и включает в себя (внизу) пептид DIQMTQSPSSLSASVGDR (SEQ ID NO: 24). ФИГ. 27В (вверху) включает пептид GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 25) и (внизу) ADYEK (SEQ ID NO: 40). ФИГ. 27С (вверху) включает пептид FNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 26) и (внизу) ALPAPIEK (SEQ ID NO: 27). ФИГ. 27D включает в себя (вверху) пептид DELTK (SEQ ID NO: 28) и включает в себя (внизу) пептид TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 29). Для каждого представленного пептида и соответствующего протокола расщепления условия для образца включали в себя 5 мкг расщепленного мАт2 и 2 мМ глицина.

[0059] На **ФИГ. 28** представлены цистеинсодержащие пептиды, полученные при расщеплении мАт5 трипсином. Для справки показан номер остатка цистеина и указание на то, где находится цистеин, - на тяжелой (H) или на легкой (L) цепи мАт5. К триптическим пептидам относятся LSCAASGFTSSSYAMNWVR (SEQ ID NO: 30), AEDTAVYYCAK (SEQ ID NO: 41), STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 31), DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK (SEQ ID NO: 32), SCDK (SEQ ID NO: 33), TPEVTCVVVDVSHEDPEVK (SEQ ID NO: 34), NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 42), WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 43), VTITCR (SEQ ID NO: 35), FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTLTFGQGTR (SEQ ID NO: 36), SGTASVVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 44), VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 45) и GEC/SFNRGEC. Что касается цистеина C213L (GEC/SFNRGEC), то GEC представляет собой ожидаемый/прогнозируемый триптический пептид, однако SFNRGEC содержит пропускаемое трипсином расщепление, что является довольно распространенной и часто встречающейся ситуацией. При рассмотрении специфических дисульфидных соединений как пептид GEC, так и пептид SFNRGEC содержат один и тот же остаток цистеина, поэтому наличие одной формы подтверждает существование другой. Таким образом, остаток C213L представлен в настоящем документе как GEC/SFNRGEC, где SFNRGEC соответствует SEQ ID NO: 16.

[0060] На **ФИГ. 29** представлены все возможные скремблированные дисульфидные

соединения из мАт5, за исключением пептида шарнирной области ТНТСРРСРАPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO: 47). Тандемную масс-спектрометрию (МС/МС) с применением нацеленного подхода MS2, рассмотренную в настоящем документе, применяли для идентификации скремблированных дисульфидных соединений. 5 мкг расщепленного трипсином мАт5 разделяли и частично восстанавливали с применением 40 мкМ ТСЕР. Для усиления сигнала МС применяли 2 мМ глицина. Процедура расщепления включала в себя протокол для мАт4 (см. ФИГ. 23А). Каждое дисульфидное соединение кодировали в соответствии с уровнем достоверности определения (не обнаружен, низкая достоверность, средняя достоверность, высокая достоверность, сверхвысокая достоверность). 63,3% всех возможных скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с высокой или сверхвысокой достоверностью, 20% всех возможных скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы со средней достоверностью, а 16,7% всех возможных скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с низкой достоверностью.

[0061] На **ФИГ. 30А, 30В и 30С** представлены таблицы, демонстрирующие процент скремблирования дисульфидов для гидролизатов мАт5 в зависимости от различных протоколов расщепления. В частности, протокол для мАт4, протокол для мАт5 и набор для расщепления при низком рН индивидуально тестировали на мАт5 для определения того, зависит ли процент скремблирования дисульфидов от протокола расщепления. Показаны все возможные дисульфиды и соответствующий процент скремблирования в зависимости от применяемого протокола расщепления. Приведенные данные включают в себя все изотопные пики всех основных состояний заряда. Уравнение для определения процента скремблирования дисульфидов, которое применяли для определения процента скремблирования в экспериментах, представленных на **ФИГ. 30А-30С**, представляет собой уравнение, представленное на **ФИГ. 20D**. Для каждого протокола расщепления, представленного на **ФИГ. 30А-30С**, условия для образцов включали в себя 5 мкг расщепленного мАт5 и 2 мМ глицина.

[0062] На **ФИГ. 31** представлен набор измерений m/z , соответствующих димерному дисульфиду STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 31). Верхняя хроматограмма иллюстрирует значение m/z только для дисульфида, средняя хроматограмма демонстрирует значение m/z только для полностью восстановленных пептидов, соответствующие дисульфидному пептиду, а нижняя хроматограмма демонстрирует значение m/z для частично восстановленных пептидов, соответствующих дисульфидному пептиду. В совокупности данные указывают на измененный характер изотопных пиков в частично восстановленном образце. Пики изотопов на верхней хроматограмме острее из-за того, что данные (без ТСЕР, следовательно, «только дисульфид») собираются с более высоким разрешением MS1. Разрешение MS1 снижалось при выполнении после прохождения через колонку восстановления с ТСЕР для максимального увеличения количество сканирований MS2, собираемых для увеличения сигнала рядом с вершиной

каждого пика восстановленного пептида с применением методологии нацеленной MS2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0063] Перед прочтением описания настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что терминология, применяемая в настоящем документе, служит только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не ограничивает объем настоящего изобретения, который может быть ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем настоящего изобретения. В представленном ниже подробном описании приведена ссылка на сопровождающие графические материалы, которые являются частью настоящего описания и на которых в виде иллюстраций показаны варианты осуществления, которые могут быть реализованы на практике. Следует понимать, что могут использоваться другие варианты осуществления, и можно вносить конструктивные или логические изменения без отступления от объема изобретения.

[0064] Различные операции могут быть описаны как множество дискретных операций по очереди таким образом, что это может быть полезно для понимания вариантов осуществления; однако порядок описания не следует понимать как означающий, что эти операции зависят от порядка.

[0065] В описании могут применяться описания, основанные на угле зрения, такие как вверх/вниз, назад/вперед и верхнее/нижнее. Такие описания применяются только для упрощения описания и не предназначены для ограничения применения раскрытых вариантов осуществления.

[0066] Могут применяться термины «присоединенный» и «соединенный» вместе с их производными. Следует понимать, что не предполагается, что эти термины являются синонимами друг друга. Вместо этого, в конкретных вариантах осуществления термин «присоединенный» может применяться для указания на то, что два или более элементов находятся в непосредственном физическом или электрическом контакте друг с другом. Термин «соединенный» может означать, что два или более элементов находятся в непосредственном физическом или электрическом контакте. Однако «соединенный» может также означать, что два или более элементов не находятся в непосредственном контакте друг с другом, но все еще совместно работают или взаимодействуют друг с другом.

[0067] Для целей описания фраза в форме «A/B» или в форме «A и/или B» означает (A), (B) или (A и B). Для целей данного описания фраза в форме «по меньшей мере один из A, B и C» означает (A), (B), (C), (A и B), (A и C), (B и C) или (A, B и C). Для целей описания фраза в форме «(A)B» означает (B) или (AB), то есть A является необязательным элементом.

[0068] В описании могут применяться термины «вариант осуществления» или

«варианты осуществления», каждый из которых может относиться к одному или более одинаковым или разным вариантам осуществления. Дополнительно термины «содержащий», «включающий в себя», «имеющий» и т. п., применяемые в отношении вариантов осуществления, являются синонимами и по существу предполагают «открытые» термины (например, термин «включающий в себя» следует интерпретировать как «включая, без ограничений», термин «имеющий» следует интерпретировать как «имеющий по меньшей мере», термин «включает в себя» следует интерпретировать как «включает в себя, без ограничений» и т. д.).

[0069] В отношении применения любых вариантов множественного и/или единственного числа для терминов в настоящем документе специалисты в данной области могут изменять множественное число на единственное и/или единственное число на множественное в соответствии с требованиями контекста и/или применения. В настоящем документе различные комбинации единственного/множественного числа для ясности могут быть указаны явным образом.

[0070] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин «примерно» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что фактическое значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в настоящем документе выражение «примерно 100» включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.)

[0071] В настоящем документе также описаны предпочтительные способы и материалы, хотя для практического осуществления или проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

[0072] Сокращения, используемые в настоящем документе

[0073] ACN: Ацетонитрил

[0074] AU: Единицы поглощения

[0075] CH: Константная область тяжелой цепи

[0076] CL: Константная область легкой цепи

[0077] Cys: Цистеин

[0078] DDA: Зависимая от данных регистрация

[0079] EIC: Экстракционные ионные хроматограммы

[0080] E/S: Фермент/субстрат

[0081] FA: Муравьиная кислота

[0082] HILIC: Жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия

[0083] ВЭЖХ: Высокоэффективная жидкостная хроматография

[0084] IAM: Йодацетамид

[0085] IgG: Иммуноглобулин G

[0086] ЖХ: Жидкостная хроматография

[0087] ЖХ-МС: Жидкостная хроматография - масс-спектрометрия

[0088] мАт: Моноклональное антитело

[0089] МРА: Подвижная фаза А

[0090] МРВ: Подвижная фаза В

[0091] МС: Масс-спектрометрия

[0092] МС/МС: Тандемная масс-спектрометрия

[0093] MS1: Первый масс-спектрометр тандемного масс-спектрометра

[0094] MS2: Второй масс-спектрометр тандемного масс-спектрометра

[0095] MM: Молекулярная масса

[0096] NEM: N-этилмалеимид

[0097] PRM: Мониторинг параллельных реакций

[0098] ОФЖХ: Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

[0099] ОФЖХ-МС/МС: Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

[0100] TCER: Трис(2-карбоксиэтил)фосфин

[0101] TFA: Трифторуксусная кислота

[0102] TIC: Полный ионный ток

[0103] УФ: Ультрафиолетовый

[0104] V_H: Варибельная область тяжелой цепи

[0105] V_L: Варибельная область легкой цепи

[0106] **Определения**

[0107] Термин «антитело», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т. е. «молекул полноразмерного антитела»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (HCVR или V_H) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может представлять собой изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь имеет изотип IgG1 или IgG4, необязательно включающий в себя химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (LCVR или V_L) и константной области легкой цепи (C_L). В V_H- и V_L-областях можно дополнительно выделить области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем

порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя ссылку как гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, такими как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Для обзора структуры антител см. Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983).

[00108] Термин антитело также включает в себя «биспецифическое антитело», которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним другим эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, которая включает в себя одну тяжелую цепь и одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связываться с тем же антигеном, но в различных эпитопах или неперекрывающихся эпитопах. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют идентичные легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела описаны по существу в публикации патентной заявки США № 2010/0331527 (30 декабря 2010 г.).

[00109] Термин «антигенсвязывающий участок» (или «фрагмент антитела») относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающий участок» антитела, включают в себя (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент дАт (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенный CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой области VL и VH соединяется с образованием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) 90 *PNAS U.S.A.* 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 *Structure* 1121-1123).

[00110] Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с применением стандартных методов рекомбинантной ДНК, общеизвестных в данной области (см. Sambrook et al., 1989). Способы получения антител человека у трансгенных мышей также известны в данной области. Например, с применением технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения

моноклональных антител высокоаффинные химерные антитела к требуемому антигену изначально выделяют с вариабельной областью человека и константной областью мышей. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее вариабельную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[00111] Предусмотрено, что термин «антитело человека» включает в себя антитела, имеющие вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. мАТ человека по изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например в CDR и, в частности, CDR3. В то же время термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, не предполагает включение мАТ, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты к FR последовательностям человека. Указанный термин включает в себя антитела, рекомбинантно продуцируемые в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Указанный термин не предназначен для включения антител, выделенных из или полученных в организме субъекта-человека.

[00112] Термин «дисульфид», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения ковалентной связи, образуемой двумя тиоловыми группами. В белках, например моноклональных антителах, эти связи проходят между тиоловыми группами двух цистеиновых аминокислот. Дисульфидные связи способствуют стабилизации глобулярной структуры белка и удержанию белков в их соответствующей конформации, что играет важную роль в свертывании и стабильности белка. Как описано в настоящем документе, термин «дисульфид» или «дисульфидный пептид» охватывает два пептида, ковалентно связанных посредством цистеиновых остатков на каждом соответствующем пептиде, а каждый из двух пептидов в своей восстановленной форме называется «восстановленным пептидом-партнером». Такие дисульфидные пептиды могут быть сформированы посредством расщепления протеазой (например, расщепления протеазой трипсином и/или расщепления рекомбинантной протеазой Lys-C) в невозстанавливающих условиях, где дисульфидные связи остаются интактными. После этого такие дисульфидные пептиды могут быть восстановлены до соответствующих им восстановленных пептидов-партнеров посредством восстанавливающего агента (например, DTT, TCEP и т. д.). В настоящем документе термин «скремблированный

дисульфид» или «скремблирование дисульфидов» охватывает дисульфидные связи, которые являются ненативными для конкретной биомолекулы, такой как моноклональное антитело.

[00113] Термин «хроматография на основе гидрофильного взаимодействия», или HPLC, должен включать в себя процесс, использующий гидрофильную неподвижную фазу и гидрофобную органическую подвижную фазу, в которой гидрофильные соединения удерживаются дольше, чем гидрофобные соединения. В определенных вариантах осуществления в процессе используют смешиваемую с водой подвижную фазу.

[00114] Термин «образец», используемый в настоящем документе, относится к смеси молекул, которая содержит по меньшей мере молекулу аналита, например дисульфидный пептид и/или соответствующие восстановленные пептиды-партнеры, например полученные из моноклонального антитела, которую подвергают манипуляциям в соответствии со способами изобретения, включая, например, разделение, анализ, экстрагирование или концентрирование.

[00115] Термины «анализ» или «проведение анализа», используемые в настоящем документе, применяются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных способов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солюбилизации и/или характеристики представляющих интерес молекул (например, биомолекул, включая, без ограничений, моноклональные антитела, дисульфидные пептиды и/или соответствующих восстановленных пептиды-партнеры). Примеры включают в себя, без ограничений, твердофазную экстракцию, твердофазную микроэкстракцию электрофорез, масс-спектрометрию, например ИЭР-МС, tandemную масс-спектрометрию (МС/МС), МАЛДИ-МС или жидкостную хроматографию, например высокоэффективную, например обращенно-фазовую, нормально-фазовую или эксклюзионную, ионно-парную жидкостную хроматографию, жидкостно-жидкостную экстракцию, например ускоренную жидкостную экстракцию, сверхкритическую жидкостную экстракцию, микроволновую экстракцию, мембранную экстракцию, экстракцию по Сокслету, осаждение, осветление, электрохимическое обнаружение, окрашивание, элементный анализ, расщепление по Эдмунду, ядерно-магнитный резонанс, инфракрасный анализ, проточно-инжекционный анализ, капиллярную электрохроматографию, ультрафиолетовое обнаружение и их комбинации.

[00116] «Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией», или «ИЭР-МС», представляет собой методику, применяемую в масс-спектрометрии для получения ионов с применением электрораспылителя, в котором к жидкости прикладывается высокое напряжение для создания аэрозоля. Например, в электрораспылителе ионы создаются из белков/пептидов в растворе, что позволяет ионизировать хрупкие молекулы в интактном виде, и это может сохранять нековалентные взаимодействия. Электрораспылительная ионизация является предпочтительным источником ионов для связывания жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Анализ можно проводить на линии, подавая жидкость, элюируемую из колонки для ЖХ,

непосредственно на электрораспылитель, или в автономном режиме посредством сбора фракций для анализа позднее, в классической установке наноэлектрораспылительной масс-спектрометрии. ЖХ-МС можно применять для характеристики белков, включая количественное определение биомаркеров, анализ вариантов последовательностей и идентификацию и количественное определение дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров.

[00117] «Тандемная масс-спектрометрия», или «МС/МС», или «МС²», представляет собой методику анализа биомолекул, таких как белки и пептиды. При тандемной масс-спектрометрии первый масс-анализатор (MS1) выбирает ионы (например, образцы, ионизированные посредством ИЭР, МАЛДИ и т. д.) с одним конкретным отношением массы к заряду (m/z) (или диапазоном отношений массы к заряду) из числа ионов, поставляемых источником ионов. Эти ионы фрагментируют, и второй масс-анализатор (MS2) регистрирует масс-спектр ионов-фрагментов. Тандемная масс-спектрометрия включает три отдельных стадии: отбор, фрагментация и детекция. Разделение этих стадий может быть реализовано в пространстве или во времени. Типичная тандемная масс-спектрометрия в приборах для космических исследований включает в себя QqQ (тройная квадрупольная спектрометрия), QTOF (квадрупольная времяпролетная), гибридная ионная ловушка/FTMS (масс-спектрометрия с преобразованием Фурье) и т. д. Приборы для тандемной по времени МС/МС включают в себя ионную ловушку и FT-ICR MS (масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье). Стадия фрагментации, как правило, реализуется посредством столкновения отобранных ионов с нейтральным газом в процессе, называемом активацией столкновениями (СА) или индуцированной столкновениями диссоциацией (CID).

[00118] Термин «частично восстановленный» или «частичное восстановление», как описано в настоящем документе, охватывает обработку образца (например, биомолекулы или фрагментов биомолекулы) восстановителем в концентрации и/или в течение некоторого времени, чтобы восстановить некоторую долю дисульфидных связей, присутствующих в образце, до соответствующих восстановленных аналогов, но при этом не всех дисульфидов, присутствующих в образце.

[00119] «Мониторинг параллельных реакций», или PRM, как описано в настоящем документе, относится к нацеленной технологии протеомики, применяемой для количественного определения множества белков/пептидов в одном эксперименте. При PRM все ионы-фрагменты, а не только отобранные, измеряют после фрагментации выбранного предшественника. PRM, как правило, выполняют на анализаторе типа «орбитальная ионная ловушка» (Orbitrap) или на времяпролетном (ToF) анализаторе. PRM может уменьшать время проведения анализа, поскольку не нужно предварительно выбирать целевые переходы (ионы-продукты). PRM устраняет большинство помех, обеспечивая более высокую точность и аттомолярные пределы обнаружения и количественного определения.

[00120] «Зависимая от данных регистрация», или DDA, как описано в настоящем

документе, относится к способу регистрации при тандемной масс-спектрометрии. В режиме DDA масс-спектрометр выбирает наиболее интенсивные пептидные ионы на первой стадии тандемной масс-спектрометрии, а затем фрагментирует и анализирует их на второй стадии масс-спектрометрии.

[00121] Общее описание

[00122] Терапевтические антитела все чаще применяют для лечения заболеваний, таких как рак, инфекции и другие состояния. Терапевтические антитела функционируют, например, посредством связывания с антигеном (например, присутствующим на клетке-мишени), в результате этого притягивая молекулы, борющиеся с заболеванием и/или инициирующие гибель клетки посредством ответов иммунной системы, и/или посредством блокирования процесса (например, проникновения вирусов в клетку или взаимодействия между рецептором и лигандом), которые в ином случае приводят к инфекции и/или заболеванию. Чтобы обеспечивать эффективность, терапевтическое антитело должно быть стабильным и правильно свернутым. Неправильное сворачивание и/или ухудшение стабильности могут способствовать неэффективности таких молекул. Одна из причин неправильного сворачивания и/или ухудшения стабильности включает в себя образование ненативных (например, скремблированных) дисульфидных связей в некоторый момент в процессе получения терапевтического антитела. Таким образом, существует потребность в способах, которые легко позволяют определить скремблированное дисульфидное связывание в терапевтических биомолекулах, включая, без ограничений, терапевтические антитела.

[00123] В настоящем документе описаны новые методики основанного на масс-спектрометрии определения характеристик скремблированных дисульфидных связей в биомолекулах. Описанные методики улучшают возможность надежного обнаружения и количественного определения скремблированных дисульфидных связей в биомолекулах, включая, без ограничений, моноклональные антитела. Как описано в настоящем документе, неожиданно было обнаружено, что улучшение масс-спектрального сигнала посредством включения низкомолекулярной добавки (например, глицина) в растворы подвижной фазы жидкостной хроматографии специфически зависит от концентрации восстановителя, применяемого для частичного восстановления компонентов образцов, элюированных из разделительной колонки для жидкостной хроматографии. Также неожиданно было обнаружено, что улучшение масс-спектрального сигнала и возможность применять масс-спектральный анализ для обнаружения восстановленных пептидов-партнеров, соответствующих дисульфидным пептидным фрагментам биомолекул, существенно зависят от выбора агента для образования ионных пар, включенного в подвижную фазу при разделении методом жидкостной хроматографии. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что условия расщепления биомолекул перед разделением расщепленных компонентов и их анализом методом масс-спектрометрии могут надежно индуцировать искусственное скремблирование дисульфидов в определенных условиях и что можно избежать этого искусственного скремблирования дисульфидов посредством

выполнения процедур расщепления при кислотном pH. Вышеуказанные открытия позволяют улучшить возможность надежного обнаружения и количественного определения скремблированных дисульфидных связей в биомолекулах с высокой степенью достоверности с применением тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), как описано в настоящем документе. Таким образом, раскрытые методики имеют очень широкий диапазон применений с точки зрения обеспечения возможности скрининга терапевтических биомолекул (например, моноклональных антител) на скремблированные дисульфиды, что, в свою очередь, может повышать эффективность терапевтических средств, полученных с применением таких молекул.

[00124] Рассматриваемое в настоящем документе разделение расщепленных протеазой биомолекул методом жидкостной хроматографии может включать в себя градиенты одного или более применяемых буферов. Один или более из указанных буферов могут в некоторых примерах включать в себя агенты для образования ионных пар, включая, без ограничений, формиат, ацетат, TFA и соли. В предпочтительном варианте осуществления агент для образования ионных пар содержит TFA.

[00125] В случае применения двух буферов концентрация первого буфера может уменьшаться, а концентрация или процентное содержание второго буфера увеличивается в ходе прогона хроматографии. Например, процентное содержание первого буфера может снижаться с примерно 100%, примерно 99%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80%, примерно 75%, примерно 70%, примерно 65%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 45% или примерно 40% до примерно 0%, примерно 1%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35% или примерно 40% в ходе прогона хроматографии. В качестве другого примера, процентное содержание второго буфера может увеличиваться от примерно 0%, примерно 1%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35% или примерно 40% до примерно 100%, примерно 99%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80%, примерно 75%, примерно 70%, примерно 65%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 45% или примерно 40% в течение того же прогона. Необязательно концентрация или процентная доля первого и второго буфера может возвращаться к своим исходным значениям в конце хроматографического прогона. В качестве примера, процентная доля первого буфера может меняться в пять стадий, от 85% до 63%, до 59%, до 10%, до 85%; при этом процентная доля второго буфера на тех же стадиях изменяется от 15% до 37%, до 41%, до 90%, до 15%. Процентные доли могут изменяться постепенно, в виде линейного градиента или нелинейным образом (например, поэтапно). Например, градиент может быть мультифазным, например двухфазным, трехфазным и т. д. В некоторых вариантах осуществления в способах, описанных в настоящем документе, применяют понижающий градиент ацетонитрила в буфере, который соответствует возрастающей полярности подвижной фазы, без применения агентов для образования ионных пар.

[00126] В некоторых вариантах осуществления применение градиента подвижной

фазы в разделительной колонке включает в себя применение первого буферного градиента подвижной фазы в разделительной колонке, причем первый буфер подвижной фазы включает в себя TFA и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту), и применение второго градиента подвижной фазы в разделительной колонке, причем второй буфер подвижной фазы содержит TFA в ACN и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту).

[00127] В различных вариантах осуществления низкомолекулярная добавка выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина. В некоторых случаях аминокислота выбрана из глицина, аланина, серина или валина. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой серин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в первом буфере подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота во втором буфере подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в первом и втором буферах подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка (например, аминокислота) в первом и/или втором буфере подвижной фазы представляет собой одно из низкомолекулярных соединений (например, модифицированные аминокислоты) или другие аминокислоты, указанные выше или в настоящем документе.

[00128] Концентрация низкомолекулярной добавки (например, аминокислоты) в буфере подвижной фазы составляет от примерно 0,5 мМ до примерно 5 мМ, например от примерно 0,5 мМ до примерно 3 мМ, от примерно 1 мМ до примерно 2 мМ, включая 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1,0 мМ, 1,1 мМ, 1,2 мМ, 1,3 мМ, 1,4 мМ, 1,5 мМ, 1,6 мМ, 1,7 мМ, 1,8 мМ, 1,9 мМ, 2,0 мМ, 2,1 мМ, 2,2 мМ, 2,3 мМ, 2,4 мМ, 2,5 мМ, 2,6 мМ, 2,7 мМ, 2,8 мМ, 2,9 мМ, 3,0 мМ, 3,1 мМ, 3,2 мМ, 3,3 мМ, 3,4 мМ, 3,5 мМ, 3,6 мМ, 3,7 мМ, 3,8 мМ, 3,9 мМ, 4,0 мМ, 4,1 мМ, 4,2 мМ, 4,3 мМ, 4,4 мМ, 4,5 мМ, 4,6 мМ, 4,7 мМ, 4,8 мМ, 4,9 мМ или 5,0 мМ. В некоторых вариантах осуществления содержание низкомолекулярной добавки (например, аминокислоты) составляет менее 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка представляет собой глицин в концентрации менее 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в первом буфере подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от примерно 1 до примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления аминокислота во втором буфере подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от примерно 1 до примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина в первом буфере подвижной фазы составляет примерно 1 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина в первом буфере подвижной фазы составляет примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления аминокислота во втором буфере подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина

составляет от примерно 1 до примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина во втором буфере подвижной фазы составляет примерно 1 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глицина во втором буфере подвижной фазы составляет примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в первом и втором буферах подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от примерно 1 до примерно 2 мМ.

[00129] В некоторых вариантах осуществления концентрация TFA в первой подвижной фазе составляет от примерно 0,03% до 0,15% TFA в H₂O, например от примерно 0,03% до 0,1%. В некоторых вариантах осуществления концентрация TFA составляет от примерно 0,05% до примерно 0,1% TFA в H₂O. Например, концентрация TFA составляет примерно 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% или 0,1% в H₂O. В некоторых вариантах осуществления концентрация TFA во второй подвижной фазе составляет примерно 0,05% TFA в 80% ACN и 20% H₂O или примерно 0,1% TFA в 80% ACN и 20% H₂O. В некоторых вариантах осуществления концентрация ACN во второй подвижной фазе составляет от примерно 60% до 100%, например от 80% до 100%, включая 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

[00130] В некоторых вариантах осуществления образец содержит пептиды. В некоторых вариантах осуществления образец содержит пептиды, связанные цистеиновыми остатками посредством дисульфидной связи. Например, образец может включать в себя дисульфидные пептиды, полученные посредством протеолитического расщепления моноклонального антитела или другой биомолекулы в невозстанавливающих условиях. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

[00131] В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя подготовку образца перед его приведением в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образцов связаться с подложкой. В некоторых вариантах осуществления подготовка образца включает в себя приведение образца в контакт с раствором для денатурации/алкилирования в условиях, которые способствуют денатурации и алкилированию образца. В примерах денатурирующий агент представляет собой мочевины. Концентрация мочевины, достаточная для обеспечения денатурации образца (например, денатурации белка), может составлять 7-9 М мочевины, например 8 М мочевины. В примерах раствор для денатурации/алкилирования включает в себя алкилирующий агент. В одном примере алкилирующий агент может включать в себя йодацетамид (IAM). Дополнительно или альтернативно алкилирующий агент может включать в себя N-этилmaleимид (NEM). В примерах алкилирующий агент в растворе для денатурации/алкилирования содержится в концентрации от примерно 0,5 мМ до примерно 10 мМ, например от примерно 1 мМ до примерно 8 мМ. В некоторых примерах алкилирующий агент в растворе для денатурации/алкилирования представляет собой NEM, и его концентрация составляет от примерно 6 мМ до примерно 10 мМ, например 8 мМ. В некоторых примерах алкилирующий агент в растворе для

денатурации/алкилирования представляет собой IAM, а его концентрация составляет от примерно 0,5 мМ до примерно 5 мМ, например примерно 1 мМ, или примерно 2 мМ, или примерно 3 мМ, или примерно 4 мМ, или примерно 5 мМ, например 2,4 мМ. В некоторых примерах раствор для денатурации/алкилирования приводят в контакт с образцом в течение периода времени от примерно 10 минут до примерно 60 минут, например 20 минут, или 30 минут, или 40 минут, или 50 минут. В примерах раствор для денатурации/алкилирования имеет температуру от примерно 40 °С до примерно 60 °С, например примерно 50 °С. В примерах pH раствора для денатурации/алкилирования является кислотным. Например, pH может составлять от примерно 5 до примерно 6,5, например от примерно 5,5 до примерно 6,0, например примерно 5,7.

[00132] В некоторых примерах подготовка образца перед приведением образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с подложкой, включает в себя, после приведения образца в контакт с раствором для денатурации/алкилирования, приведение образца в контакт с раствором для предварительного расщепления. В примерах раствор для предварительного расщепления содержит протеазу, например сериновую протеазу. В примерах протеаза представляет собой эндопротеиназу LysC. В примерах протеаза представляет собой рекомбинантную протеазу, например рекомбинантную эндопротеиназу LysC. В примерах раствор для предварительного расщепления включает в себя протеазу при отношении фермент/субстрат от примерно 1 : 2 до примерно 1 : 20, например от примерно 1 : 5 до примерно 1 : 15, например примерно 1 : 10 соответственно. В примерах раствор для предварительного расщепления приводят в контакт с образцом в течение периода от примерно 30 минут до 2 часов, например 1 часа. В примерах раствор для предварительного расщепления имеет температуру примерно 35-40 °С, например примерно 37 °С. В примерах раствор для предварительного расщепления имеет кислотный pH, например pH от примерно 5 до примерно 6, например примерно 5,2-5,5, например примерно 5,3.

[00133] В некоторых примерах подготовка образца перед приведением образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с подложкой, включает в себя, после приведения образца в контакт с раствором для денатурации/алкилирования и приведения образца в контакт с раствором для предварительного расщепления, приведение образца в контакт с раствором для расщепления. В примерах раствор для расщепления содержит первую протеазу, например сериновую протеазу. В примерах первая протеаза представляет собой эндопротеиназу LysC. В примерах первая протеаза представляет собой рекомбинантную протеазу, например рекомбинантную эндопротеиназу LysC. В примерах раствор для расщепления включает в себя первую протеазу при отношении фермент/субстрат от примерно 1 : 2 до примерно 1 : 20, например от примерно 1 : 5 до примерно 1 : 15, например примерно 1 : 10 соответственно. В примерах раствор для расщепления содержит вторую протеазу, например сериновую протеазу. В примерах вторая протеаза представляет собой трипсин.

В примерах раствор для расщепления включает в себя вторую протеазу при отношении фермент/субстрат от примерно 1 : 2 до примерно 1 : 10, например примерно 1 : 5 соответственно. В примерах раствор для расщепления приводят в контакт с образцом в течение периода от примерно 1 часа до примерно 4 часов, например 3 часов. В примерах раствор для расщепления имеет температуру примерно 35-40 °С, например примерно 37 °С. В примерах раствор для расщепления имеет кислотный pH, например pH от примерно 5 до примерно 6, например примерно 5,2-5,5, например примерно 5,3.

[00134] Как описано в настоящем документе, процедуру частичного восстановления выполняют на компонентах образцов, элюированных из колонки для жидкостной хроматографии после их разделения. Следует понимать, что до процедуры частичного восстановления компоненты образцов содержат невосстановленную (-ые) расщепленную (-ые) биомолекулу (-ы) (например, моноклональное антитело). Процедура частичного восстановления включает в себя обработку элюированных компонентов образца восстановителем. В примерах восстановитель представляет собой ТСЕР. В примерах концентрация восстановителя, применяемого для частичного восстановления элюированных компонентов образца, составляет от примерно 20 мкМ до примерно 100 мкМ, например от примерно 30 мкМ до примерно 60 мкМ, например примерно 40 мкМ. Как описано ниже в примере 1 и по меньшей мере представлено на ФИГ. 6А-6В, неожиданно было обнаружено, что сигнал МС восстановленных пептидов-партнеров существенно зависит от определенного диапазона концентрации ТСЕР (от примерно 20 мкМ до примерно 100 мкМ), причем с концентрациями ТСЕР за пределами этого конкретного диапазона (например, как более высокими, так и более низкими) связано снижение сигнала МС. Это открытие было особенно неожиданным, так как ожидалось, что более высокие концентрации ТСЕР (например, от 400 мкМ до 2 мМ и выше) приведут к увеличению численности восстановленных пептидов-партнеров, соответствующих дисульфидным пептидам, что приводит к увеличению сигнала МС для соответствующих восстановленных пептидов-партнеров при более высоких концентрациях ТСЕР. Таким образом, обнаружение того, что более низкие концентрации ТСЕР (например, 20-100 мкМ, например примерно 40 мкМ) улучшают, а не ухудшают способность обнаруживать соответствующие восстановленные пептиды-партнеры, было неожиданным. В примерах процедура частичного восстановления включает в себя дополнительную обработку элюированных компонентов образца NH_4OH . В примерах конечная процентная концентрация NH_4OH составляет от примерно 0,05% до примерно 0,2%, например примерно 0,12%. В примерах процедуру частичного восстановления выполняют на элюированных компонентах образцов в течение периода времени от примерно 0,5 секунды до примерно 5 секунд, например примерно 1-3 секунд, например примерно 2 секунд. В примерах эффективность, соответствующая процедуре частичного восстановления, составляет примерно 1-3%.

[00135] В некоторых вариантах осуществления разделительная колонка представляет собой разделительную колонку для жидкостной хроматографии (ЖХ).

Жидкостная хроматография, включая ВЭЖХ, может применяться для разделения структур, таких как пептиды, включая дисульфидные пептиды. Для разделения этих структур можно применять различные формы жидкостной хроматографии, включая анионообменную хроматографию, обращенно-фазовую ВЭЖХ, эксклюзионную хроматографию, высокоэффективную анионообменную хроматографию и нормально-фазовую (НФ) хроматографию, включая НФ-ВЭЖХ (см., например, Alpert et al., J. Chromatogr. A 676:191-202 (1994)). Хроматография на основе гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант НФ-ВЭЖХ, который может выполняться с частично водными подвижными фазами, что позволяет проводить нормально-фазное разделение пептидов, дисульфидных пептидов, углеводов, нуклеиновых кислот и многих белков. Порядок элюирования при HILIC - от менее полярных к более полярным - противоположен порядку при обращенно-фазовой ВЭЖХ. ВЭЖХ можно выполнять, например, на системе ВЭЖХ производства Waters (например, система для ВЭЖХ Waters 2695 Alliance), Agilent, Perkin Elmer, Gilson и т. д.

[00136] В некоторых примерах в способах, описанных в настоящем документе, можно применять НФ-ВЭЖХ, предпочтительно HILIC. НФ-ВЭЖХ разделяет аналиты на основе полярных взаимодействий между аналитами и неподвижной фазой (например, подложкой). Полярный аналит связывается с полярной неподвижной фазой и удерживается ей. Силы адсорбции увеличиваются с увеличением полярности аналита, и взаимодействие между полярным аналитом и полярной неподвижной фазой (относительно подвижной фазы) увеличивает время элюирования. Применение более полярных растворителей в подвижной фазе уменьшит время удерживания аналитов, тогда как более гидрофобные растворители, как правило, увеличивают время удерживания.

[00137] С НФ-ВЭЖХ можно применять различные типы подложек, например, для колоночной хроматографии, включая диоксид кремния, аминные, амидные, целлюлозные, циклодекстриновые и полистирольные подложки. Примеры используемых подложек, которые, например, могут применяться в колоночной хроматографии, включают в себя: PolySulfoethyl Aspartamide (например, от компании PolyLC), сульфобетаиновый субстрат, например ZIC®-HILIC (например, от компании SeQuant), POROS® HS (например, от компании Applied Biosystems), POROS® S (например, от компании Applied Biosystems), PolyHydroethyl Aspartamide (например, от компании PolyLC), Zorbax 300 SCX (например, от компании Agilent), PolyGLYCOPLEX® (например, от компании PolyLC), Amide-80 (например, от компании Tosohaas), TSK GEL® Amide-80 (например, от компании Tosohaas), Polyhydroxyethyl A (например, от компании PolyLC), Glyco-Sep-N (например, от компании Oxford GlycoSciences) и Atlantis HILIC (например, от компании Waters). В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя колонки, в которых используют одну или более из следующих функциональных групп: карбамоильные группы, сульфопропильные группы, сульфоэтильные группы (например, поли(2-сульфоэтиласпартамид), гидроксизетильные группы (например, поли(2-гидроксизетиласпартамид) и группы ароматической сульфокислоты.

[00138] В некоторых вариантах осуществления со способами, описанными в настоящем документе, можно применять обращенно-фазовую ВЭЖХ. Обращенно-фазовая ВЭЖХ разделяет аналиты на основе неполярных взаимодействий между аналитами и неподвижной фазой (например, подложкой). Неполярный аналит связывается с неполярной неподвижной фазой и удерживается ей. Прочность адсорбции увеличивается с неполярностью аналита, и взаимодействие между неполярным аналитом и неполярной неподвижной фазой (относительно подвижной фазы) увеличивает время элюирования. Применение более неполярных растворителей в подвижной фазе уменьшает время удерживания аналитов, тогда как более полярные растворители, как правило, увеличивают время удерживания.

[00139] Температуру колонки можно поддерживать на постоянном уровне температуры в течение всего прогона хроматографии, например, с применением промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах осуществления колонка поддерживается при температуре от примерно 18 °C до примерно 70 °C, например от примерно 30 °C до примерно 60 °C, от примерно 40 °C до примерно 50 °C, например при примерно 20 °C, примерно 25 °C, примерно 30 °C, примерно 35 °C, примерно 40 °C, примерно 45 °C, примерно 50 °C, примерно 55 °C, примерно 60 °C, примерно 65 °C или примерно 70 °C. В некоторых вариантах осуществления температура колонки составляет примерно 40 °C.

[00140] Скорость потока подвижной фазы может составлять от примерно 0 до примерно 100 мл/мин. Для целей анализа скорость потока, как правило, находится в диапазоне от 0 до 10 мл/мин, а для препаративной ВЭЖХ можно применять скорости потока, превышающие 100 мл/мин. Например, скорость потока может составлять примерно 0,5, примерно 1, примерно 1,5, примерно 2, примерно 2,5, примерно 3, примерно 3,5, примерно 4, примерно 4,5 или примерно 5 мл/мин (или выше для препаративной ВЭЖХ). Замена колонки на имеющую ту же набивку, ту же длину, но меньший диаметр требует снижения скорости потока для сохранения того же времени удерживания и разрешения пиков, что и у колонки большего диаметра. В некоторых вариантах осуществления на колонке $4,6 \times 100$ мм, 5 мкм применяют скорость потока, эквивалентную примерно 1 мл/мин.

[00141] В некоторых вариантах осуществления время прогона может составлять от примерно 15 мин до примерно 240 минут, например от примерно 20 мин до примерно 70 мин, от примерно 30 мин до примерно 60 мин, от примерно 40 мин до примерно 90 мин, от примерно 50 мин до примерно 100 мин, от примерно 60 мин до примерно 120 мин, от примерно 50 мин до примерно 80 мин.

[00142] В примерах после процедуры частичного восстановления частично восстановленный образец анализируют посредством масс-спектрометрии. В примерах частично восстановленный образец включает в себя дисульфидные пептиды и соответствующие восстановленные пептиды-партнеры. В примерах дисульфидные пептиды и соответствующие восстановленные пептиды-партнеры поступают в масс-

спектрометр одновременно.

[00143] В примерах анализ образца посредством масс-спектрометрии включает в себя, в зависимости от конфигурации тандемного масс-спектрометра, получение спектров MS1 и спектров MS2. В примерах получение спектров MS2 включает в себя нацеленный подход MS2. Такой нацеленный подход MS2 может включать в себя нацеливание только на расщепленные протеазой (например, расщепленные трипсином) восстановленные пептиды-партнеры, соответствующие дисульфидным пептидам, которые содержат остаток цистеина. В примерах нацеливание только на соответствующие восстановленные пептиды-партнеры, которые содержат цистеин, обеспечивает значительно более простую характеризацию любых скремблированных дисульфидов по сравнению с подходом, в котором MS/MS применяется при попытке нацеливания на дисульфидные пептиды, из-за того, что дисульфидные пептиды обладают экспоненциально большими возможными фрагментациями по сравнению с соответствующими им восстановленными пептидами-партнерами. Если применять в качестве примера моноклональное антитело, такое моноклональное антитело может содержать определенное количество цистеиновых остатков (например, 16). При использовании процедуры частичного восстановления, описанной в настоящем документе, для нацеливания на стадии MS2 нужны только 15 восстановленных триптических пептидов (15 триптических пептидов минус шарнирная область антитела), которые содержат цистеин. Таким образом, в примерах анализ образца посредством масс-спектрометрии может включать в себя построение перечня включений для PRM только с образованными протеазой фрагментами, которые содержат цистеин, и сканирование по всему градиенту. В примерах разрешение MS1 можно снизить для увеличения количества сканирований MS2.

[00144] В примерах анализ образца с помощью масс-спектрометрии включает в себя присвоение оценки достоверности идентификации дисульфида для каждого возможного дисульфидного пептида в конкретной биомолекуле. Присвоение оценки достоверности идентификации дисульфида в примерах включает в себя присвоение балла для каждого запроса с положительным ответом из ряда запросов, относящихся к сформированным данным MS/MS. В примерах запросы могут включать в себя, без ограничений, следующие: определена ли масса MS1 дисульфидного пептида, определена ли масса MS1 первого соответствующего восстановленного пептида, определена ли масса MS1 второго соответствующего восстановленного пептида, выполнена ли идентификация MS2 методом Byonic для первого соответствующего восстановленного пептида с баллом, превышающим заданное пороговое значение, и выполнена ли идентификация MS2 методом Byonic для второго соответствующего восстановленного пептида с баллом, превышающим другое заданное пороговое значение. В примерах заданные пороговые значения являются одинаковыми, хотя объем настоящего описания предусматривает и ситуацию, когда заданные пороговые значения являются разными. В примерах анализ образца посредством масс-спектрометрии включает в себя присвоение процентной доли скремблирования каждому возможному дисульфидному соединению в конкретной

биомолекуле (например, моноклональном антителе).

ПРИМЕРЫ

[00145] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать возможность некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет примерно 25 °C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Оптимизированное частичное восстановление дисульфидов после пропуска через колонку и усиление сигнала МС

[00146] Антитела (например, моноклональные антитела) и другие биомолекулы несут нативные дисульфидные связи, которые способствуют стабильности и эффективной функциональности. Однако при определенных условиях (например, при щелочных условиях) может происходить образование ненативных дисульфидных связей (также называемых в настоящем документе скремблированными), таким образом ухудшая стабильность и функциональную эффективность. На ФИГ. 1А представлено МАт со множеством нативных дисульфидных связей (слева) и то же МАт с несколькими скремблированными дисульфидными связями (справа). На ФИГ. 1В представлена упрощенная схема, иллюстрирующая, как дисульфидные связи могут перераспределяться (например, скремблироваться) в щелочных условиях. Данное описание относится к обнаружению скремблированных дисульфидных связей в биомолекулах с акцентом на МАт.

[00147] Терапевтические МАт (или другие терапевтические биомолекулы) со скремблированными дисульфидами могут проявлять ухудшенную функциональность, поэтому возможность обнаруживать скремблированные дисульфиды имеет большое значение. На ФИГ. 2 представлено, что может быть сложно однозначно идентифицировать малочисленные скремблированные дисульфиды в МАт. На ФИГ. 2 показан дисульфид (C133H-C202H, относительное количество 0,2%), образованный из соответствующих восстановленных пептидов-партнеров GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2) по данным анализа посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) (верхние панели) и tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) (нижняя панель). EIC демонстрирует отношение m/z , соответствующее дисульфиду, но анализ МС/МС является слишком сложным для идентификации фрагментов, соответствующих TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2).

[00148] Проблему сложности, связанную с фрагментацией дисульфидной пары при анализе МС/МС, можно уменьшить посредством по меньшей мере частичного

восстановления дисульфидной пары перед масс-спектральным анализом. На ФИГ. 3 показана серия графиков, демонстрирующих зависимость содержания от отношения массы к заряду (m/z) для дисульфида и соответствующих восстановленных пептидов-партнера в зависимости от увеличения концентрации ТСЕР (0 мМ, 0,4 мМ, 0,8 мМ, 2 мМ, 4 мМ). Вкратце, мАт расщепляли трипсином в невосстанавливающих условиях для сохранения дисульфидных соединений, и невосстановленный гидролизат разделяли посредством ВЭЖХ. После разделения ТСЕР в представленных концентрациях вводили в реакцию с элюированными дисульфидами в течение 1-3 секунд (например, частичное восстановление), после чего направляли в масс-спектрометр. Дополнительно вместе с ТСЕР добавляли NH_4OH (конечная концентрация 0,12%) для повышения эффективности ТСЕР при восстановлении дисульфидов. При применении этой методики дисульфид совместно элюируется с восстановленными пептидами таким образом, что все компоненты имеют в точности одинаковое время удерживания. Для экспериментальной процедуры расщепленное мАт пропускали через колонку при 50 мкл/мин (0,02% TFA, 0,08% FA) и к образцу после разделения добавляли ТСЕР и NH_4OH через шприц и перемешивали. Эксперименты продемонстрировали самый высокий сигнал восстановленных пептидов-партнеров при 2 мМ ТСЕР.

[00149] Так как малочисленные дисульфиды может быть сложно обнаружить, идентифицировать и количественно определить, если сигнал МС является слишком низким, проводили эксперименты для определения того, может ли добавление глицина в элюент подвижной фазы, содержащей ТСЕР, улучшить сигнал МС скремблированных дисульфидов. В частности, был проведен эксперимент для определения того, может ли глицин улучшить сигнал МС в образцах, которые также включают в себя 2 мМ ТСЕР. Экспериментальная процедура включала в себя изучение сигнала МС пептидного фрагмента VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 3) из мАт1 в различных условиях, как представлено на ФИГ. 4. Результаты указывают на то, что 2 мМ ТСЕР подавляет усиление сигнала МС, наблюдаемое в ином случае при добавлении глицина (2 мМ). Если двигаться слева направо, образец 1, содержащий ТСЕР и NH_4OH , демонстрировал пониженный сигнал по сравнению с контролем без ТСЕР, NH_4OH и глицина. Добавление 2 мМ глицина к образцу, содержащему ТСЕР и NH_4OH (образец 2), демонстрировало лишь незначительное улучшение, а удаление NH_4OH при сохранении добавления ТСЕР и глицина (образец 3) показывало лишь незначительное улучшение сигнала МС по сравнению с образцом 3. Только образец 4 (2 мМ глицина в отсутствие ТСЕР и NH_4OH) демонстрировал существенное усиление сигнала МС, указывая на то, что ТСЕР в концентрации 2 мМ подавляет любой эффект усиления сигнала МС от 2 мМ глицина (сравнение образца 3 с образцом 4).

[00150] Этот подавляющий эффект ТСЕР на индуцированное глицином усиление сигнала МС дополнительно изучали в исследованиях влияния дозы на ответ. На ФИГ. 5А представлен сигнал МС от пептидного фрагмента VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 3) из мАт1 в диапазоне концентраций ТСЕР от 0 мкМ до 2000 мкМ, а на ФИГ. 5В показан

сигнал МС другого пептида DTLMISR (SEQ ID NO: 4) в том же диапазоне концентраций ТСЕР. И на ФИГ. 5А, и на ФИГ. 5В представлено, что сигнал МС уменьшается с увеличением концентраций ТСЕР. Для каждого из ФИГ. 5А-5В параметры образца включали в себя мАт1 в концентрации 0,1 мкг, 0,05% TFA и 2 мМ глицина и указанные концентрации ТСЕР.

[00151] Результаты на ФИГ. 5А-5В иллюстрируют более высокий сигнал МС, связанный с более низкими концентрациями ТСЕР. Были проведены дополнительные эксперименты для определения того, позволят ли более низкие концентрации ТСЕР по меньшей мере частично избежать подавляющего эффекта на сигнал МС, сохраняя при этом способность обнаруживать восстановленные пептиды-партнеры, соответствующие пептидной паре, соединенной дисульфидом. На ФИГ. 6А представлен сигнал МС для дисульфида, соответствующего пептидам NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 5) и WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 6), а на ФИГ. 6В представлен сигнал МС для соответствующих восстановленных пептидов-партнеров. Для каждого из ФИГ. 6А-6В тестировали различные концентрации ТСЕР в диапазоне от 0 мкМ до 2000 мкМ, аналогично описанному выше для ФИГ. 5А-5В. Условия для образцов на ФИГ. 6А-6В включали в себя расщепленное трипсином мАт1 в загрузочном количестве 1 мкг, 0,05% TFA и 2 мМ глицина и с указанными концентрациями ТСЕР. Данные указывают на то, что возрастающие концентрации ТСЕР подавляют сигнал МС, соответствующий дисульфиду (ФИГ. 6А), и что существует такой диапазон (от примерно 20 мкМ до примерно 100 мкМ), в котором ТСЕР эффективно восстанавливает пептидную пару с дисульфидной связью, а сигнал МС не имеет нежелательного подавления. Увеличение сигнала МС для соответствующих восстановленных пептидов-партнеров (ФИГ. 6В) является желательным для идентификации методом МС/МС. Наилучший сигнал МС наблюдался при примерно 40 мкМ ТСЕР.

[00152] Соответственно, проводили дополнительные эксперименты с 40 мкМ ТСЕР для частичного восстановления дисульфидов в соответствующие восстановленные пептиды-партнеры. На ФИГ. 7А-7В представлены относительные количества дисульфида, состоящего из GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров без обработки ТСЕР (ФИГ. 7А) и с частичным восстановлением дисульфида посредством обработки 40 мкМ ТСЕР (ФИГ. 7В). Анализируемые пептидные фрагменты получали посредством расщепления мАт2 трипсином перед проведением ВЭЖХ. В отсутствие частичного восстановления дисульфида не наблюдалось никакого сигнала соответствующих восстановленных пептидов-партнеров (ФИГ. 7А), в то время как наблюдали хороший сигнал соответствующих восстановленных пептидов-партнеров, если дисульфидный пептид частично восстанавливали 40 мкМ ТСЕР (ФИГ. 7В).

[00153] Как показано на ФИГ. 8А-8В, было отмечено, что глицин улучшает сигнал МС дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров более чем в 10 раз (например, 10х-20х) в присутствии 40 мкМ ТСЕР и TFA (0,05%). На

ФИГ. 8С-8G представлены данные, иллюстрирующие, можно ли применять FA, с глицином или без него, для улучшения обнаружения восстановленных пептидов-партнеров. Для каждого из ФИГ. 8А-8Е восстановленные пептиды-партнеры соответствуют GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), которые в невосстановленной форме образуют дисульфидный пептид, и для каждого из ФИГ. 8F-8G восстановленные пептиды-партнеры соответствуют GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7), которые в невосстановленной форме составляют дисульфид. На каждом из ФИГ. 8А-8G показаны относительные количества пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином, с обработкой 40 мкМ ТСЕР после разделения на колонке. Как представлено, глицин (например, 2 мМ) необходим для обнаружения соответствующих восстановленных пептидов-партнеров, независимо от того, является ли агент для образования ионных пар TFA (см. ФИГ. 8А-8В) или FA (см. ФИГ. 8С-8Е и ФИГ. 8F-8G).

[00154] На ФИГ. 9А-9В показан сигнал МС для пептидных фрагментов, полученных при расщеплении мАт2 трипсином. Дисульфид соответствует дисульфиду восстановленных пептидов-партнеров GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7). Аналогичные данные представлены на обеих из ФИГ. 9А-9В, причем на ФИГ. 9В показано увеличение ФИГ. 9А по оси у. Данные демонстрируют, что наибольший сигнал МС как для дисульфида, так и для соответствующих восстановленных пептидов-партнеров наблюдался в условиях проведенного частичного восстановления с 40 мкМ ТСЕР, и где подвижная фаза включала в себя 2 мМ глицина и 0,05% TFA по сравнению с образцами, обработанными 2 мМ ТСЕР, 0,12% NH₄OH, и 0,05% TFA или 2 мМ ТСЕР, 0,12% NH₄OH и 0,1% FA. Данные, полученные в условиях, в которых подвижная фаза включала в себя 2 мМ ТСЕР, 0,12% NH₄OH и 0,1% FA, показывают, что восстановленные пептиды-партнеры можно обнаружить с применением FA без глицина. Однако это, по-видимому, требует условий с высокими концентрациями других компонентов (2 мМ ТСЕР и 0,12% NH₄OH), которых, как описано выше, желательно избегать для получения улучшенного сигнала МС. При более слабых концентрациях (например, 40 мкМ ТСЕР, 0% NH₄OH) для обнаружения восстановленных пептидов требуется TFA в подвижной фазе.

Пример 2. Оптимизация обнаружения скремблированных дисульфидов методом МС/МС

[00155] Описанная выше стратегия частичного восстановления с применением ТСЕР (например, 20-100 мкМ), как было установлено, приводит к типичной эффективности восстановления 1-3%, что само по себе выше количества скремблированных дисульфидов при их низком содержании. Соответственно, признается, что даже при приемлемом сигнале MS1 сканирование MS2 при зависимой от данных регистрации (DDA) может отсутствовать и/или может быть слишком слабым, если сканирование MS2 происходит на хвостовых частях пика.

[00156] Для иллюстрации этих проблем 5 мкг расщепленного трипсином мАт2

подвергали tandemной масс-спектрометрии после частичного восстановления с 40 мкМ ТСЕР. Подвижная фаза включала в себя 2 мМ глицина и 0,05% TFA. На ФИГ. 10А показаны относительные количества (MS1) дисульфидного пептида и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), обозначен как R1, и TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2), обозначен как R2. На ФИГ. 10В представлено относительное количество в зависимости от m/z для второй стадии (MS2) анализа MC/MC. Как показано, даже при хорошем сигнале MS1 сигнал MS2 может быть слабым или может отсутствовать.

[00157] Соответственно, чтобы гарантировать, что сканирование MS2 присутствует и находится рядом с вершиной каждого пика, был разработан нацеленный подход MS2, соответствующий всем восстановленным цистеинсодержащим пептидам. В частности, на ФИГ. 10С представлен иллюстративный пример мАт, которое содержит 16 уникальных цистеиновых остатков, что соответствует 15 триптическим восстановленным пептидам, включая шарнирную область. Нацеливание на все комбинации дисульфидов по отдельности, без использования вышеописанной стратегии частичного восстановления, позволило бы получить 120 уникальных дисульфидных пептидов, 8 из которых являются нативными. Таким образом, при выполнении частичного восстановления необходимо нацелиться всего на ~ 15 восстановленных триптических пептидов, содержащих цистеин. Соответственно, методика может включать в себя построение перечня включений для мониторинга параллельный реакций (PRM) с ~ 15 пептидами и сканирование по всему градиенту. Количество восстановленных пептидов (например, ~ 15) указано приблизительно, так как опускается шарнирный пептид, но также могут потенциально существовать и другие неправильно расщепленные пептиды, которые могут быть включены в зависимости от предпочтений пользователя. Кроме того, разрешение MS1 можно снизить для увеличения количества сканирований MS2.

[00158] На ФИГ. 11 представлены спектры MC/MC дисульфида и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1) и STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7). Пептидные фрагменты получали посредством расщепления мАт2 трипсином. Данные, представленные на ФИГ. 11, иллюстрируют, что спектры MC/MC дисульфидов имеют большую степень сложности по сравнению с соответствующими восстановленными пептидами-партнерами и что выполнение после прохождения через колонку частичного восстановления с 40 мкМ ТСЕР обеспечивает более простое определение характеристик любых обнаруживаемых скремблированных дисульфидов. Иными словами, восстановленные пептиды имеют гораздо более простые спектры MC/MC, чем дисульфидные пептиды, так как спектры MC/MC дисульфидов имеют повышенную сложность из-за экспоненциально большего числа возможных фрагментов по сравнению с отдельными пептидами.

[00159] Для облегчения обнаружения методом MC/MC скремблированных дисульфидов была разработана описанная ниже система оценки достоверности. Система оценки достоверности состоит из пяти вопросов с ответом «да»/«нет». Первый вопрос

оценивает, определена ли масса MS1 конкретного дисульфида. Второй вопрос оценивает, определена ли масса MS1 первого восстановленного пептида-партнера. Третий вопрос оценивает, определена ли масса MS1 второго восстановленного пептида-партнера. На основании настоящего описания понятно, что первый восстановленный пептид-партнер и второй восстановленный пептид-партнер, соединенные цистеиновыми остатками, образуют дисульфид, упомянутый в первом вопросе. Четвертый вопрос оценивает, имеет ли идентификация MS2 методом Byonic первого восстановленного пептида-партнера оценку выше заданного порогового значения (например, > 200). Пятый вопрос оценивает, имеет ли идентификация MS2 методом Byonic второго восстановленного пептида-партнера оценку выше другого заданного порогового значения (например, > 200). Для каждого вопроса ответ «да» дает один балл, а каждый ответ «нет» не дает баллов, т. е. дает ноль баллов. Таким образом, оценка достоверности идентификации дисульфида проводится следующим образом: 0=не обнаружен, 1=низкая достоверность, 2=средняя достоверность, 3=высокая достоверность и 4 или 5=сверхвысокая достоверность. Для повышения точности определения достоверности можно использовать прогон дополнительного образца без частичного восстановления (например, в отсутствие TCEP) и определить, исчезли ли пики восстановленных пептидов при том же времени удерживания. Некоторые проблемы, которые могут усложнить такую схему определения достоверности: короткие (например, из 2-3 остатков пептиды) могут не обнаруживаться, а димерные дисульфидные пептиды имеют тот же m/z , что и соответствующие им восстановленные пептиды-партнеры (хотя см. ниже применительно к ФИГ. 31).

Пример 3. Количественная оценка скремблирования дисульфидов в мАт2

[00160] Вышеприведенный нацеленный подход MS2 для идентификации и присвоения значений достоверности скремблированным дисульфидам применяли к мАт2. В частности, мАт2 подвергали расщеплению трипсином в невозстанавливающих условиях, пептидные фрагменты разделяли посредством ВЭЖХ, и элюированные компоненты частично восстанавливали с 40 мкМ TCEP перед анализом МС/МС (например, нацеленным MS2). Для усиления сигнала МС применяли 2 мМ глицина. На ФИГ. 12 представлены триптические пептиды мАт2, которые содержат остаток цистеина с соответствующим обозначением цистеина, включающим в себя номер остатка и указание того, где находится остаток, - в легкой цепи (L) или тяжелой цепи (H).

[00161] Результаты представлены на ФИГ. 13, где приведены все возможные скремблированные дисульфидные соединения из мАт2, закодированные по уровню достоверности. 71,6% скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с высоким или сверхвысоким уровнем достоверности, 17% были идентифицированы со средним уровнем достоверности, а 11,3% были идентифицированы с низким уровнем достоверности. Из анализа исключены скремблированные пептиды, соответствующие шарниру. Данные показывают, что подавляющее большинство всех возможных скремблированных дисульфидов были обнаружимы в какой-либо степени. Эти результаты подняли вопрос о том, может ли скремблирование дисульфидов быть

искусственно вызвано протоколом, применяемым для расщепления трипсином. Соответственно, эта проблема была исследована так, как описано ниже.

[00162] На ФИГ. 14А-14С представлены разные протоколы расщепления, соответствующие протоколу для МАТ2 (ФИГ. 14А, который применялся для формирования данных, представленных на ФИГ. 13), протокола для МАТ3 (ФИГ. 14В) и набора для расщепления при низком рН (ФИГ. 14С) (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США). Как показано на ФИГ. 14А-14С, каждый протокол включает в себя аналогичные стадии (например, замену буферов, денатурацию, алкилирование, расщепление) с некоторыми указанными различиями. Каждый протокол включает в себя стадию алкилирования, которая в протоколах для МАТ2 и для МАТ3 включает в себя алкилирование йодацетамидом (IAM) и которая в наборе для расщепления при низком рН включает в себя N-этилмалеимид (NEM). Структуры IAM и NEM и то, как они метят остатки цистеина, приведены для справки на ФИГ. 15А и ФИГ. 15В соответственно. Другие основные различия между протоколами основаны на рН, при которых выполняются стадии денатурации, алкилирования и расщепления. Дополнительно процедура расщепления при низком рН включает в себя дополнительную стадию предварительного расщепления рекомбинантной протеазой Lys-C перед стадией расщепления, дополнительно включающей в себя трипсин. Важно отметить, что стадию денатурации/алкилирования для процедуры набора для расщепления при низком рН выполняют при рН 5,7, стадию предварительного расщепления выполняют при рН 5,3, а стадию расщепления выполняют при рН 5,3. Это отличается от аналогичных стадий, соответствующих протоколам для МАТ2 и для МАТ3, которые проводят при более высоком рН (например, 7,5).

[00163] На ФИГ. 16 показана УФ-хроматограмма, демонстрирующая, что, несмотря на низкий рН, связанный с процедурой для набора для расщепления при низком рН, процедура для набора для расщепления при низком рН позволяет получать результаты, сопоставимые с таковыми для процедур для МАТ2 и МАТ3. На ФИГ. 16 представлена УФ-хроматограмма от примерно 9 минут до примерно 72 минут. На ФИГ. 17А показана часть УФ-хроматограммы с выделением временного окна от примерно 14 минут до примерно 30 минут, а на ФИГ. 17В показана другая часть УФ-хроматограммы с на ФИГ. 16 с выделением временного окна от примерно 34 минут до примерно 49 минут. В совокупности ФИГ. 16-17В иллюстрируют, что с применением более низкого рН, связанного с процедурой для набора для расщепления при низком рН, можно добиться расщепления трипсином, сопоставимого с процедурами расщепления трипсином при более высоком рН (например, процедурами для МАТ2 и для МАТ3). Для УФ-хроматограмм, показанных на ФИГ. 16-17В, индивидуальные образцы соответствуют 5 мкг МАТ2, расщепленным посредством процедуры для МАТ2, процедуры для МАТ3 и процедуры набора для расщепления при низком рН.

[00164] Такие же образцы применяли для оценки того, есть ли какие-либо определяемые различия в сигнале МС в зависимости от применяемой процедуры

расщепления (например, процедуры для мАт2, процедуры для мАт3 или процедуры набора для расщепления при низком рН). На ФИГ. 18 представлен график, иллюстрирующий сигнал МС для ряда разных нативных дисульфидных пептидов, соответствующих расщепленному трипсином мАт2 (или трипсином с рекомбинантной LysC в случае набора для расщепления при низком рН). Как показано на ФИГ. 18, для всех нативных дисульфидов наблюдали сопоставимые интенсивности сигнала, независимо от того, применяли ли для получения дисульфидных пептидных фрагментов процедуру для мАт2, процедуру для мАт3 или процедуру набора расщепления при низком рН.

[00165] На ФИГ. 19А-19D представлено, что расщепление при низком рН имеет по всему белку аналогичную эффективность расщепления по сравнению с щелочными процедурами расщепления (например, процедурами для мАт2 и мАт3). Столбцы на ФИГ. 19А-19D представляют собой интегрирование пиков MS1 для пептидов, не содержащих цистеин, в пределах всех из различных областей мАт (например, VH, VL, CH1, CH2, CH3, CL). Данные на ФИГ. 19А-19D в комбинации с данными, представленными на ФИГ. 18, подтверждают, что отмеченные уровни скремблированных дисульфидов (см. ФИГ. 20А-20С) являются точными в отношении условий расщепления при низком рН. Поскольку данные свидетельствуют о сопоставимом расщеплении и уровне сигнала МС в образцах, расщепленных в кислотных условиях (например, с использованием процедуры набора для расщепления при низком рН), проводили оценку того, было ли количество скремблированных дисульфидов, идентифицированных изначально (см. ФИГ. 13), искусственно вызвано вариантом процедуры расщепления. На каждой из ФИГ. 20А-20С представлены таблицы, иллюстрирующие дисульфидные пептиды, обнаруженные в ходе процедуры, описанной выше, которая включала в себя нацеленный подход MS2. На ФИГ. 20А-20С показаны все возможные скремблированные дисульфидные соединения из мАт2, представленные в виде тепловой карты, соответствующей количественному содержанию скремблированного дисульфида для каждой из трех разных процедур расщепления, соответствующих процедуре для мАт2, процедуре для мАт3 и процедуре набора для расщепления при низком рН (см. ФИГ. 14А-14С). Для каждого возможного скремблированного дисульфида рассчитывали процент скремблирования в зависимости от конкретного метода расщепления (например, процедуры для мАт2, процедуры для мАт3 или процедуры для набора для расщепления при низком рН). Уравнение для расчета процента скремблирования показано на ФИГ. 20D. Вкратце, процент скремблирования определяли посредством деления площади пика скремблированного дисульфида на сумму средних площадей пиков как нативных дисульфидов, так и скремблированного дисульфида. Как можно видеть на ФИГ. 20А-20С, все скремблированные дисульфиды количественно составляли менее 0,01% при применении процедуры расщепления при низком рН по сравнению с более высокими процентными долями при применении процедур расщепления с более высоким рН (например, процедур для мАт2 и для мАт3). Для некоторых из дисульфидов наблюдалась интерференция, а на ФИГ. 20Е показан

типичный пример такой интерференции.

[00166] ФИГ. 20А включает в себя овальное выделенное окно с особенно высоким выявленным содержанием скремблированного дисульфида (C152H-C139H), как и в случае ФИГ. 20С (C23L-C22H). Эти результаты исследовали дополнительно, как описано в отношении ФИГ. 21А-21В. В частности, на ФИГ. 21А-21В представлено относительное количество скремблированных дисульфидов с большой распространенностью, если процедуры расщепления трипсином проводились при более высоком рН (например, процедуры для МАт2 и для МАт3) или при более низком рН (процедура набора для расщепления при низком рН). На ФИГ. 21А представлен пептид C152H-C139H, который соответствует восстановленным пептидам-партнерам STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7) и GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1), а на ФИГ. 21В представлен пептид C23L-C22H, соответствующий дисульфиду соответствующих восстановленных пептидов-партнеров DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR (SEQ ID NO: 12) и LSCAGSGFTFR (SEQ ID NO: 8). Для каждого из ФИГ. 21А-21В относительные количества показаны в зависимости от протокола расщепления (протокол для МАт2, протокол для МАт3 или протокол для расщепления при низком рН). Как представлено на обоих из ФИГ. 21А-21В, ЕИС-хроматограммы позволяют легко различать дисульфиды с большой распространенностью от фонового шума при проведении расщепления с использованием протокола для МАт2 и протокола для МАт3, но ЕИС-хроматограмма скремблированного дисульфида была неотличима от фонового шума в условиях расщепления при низком рН. Для каждого условия образцы включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином МАт2 (или трипсином с устойчивой к низкому рН рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком рН) и 2 мМ глицина. Это наблюдение согласуется с данными, представленными на ФИГ. 22, на которых показана УФ-хроматограмма скремблированного дисульфида C152H-C139H (который соответствует восстановленным пептидам-партнерам STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7) и GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1)), которая, как было указано, имеет скремблированный дисульфид с большой распространенностью при применении для получения образцов либо протокола для МАт2, либо протокола для МАт3. В частности, на ФИГ. 22 представлено отсутствие соответствующего пика для образца, полученного с помощью процедуры набора для расщепления при низком рН, по сравнению с пиками, наблюдаемыми при приготовлении образцов посредством процедур расщепления для МАт2 и для МАт3.

Пример 4. Количественная оценка скремблирования дисульфидов в МАт5

[00167] Набор экспериментов, аналогичный рассмотренным выше в отношении примера 3, проводили на другом моноклональном антителе, называемом в настоящем документе МАт5. На ФИГ. 23А-23С представлены разные протоколы расщепления, в частности процедура для МАт4, процедура для МАт5 и такая же процедура набора для расщепления при низком рН, как описано выше и показано на ФИГ. 14С. Подробности каждой процедуры представлены на ФИГ. 23А-23С, причем основное различие заключается в более низком рН для стадии денатурации/алкилирования (например, рН

5,7) и стадии расщепления (например, pH 5,3) в процедуре набора для расщепления при низком pH по сравнению с процедурами расщепления для мАт4 и для мАт5.

[00168] На ФИГ. 24 представлены наложенные УФ-хроматограммы, соответствующие расщепленному трипсином мАт5 (или трипсином с рекомбинантной LysC в случае протокола набора для расщепления при низком pH), при применении каждой из процедур расщепления, иллюстративно представленных на ФИГ. 23А-23С (например, процедуры для мАт4, процедуры для мАт5 и процедуры набора для расщепления при низком pH). Аналогично показанному выше для антитела мАт2 (см. ФИГ. 16-17В), на ФИГ. 24 представлено, что несмотря на низкий pH, связанный с процедурой набора для расщепления при низком pH, было достигнуто расщепление, сопоставимое с расщеплением с применением процедур для мАт4 и для мАт5. Прогоны образцов для получения хроматограммы, показанной на ФИГ. 24, включали в себя 5 мкг расщепленного трипсином мАт5 (или трипсином вместе с устойчивой к низкому pH рекомбинантной LysC в случае протокола расщепления при низком pH) в присутствии 2 mM глицина. На ФИГ. 25А-25В представлены участки полной хроматограммы, показанной на ФИГ. 24, для лучшего визуального разрешения и подчеркивания того факта, что расщепление мАт5 было аналогичным, независимо от того, применялись условия с более высоким уровнем pH (например, процедуры расщепления для мАт4 и для мАт5) или условия с более низким pH (например, процедура набора для расщепления при низком pH).

[00169] Такие же образцы, описанные в отношении ФИГ. 24-25В, применяли для оценки того, имеются ли какие-либо определяемые различия в сигнале МС в зависимости от применяемой процедуры расщепления (например, процедуры для мАт4, процедуры для мАт5 или процедуры набора для расщепления при низком pH). На ФИГ. 26 представлен график, иллюстрирующий сигнал МС (например, площадь пика) для ряда различных нативных дисульфидных пептидов, соответствующих расщепленному трипсином мАт5 (или трипсином с рекомбинантной LysC в случае набора для расщепления при низком pH). Как показано на ФИГ. 26, для всех нативных дисульфидов наблюдали сопоставимые интенсивности сигнала, независимо от того, применяли ли для получения дисульфидных пептидных фрагментов процедуру для мАт4, процедуру для мАт5 или процедуру набора для расщепления при низком pH.

[00170] На ФИГ. 27А-Д представлено, что расщепление при низком pH имеет по всему белку аналогичную эффективность расщепления по сравнению с щелочными процедурами расщепления (например, процедурами для мАт4 и мАт5). Столбцы на ФИГ. 27А-27Д представляют собой интегрирование пиков MS1 для пептидов, не содержащих цистеин, в пределах всех из различных областей мАт (например, VH, VL, CH1, CH2, CH3, CL). Данные на ФИГ. 27А-27Д в комбинации с данными, представленными на ФИГ. 26, подтверждают, что отмеченные уровни скремблированных дисульфидов (см. ФИГ. 30А-30С) являются точными в отношении условий расщепления при низком pH.

[00171] Вышеописанный нацеленный подход MS2 для идентификации и

присвоения значений достоверности скремблированным дисульфидам был применен к мАт5. В частности, мАт5 подвергали расщеплению трипсином в невозстанавливающих условиях с применением процедуры расщепления для мАт4, пептидные фрагменты разделяли посредством ВЭЖХ, а элюированные компоненты частично восстанавливали с 40 мкМ ТСЕР перед анализом МС/МС (например, нацеленным MS2). Для усиления сигнала МС применяли 2 мМ глицина. На ФИГ. 28 представлены триптические пептиды мАт5, которые содержат остаток цистеина с соответствующим обозначением цистеина, включающим в себя номер остатка и указание того, где находится остаток, - в легкой цепи (L) или тяжелой цепи (H).

[00172] Результаты представлены на ФИГ. 29, где приведены все возможные скремблированные дисульфидные соединения из мАт2, закодированные по уровню достоверности. 63,3% скремблированных дисульфидных соединений были идентифицированы с высоким или сверхвысоким уровнем достоверности, 20% были идентифицированы со средним уровнем достоверности, а 16,7% были идентифицированы с низким уровнем достоверности. Из анализа исключены скремблированные пептиды, соответствующие шарниру. Данные показывают, что подавляющее большинство всех возможных скремблированных дисульфидов были обнаружимы в какой-либо степени. Опять же, эти результаты подняли вопрос о том, может ли скремблирование дисульфидов быть искусственно вызвано протоколом, применяемым для расщепления трипсином.

[00173] Соответственно, эту проблему исследовали так же, как описано выше для антитела мАт2. В частности, для антитела мАт5 был проведен эксперимент по определению того, было ли выявленное количество скремблированных дисульфидов (см. ФИГ. 29) искусственно вызвано выбором процедуры расщепления (например, процедурой расщепления с более высоким pH). На каждом из ФИГ. 30А-30С представлены таблицы, иллюстрирующие дисульфиды, обнаруженные посредством процедуры, описанной выше, которая включала в себя нацеленный подход MS2, в комбинации с системой оценки достоверности, которая присваивает уровни достоверности каждому идентифицированному дисульфидному пептидному фрагменту. На ФИГ. 30А-30С показаны все возможные скремблированные дисульфидные соединения из мАт5 с кодировкой уровня достоверности, аналогичной описанной для ФИГ. 29 для каждой из трех различных процедур расщепления, соответствующих процедуре для мАт4, процедуре для мАт5 и процедуре набора для расщепления при низком pH (см. ФИГ. 23А-23С). Для каждого возможного скремблированного дисульфида рассчитывали процент скремблирования в зависимости от конкретного метода расщепления (например, процедуры для мАт4, процедуры для мАт5 или процедуры для набора для расщепления при низком pH). Уравнение для расчета процента скремблирования показано на ФИГ. 20D и рассмотрено выше. Как можно видеть на ФИГ. 30А-30С, все скремблированные дисульфиды количественно составляют менее 0,01% при применении процедуры расщепления при низком pH по сравнению с более высокими процентными долями при применении процедур расщепления с более высоким pH (например, процедур для мАт2 и

для мАт3). Для некоторых из дисульфидов наблюдали интерференцию, аналогичную описанной выше и показанной в качестве примера на ФИГ. 20Е.

[00174] В совокупности методику, описанную в настоящем документе, можно эффективно применять для идентификации малочисленных скремблированных дисульфидов в биомолекулах, например моноклональных антителах.

[00175] Эти примеры демонстрируют, что частичное восстановление с ТСЕР после прохождения через колонку является простым и эффективным способом идентификации скремблированных дисульфидных пептидов посредством получения более простых МС/МС спектров (по сравнению со спектрами МС/МС интактных дисульфидных пептидов), и при этом все компоненты имеют в точности одинаковое время удерживания. Дополнительно эксперименты показывают, что расщепление при более щелочных (например, pH 7,5) условиях могут индуцировать искусственное скремблирование дисульфидов. Таким образом, содержание искусственно скремблированных дисульфидных пептидов может зависеть от протокола расщепления, и скремблированию дисульфидов способствуют, вероятно, но не исключительно, свободные тиолы. Выполнение невозстанавливающего расщепления в более кислотных условиях (например, pH 5,7) может препятствовать искусственному скремблированию дисульфидов. Наконец, было показано, что мАт, описанные в настоящем документе (например, мАт2 и мАт5), содержат пренебрежимо малые реальные уровни скремблированных дисульфидов.

[00176] Несмотря на то что в настоящем документе были проиллюстрированы и описаны определенные варианты осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что широкий спектр альтернативных и/или эквивалентных вариантов осуществления или вариантов реализации, рассчитанных на достижение одинаковых целей, может использоваться вместо показанных и описанных вариантов осуществления, без отступления от объема изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что варианты осуществления могут быть реализованы широким спектром различных способов. Настоящая заявка предназначена для того, чтобы охватить любые адаптации или вариации вариантов изобретения, описанных в настоящем документе. Таким образом, очевидно, что варианты осуществления ограничены только пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле, включающий в себя:

выполнение расщепления биомолекулы в невозстанавливающих условиях с получением образца, который включает в себя множество фрагментов биомолекулы;

приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с подложкой колонки;

нанесение первого градиента подвижной фазы на разделительную колонку, причем первый градиент подвижной фазы содержит трифторуксусную кислоту (TFA) и низкомолекулярную добавку в концентрации примерно 1-2 мМ;

нанесение второго градиента подвижной фазы на разделительную колонку, при этом второй градиент подвижной фазы содержит TFA в ацетонитриле (ACN) и низкомолекулярную добавку в концентрации примерно 1-2 мМ;

выполнение процедуры частичного восстановления посредством обработки элюированных компонентов образца трис(2-карбоксиэтил)фосфином (TCEP) в концентрации 10-100 мкМ;

введение частично восстановленных элюированных компонентов образца в масс-спектрометр; и

выполнение масс-спектрометрического анализа на частично восстановленных элюированных компонентах образца для идентификации одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле.

2. Способ по п. 1, в котором низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина.

3. Способ по п. 2, в котором низкомолекулярная добавка представляет собой глицин.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина.

5. Способ по п. 4, в котором низкомолекулярная добавка представляет собой глицин.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором концентрация TFA в первой подвижной фазе составляет от примерно 0,05% до 0,1% TFA в H₂O.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором концентрация TFA во второй подвижной фазе составляет примерно 0,05% TFA в 80% ACN и 20% H₂O или примерно 0,1% TFA в 80% ACN и 20% H₂O.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором процедура частичного восстановления проводится в течение 500 мс-3 с.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором выполнение расщепления биомолекулы дополнительно включает в себя:

проведение стадии денатурации и алкилирования с получением денатурированной алкилированной биомолекулы;

проведение стадии предварительного расщепления денатурированной алкилированной биомолекулы с получением предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы; и

проведение стадии расщепления предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы после стадии предварительного расщепления с получением образца, который приводят в контакт с разделительной колонкой.

10. Способ по п. 9, в котором стадия денатурации и алкилирования включает в себя денатурирование биомолекулы в 7-9 М растворе мочевины в присутствии алкилирующего агента при pH примерно 5,5-5,9.

11. Способ по п. 9 или 10, дополнительно включающий в себя стадию денатурации и алкилирования при 45-55 °C.

12. Способ по п. 10 или 11, в котором алкилирующий агент представляет собой N-этилmaleимид (NEM) в концентрации 5-15 mM.

13. Способ по п. 10 или 11, в котором алкилирующий агент представляет собой йодацетамид (IAM) в концентрации примерно 0,5-5 mM.

14. Способ по любому из пп. 9-13, дополнительно включающий в себя проведение стадии денатурации и алкилирования в течение 20-40 минут.

15. Способ по любому из пп. 9-14, в котором проведение стадии предварительного расщепления дополнительно включает в себя инкубацию денатурированной алкилированной биомолекулы в присутствии рекомбинантной протеазы Lys-C при pH 5-5,6.

16. Способ по любому из пп. 9-15, дополнительно включающий в себя проведение стадии предварительного расщепления при 35-40 °C.

17. Способ по любому из пп. 9-16, дополнительно включающий в себя проведение стадии предварительного расщепления в течение периода от 30 минут до 90 минут.

18. Способ по любому из пп. 15-17, в котором отношение рекомбинантной протеазы Lys-C к денатурированной алкилированной биомолекуле составляет от 1 : 5 до 1 : 20 соответственно.

19. Способ по любому из пп. 9-18, в котором проведение стадии расщепления дополнительно включает в себя инкубацию предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекулы в присутствии рекомбинантной протеазы Lys-C и протеазы трипсина при pH 5-5,6.

20. Способ по любому из пп. 9-19, в котором отношение рекомбинантной протеазы Lys-C к предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекуле во время стадии расщепления составляет приблизительно от 1 : 5 до 1 : 20 соответственно.

21. Способ по любому из пп. 9-20, в котором отношение протеазы трипсина к предварительно расщепленной денатурированной алкилированной биомолекуле составляет от 1 : 2 до 1 : 10 соответственно.

22. Способ по любому из пп. 9-21, дополнительно включающий в себя проведение стадии расщепления при 35-40 °С.

23. Способ по любому из пп. 9-22, дополнительно включающий в себя проведение стадии расщепления в течение 2-4 часов.

24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором частично восстановленные элюированные компоненты образца включают в себя один или более дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров.

25. Способ по п. 24, в котором каждый из одного или более дисульфидных пептидов и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров поступают в масс-спектрометр одновременно.

26. Способ по п. 25, в котором масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр; и

при этом выполнение масс-спектрометрического анализа включает в себя получение спектров MS1 и спектров MS2.

27. Способ по п. 26, дополнительно включающий в себя построение перечня включений для мониторинга параллельных реакций (PRM) с соответствующими восстановленными пептидами-партнерами.

28. Способ по п. 26 или 27, дополнительно включающий в себя назначение оценки достоверности идентификации дисульфида для одного или более дисульфидных пептидов на основе системы оценки достоверности.

29. Способ по п. 28, в котором система оценки достоверности дополнительно включает в себя:

указание того, идентифицирована ли масса MS1 дисульфидного пептида посредством масс-спектрометрического анализа;

указание того, идентифицирована ли масса MS1 первого восстановленного пептида-партнера, соответствующего дисульфидному пептиду, посредством масс-спектрометрического анализа;

указание того, идентифицирована ли масса MS1 второго восстановленного пептида-партнера, соответствующего дисульфидному пептиду, посредством масс-спектрометрического анализа;

указание того, идентифицирована ли масса MS2 первого восстановленного пептида-партнера с оценкой, которая выше заданного порогового значения;

указание того, идентифицирована ли масса MS2 второго восстановленного пептида-партнера с оценкой, которая выше заданного порогового значения;

для каждой из стадий указания в системе оценки достоверности - присвоение одного балла, если соответствующий пептид идентифицирован, и нуля баллов, если соответствующий пептид не идентифицирован;

суммирование единичных баллов; и

назначение оценки достоверности идентификации дисульфида на основе суммы, причем чем больше сумма, тем выше достоверность.

30. Способ по любому из пп. 1-29, в котором выполнение масс-спектрометрического анализа дополнительно включает в себя:

определение процентной доли скремблирования дисульфидов для каждой из одной или более ненативных дисульфидных связей в биомолекуле;

причем процентная доля скремблирования дисульфидов представляет собой отношение средней площади пика пептида, который включает в себя ненативную дисульфидную связь, к сумме средней площади пика пептида, который включает в себя ненативную дисульфидную связь, и средней площади другого пика двух пептидов, которые включают в себя нативные дисульфидные связи, соответствующие остаткам цистеина, участвующим в образовании ненативной дисульфидной связи.

31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором концентрация ТСЕР составляет от 20 мкМ до 80 мкМ.

32. Способ по п. 31, в котором концентрация ТСЕР составляет 40 мкМ.

33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором биомолекула представляет собой моноклональное антитело; и

при этом моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

34. Способ по п. 33, в котором моноклональное антитело получено рекомбинантным способом.

35. Способ идентификации одной или более скремблированных дисульфидных связей в биомолекуле, включающий в себя:

выполнение расщепления биомолекулы в невозстанавливающих условиях и при кислотном pH с получением образца, который включает в себя один или более дисульфидных пептидов;

приведение образца в контакт с разделительной колонкой для разделения компонентов образца, причем разделение компонентов осуществляют в присутствии глицина в концентрации 1-2 мМ;

частичное восстановление элюированных компонентов образца после разделения на разделительной колонке; и

выполнение масс-спектрометрического анализа посредством tandemного масс-спектрометра на частично восстановленных элюированных компонентах образца, что включает в себя идентификацию посредством первого масс-анализатора массы MS1 каждого из одного или более дисульфидных пептидов и/или соответствующих восстановленных пептидов-партнеров и идентификацию посредством второго масс-анализатора массы MS2 только одного или более соответствующих восстановленных пептидов-партнеров посредством нацеливания только на соответствующие восстановленные пептиды-партнеры, а не на каждый из одного или более дисульфидных пептидов.

36. Способ по п. 35, в котором нацеливание только на соответствующие восстановленные пептиды-партнеры, а не на каждый из одного или более дисульфидных

пептидов, дополнительно включает в себя:

построение перечня включений для мониторинга параллельных реакций только с соответствующими восстановленными пептидами-партнерами.

37. Способ по п. 35 или 36, дополнительно включающий в себя:

назначение оценки достоверности идентификации дисульфида для каждого из одного или более дисульфидных пептидов.

38. Способ по п. 37, в котором назначение оценки достоверности идентификации дисульфида основано на системе оценки достоверности идентификации дисульфида, которая включает в себя назначение балла для каждой идентифицируемой массы MS1 и балла для каждой идентифицируемой массы MS2 конкретного дисульфидного пептида и соответствующих восстановленных пептидов-партнеров выше заданного порогового уровня обнаружения; и

суммирование баллов для получения оценки достоверности идентификации дисульфида, где максимальный балл равен 5 и соответствует наивысшему уровню достоверности.

39. Способ по любому из пп. 35-38, в котором выполнение масс-спектрометрического анализа дополнительно включает в себя:

определение процентной доли скремблирования дисульфидов для каждой из одной или более скремблированных дисульфидных связей в биомолекуле;

причем процентная доля скремблирования дисульфидов представляет собой отношение средней площади пика пептида, который включает в себя скремблированную дисульфидную связь, к сумме средней площади пика пептида, который включает в себя скремблированную дисульфидную связь, и средней площади другого пика двух пептидов, которые включают в себя нативные дисульфидные связи, соответствующие остаткам цистеина, участвующим в образовании скремблированной дисульфидной связи.

40. Способ по любому из пп. 35-40, в котором частичное восстановление элюированных компонентов образца после разделения разделительной колонкой проводят посредством обработки трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР) в концентрации 10-100 мкМ.

41. Способ по п. 40, в котором концентрация ТСЕР составляет 20-80 мкМ.

42. Способ по п. 40, в котором концентрация ТСЕР составляет 40 мкМ.

43. Способ по п. 40, дополнительно включающий в себя частичное восстановление элюированных компонентов образца в течение периода времени примерно 1-3 секунды.

44. Способ по любому из пп. 35-43, в котором частичное восстановление элюированных компонентов образца происходит с эффективностью восстановления примерно 1-3%.

45. Способ по любому из пп. 35-44, в котором разделительная колонка представляет собой колонку для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

46. Способ по любому из пп. 35-44, в котором разделительная колонка

представляет собой колонку для жидкостной хроматографии на основе гидрофильных взаимодействий (HILIC).

47. Способ по любому из пп. 35-46, в котором разделение компонентов на разделительной колонке осуществляют в присутствии 0,05-0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) и в отсутствие NH_4OH .

48. Способ по любому из пп. 35-47, в котором кислотный pH составляет 5-5,6.

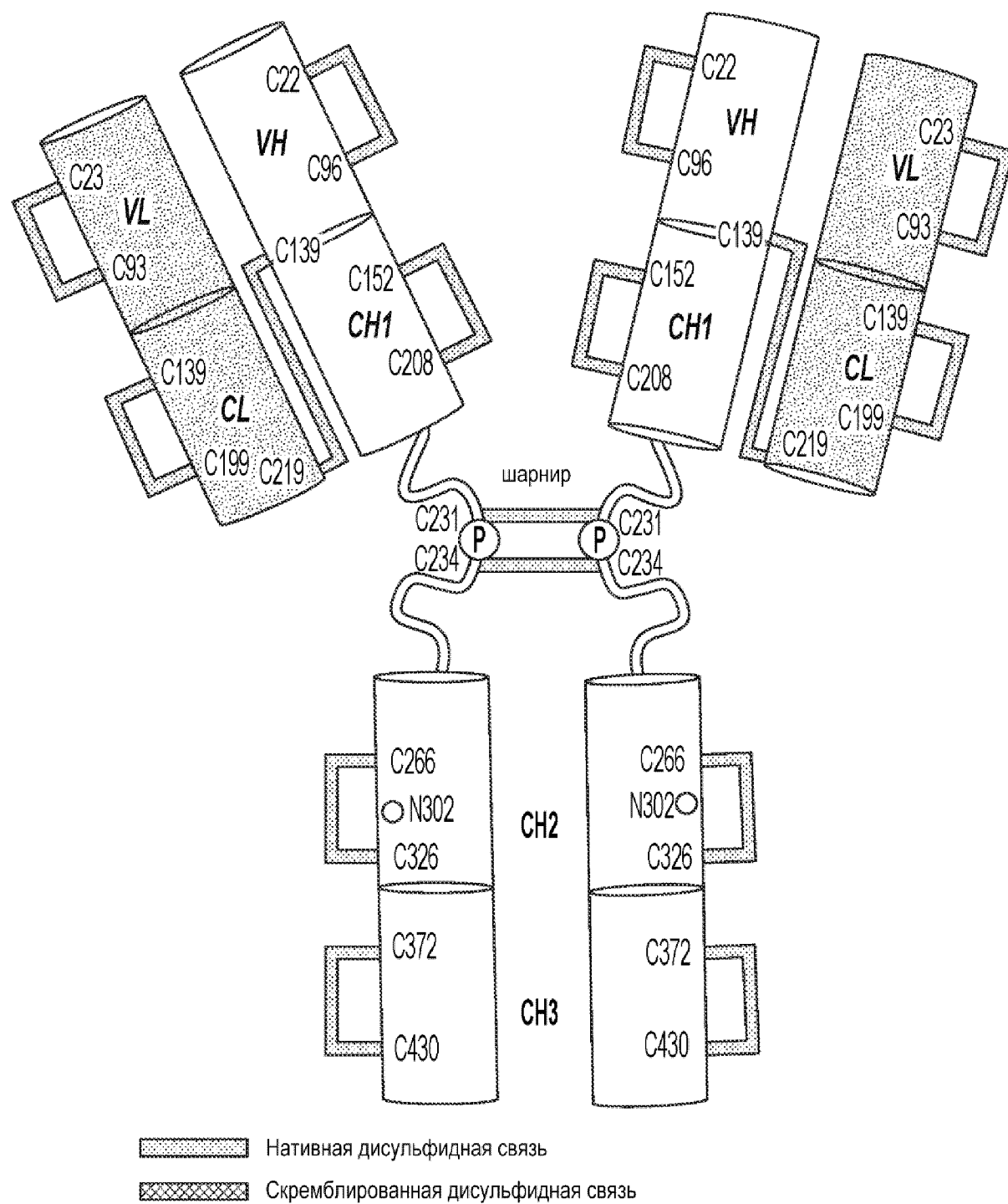
49. Способ по любому из пп. 35-48, в котором выполнение расщепления включает в себя инкубацию биомолекулы в присутствии рекомбинантной протеазы Lys-C и протеазы трипсина.

50. Способ по любому из пп. 35-49, дополнительно включающий в себя перед проведением расщепления денатурирование биомолекулы в присутствии одного или более алкилирующих агентов при pH 5,5-5,9.

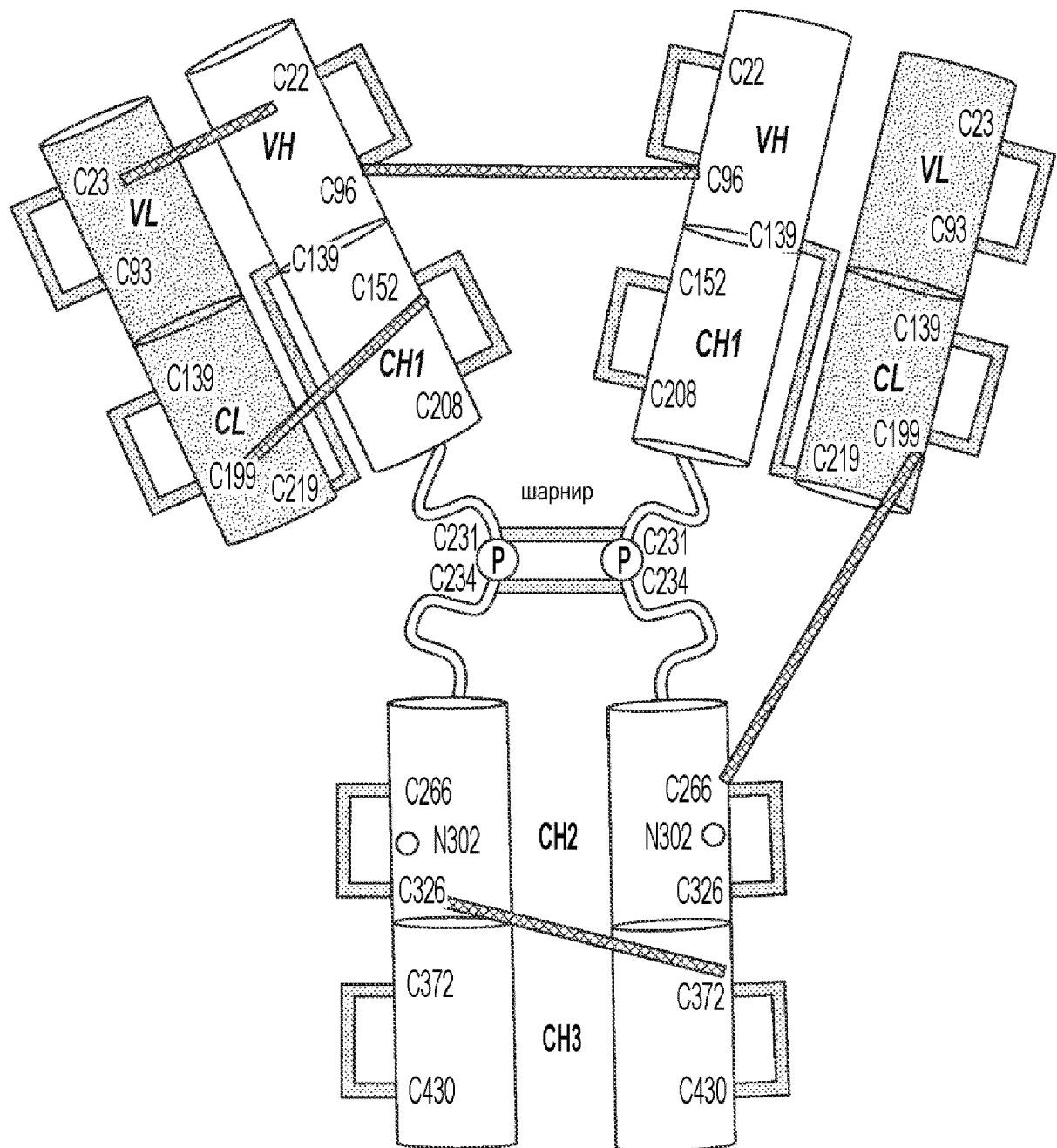
51. Способ по любому из пп. 35-50, в котором биомолекула представляет собой моноклональное антитело; и при этом моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

По доверенности

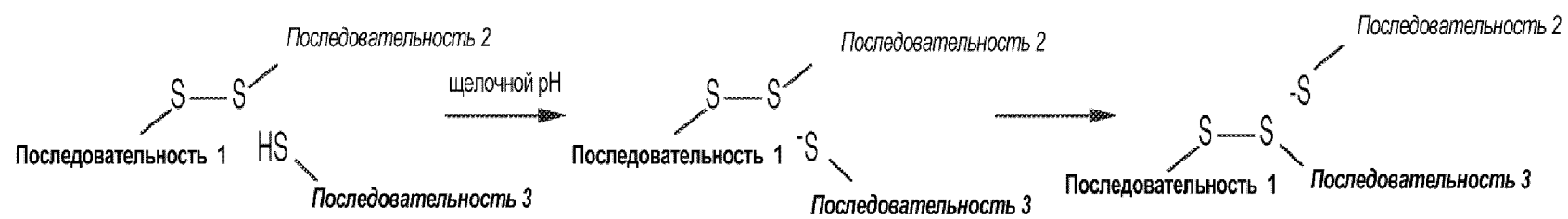
1/66



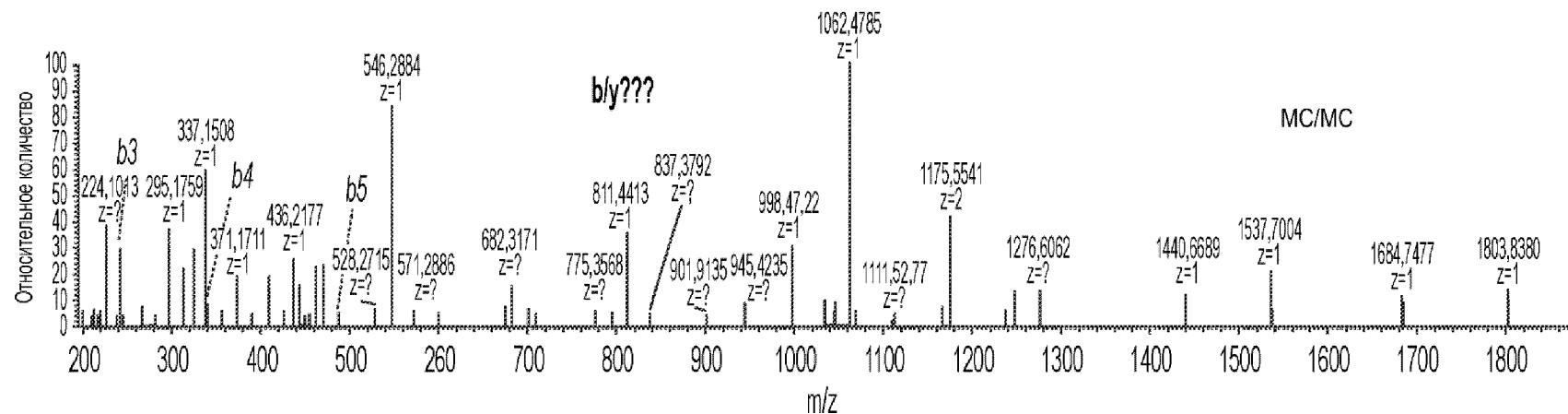
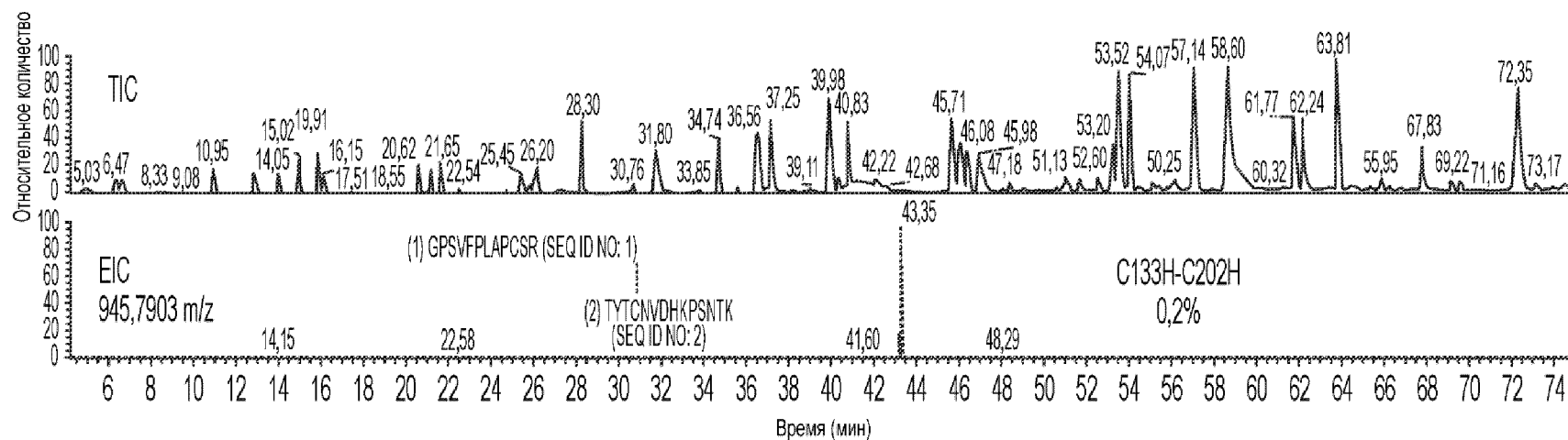
ФИГ. 1А



ФИГ. 1А (ПРОДОЛЖ.)

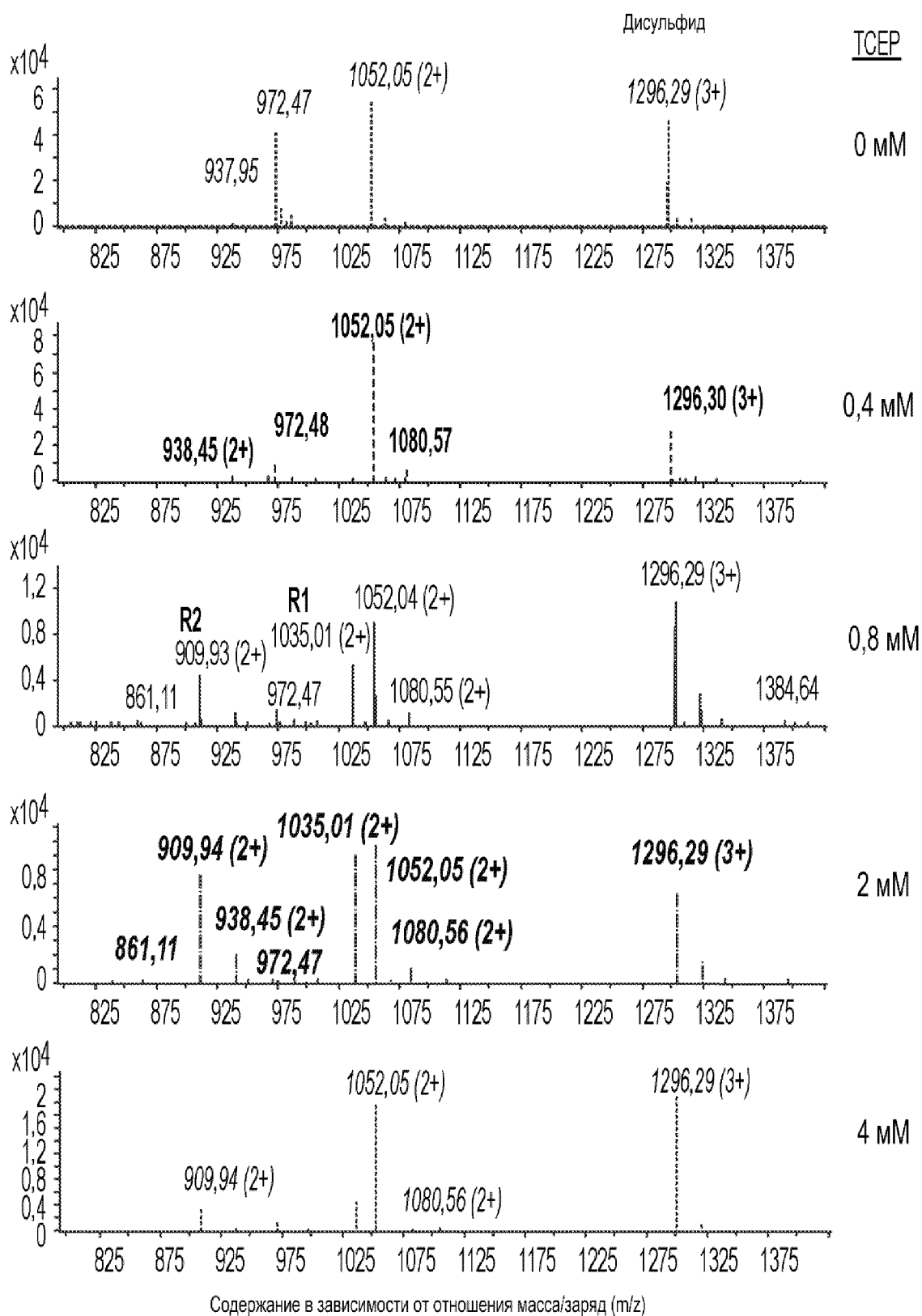


ФИГ. 1В

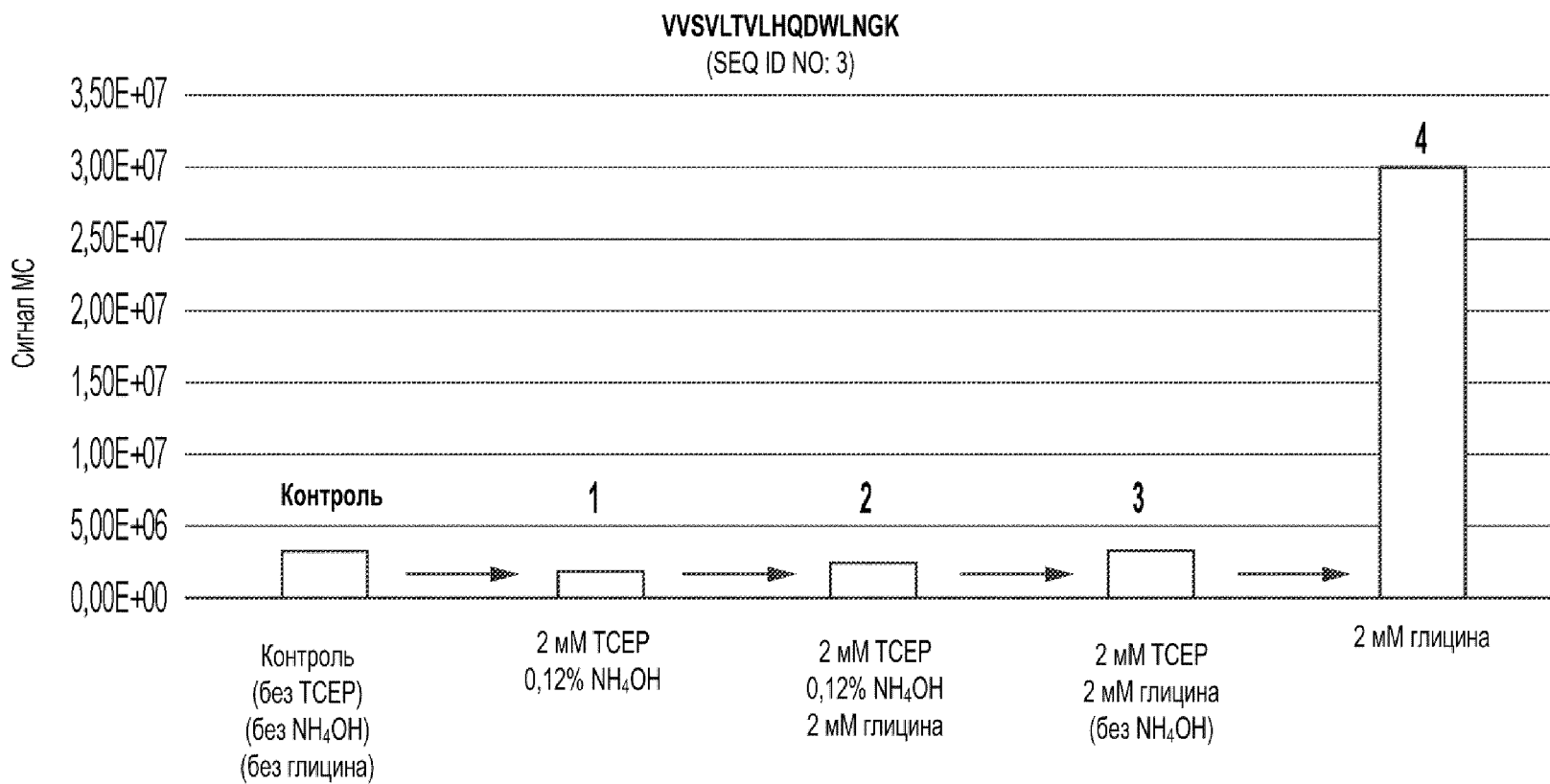


ФИГ. 2

5/66



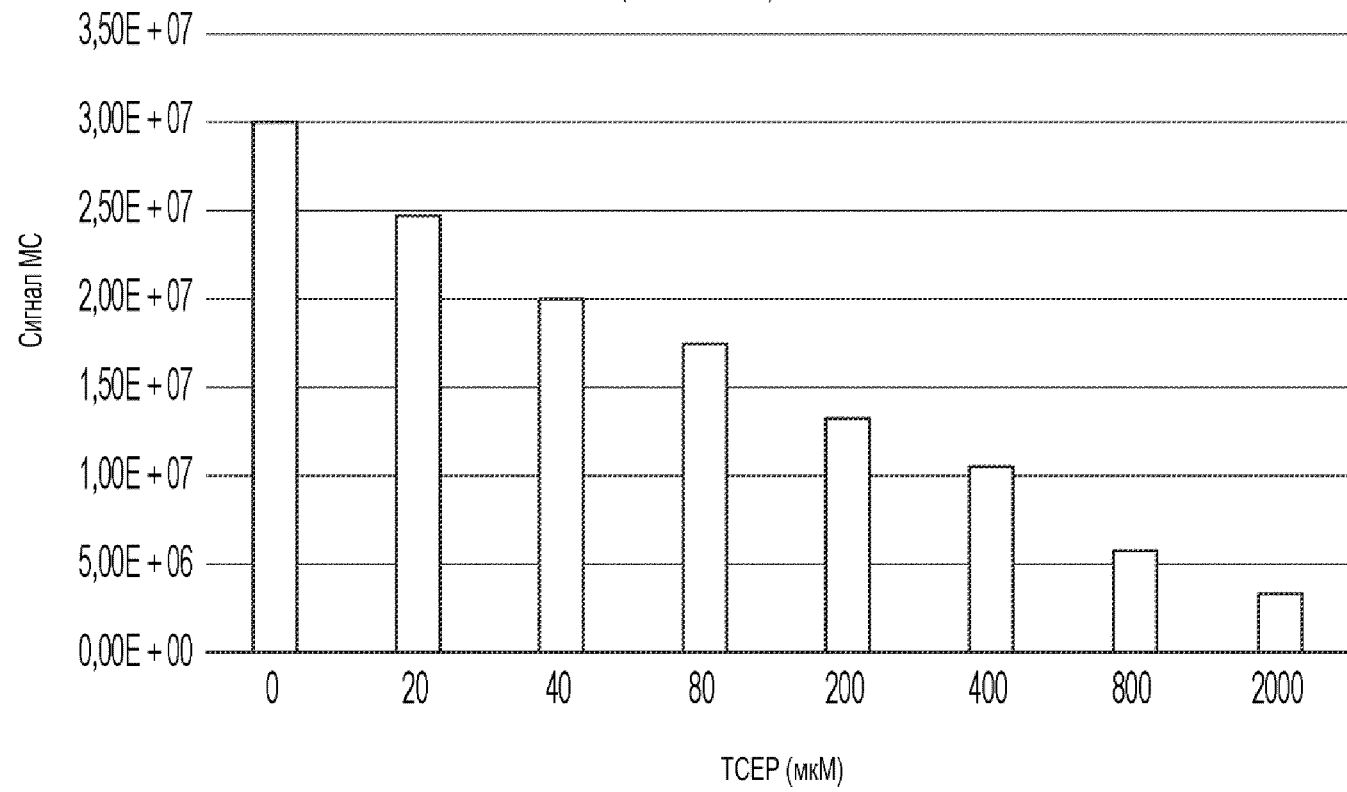
ФИГ. 3



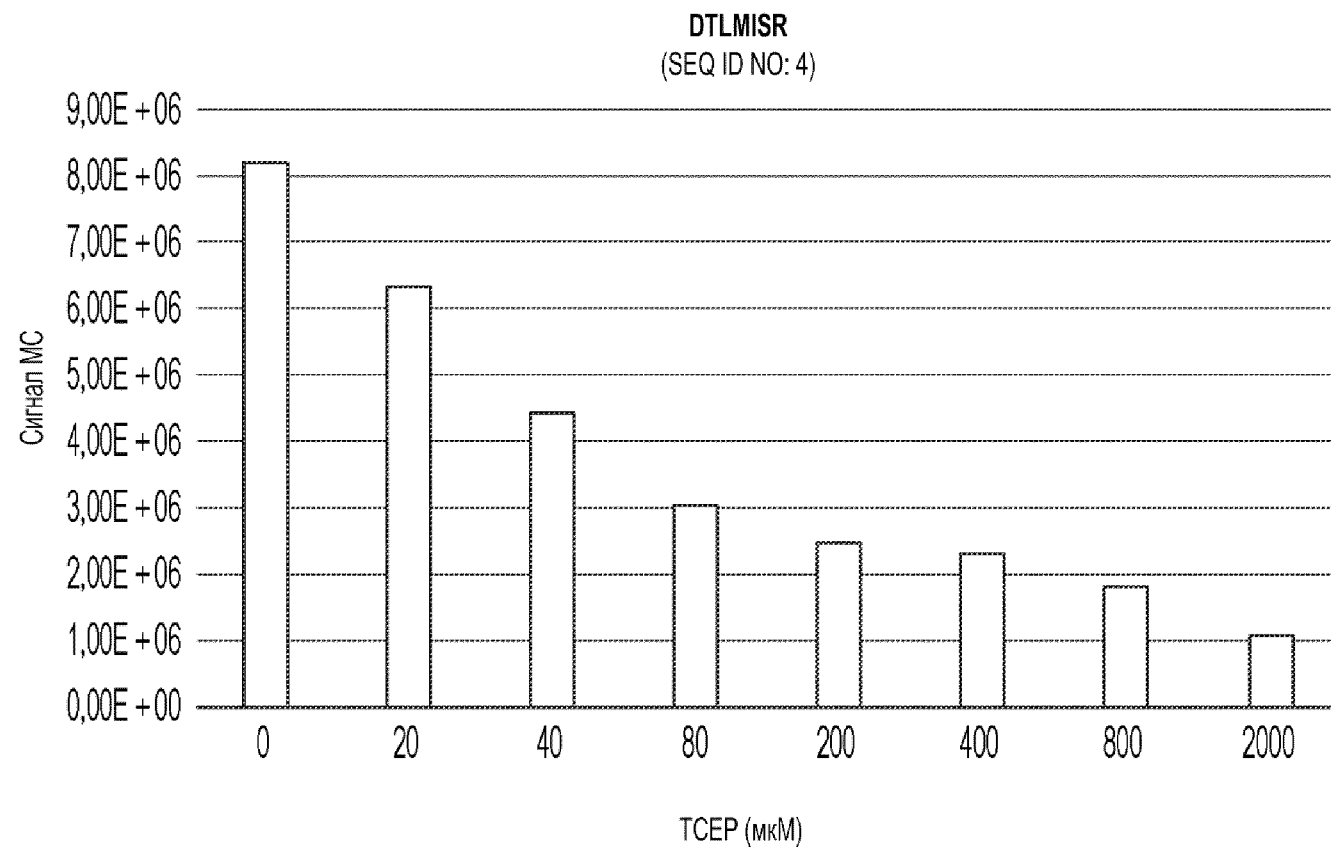
Компоненты инфузии в шприце

ФИГ. 4

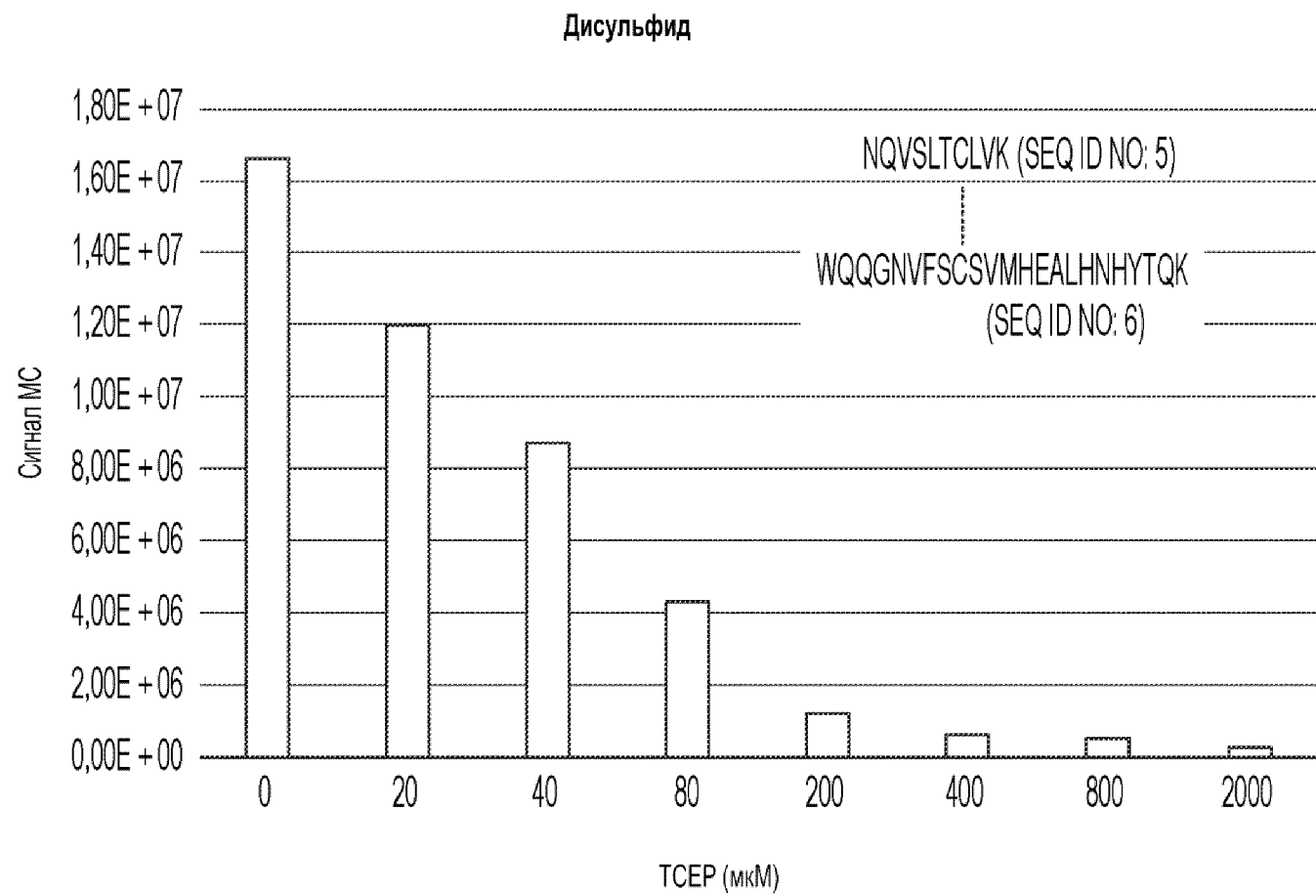
VSVLTVLHQDWLNGK
(SEQ ID NO: 3)



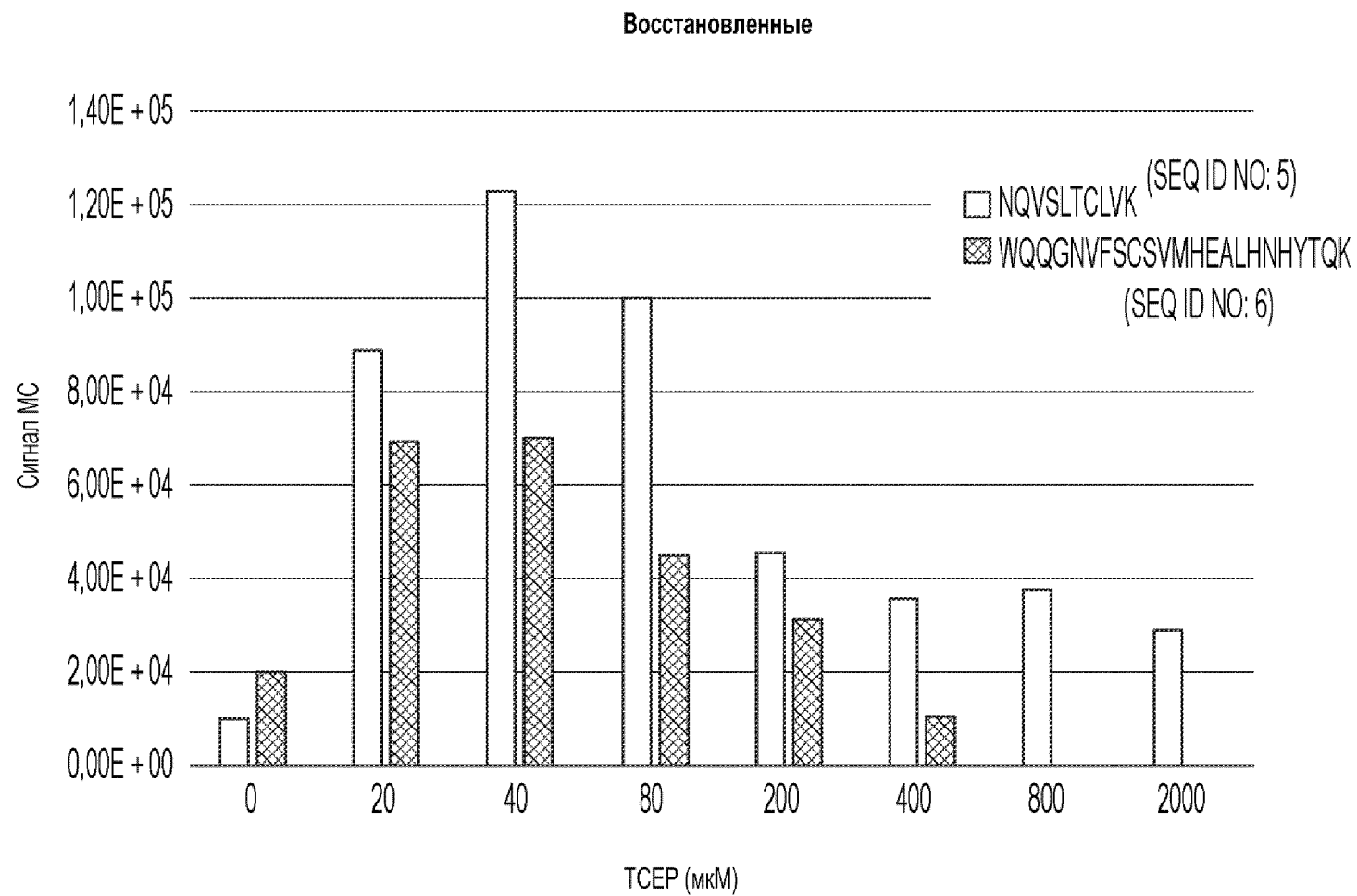
ФИГ. 5А



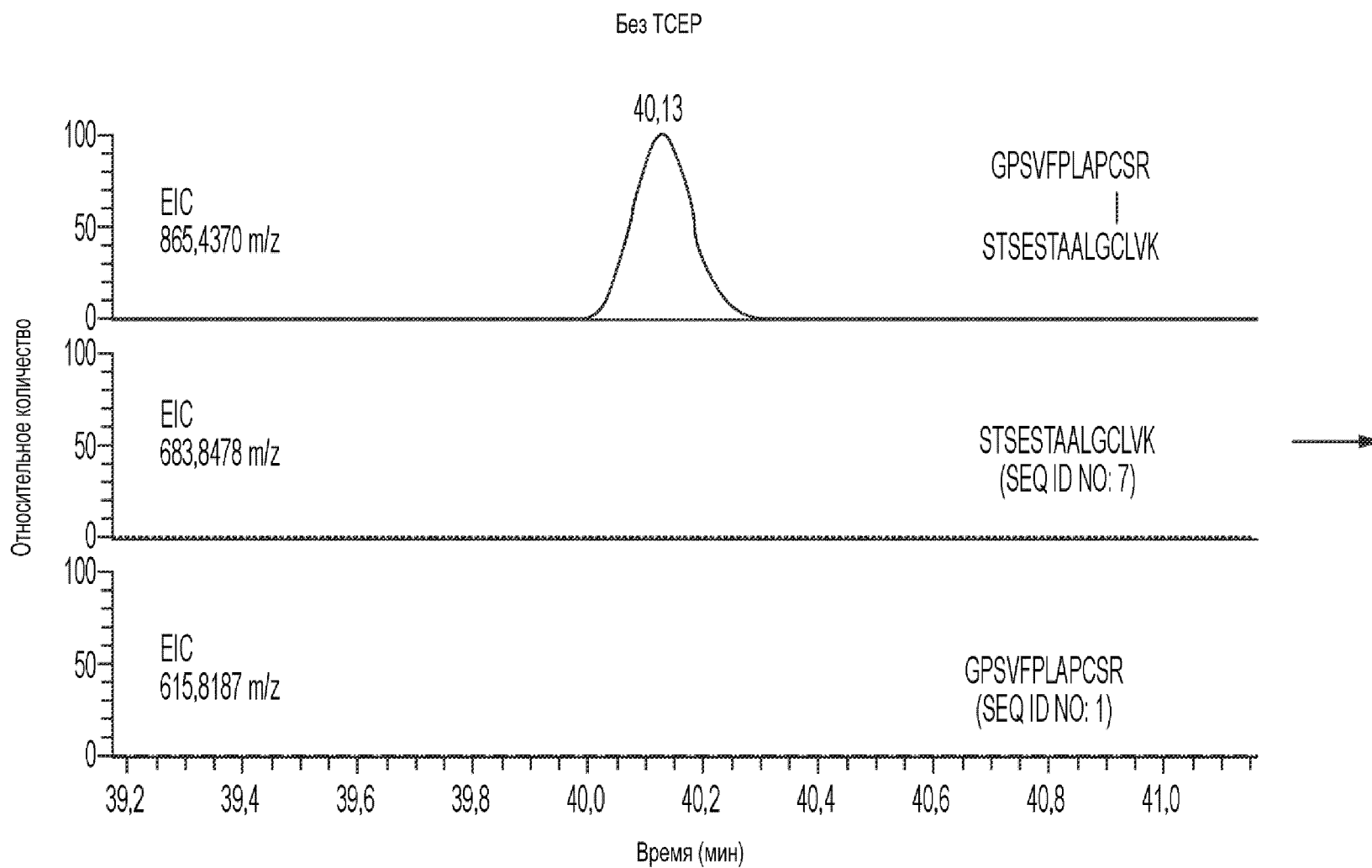
ФИГ. 5В



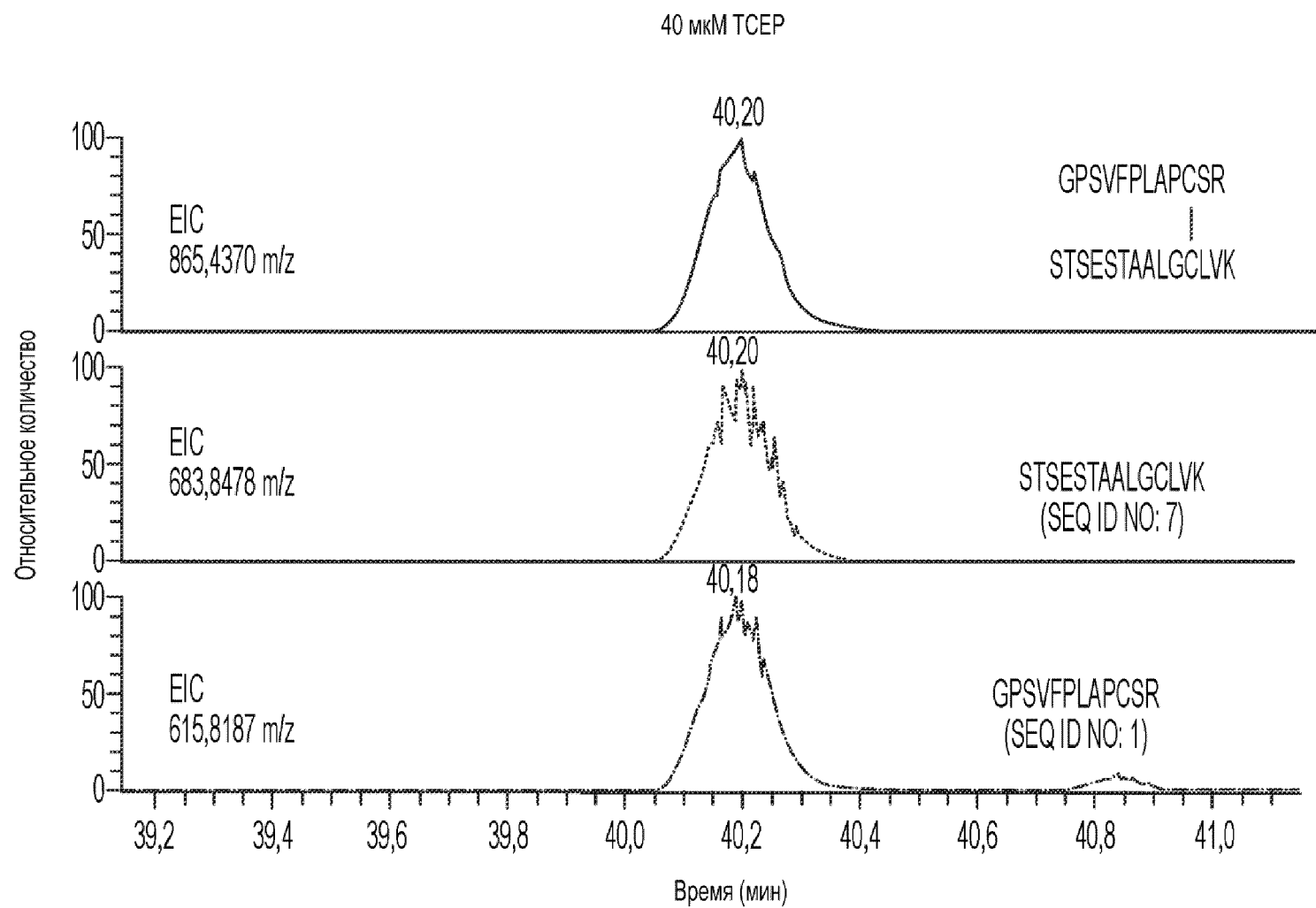
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 7А

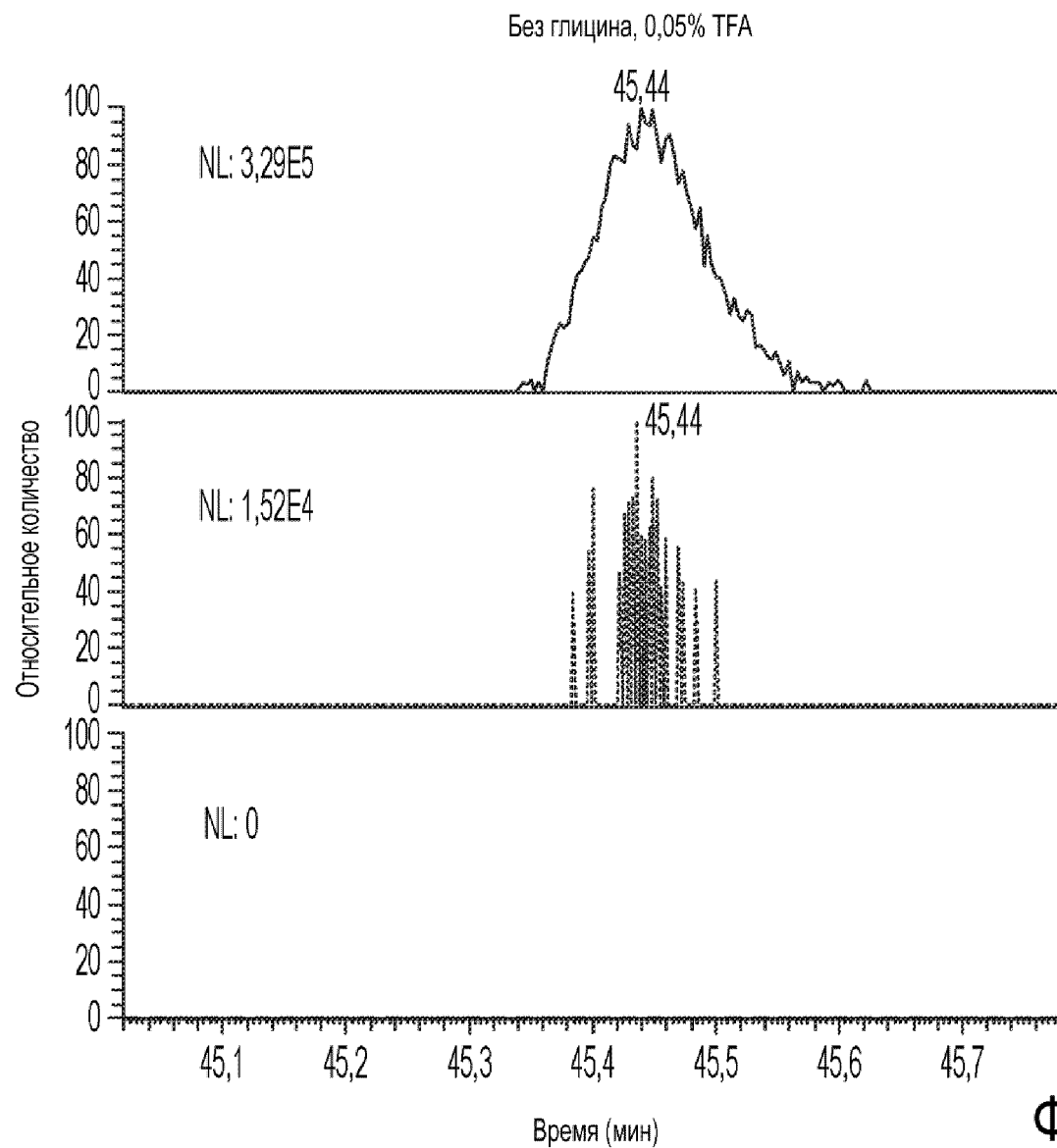


ФИГ. 7В

GPSVFPLAPCSR
 TYTCNVDPHKPSNTK

GPSVFPLAPCSR
 (SEQ ID NO: 1)

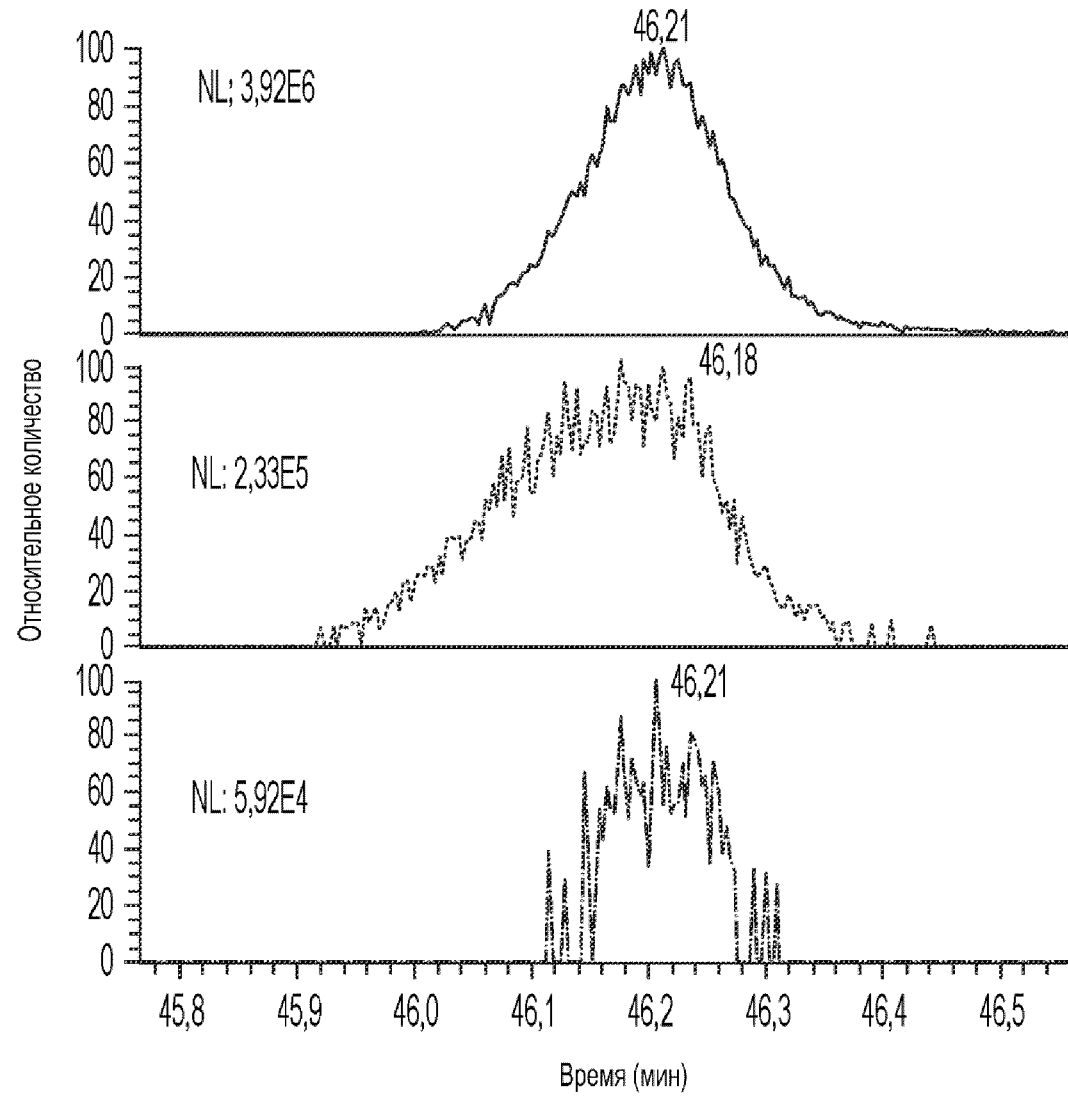
TYTCNVDPHKPSNTK
 (SEQ ID NO: 2)



ФИГ. 8А

2 мМ глицина, 0,05% TFA

GPSVFPLAPCSR
|
TYTCNV~~VDHKPS~~NTK



GPSVFPLAPCSR
(SEQ ID NO: 1)

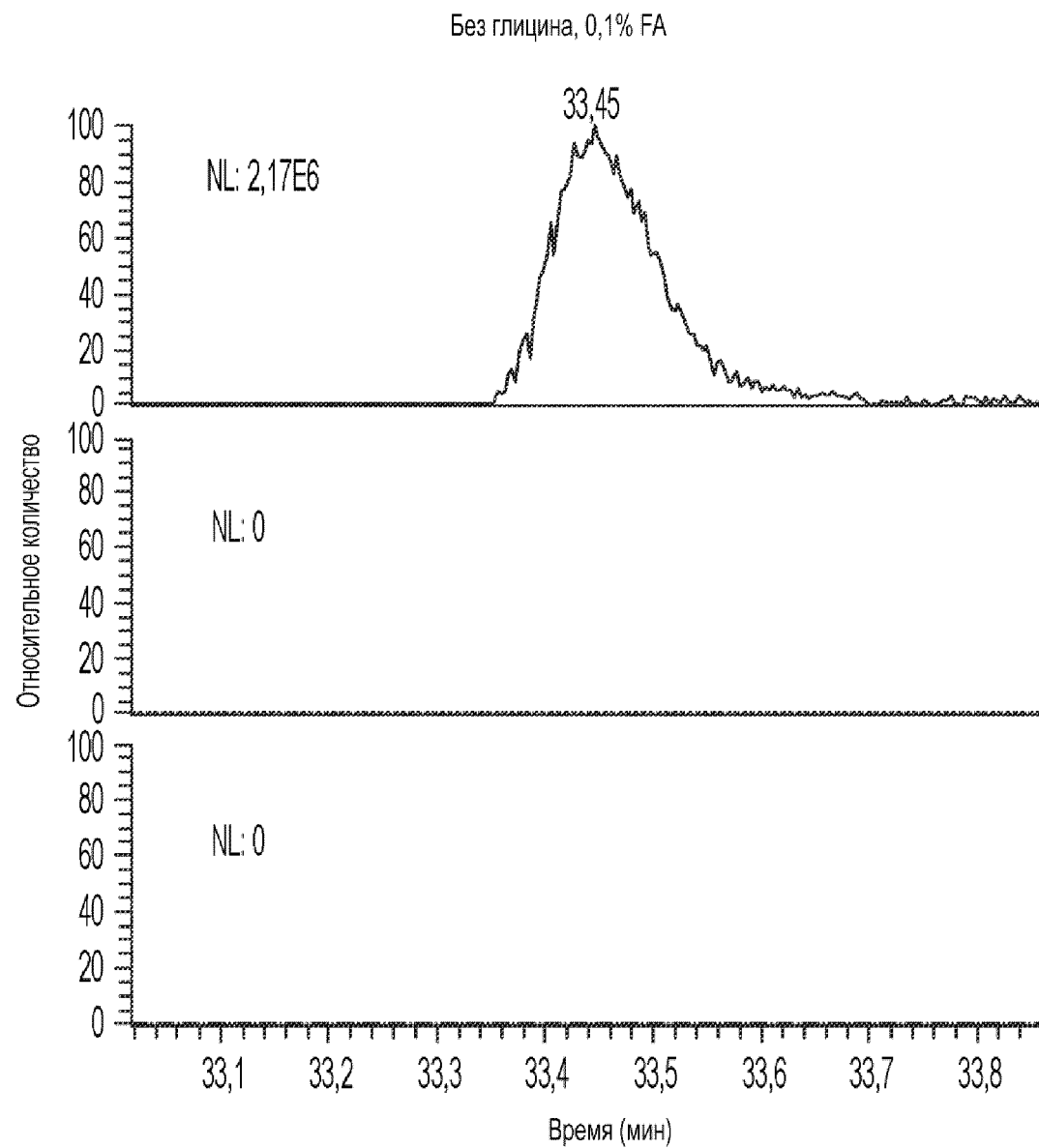
TYTCNV~~VDHKPS~~NTK
(SEQ ID NO: 2)

ФИГ. 8В

GPSVFPLAPCSR
|
TYTCNVDPHKPSNTK

GPSVFPLAPCSR
(SEQ ID NO: 1)

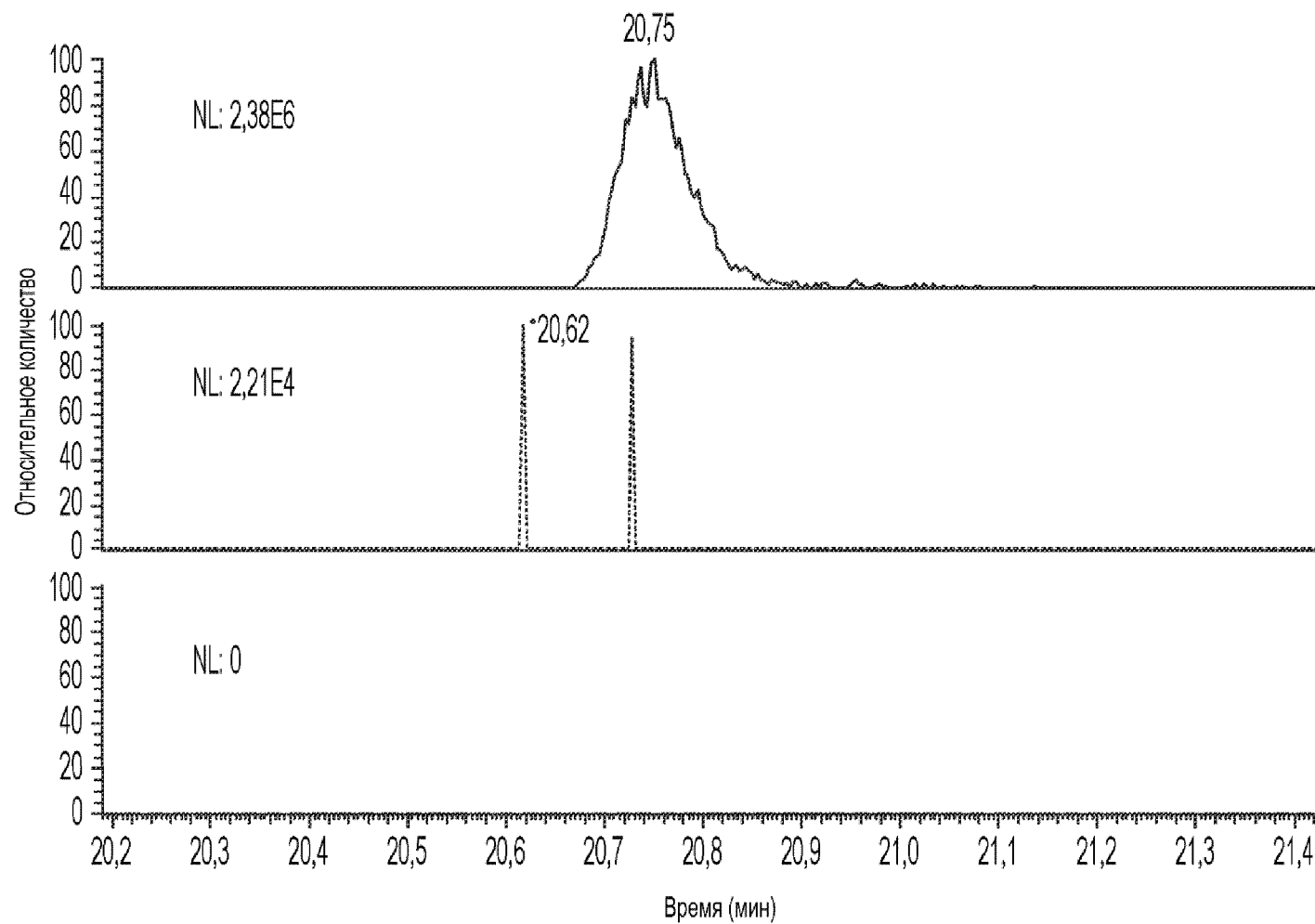
TYTCNVDPHKPSNTK
(SEQ ID NO: 2)



ФИГ. 8С

Без глицина, 0,1% FA

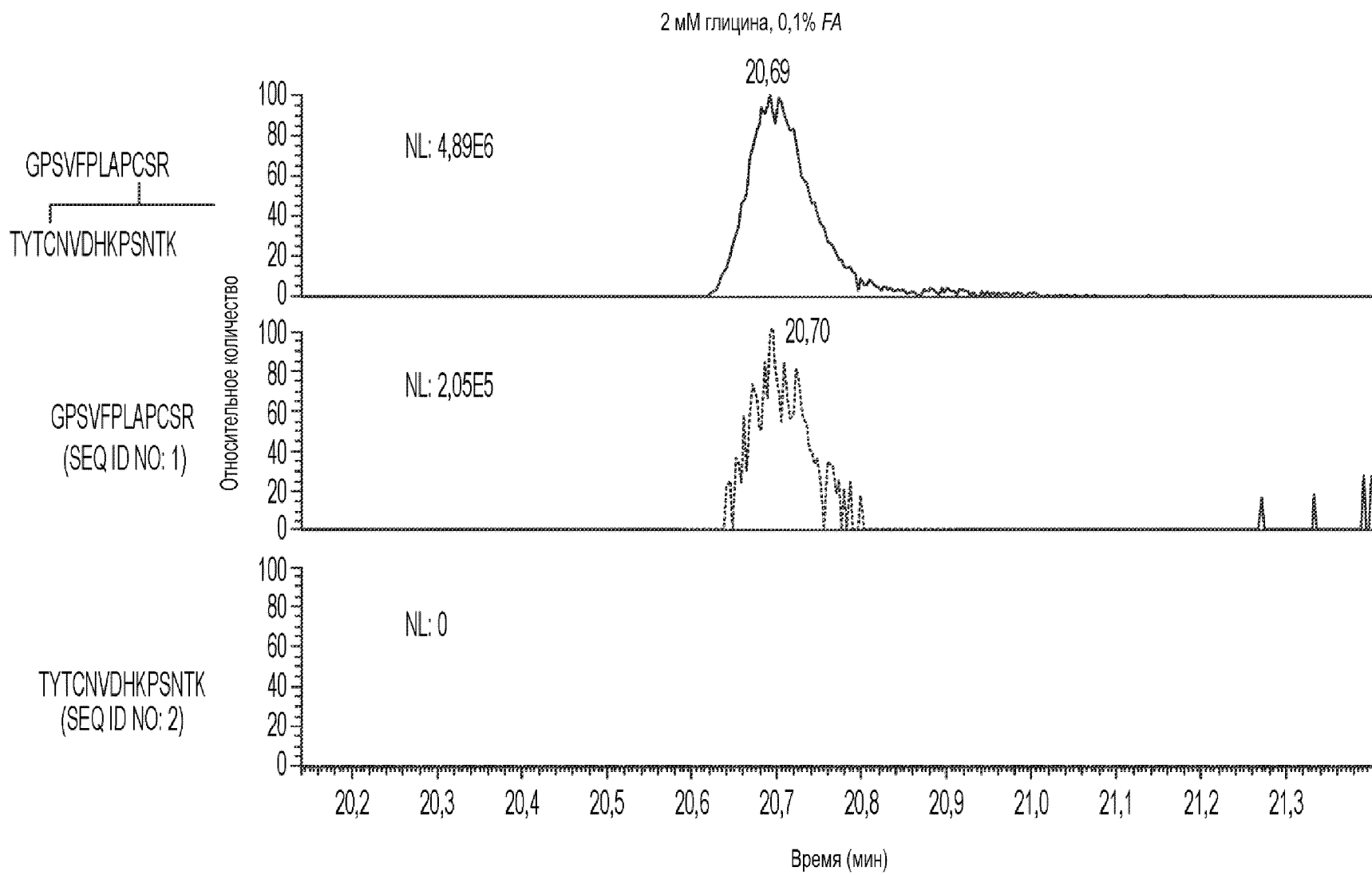
GPSVFPLAPCSR
TYTCNVDPHKPSNTK



GPSVFPLAPCSR
(SEQ ID NO: 1)

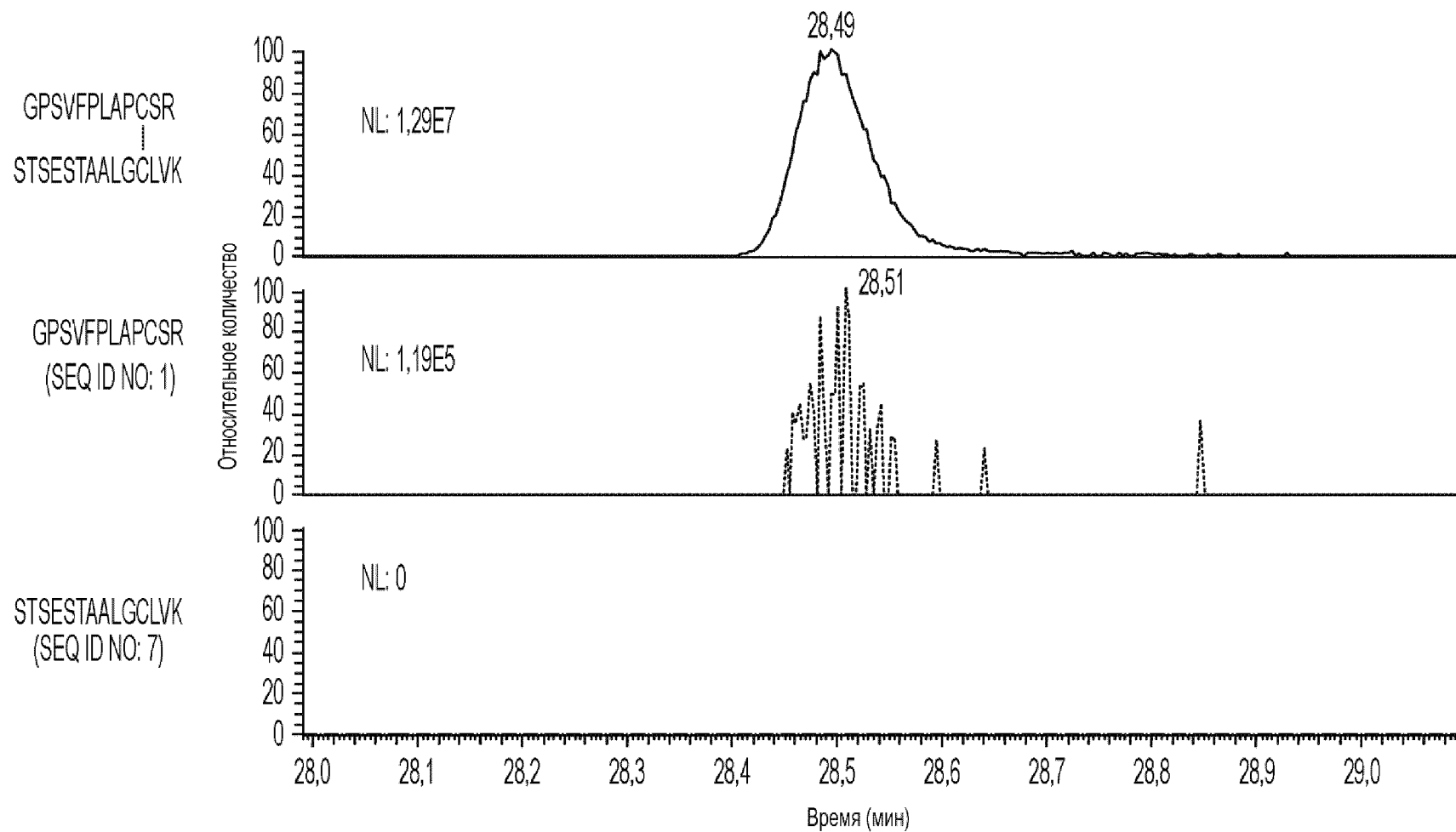
TYTCNVDPHKPSNTK
(SEQ ID NO: 2)

ФИГ. 8D

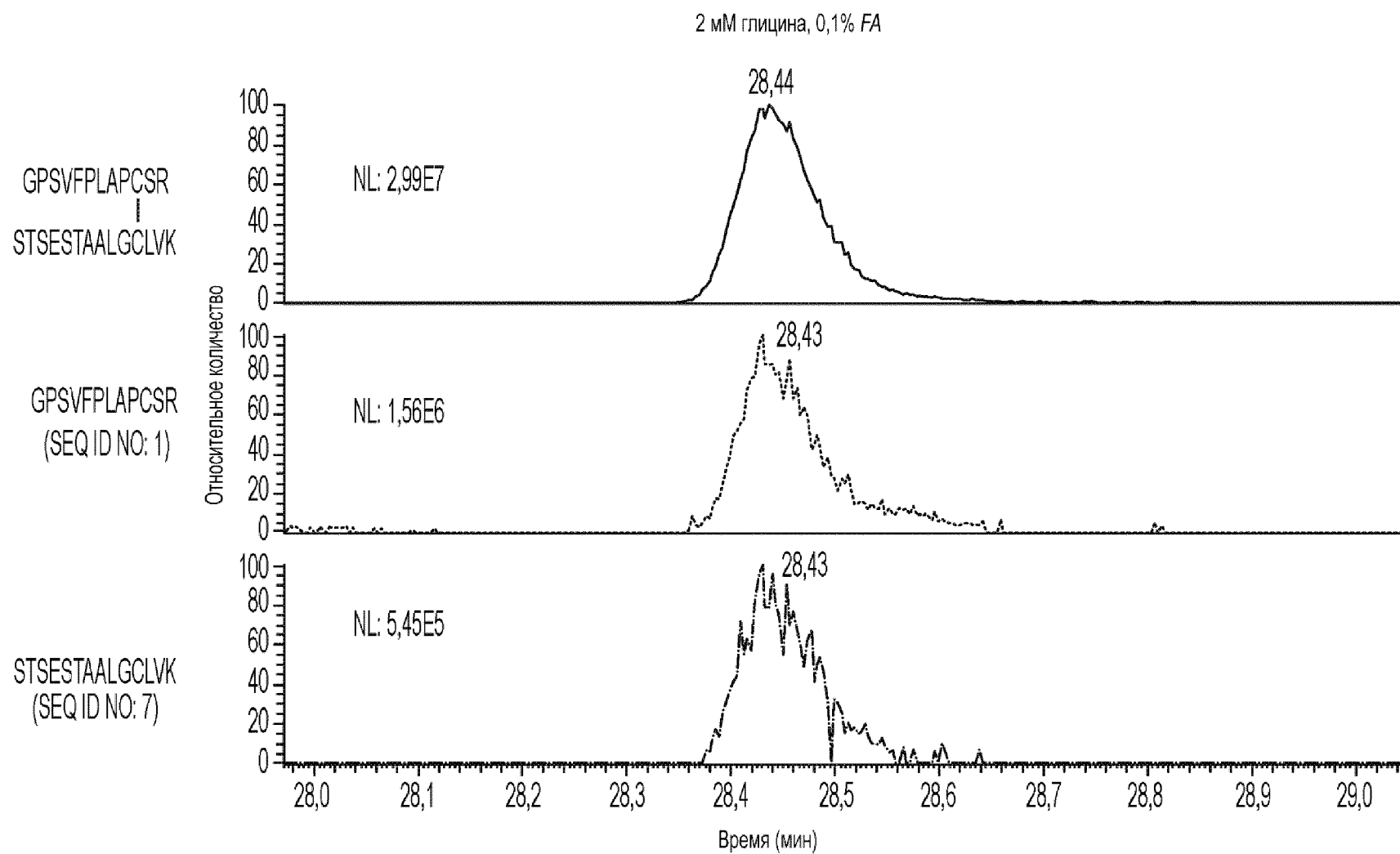


ФИГ. 8Е

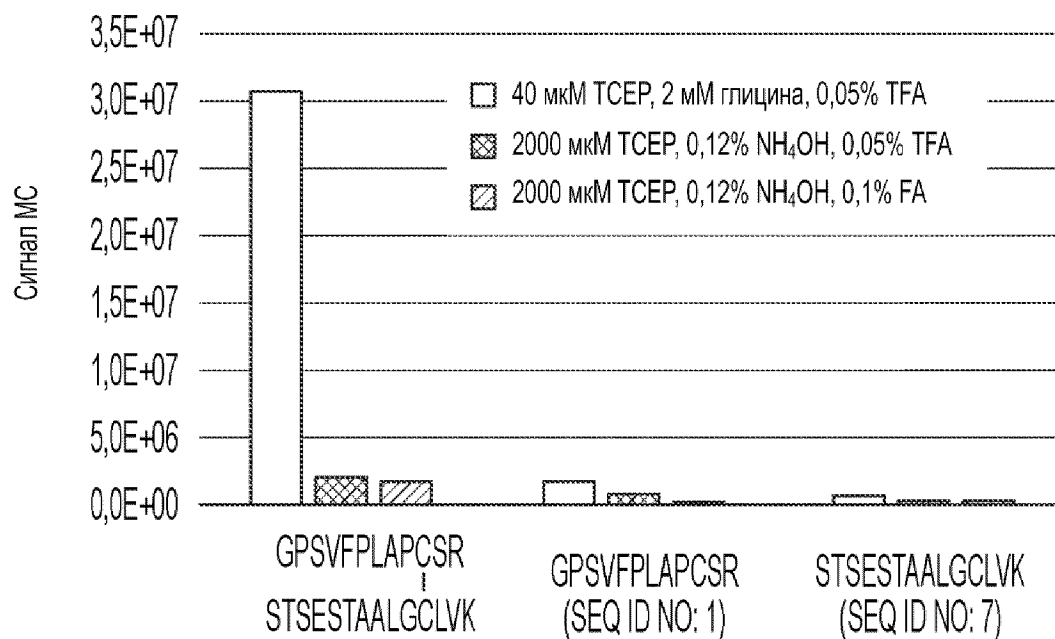
Без глицина, 0,1% FA



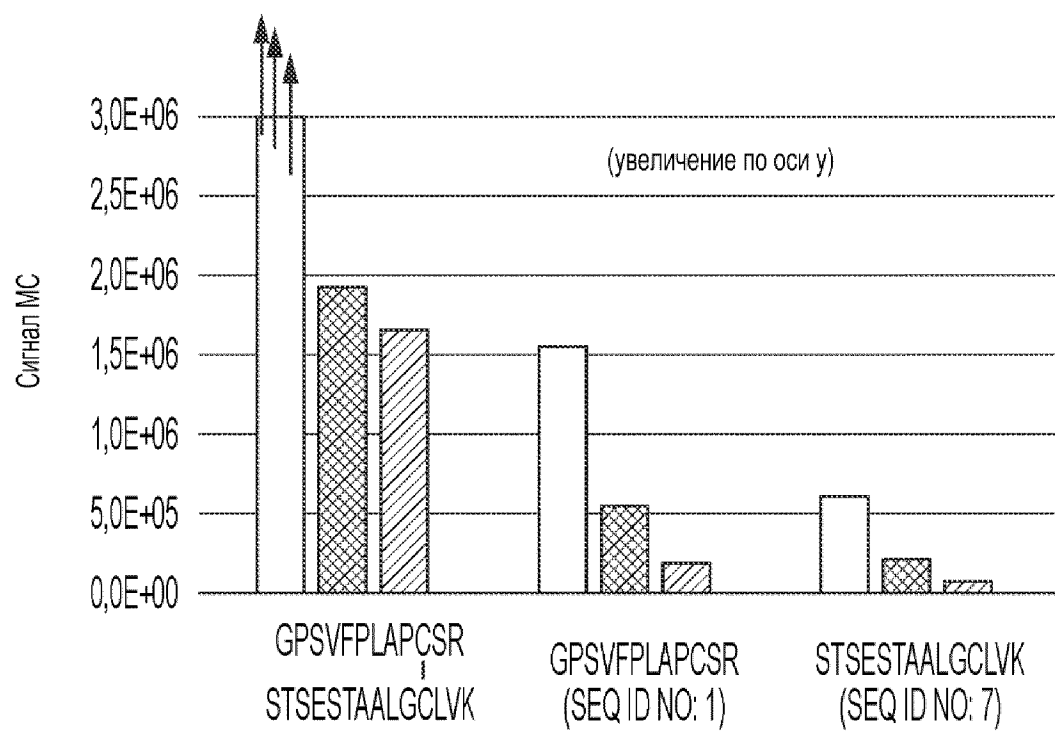
ФИГ. 8F



ФИГ. 8G



ФИГ. 9А

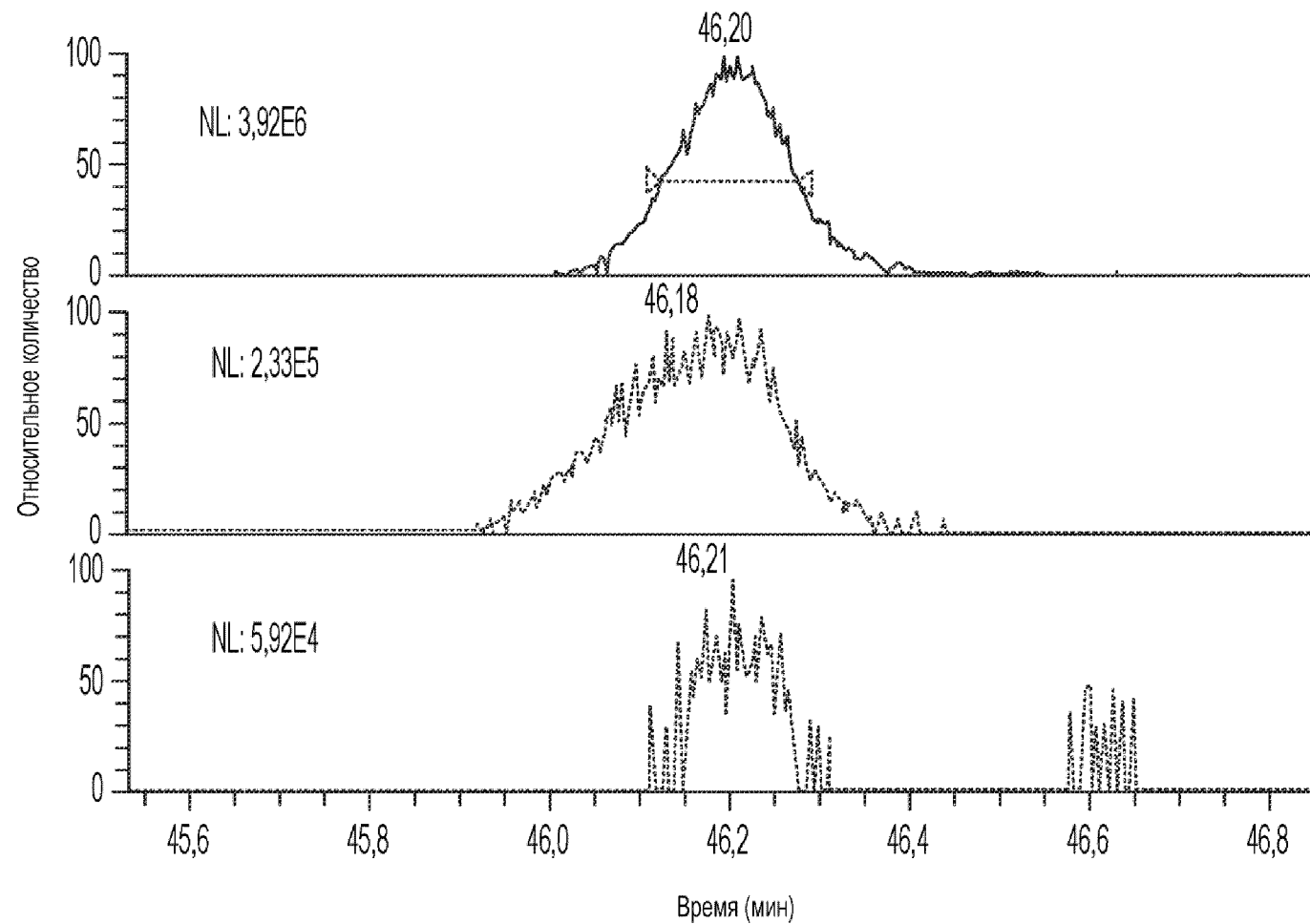


ФИГ. 9В

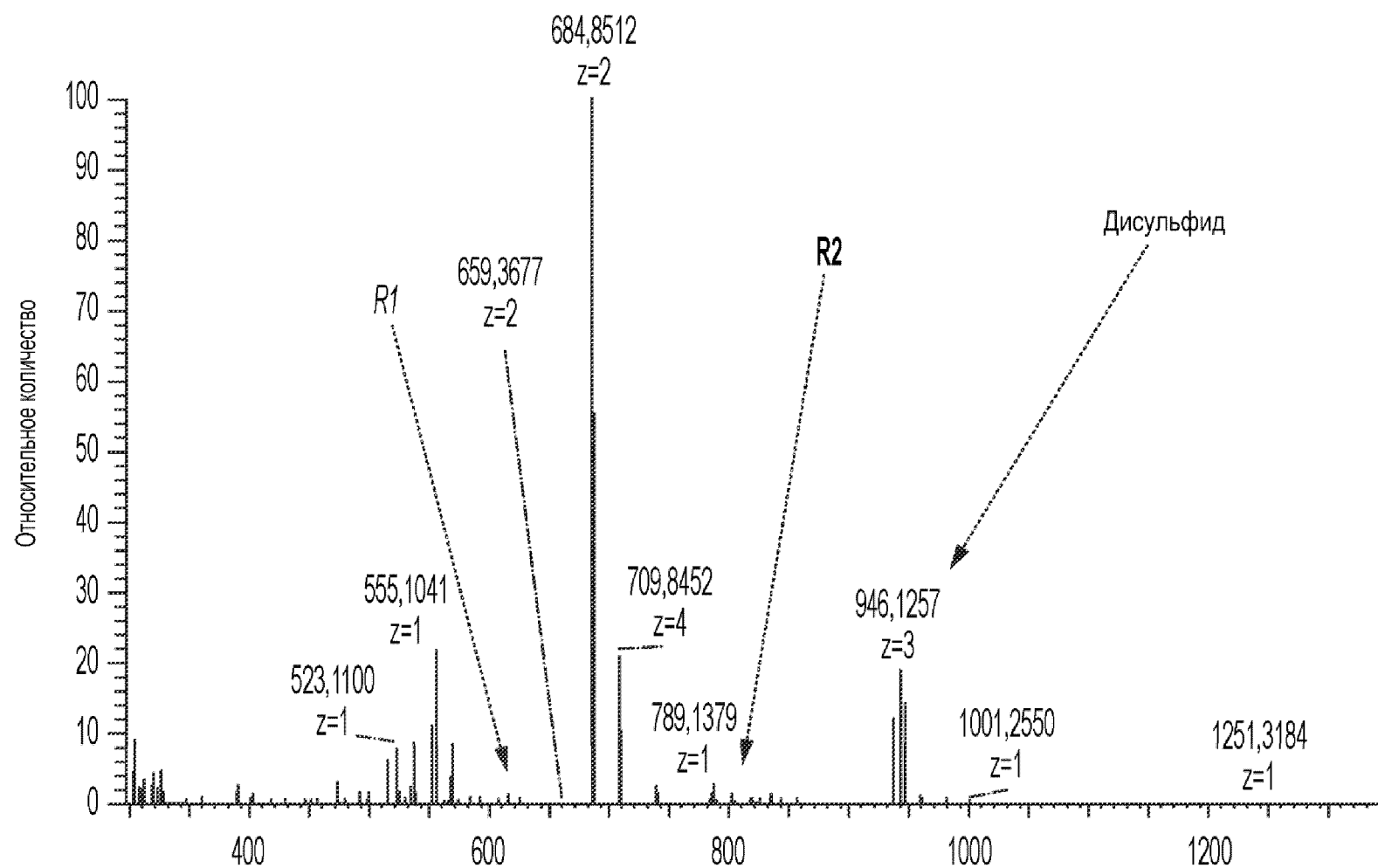
GPSVFPLAPCSR
TYTCNV¹DKPSNTK

(R1) GPSVFPLAPCSR
(SEQ ID NO: 1)

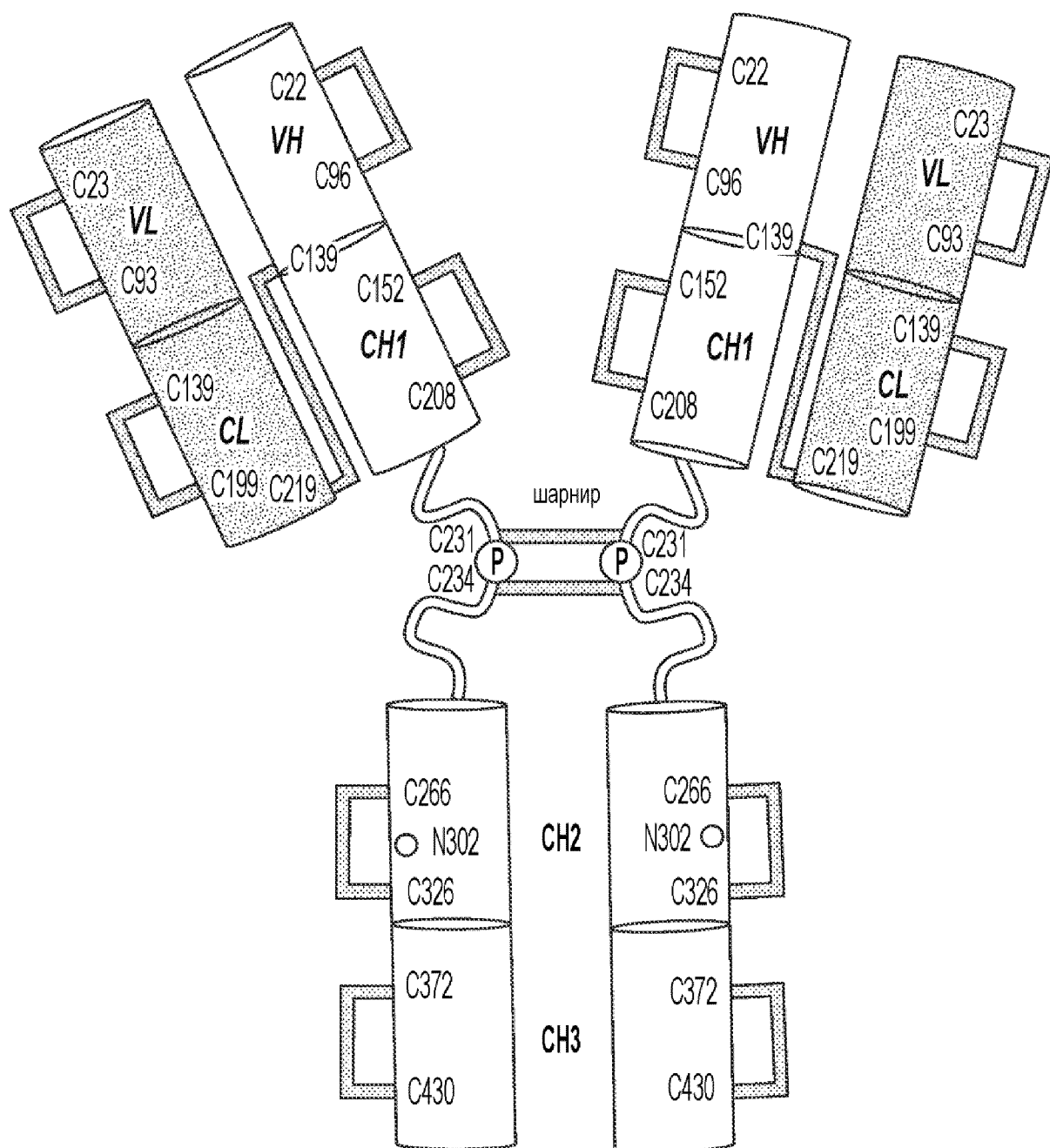
(R2) TYTCNV²DKPSNTK
(SEQ ID NO: 2)



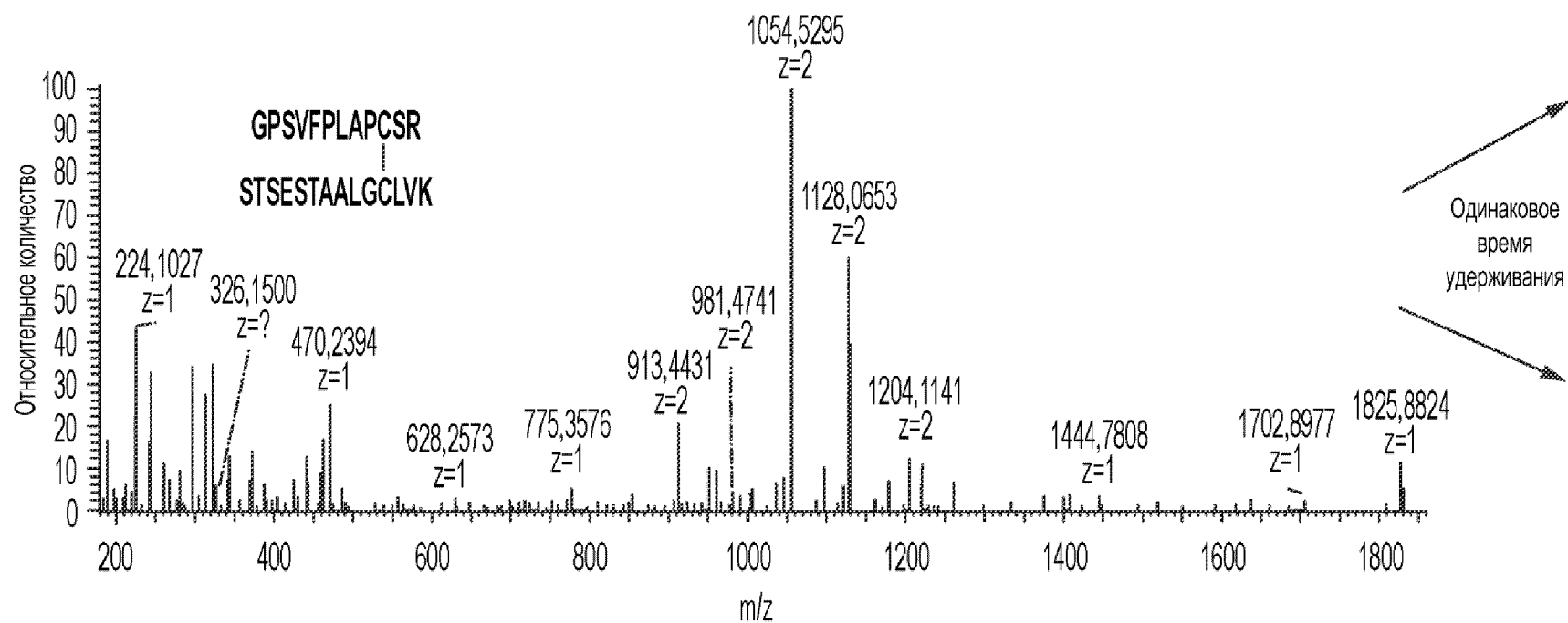
ФИГ. 10А



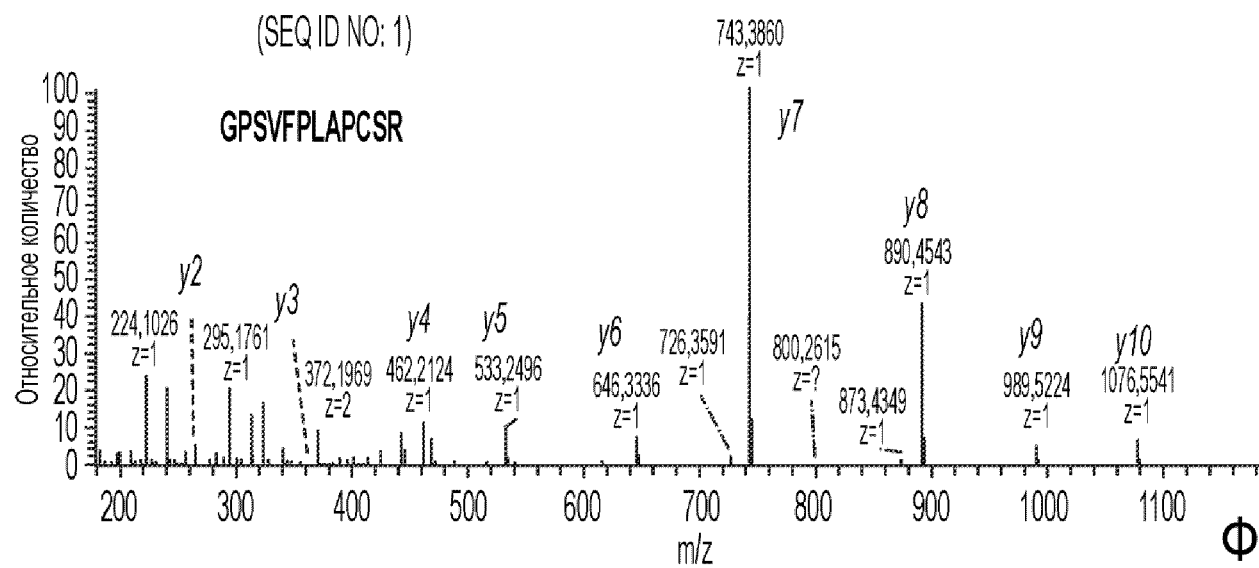
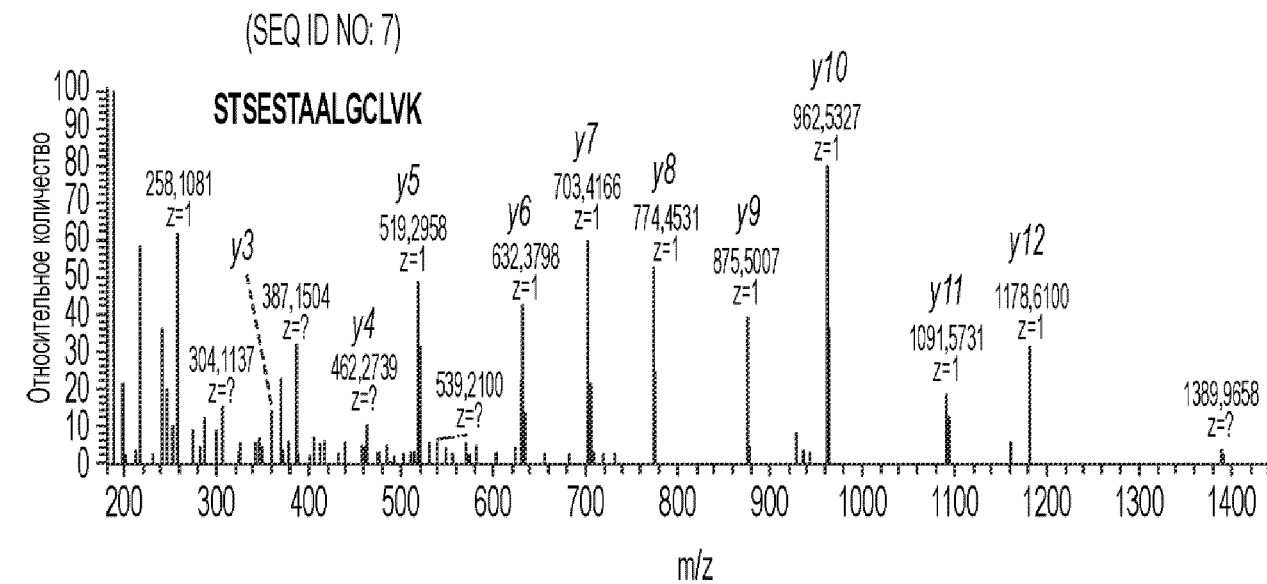
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С



ФИГ. 11



ФИГ. 11 (ПРОДОЛЖ.)

Обозначение цистеина	Триптический пептид МАТ2
C22H	LSCAGSGFTFR (SEQ ID NO: 8)
C96H	AEDTAVYYCAK (SEQ ID NO: 9)
C139H	GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1)
C152H	STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7)
C208H	TYTCNVDPHKPSNTK (SEQ ID NO: 2)
C266H	TPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10)
C326H	CK
C372H	NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 37)
C430H	WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 11)
C23L	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCR (SEQ ID NO: 12)
C93L	VEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTK (SEQ ID NO: 13)
C139L	SGTASVCLNNFYPR (SEQ ID NO: 14)
C199L	VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 15)
C219L	SFNRGEC (SEQ ID NO: 16)

ФИГ. 12

Пептид 1	Пептид 2	Пептид 1	Пептид 2
C152H	C152H	C208H	C139L
C152H	C139H	C139H	C139H
C152H	C219L	C139H	C372H
C152H	C372H	C139H	C430H
C152H	C430H	C139H	C96H
C152H	C96H	C139H	C199L
C152H	C199L	C139H	C266H
C152H	C266H	C139H	C23L
C152H	C23L	C139H	C93L
C152H	C93L	C139H	C22H
C152H	C22H	C139H	C326H
C152H	C326H	C139H	C139L
C152H	C139L	C219L	C219L
C208H	C208H	C219L	C372H
C208H	C139H	C219L	C430H
C208H	C219L	C219L	C96H
C208H	C372H	C219L	C199L
C208H	C430H	C219L	C266H
C208H	C96H	C219L	C23L
C208H	C199L	C219L	C93L
C208H	C266H	C219L	C22H
C208H	C23L	C219L	C326H
C208H	C93L	C219L	C139L
C208H	C22H	C372H	C372H
C208H	C326H	C372H	C96H

ФИГ. 13

Пептид 1	Пептид 2	Пептид 1	Пептид 2	Уровень достоверности
C372H	C199L	C199L	C266H	
C372H	C266H	C199L	C23L	
C372H	C23L	C199L	C93L	
C372H	C93L	C199L	C22H	
C372H	C22H	C199L	C326H	Уровень достоверности
C372H	C326H	C266H	C266H	
C372H	C139L	C266H	C23L	
C430H	C430H	C266H	C93L	
C430H	C96H	C266H	C22H	
C430H	C199L	C266H	C139L	Уровень достоверности
C430H	C266H	C23L	C23L	
C430H	C23L	C23L	C22H	
C430H	C93L	C23L	C326H	
C430H	C22H	C23L	C139L	
C430H	C326H	C93L	C93L	Уровень достоверности
C430H	C139L	C93L	C22H	
C96H	C96H	C93L	C326H	
C96H	C199L	C93L	C139L	
C96H	C266H	C22H	C22H	
C96H	C23L	C22H	C326H	Уровень достоверности
C96H	C93L	C22H	C139L	
C96H	C326H	C326H	C326H	
C96H	C139L	C326H	C139L	
C199L	C199L	C139L	C139L	

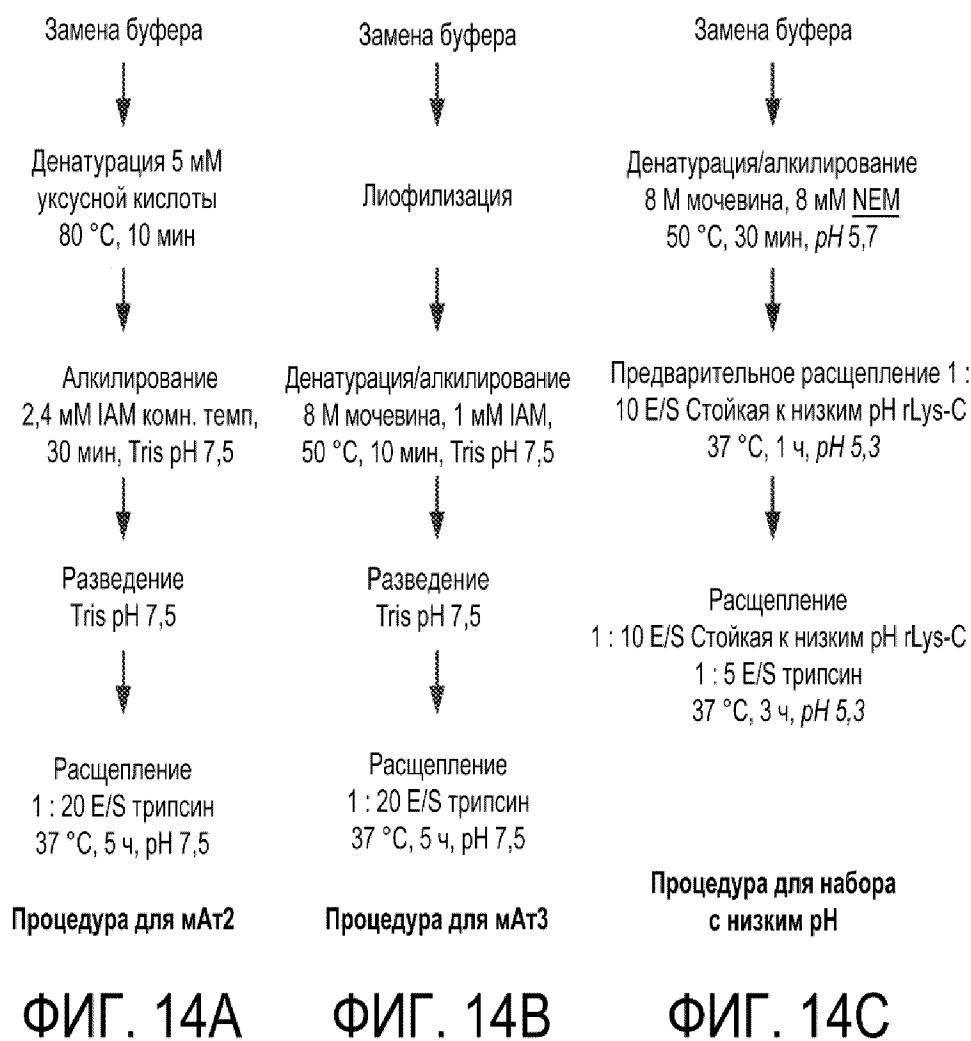
Не обнаружено
Низкая
Средняя
Высокая
Сверхвысокая

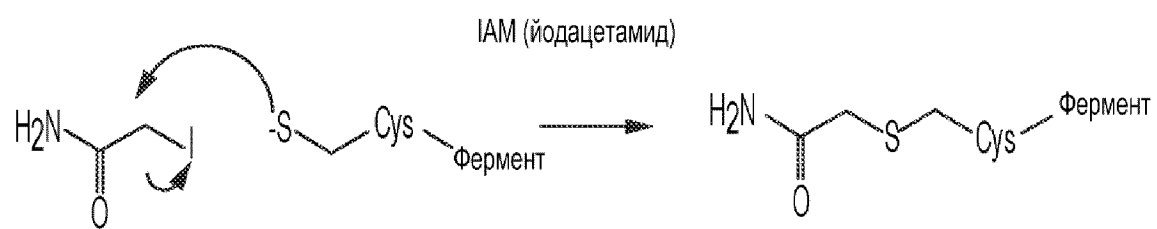
Низкий = 11,3%

Средний = 17,0%

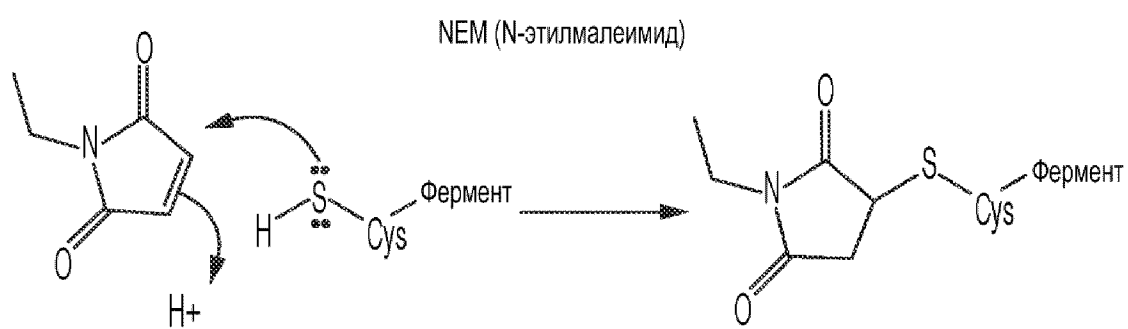
Высокий(+) = 71,6%

ФИГ. 13 (ПРОДОЛЖ.)

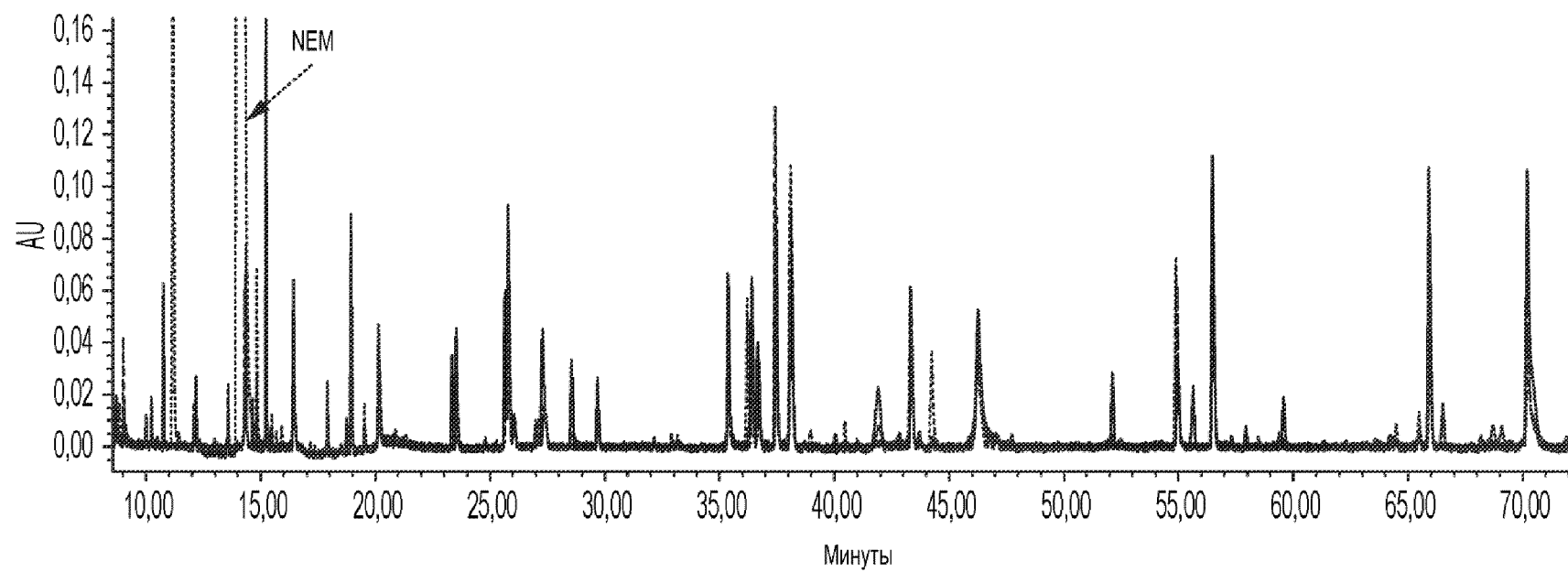




ФИГ. 15А

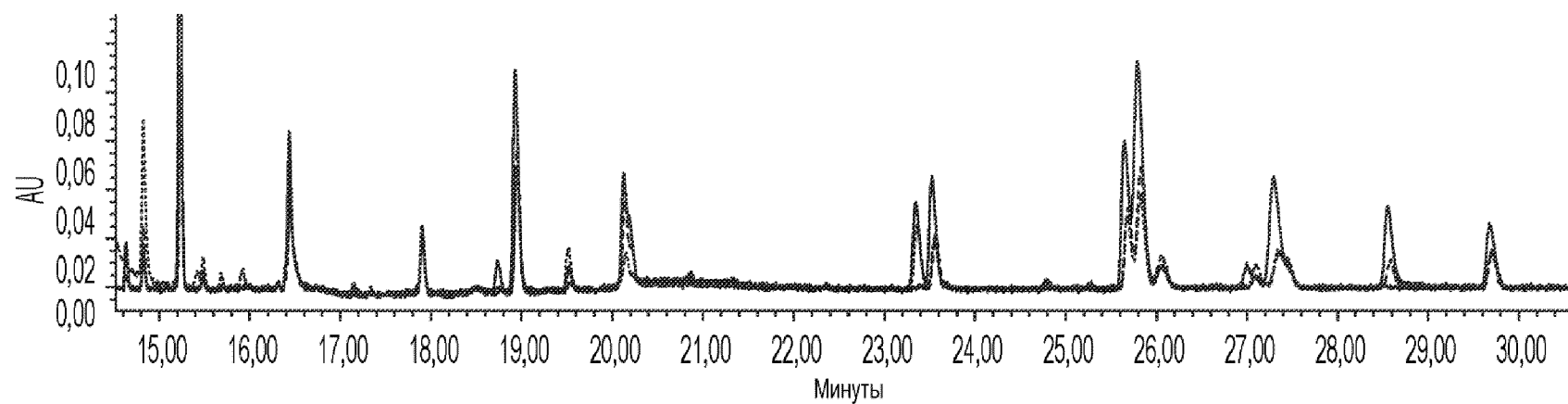


ФИГ. 15В

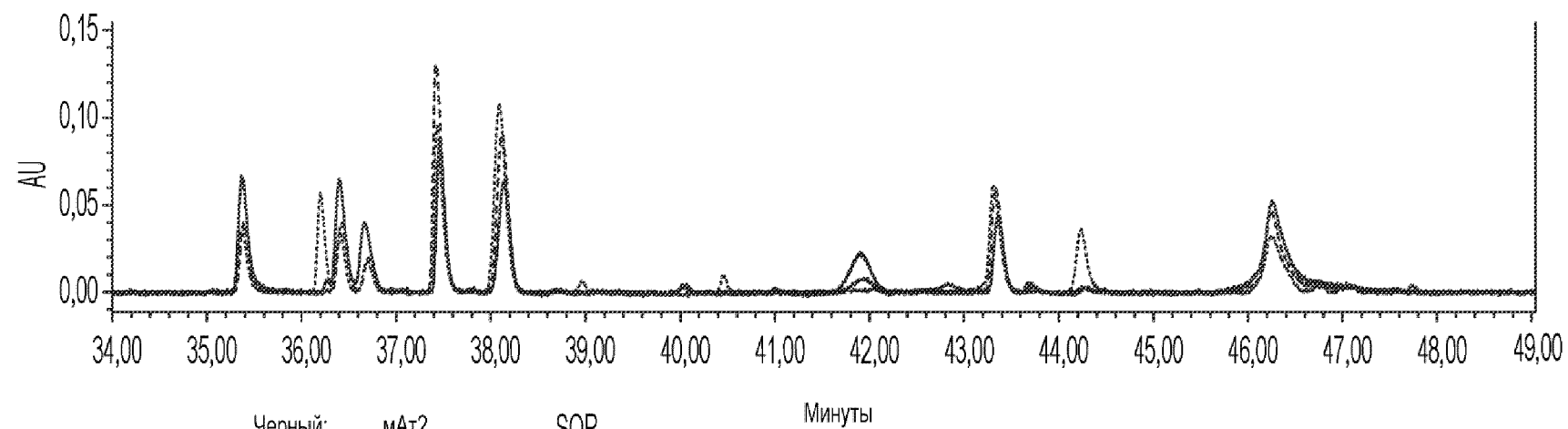


— Черный: mAt2 SOP
 - - - Синий: mAt3 SOP
 - - - Красный: Расщепление при низком pH

ФИГ. 16

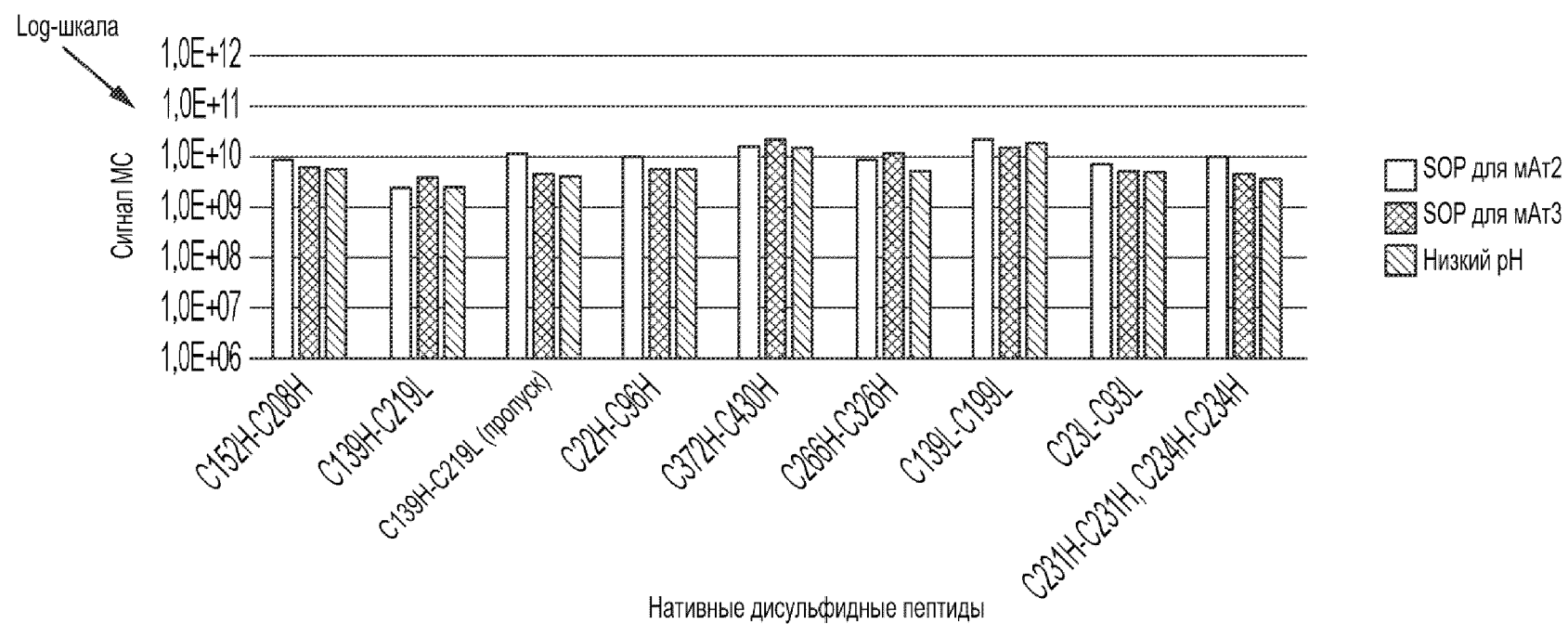


ФИГ. 17А



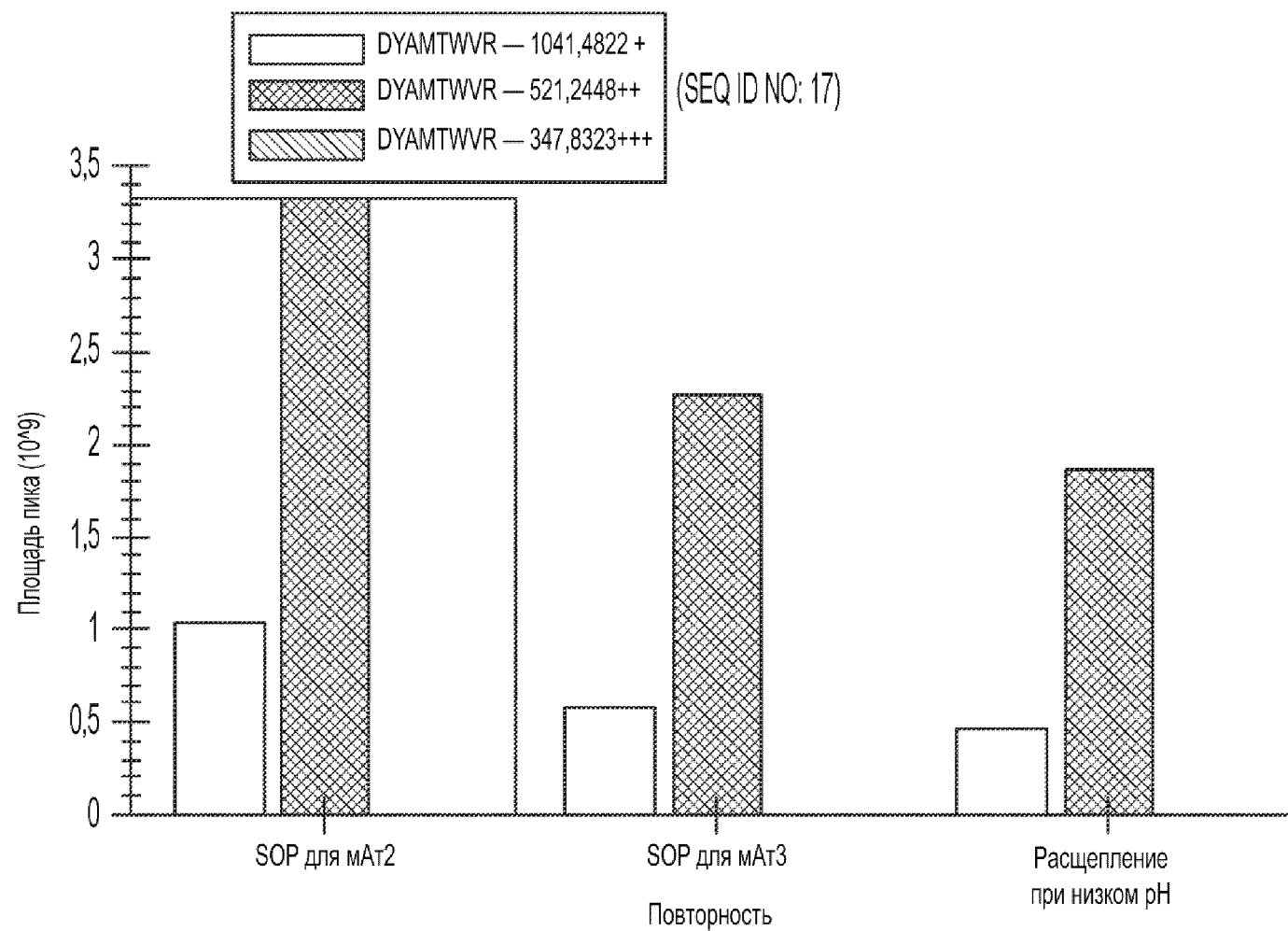
— Черный: МАТ2 SOP
 - - - Синий: МАТ3 SOP
 . . . Красный: Расщепление при низком pH

ФИГ. 17В

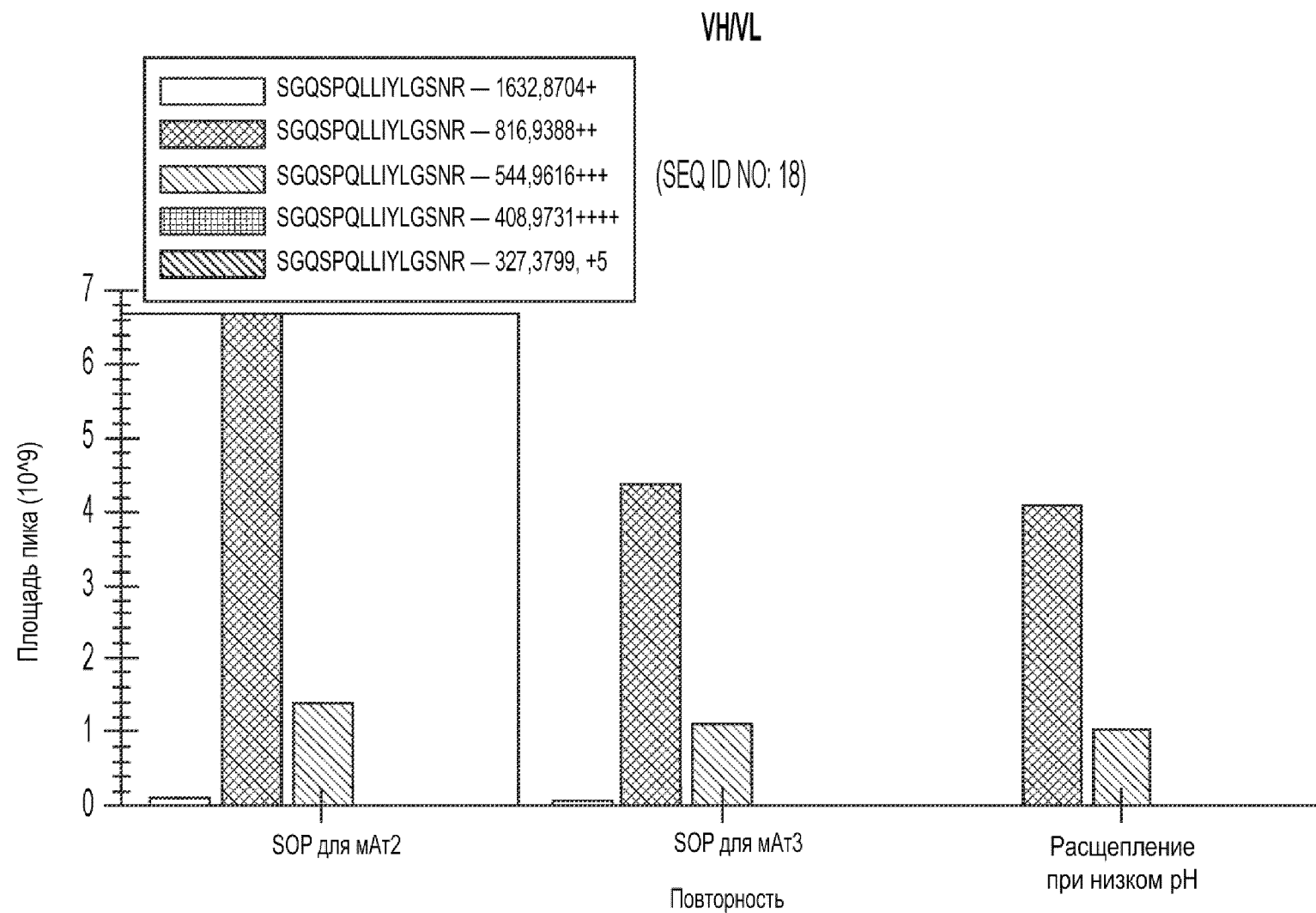


ФИГ. 18

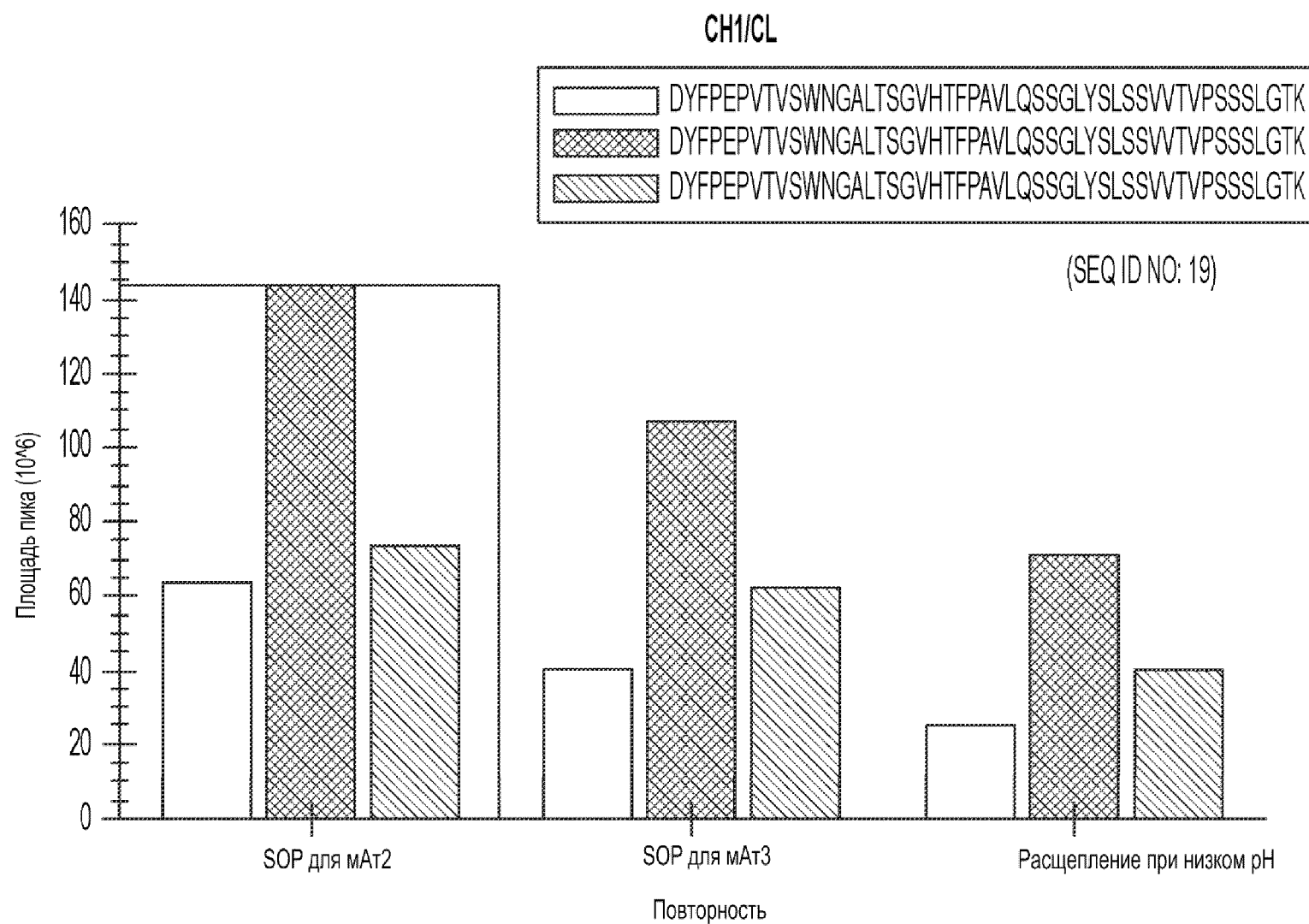
VH/VL



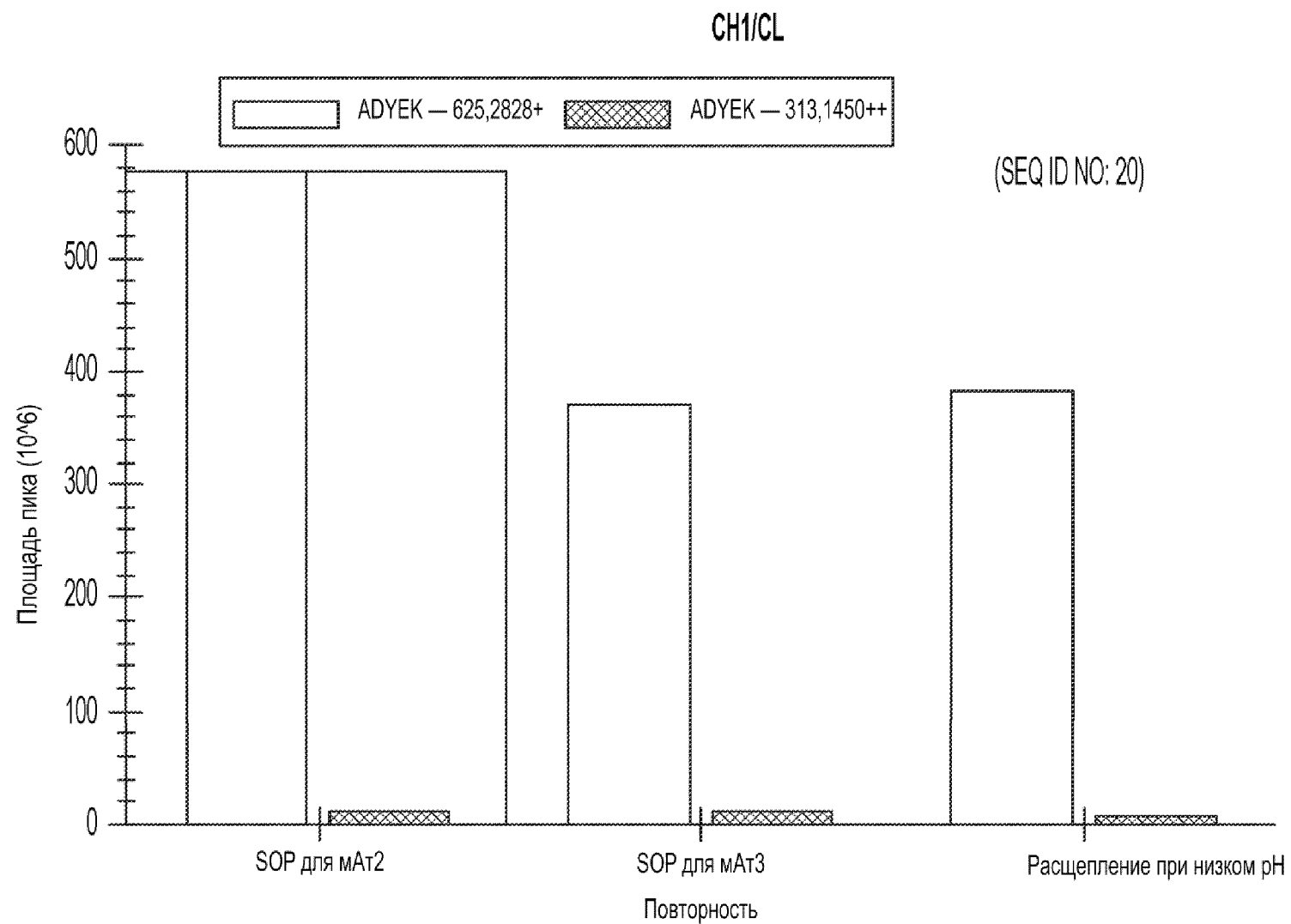
ФИГ. 19А



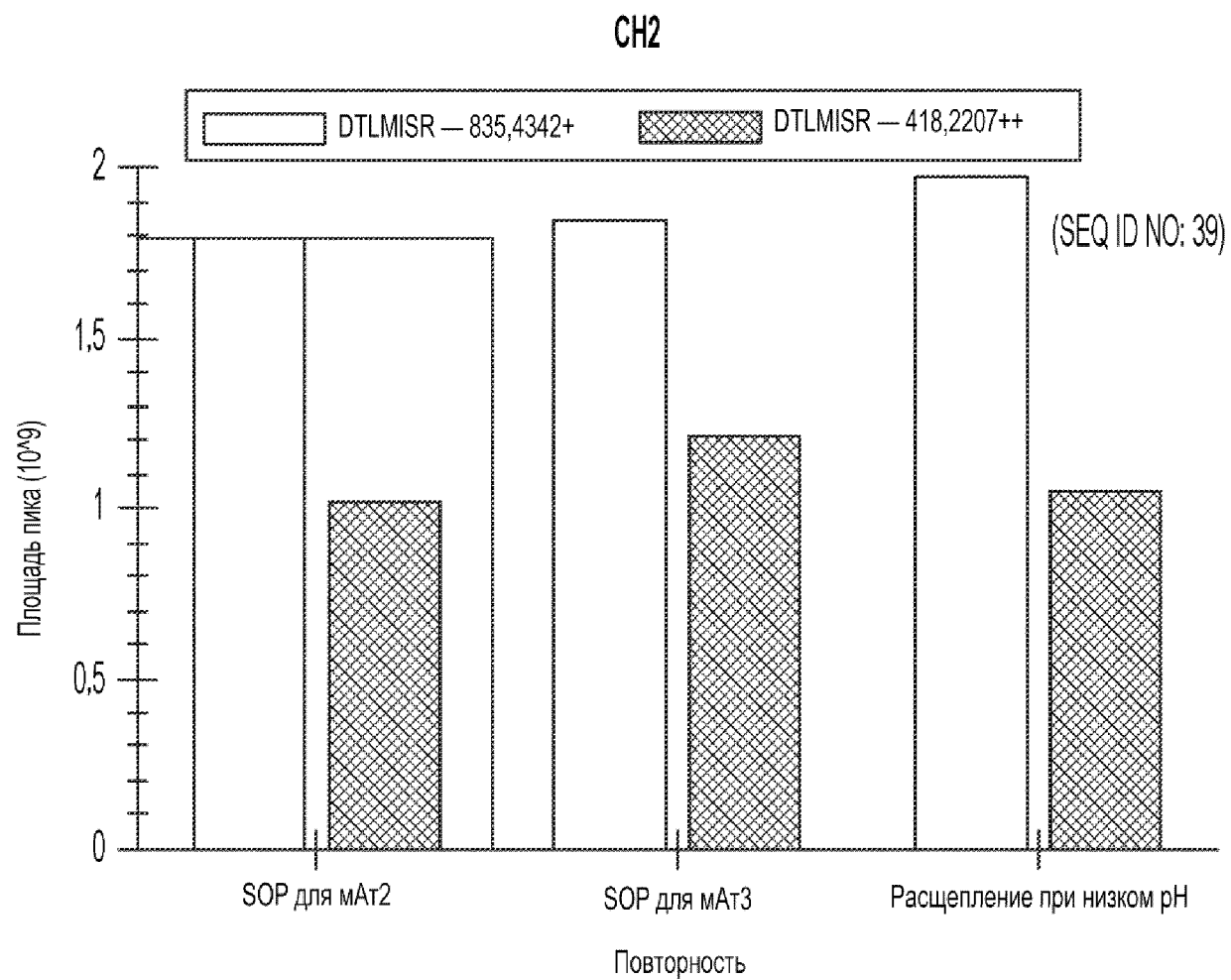
ФИГ. 19А (ПРОДОЛЖ.)



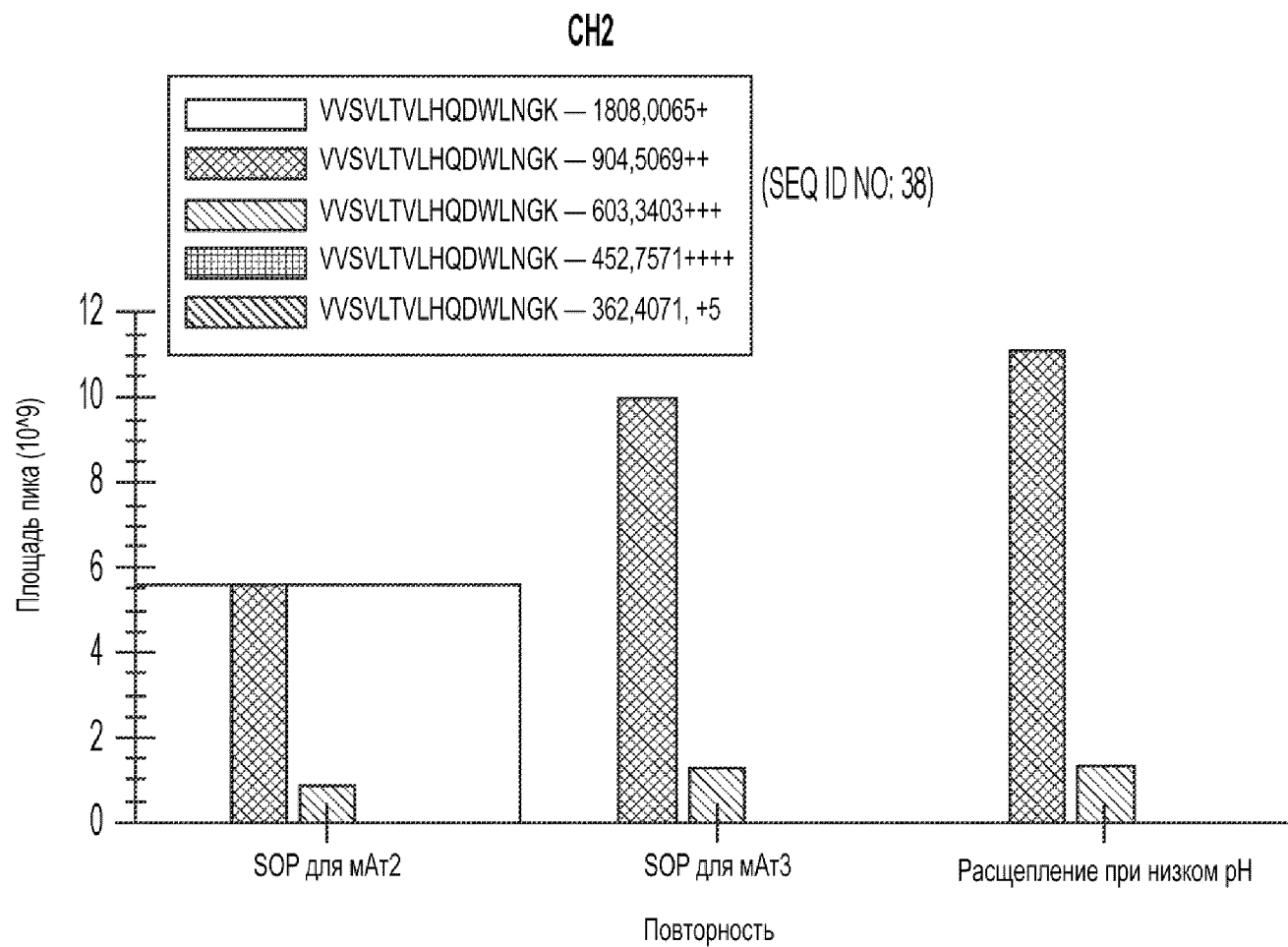
ФИГ. 19В



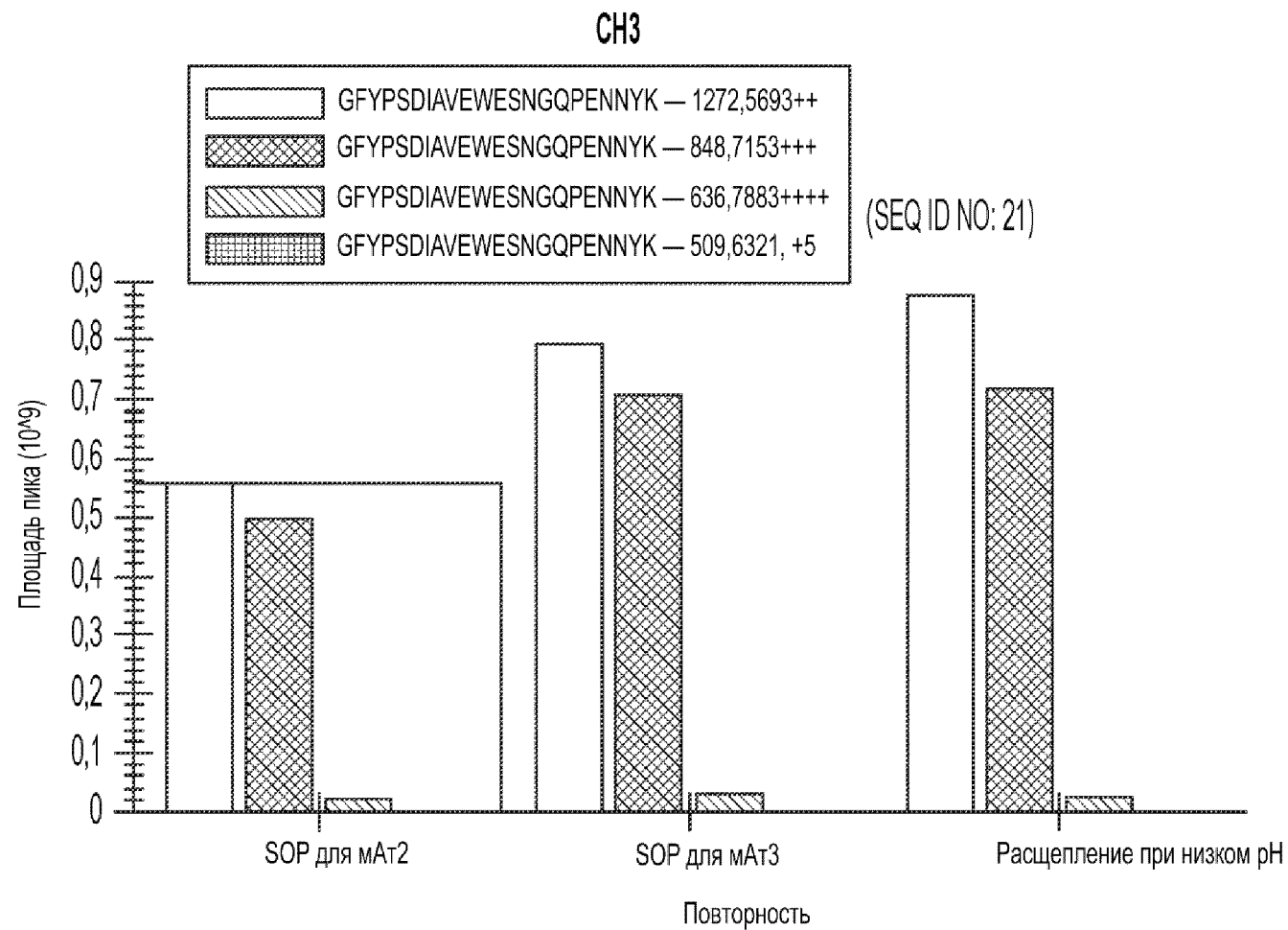
ФИГ. 19В (ПРОДОЛЖ.)



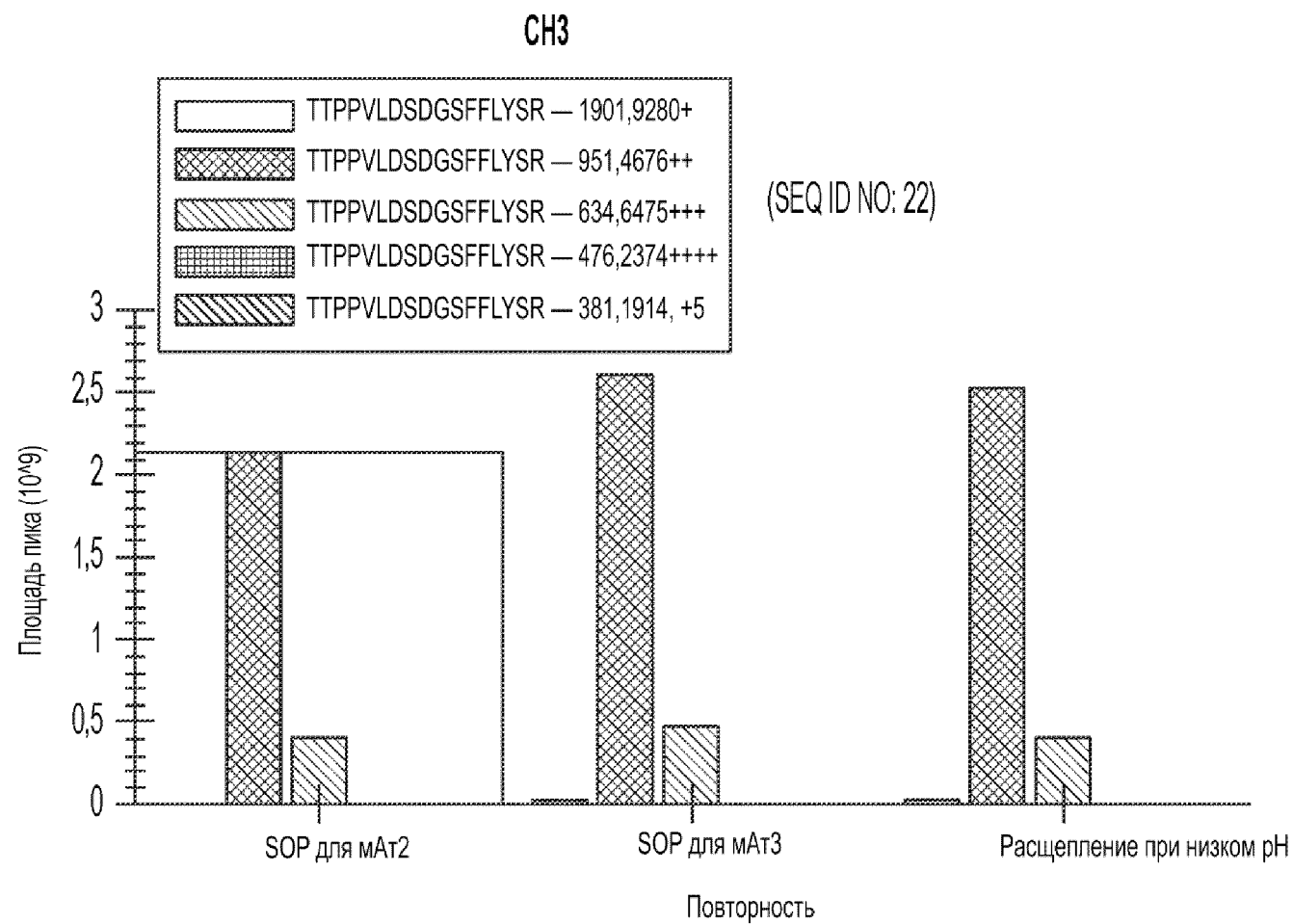
ФИГ. 19С



ФИГ. 19С (ПРОДОЛЖ.)



ФИГ. 19D



ФИГ. 19D (ПРОДОЛЖ.)

Пептид 1	Пептид 2	SOP для МАТ2	SOP для МАТ3	Расщепление при низком pH
C152H	C152H	0,10%	0,05%	0,00%
C152H	C139H	10,00%	4,54%	0,00%
C152H	C219L	0,70%	0,43%	0,00%
C152H	C372H	0,39%	0,20%	0,00%
C152H	C430H	0,51%	0,22%	0,00%
C152H	C96H	0,89%	0,67%	0,00%
C152H	C199L	0,30%	0,44%	0,00%
C152H	C266H	0,24%	0,11%	0,00%
C152H	C23L	1,98%	1,26%	0,00%
C152H	C93L	0,55%	0,22%	0,00%
C152H	C22H	1,40%	0,71%	0,00%
C152H	C326H	0,24%	0,14%	0,00%
C152H	C139L	0,55%	0,24%	0,00%
C208H	C208H	0,89%	0,18%	0,00%
C208H	C139H	1,93%	0,50%	0,00%
C208H	C219L	0,38%	0,48%	0,00%
C208H	C372H	0,83%	0,52%	0,00%
C208H	C430H	0,38%	0,21%	0,00%
C208H	C96H	0,68%	0,43%	0,00%
C208H	C199L	0,26%	0,16%	0,00%
C208H	C266H	1,23%	0,71%	0,00%
C208H	C23L	2,67%	0,72%	0,00%
C208H	C93L	Помехи	Помехи	0,00%
C208H	C22H	0,81%	0,39%	0,00%
C208H	C326H	0,16%	0,09%	0,00%
C208H	C139L	0,87%	0,29%	0,00%
C139H	C139H	0,17%	0,00%	0,00%
C139H	C372H	0,29%	0,09%	0,00%
C139H	C430H	0,39%	0,10%	0,00%
C139H	C96H	1,52%	0,74%	0,00%
C139H	C199L	0,35%	0,25%	0,00%
C139H	C266H	0,19%	0,05%	0,00%
C139H	C23L	1,22%	2,18%	0,00%
C139H	C93L	0,41%	0,13%	0,00%

ФИГ. 20А

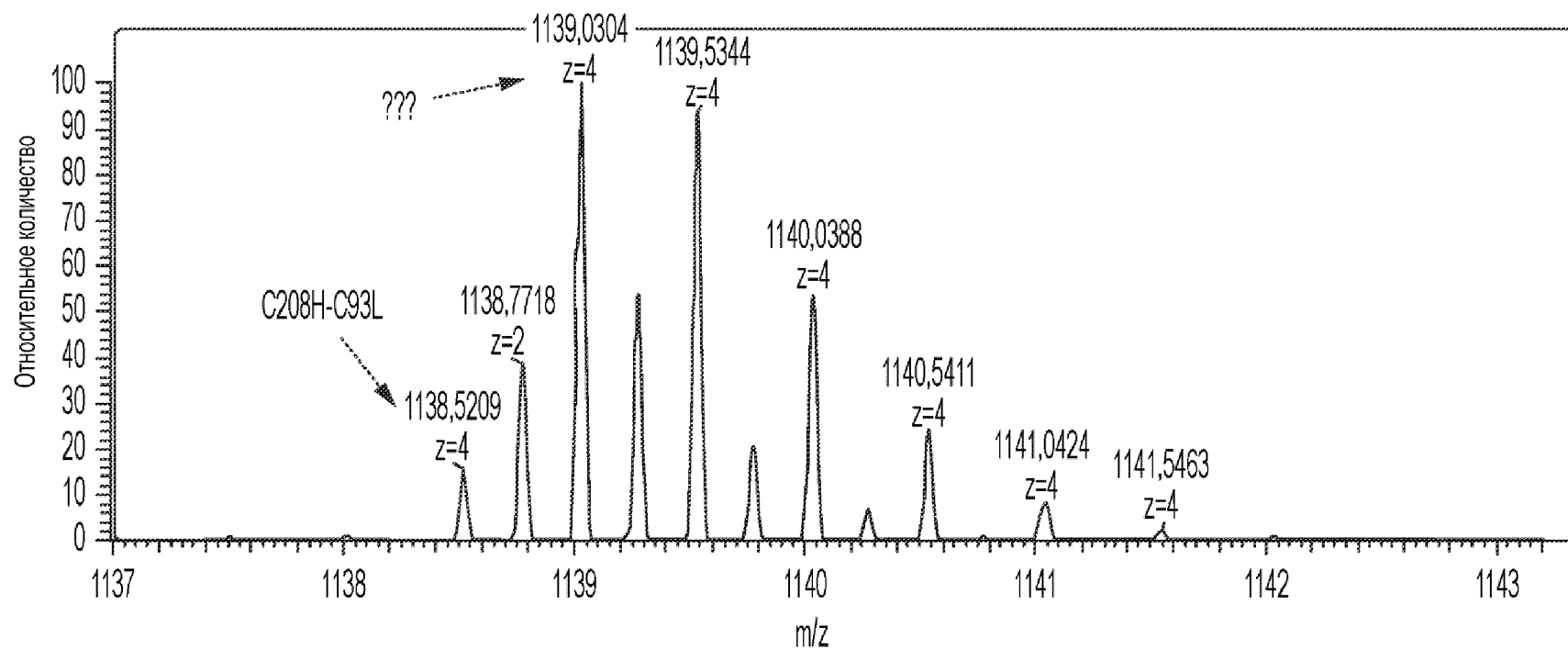
Пептид 1	Пептид 2	SOP для МАТ2	SOP для МАТ3	Расщепление при низком pH
C139H	C22H	0,99%	0,38%	0,00%
C139H	C326H	Помехи	Помехи	0,00%
C139H	C139L	0,38%	0,09%	0,00%
C219L	C219L	0,02%	0,00%	0,00%
C219L	C372H	Помехи	Помехи	0,00%
C219L	C430H	0,16%	0,01%	0,00%
C219L	C96H	0,21%	0,05%	0,00%
C219L	C199L	1,15%	0,25%	0,00%
C219L	C266H	Н/О	Н/О	Н/О
C219L	C23L	1,86%	0,24%	0,00%
C219L	C93L	0,24%	0,03%	0,00%
C219L	C22H	0,45%	0,06%	0,00%
C219L	C326H	0,04%	0,00%	0,00%
C219L	C139L	0,90%	0,26%	0,00%
C372H	C372H	Помехи	Помехи	0,00%
C372H	C96H	Помехи	Помехи	0,00%
C372H	C199L	0,07%	0,07%	0,00%
C372H	C266H	0,64%	0,40%	0,00%
C372H	C23L	0,66%	0,23%	0,00%
C372H	C93L	0,32%	0,14%	0,00%
C372H	C22H	0,92%	0,44%	0,00%
C372H	C326H	0,88%	0,73%	0,00%
C372H	C139L	Помехи	Помехи	0,00%
C430H	C430H	0,05%	0,04%	0,00%
C430H	C96H	0,59%	0,25%	0,00%
C430H	C199L	0,06%	0,05%	0,00%
C430H	C266H	Н/О	Н/О	Н/О
C430H	C23L	0,51%	0,18%	0,00%
C430H	C93L	Помехи	Помехи	0,00%
C430H	C22H	0,85%	0,35%	0,00%
C430H	C326H	0,52%	0,40%	0,00%
C430H	C139L	0,40%	0,21%	0,00%

Пептид 1	Пептид 2	SOP для МАТ2	SOP для МАТ3	Расщепление при низком pH
C96H	C96H	0,09%	0,03%	0,00%
C96H	C199L	0,17%	0,17%	0,00%
C96H	C266H	0,28%	0,18%	0,00%
C96H	C23L	1,30%	0,56%	0,00%
C96H	C93L	0,57%	0,23%	0,00%
C96H	C326H	0,15%	0,09%	0,00%
C96H	C139L	0,41%	0,28%	0,00%
C199L	C199L	0,01%	0,00%	0,00%
C199L	C266H	Н/О	Н/О	Н/О
C199L	C23L	Н/О	Н/О	Н/О
C199L	C93L	Н/О	Н/О	Н/О
C199L	C22H	0,33%	0,21%	0,00%
C199L	C326H	0,08%	0,07%	0,00%
C266H	C266H	Н/О	Н/О	Н/О
C266H	C23L	Н/О	Н/О	Н/О
C266H	C93L	Н/О	Н/О	Н/О
C266H	C22H	1,29%	0,74%	0,00%
C266H	C139L	Помехи	Помехи	0,00%
C23L	C23L	Н/О	Н/О	Н/О
C23L	C22H	2,04%	0,80%	0,00%
C23L	C326H	0,98%	0,29%	0,00%
C23L	C139L	1,47%	0,64%	0,00%
C93L	C93L	Н/О	Н/О	Н/О
C93L	C22H	0,51%	0,22%	0,00%
C93L	C326H	Помехи	Помехи	0,00%
C93L	C139L	1,61%	1,04%	0,00%
C22H	C22H	0,26%	0,12%	0,00%
C22H	C326H	0,23%	0,12%	0,00%
C22H	C139L	0,72%	0,31%	0,00%
C326H	C326H	Н/О	Н/О	Н/О
C326H	C139L	Помехи	Помехи	0,00%
C139L	C139L	0,15%	0,03%	0,00%

ФИГ. 20С

$$\text{Скремливание, \%} = \frac{(\text{Площадь пика скремблированного дисульфида})}{(\text{Площадь пика обоих нативных дисульфидов}) + (\text{площадь пика скремблированного дисульфида})}$$

ФИГ. 20D

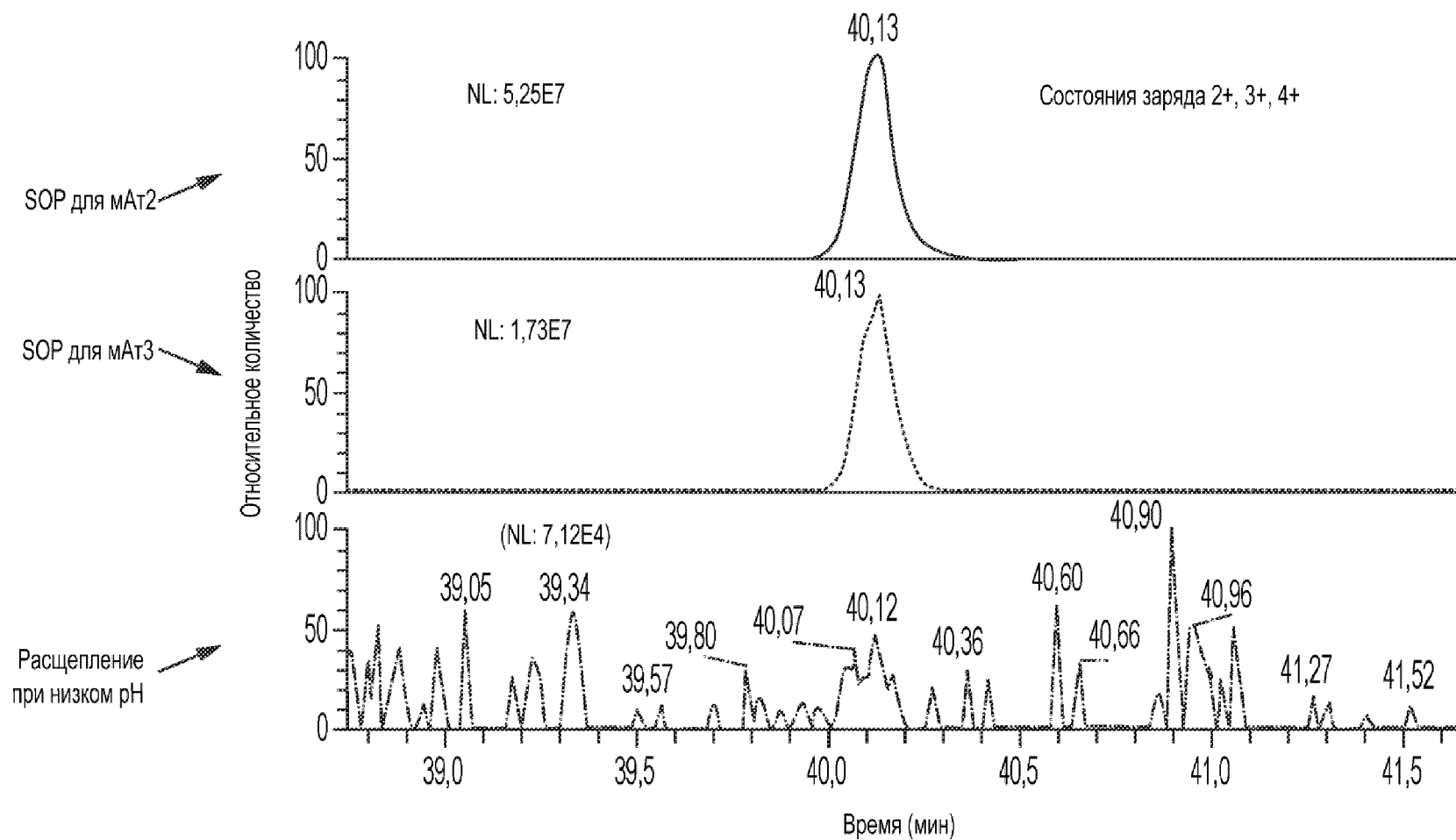


ФИГ. 20E

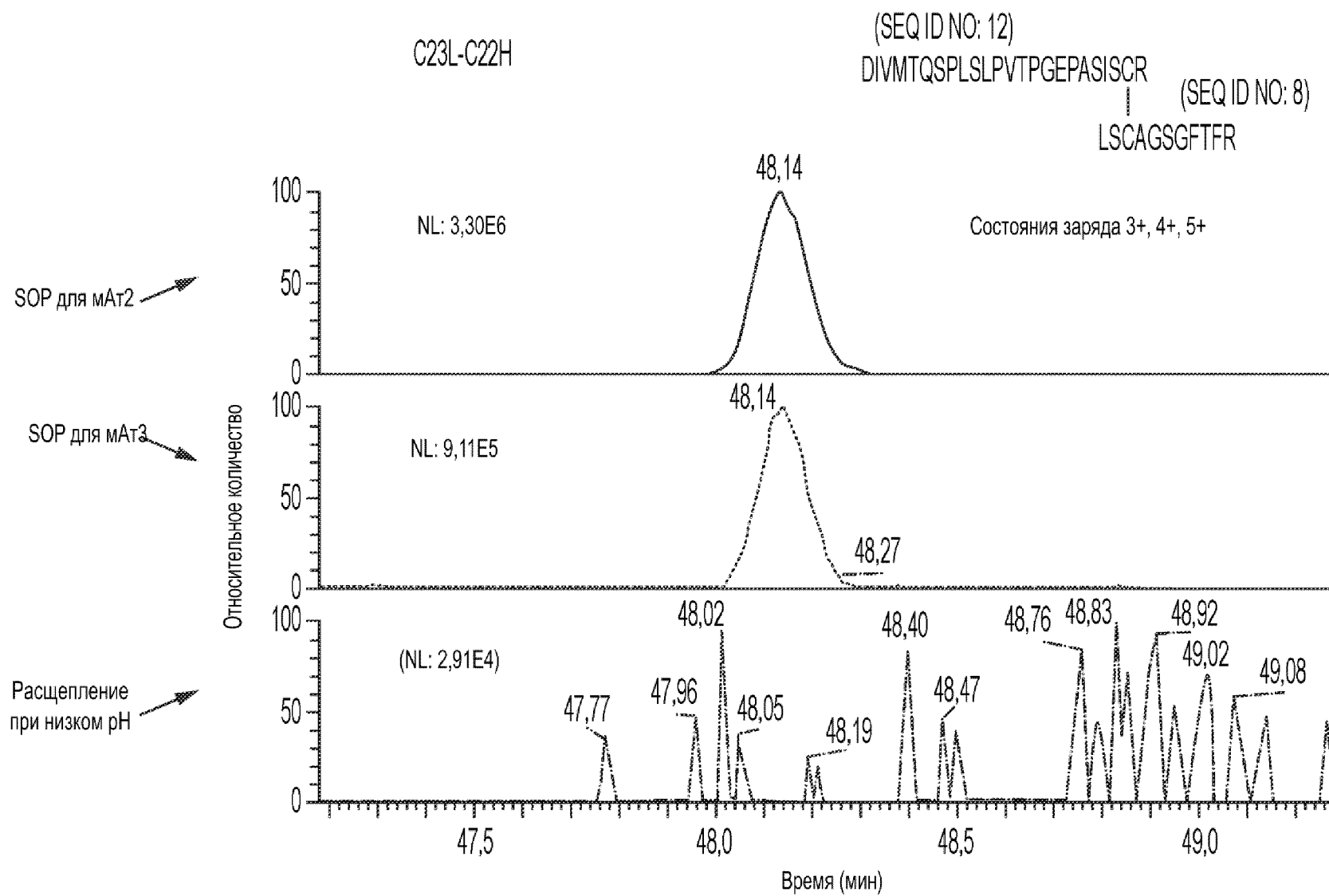
C152H-C139H

STSESTAALGCLVK (SEQ ID NO: 7)

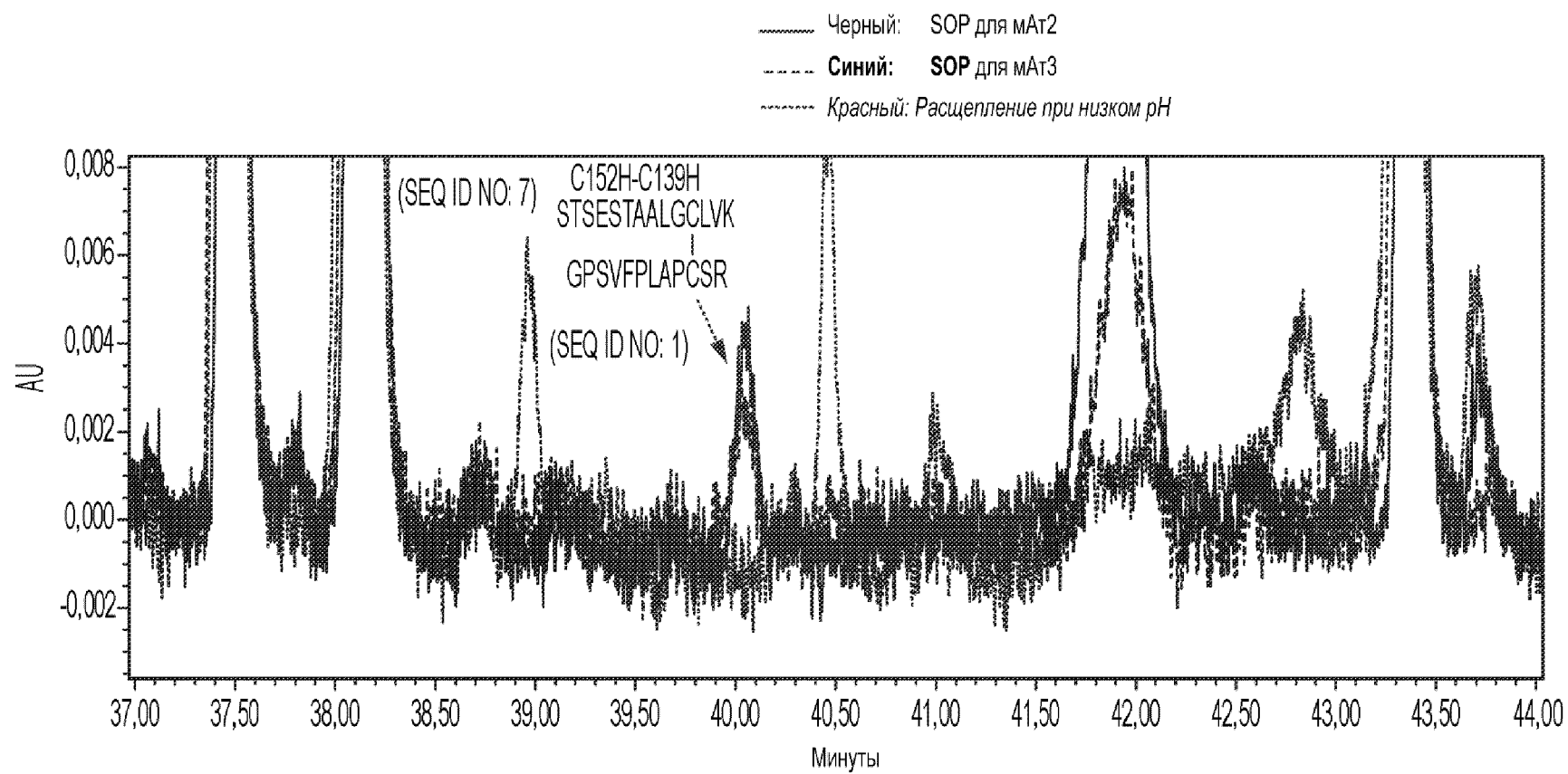
GPSVFPLAPCSR (SEQ ID NO: 1)



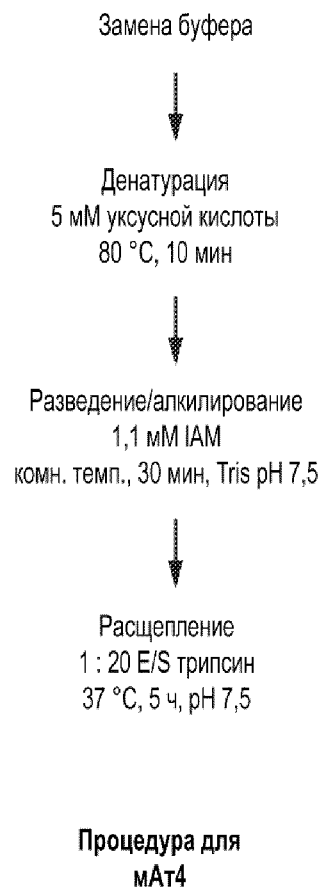
ФИГ. 21А



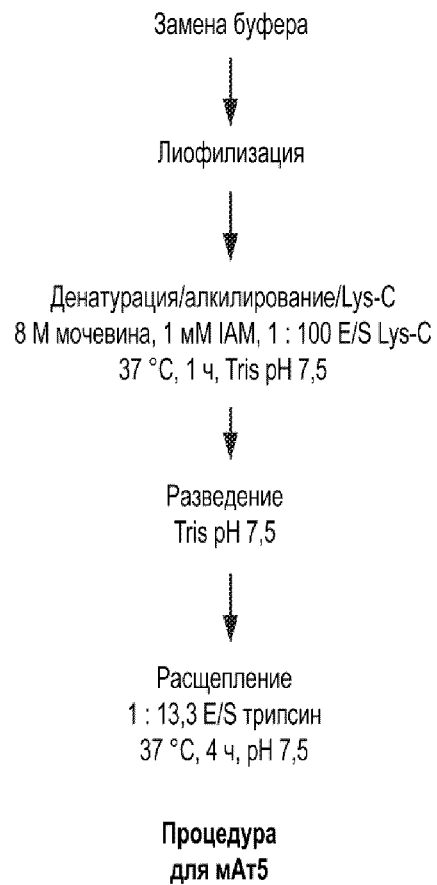
ФИГ. 21В



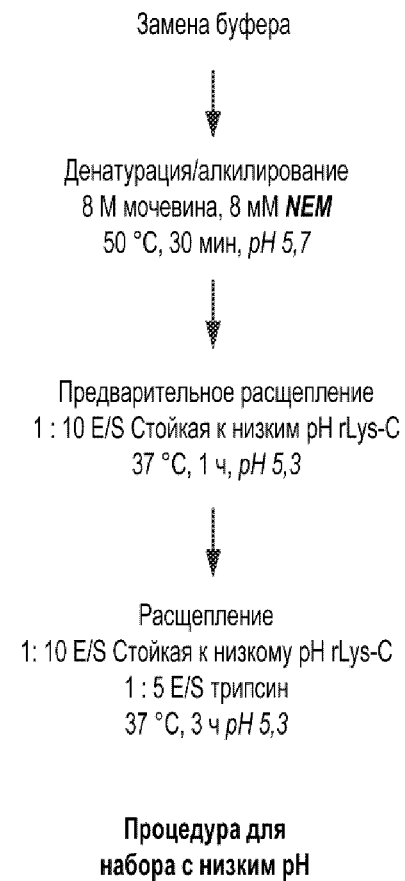
ФИГ. 22



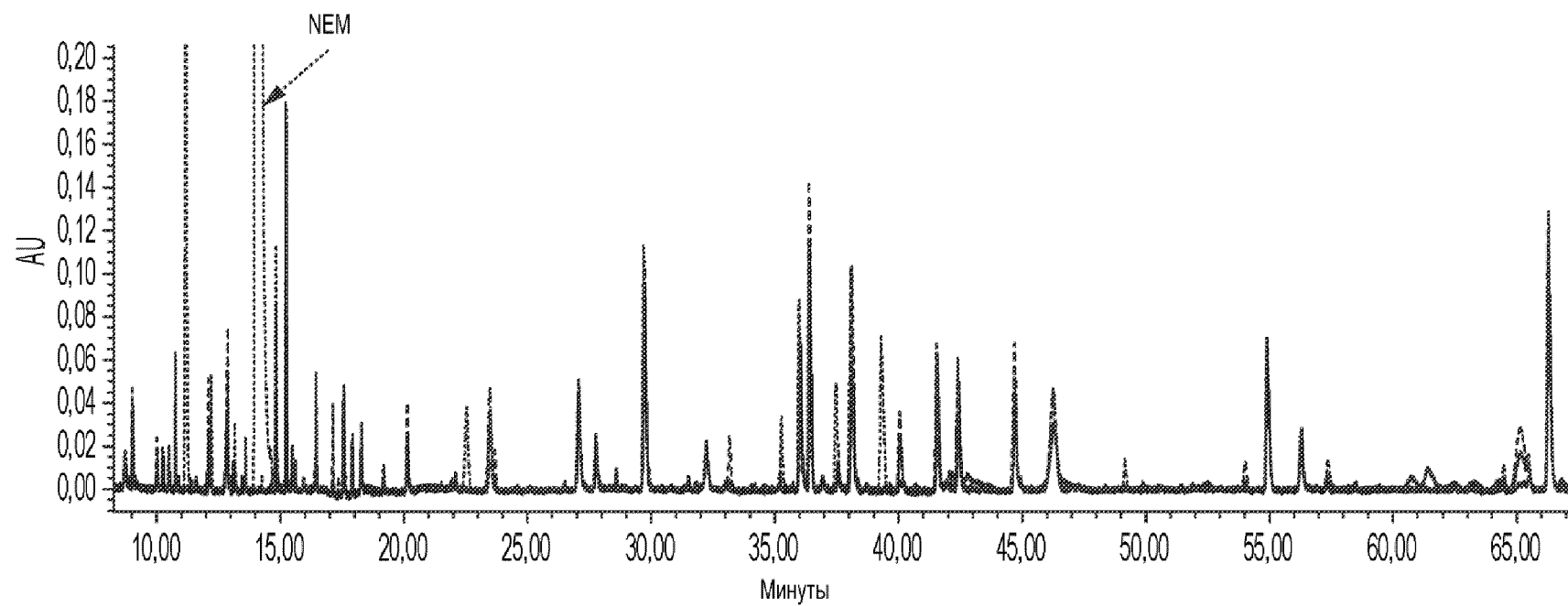
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В

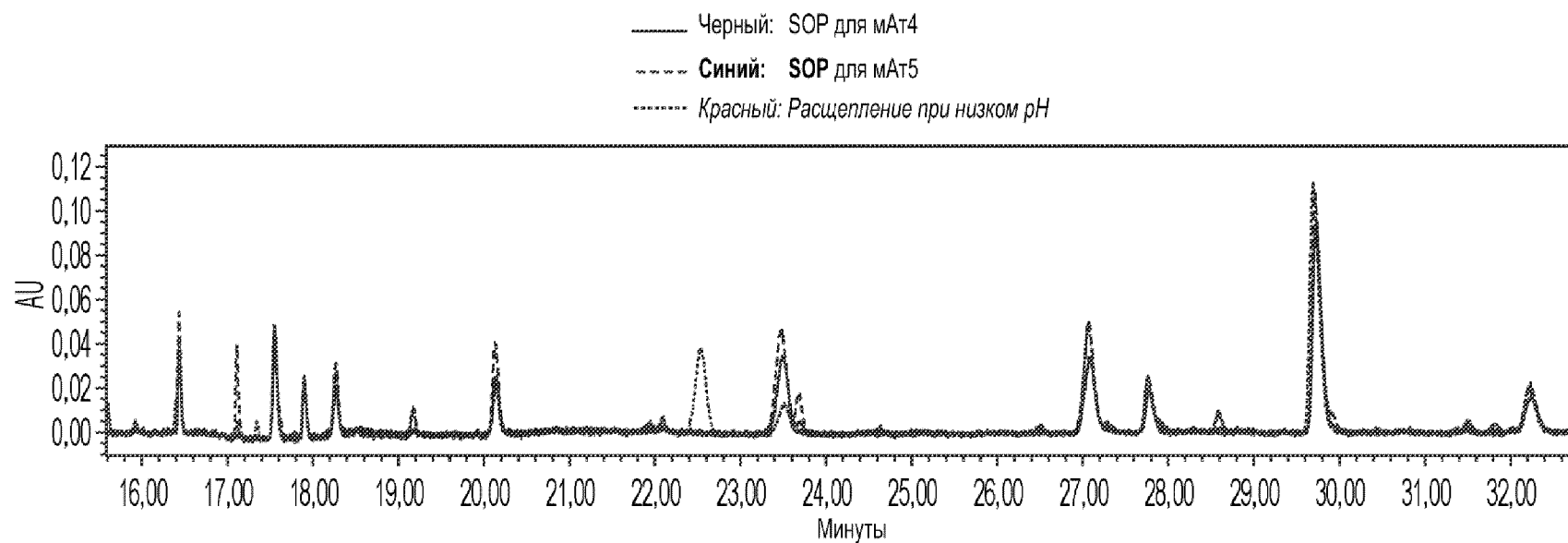


ФИГ. 23С

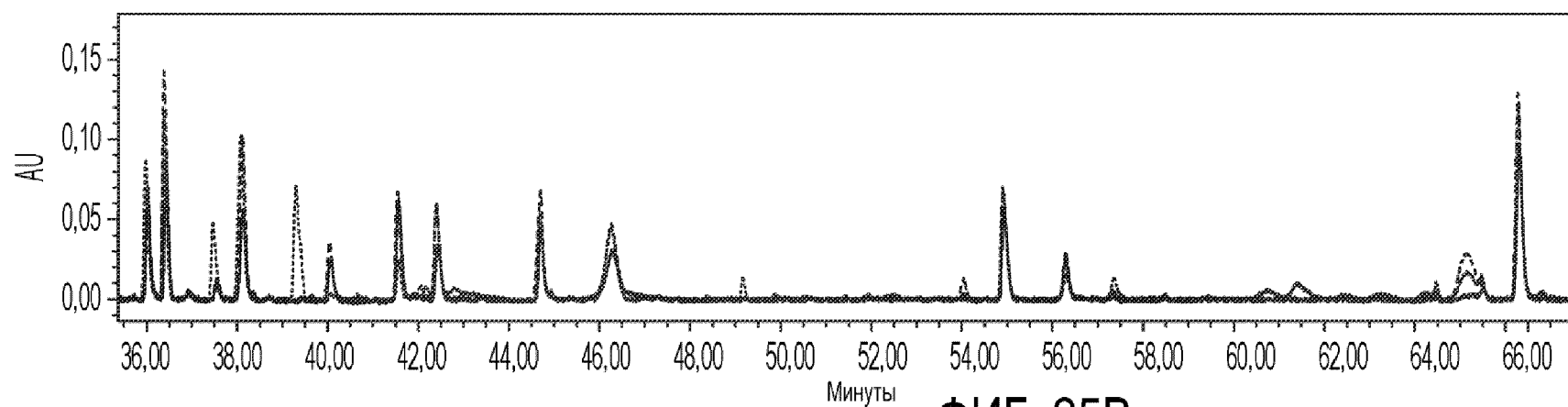


..... Черный: SOP для МАТ4
 - - - - - Синий: SOP для МАТ5
 - - - - - Красный: Расщепление при низком pH

ФИГ. 24

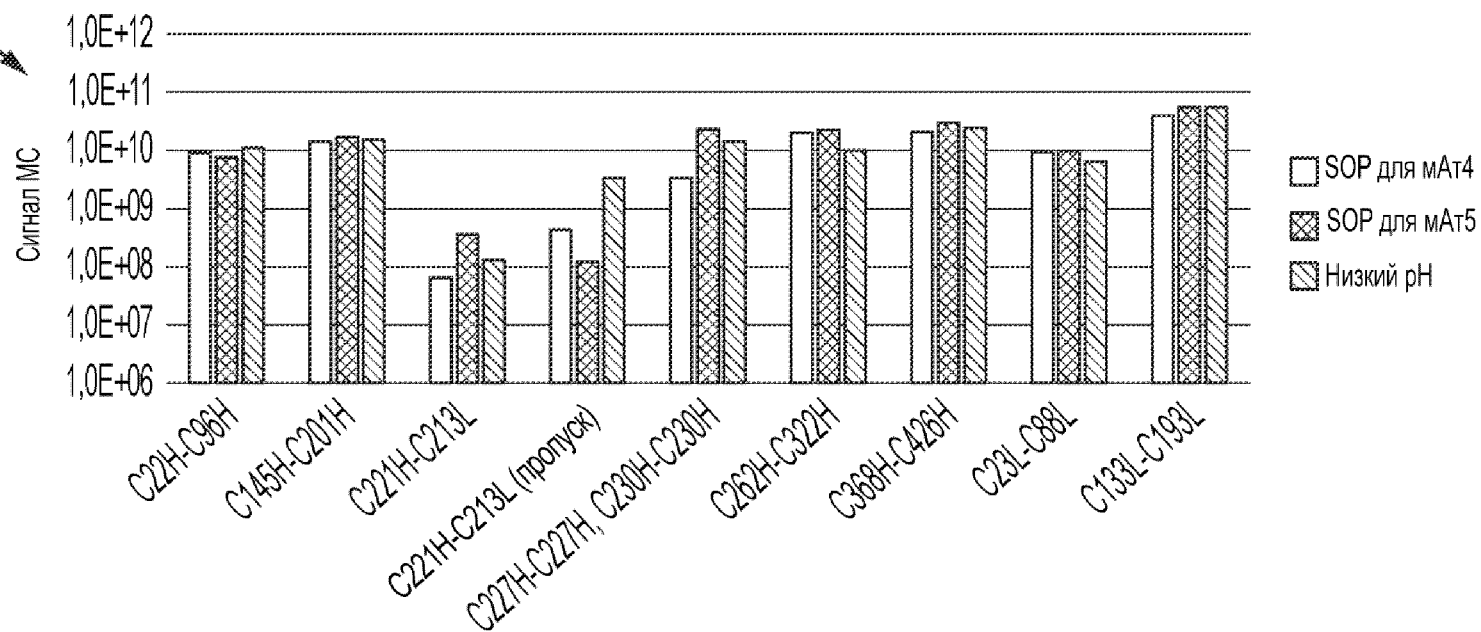


ФИГ. 25А



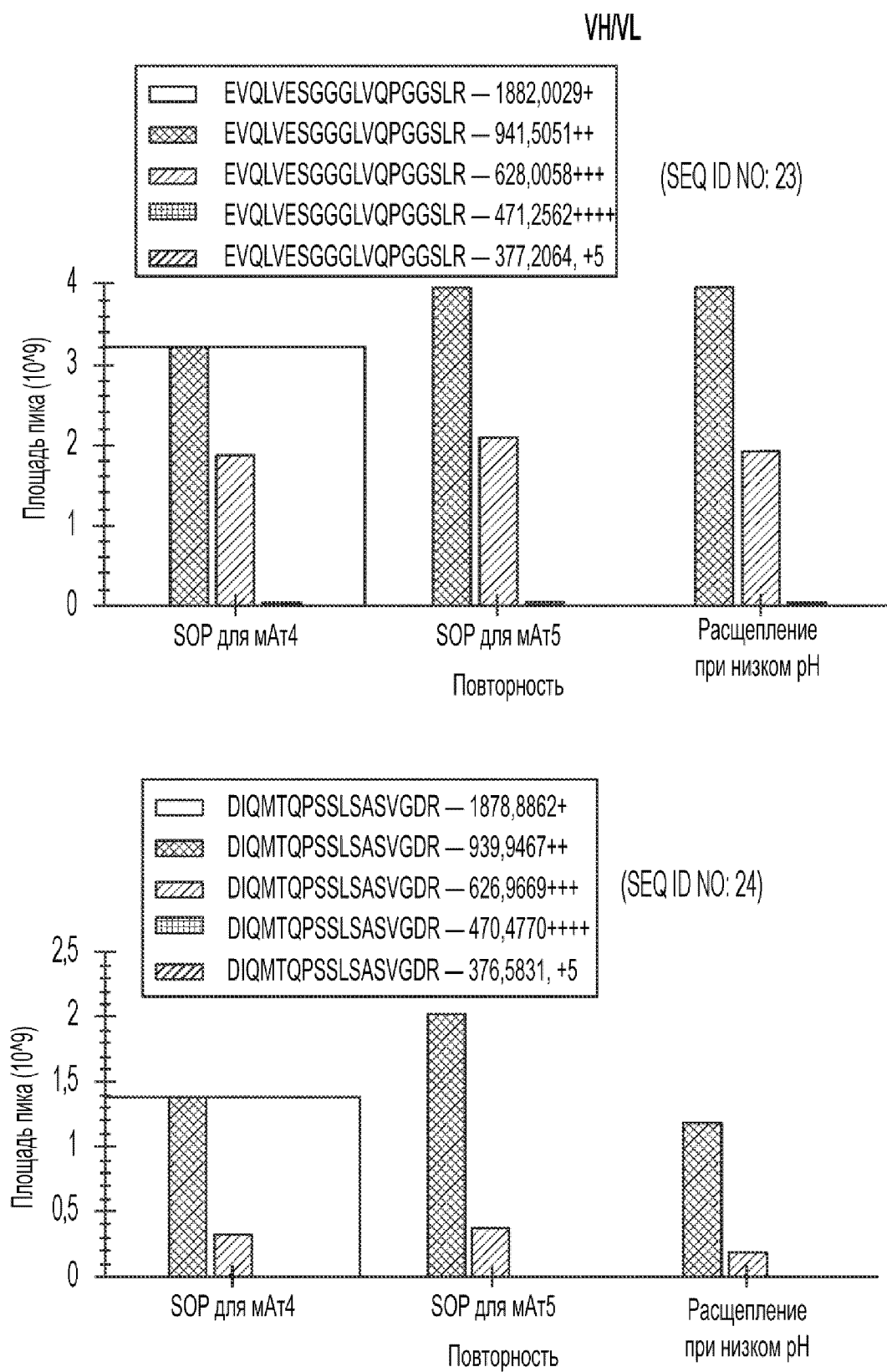
ФИГ. 25В

Log-шкала

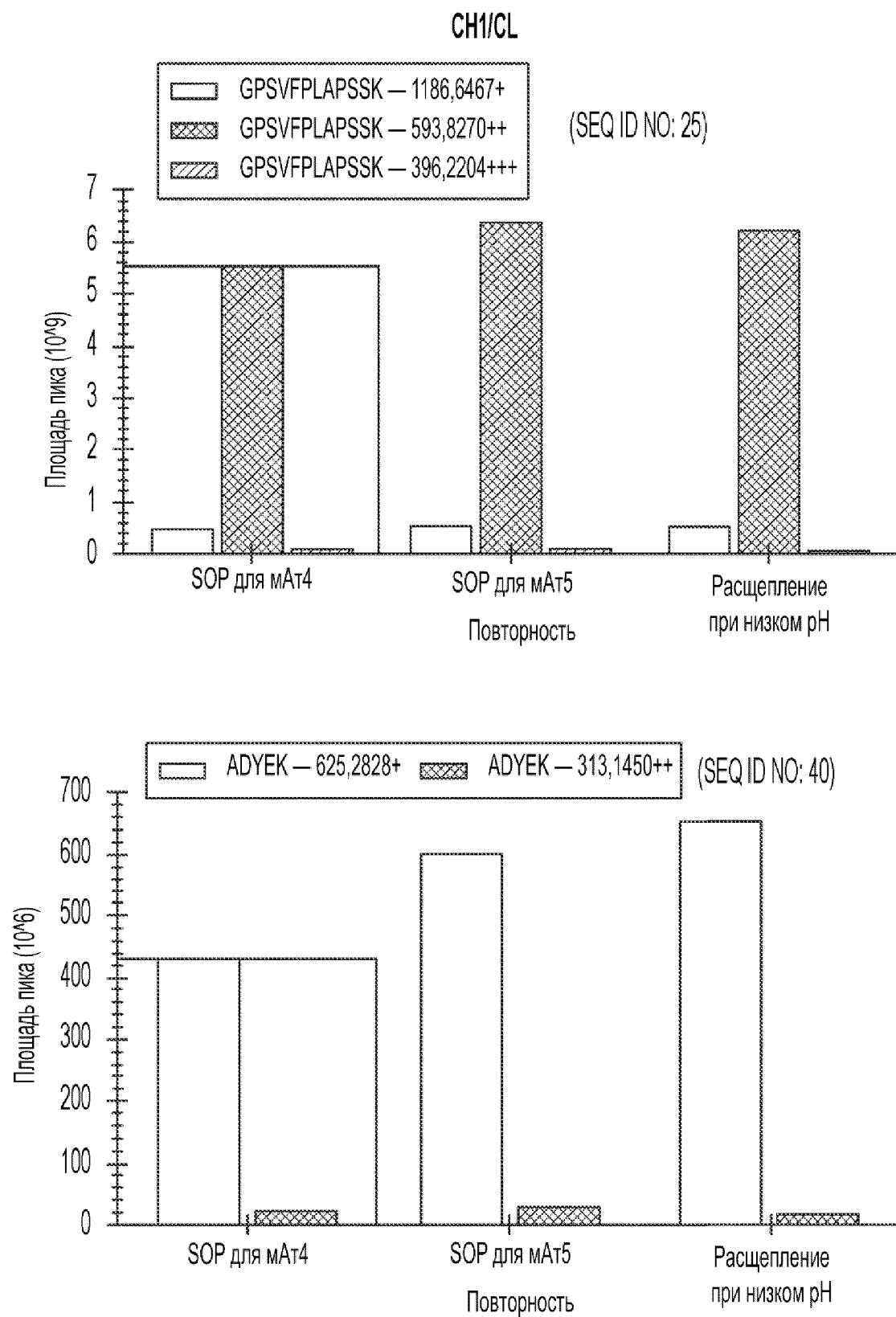


Нативные дисульфидные пептиды

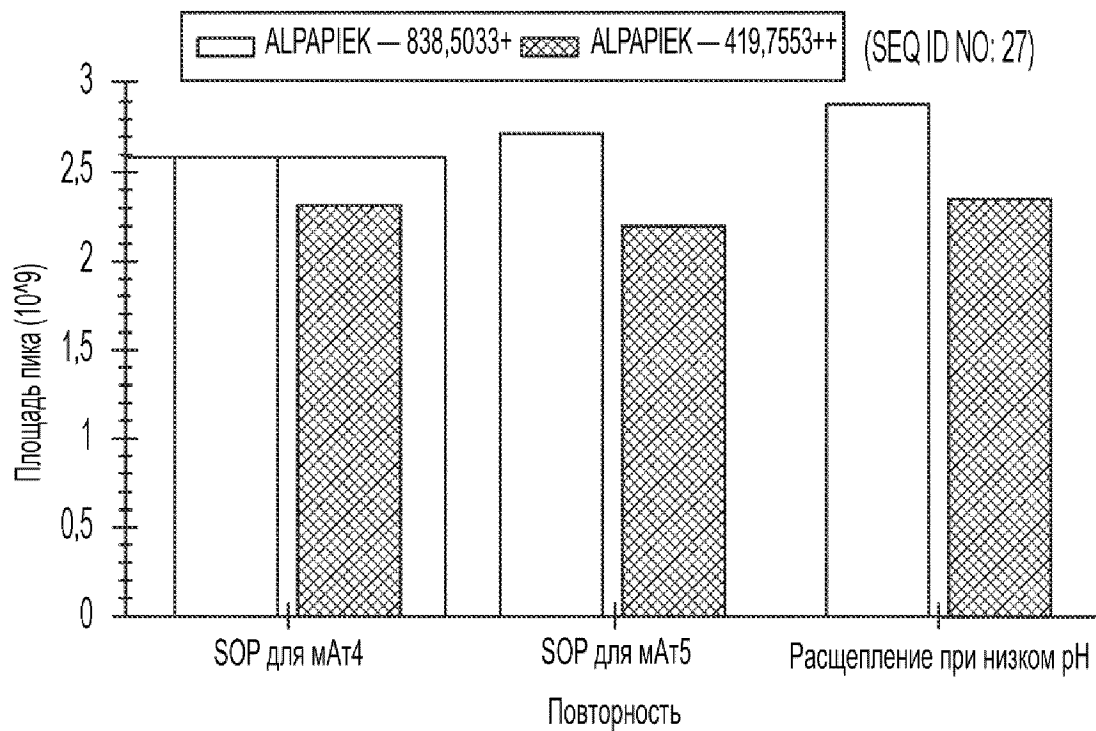
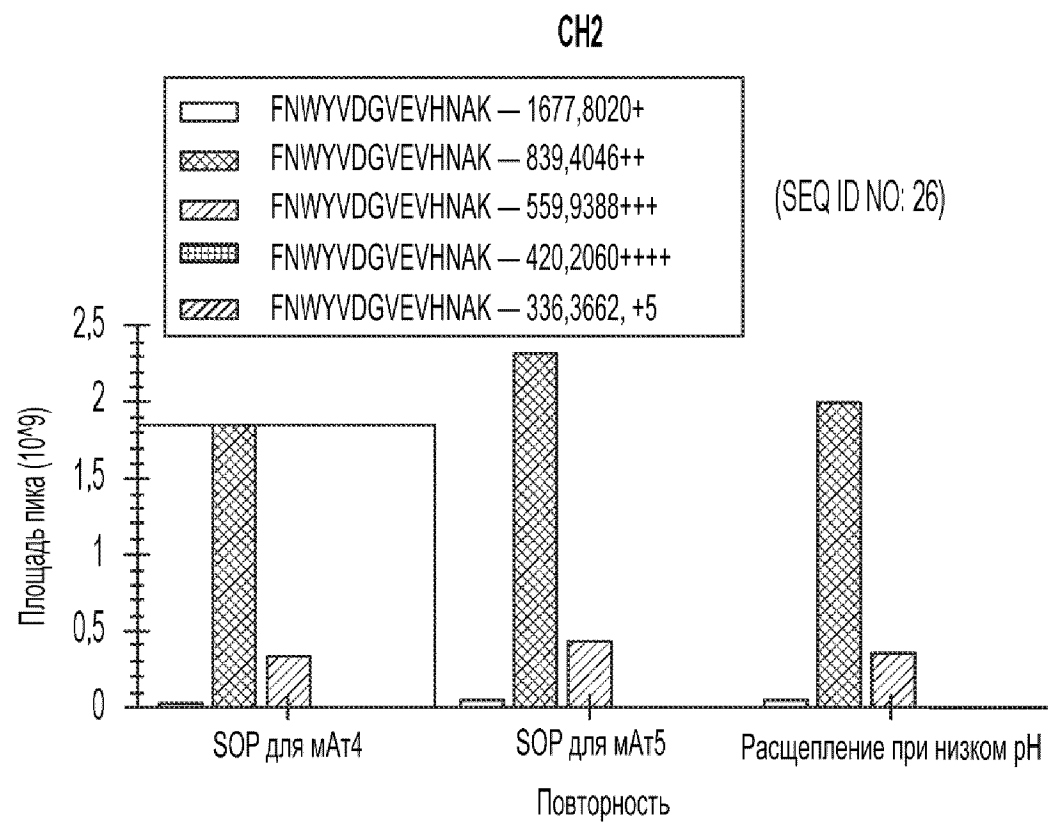
ФИГ. 26



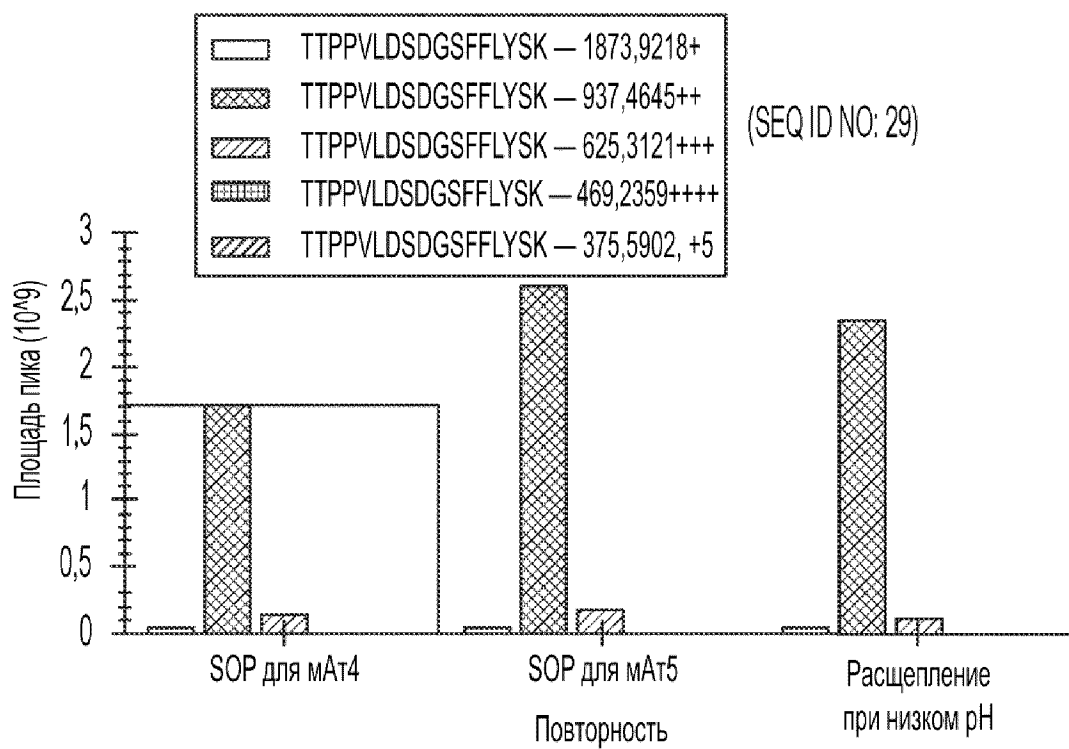
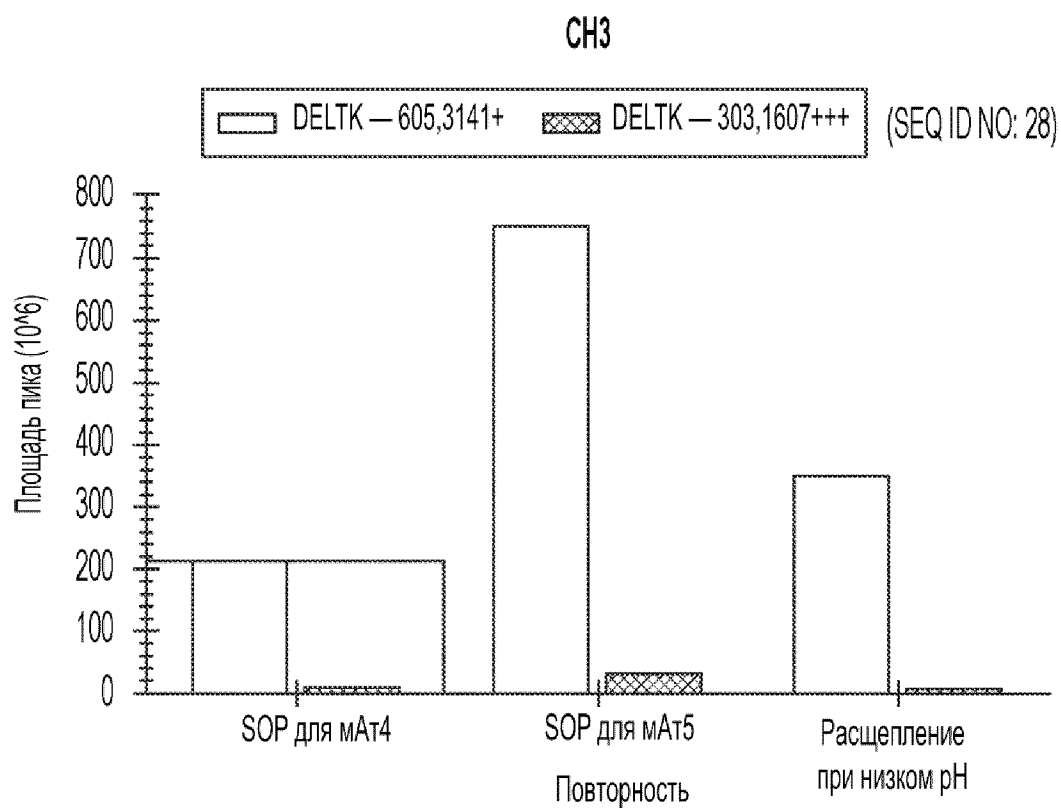
ФИГ. 27А



ФИГ. 27В



ФИГ. 27С



ФИГ. 27D

Обозначение цистеина	Триптический пептид mAt5
C22H	LSCAASGFTSSSYAMNWVR (SEQ ID NO: 30)
C96H	AEDTAVYYCAK (SEQ ID NO: 41)
C145H	STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 31)
C201H	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK (SEQ ID NO: 32)
C221H	SCDK (SEQ ID NO: 33)
C262H	TPEVTCVWVDVSHEDPEVK (SEQ ID NO: 34)
C322H	CK
C368H	NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 42)
C426H	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 43)
C23L	VTITCR (SEQ ID NO: 35)
C88L	FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTLTFGQGTR (SEQ ID NO: 36)
C133L	SGTASVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 44)
C193L	VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 45)
C213L	GEC/SFNRGEC

ФИГ. 28

Уровень достоверности

Пептид 1	Пептид 2
C368H	C368H
C368H	C96H
C368H	C193L
C368H	C133L
C368H	C23L
C368H	C88L
C368H	C22H
C368H	C145H
C368H	C201H
C368H	C221H
C368H	C262H
C368H	C213L
C368H	C322H
C96H	C96H
C96H	C193L
C96H	C133L
C96H	C23L
C96H	C88L
C96H	C145H
C96H	C201H
C96H	C221H
C96H	C262H
C96H	C426H
C96H	C213L
C96H	C322H

Пептид 1	Пептид 2
C193L	C193L
C193L	C23L
C193L	C88L
C193L	C22H
C193L	C145H
C193L	C201H
C193L	C221H
C193L	C262H
C193L	C426H
C193L	C213L
C193L	C322H
C133L	C133L
C133L	C23L
C133L	C88L
C133L	C22H
C133L	C145H
C133L	C201H
C133L	C221H
C133L	C262H
C133L	C426H
C133L	C213L
C133L	C322H
C23L	C23L
C23L	C22H
C23L	C145H

Не обнаружен
Низкий
Средний
Высокий
Сверхвысокий

Низкий = 16,7%

Средний = 20,0%

Высокий(+) = 63,3%

ФИГ. 29

Уровень достоверности

Пептид 1	Пептид 2
C23L	C201H
C23L	C221H
C23L	C262H
C23L	C426H
C23L	C213L
C23L	C322H
C88L	C88L
C88L	C22H
C88L	C145H
C88L	C201H
C88L	C221H
C88L	C262H
C88L	C426H
C88L	C213L
C88L	C322H
C22H	C22H
C22H	C145H
C22H	C201H
C22H	C221H
C22H	C262H
C22H	C426H
C22H	C213L
C22H	C322H
C145H	C145H
C145H	C221H

Пептид 1	Пептид 2
C145H	C262H
C145H	C426H
C145H	C213L
C145H	C322H
C201H	C201H
C201H	C221H
C201H	C262H
C201H	C426H
C201H	C213L
C201H	C322H
C221H	C221H
C221H	C262H
C221H	C426H
C221H	C322H
C262H	C262H
C262H	C426H
C262H	C213L
C426H	C426H
C426H	C213L
C426H	C322H
C213L	C213L
C213L	C322H
C213L	C322H
C322H	C322H

Не обнаружен
Низкий
Средний
Высокий
Сверхвысокий

Низкий = 16,7%

Средний = 20,0%

Высокий(+) = 63,3%

ФИГ. 29 (ПРОДОЛЖ.)

Пептид 1	Пептид 2	SOP для МАТ4	SOP для МАТ5	Расщепление при низком pH
C368H	C368H	0,31%	0,33%	0,00%
C368H	C96H	0,30%	1,01%	0,00%
C368H	C193L	0,66%	1,14%	0,00%
C368H	C133L	1,56%	1,08%	0,00%
C368H	C23L	0,96%	0,32%	0,00%
C368H	C88L	0,41%	0,24%	0,00%
C368H	C22H	0,53%	0,81%	0,00%
C368H	C145H	0,65%	1,12%	0,00%
C368H	C201H	0,50%	0,66%	0,00%
C368H	C221H	0,08%	0,11%	0,00%
C368H	C262H	3,61%	1,07%	0,00%
C368H	C213L	0,14%	0,10%	0,00%
C368H	C213L (пропуск)	0,02%	0,00%	0,00%
C368H	C322H	2,12%	0,46%	0,00%
C96H	C96H	0,02%	0,11%	0,00%
C96H	C193L	0,10%	0,25%	0,00%
C96H	C133L	0,55%	0,69%	0,00%
C96H	C23L	0,19%	0,27%	0,00%
C96H	C88L	0,14%	0,10%	0,00%
C96H	C145H	4,22%	1,53%	0,00%
C96H	C201H	0,42%	0,29%	0,00%
C96H	C221H	Н/О	Н/О	Н/О
C96H	C262H	0,24%	0,40%	0,00%
C96H	C426H	0,59%	1,13%	0,00%

ФИГ. 30А

C96H	C213L	0,10%	0,05%	0,00%
C96H	C213L (пропуск)	H/O	H/O	H/O
C96H	C322H	0,08%	0,12%	0,00%
C193L	C193L	0,16%	0,16%	0,00%
C193L	C23L	0,76%	0,21%	0,00%
C193L	C88L	0,25%	0,07%	0,00%
C193L	C22H	0,17%	0,03%	0,00%
C193L	C145H	0,83%	0,79%	0,00%
C193L	C201H	0,86%	0,32%	0,00%
C193L	C221H	0,22%	0,02%	0,00%
C193L	C262H	1,54%	0,99%	0,00%
C193L	C426H	0,68%	0,93%	0,00%
C193L	C213L	0,96%	0,02%	0,00%
C193L	C213L (пропуск)	0,33%	0,00%	0,00%

ФИГ. 30А (ПРОДОЛЖ.)

Пептид 1	Пептид 2	SOP для мАт4	SOP для мАт5	Расщепление при низком pH
C193L	C322H	0,18%	0,17%	0,00%
C133L	C133L	0,22%	0,27%	0,00%
C133L	C23L	3,03%	0,49%	0,00%
C133L	C88L	0,64%	Помехи	0,00%
C133L	C22H	0,57%	0,52%	0,00%
C133L	C145H	0,61%	0,42%	0,00%
C133L	C201H	1,01%	0,45%	0,00%
C133L	C221H	0,08%	0,03%	0,00%
C133L	C262H	2,59%	0,97%	0,00%
C133L	C426H	2,24%	1,48%	0,00%
C133L	C213L	0,29%	0,07%	0,00%
C133L	C213L (missed)	0,33%	0,00%	0,00%
C133L	C322H	0,93%	0,38%	0,00%
C23L	C23L	H/O	H/O	H/O
C23L	C22H	0,47%	0,48%	0,00%
C23L	C145H	1,15%	0,67%	0,00%
C23L	C201H	0,78%	0,29%	0,00%
C23L	C221H	H/O	H/O	H/O
C23L	C262H	1,52%	0,57%	0,00%
C23L	C426H	2,30%	0,88%	0,00%
C23L	C213L	H/O	H/O	H/O
C23L	C213L (пропуск)	H/O	H/O	H/O
C23L	C322H	0,29%	0,16%	0,00%

C88L	C88L	H/O	H/O	H/O
C88L	C22H	H/O	H/O	H/O
C88L	C145H	0,31%	0,19%	0,00%
C88L	C201H	H/O	H/O	H/O
C88L	C221H	H/O	H/O	H/O
C88L	C262H	0,28%	0,09%	0,00%
C88L	C426H	0,92%	0,22%	0,00%
C88L	C213L	H/O	H/O	H/O
C88L	C213L (пропуск)	H/O	H/O	H/O
C88L	C322H	0,16%	0,05%	0,00%
C22H	C22H	0,08%	0,09%	0,00%
C22H	C145H	1,70%	0,61%	0,00%
C22H	C201H	0,46%	0,18%	0,00%
C22H	C221H	0,16%	0,09%	0,00%

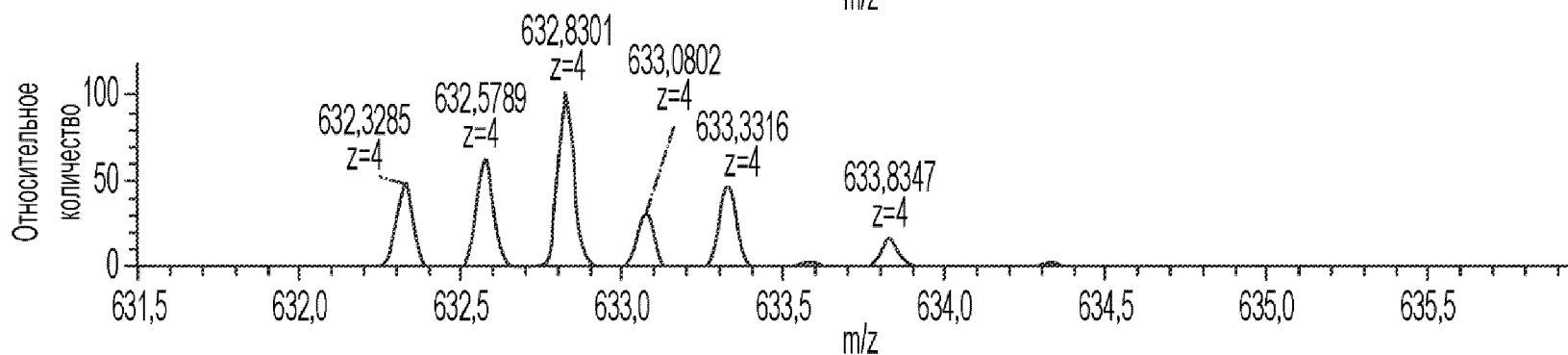
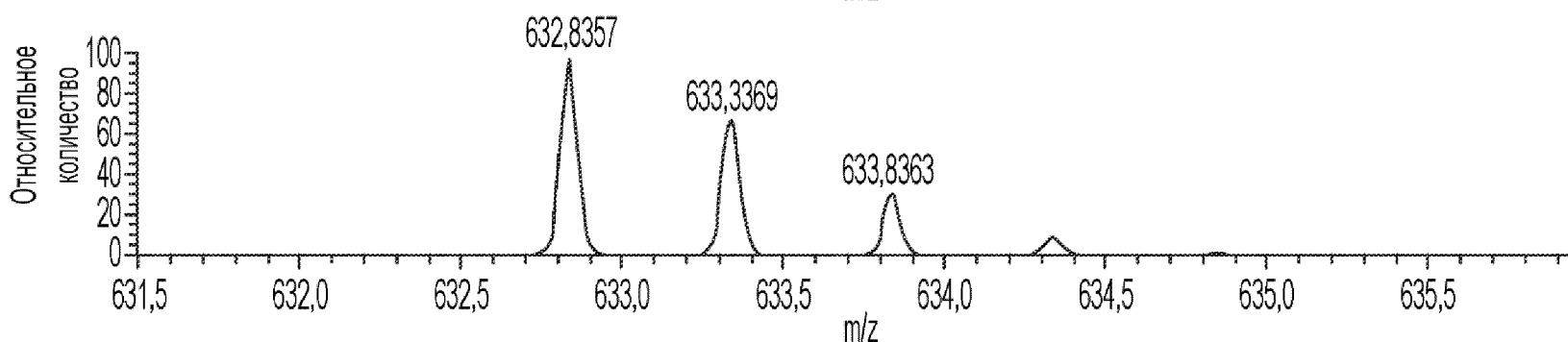
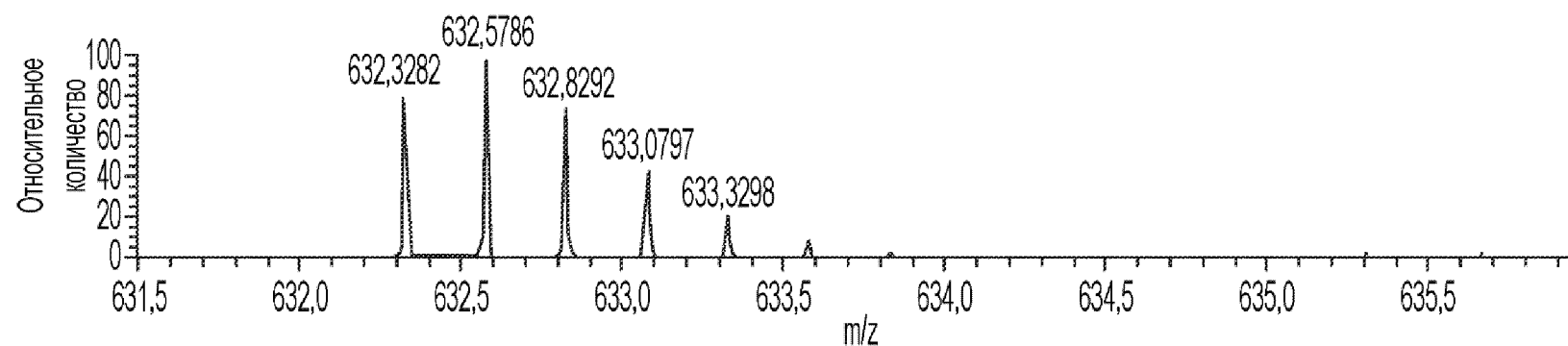
ФИГ. 30В (ПРОДОЛЖ.)

Пептид 1	Пептид 2	SOP для мАт4	SOP для мАт5	Расщепление при низком pH
C22H	C262H	1,16%	1,13%	0,00%
C22H	C426H	Помехи	0,89%	0,00%
C22H	C213L	0,52%	0,12%	0,00%
C22H	C213L (пропуск)	0,16%	0,00%	0,00%
C22H	C322H	0,20%	0,05%	0,00%
C145H	C145H	1,78%	0,79%	0,00%
C145H	C221H	0,84%	0,21%	0,00%
C145H	C262H	0,86%	0,83%	0,00%
C145H	C426H	1,03%	0,71%	0,00%
C145H	C213L	1,80%	0,19%	0,00%
C145H	C213L (пропуск)	1,45%	0,00%	0,00%
C145H	C322H	1,05%	0,64%	0,00%
C201H	C201H	Н/О	Н/О	Н/О
C201H	C221H	0,70%	0,00%	0,00%
C201H	C262H	0,68%	0,41%	0,00%
C201H	C426H	0,91%	0,62%	0,00%
C201H	C213L	1,09%	0,07%	0,00%
C201H	C213L (пропуск)	0,24%	0,00%	0,00%
C201H	C322H	0,31%	0,16%	0,00%
C221H	C221H	0,91%	0,14%	0,00%
C221H	C262H	Н/О	Н/О	Н/О
C221H	C426H	0,30%	0,13%	0,00%
C221H	C322H	Н/О	Н/О	Н/О

ФИГ. 30С

C262H	C262H	0,75%	0,06%	0,00%
C262H	C426H	1,57%	0,88%	0,00%
C262H	C213L	Помехи	Помехи	0,00%
C262H	C213L (пропуск)	Н/О	Н/О	Н/О
C426H	C426H	0,53%	0,68%	0,00%
C426H	C213L	0,63%	0,14%	0,00%
C426H	C213L (пропуск)	0,09%	0,00%	0,00%
C426H	C322H	1,24%	0,26%	0,00%
C213L	C213L	Н/О	Н/О	Н/О
C213L	C213L (пропуск)	Н/О	Н/О	Н/О
C213L	C322H	Н/О	Н/О	Н/О
C213L (пропуск)	C213L (пропуск)	Н/О	Н/О	Н/О
C213L (пропуск)	C322H	0,04%	0,00%	0,00%
C322H	C322H	Н/О	Н/О	Н/О

ФИГ. 30С (ПРОДОЛЖ.)



STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 31)
 STSGGTAALGCLVK

ФИГ. 31