

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

202392863

(13)

A1

(12)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43)

Дата публикации заявки
2024.02.01

(51)

Int. Cl. G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/84 (2006.01)
H01J 49/16 (2006.01)

(22)

Дата подачи заявки
2021.01.29

(54)

ПЛАТФОРМА ДЛЯ НАТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ

(31)

62/967,836; 63/041,348

(72)

Изобретатель:
Ванг Шунхай, Янь Юэтянь (US)

(32)

2020.01.30; 2020.06.19

(33)

US

(74)

Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(62)

202292219; 2021.01.29

(71)

Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57)

Раскрыты системы нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии и способы их использования. Нативная система жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии может включать систему жидкостной хроматографии, способную разделять образец; и система масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS), сообщающаяся по текучей среде с системой жидкостной хроматографии, при этом система ESI-MS включает эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами и систему для модификации десольватирующего газа и масс-спектрометр, при этом масс-спектрометр сконфигурирован для приема ионов и определения отношения массы к заряду ионов.

202392863

A1

A1

202392863

ПЛАТФОРМА ДЛЯ НАТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[001] Данное изобретение относится к системе и способу характеристики белка и, в частности, к платформе нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) для характеристики белков, таких как белковые биофармацевтические препараты.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Масс-спектрометрия (МС) с ионизацией электрораспылением (ESI) в сочетании с методами хроматографического и электрофоретического разделения является ключевой технологией в протеомике. Она стала важным инструментом для углубленной характеристики белковых биофармацевтических препаратов в аналитических лабораториях для поддержки их разработки и подачи нормативных документов. Белковые биофармацевтические препараты должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты, поэтому важно отслеживать и характеризовать белки на разных этапах разработки и производства лекарств.

[003] Анализ белковых биофармацевтических препаратов на основе жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) может значительно выиграть от повышения качества данных, что впоследствии может привести к улучшению характеристик лекарств с большей достоверностью и меньшей неопределенностью. Чтобы получить характеристику различных атрибутов белка, можно выполнить широкий спектр анализов на основе ЖХ-МС, в рамках которых анализ пептидного картирования и анализ интактной массы наиболее часто и широко применяются. Чтобы повысить достоверность анализа и уменьшить неоднозначность, связанную с интерпретацией данных, необходимо прилагать постоянные усилия для улучшения качества данных анализа ЖХ-МС, в том числе с использованием оптимизированных экспериментальных процедур, а также точной настройки параметров прибора и более совершенных масс-спектрометров.

КРАТКАЯ СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[004] В одном аспекте, данное изобретение обеспечивает систему нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, включающую: систему жидкостной хроматографии, способную разделять образец; а также систему масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS), сообщающаяся по текучей среде с системой жидкостной хроматографии, при этом система ESI-MS включает эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами, систему модификации десольватационного газа и масс-спектрометр, причем масс-спектрометр сконфигурирован для приема ионов и определения отношения массы к заряду ионов.

[005] В некоторых вариантах реализации, система для модификации газа десольватации содержит контейнер с крышкой, при этом крышка имеет порт впускной линии и порт выпускной линии; впускную линию защитного газа для подачи защитного газа к порту впускной линии; и модифицированную выпускную линию газа

десольватации, способную соединять порт выпускной линии модифицированного газа десольватации с эмиттером ионизации электрораспылением с несколькими соплами.

[006] В некоторых вариантах реализации, контейнер содержит органический растворитель и дополнительный химический компонент.

[007] В некоторых вариантах реализации дополнительный химический компонент представляет собой кислоту.

[008] В некоторых вариантах реализации, кислота представляет собой трифторуксусную кислоту.

[009] В некоторых вариантах реализации дополнительный химический компонент представляет собой основание.

[0010] В некоторых вариантах реализации, основание представляет собой триэтиламин.

[0011] В некоторых вариантах реализации органический соразтворитель представляет собой ацетонитрил.

[0012] В некоторых вариантах реализации, защитный газ представляет собой азот.

[0013] В некоторых вариантах реализации, впускная линия защитного газа частично вставлена в отверстие впускной линии.

[0014] В некоторых вариантах реализации, выпускная линия модифицированного газа десольватации частично вставлена в отверстие выпускной линии.

[0015] В некоторых вариантах реализации, защитный газ поступает из впускной линии защитного газа через контейнер, содержащий органический растворитель, в выпускную линию газа десольватации.

[0016] В некоторых вариантах реализации, эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами включает в себя восемь сопел.

[0017] В некоторых вариантах реализации, система жидкостной хроматографии включает колонку для эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

[0018] В некоторых вариантах реализации, система жидкостной хроматографии содержит столбец ионообменной хроматографии (ИЕХ).

[0019] В некоторых вариантах реализации, система жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии дополнительно содержит аналитический делитель потока для регулирования скорости потока от жидкостного хроматографа к масс-спектрометру.

[0020] В некоторых вариантах реализации, аналитический делитель потока способен обеспечить электрораспыление со скоростью потока растворителя около от 1 до 5 мкл/мин.

[0021] В некоторых вариантах реализации, масс-спектрометр содержит масс-анализатор с орбитальной ловушкой.

[0022] В некоторых вариантах реализации, раскрыт способ характеристики белка в образце, включающий: подачу образца в систему жидкостной хроматографии, обеспечивающую разделение и фрагментацию образца; и анализ фрагментированного образца с использованием системы масс-спектрометрии с ионизацией

электрораспылением (ESI-MS), сообщаемой по текучей среде с системой жидкостной хроматографии, при этом система ESI-MS включает эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами, систему для модификации десольватирующего газа и масс-спектрометр, при этом масс-спектрометр сконфигурирован для приема ионов и определения отношения массы к заряду ионов для идентификации компонентов белка для характеристики белка.

[0023] В некоторых вариантах реализации, белок представляет собой антитело, слитый белок, рекомбинантный белок или их комбинацию.

[0024] В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0025] В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанного изотипа.

[0026] В некоторых вариантах реализации, способ не требует дегликозилирования белка в образце перед подачей образца в систему жидкостной хроматографии.

[0027] В некоторых вариантах реализации, способ предназначен для определения характеристик примесей с высокой молекулярной массой и с низкой молекулярной массой.

[0028] В некоторых вариантах реализации способа, система для модификации газа десольватации содержит контейнер с крышкой, при этом крышка имеет порт впускной линии и порт выпускной линии; впускную линию защитного газа для подачи защитного газа на вход линейный порт; и модифицированную выпускную линию газа десольватации, способную соединять порт выпускной линии модифицированного газа десольватации с эмиттером ионизации электрораспылением с несколькими соплами.

[0029] В некоторых вариантах реализации способа, контейнер содержит органический растворитель и дополнительный химический компонент.

[0030] В некоторых вариантах реализации способа, дополнительным химическим компонентом является кислота.

[0031] В некоторых вариантах реализации способа, кислота представляет собой трифторуксусную кислоту.

[0032] В некоторых вариантах реализации способа, дополнительным химическим компонентом является основание.

[0033] В некоторых вариантах реализации способа, основание представляет собой триэтиламин.

[0034] В некоторых вариантах реализации способа, органическим растворителем является ацетонитрил.

[0035] В некоторых вариантах реализации способа, защитный газ представляет собой азот.

[0036] В некоторых вариантах реализации способа, впускная линия защитного газа частично вставляется в порт впускной линии.

[0037] В некоторых вариантах реализации способа, выпускная линия

модифицированного газа десольватации частично вставляется в порт выпускной линии.

[0038] В некоторых вариантах реализации способа защитный газ поступает из выпускной линии защитного газа через контейнер, содержащий органический растворитель, в выпускную линию газа десольватации.

[0039] В некоторых вариантах реализации способа излучатель ионизации электрораспылением с несколькими соплами включает в себя восемь сопел.

[0040] В некоторых вариантах реализации способа система жидкостной хроматографии включает колонку для эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

[0041] В некоторых вариантах реализации способа система жидкостной хроматографии включает ионообменную хроматографическую (ИЕХ) колонку.

[0042] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает использование аналитического делителя потока для регулирования скорости потока от жидкостного хроматографа к масс-спектрометру.

[0043] В некоторых вариантах реализации способа аналитический делитель потока способен обеспечивать электрораспыление со скоростью потока растворителя от 1 до 5 мкл/мин.

[0044] В некоторых вариантах реализации способа масс-спектрометр содержит масс-анализатор с орбитальной ловушкой.

[0045] В различных вариантах реализации изобретения, любые из признаков или компонентов вариантов реализации изобретения, обсуждаемых выше или описанных в данном документе, можно комбинировать, и такие комбинации входят в рамки настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в данном документе, может быть комбинировано с другим взаимосвязанным значением, обсуждаемым выше или далее в данном 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, охваченные в пределах объема 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 реализации изобретения будут выявлены из обзора следующего подробного описания изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0046] **На Фиг. 1** показана схема околого варианта реализации собственной платформы ЖХ-МС, раскрытой в настоящем документе, которая обеспечивает чувствительную, надежную и универсальную собственную платформу ЖХ-МС.

[0047] **На Фиг. 2** показан микроизготовленный монолитный эмиттер с несколькими соплами (МЗ), который используется в варианте реализации собственной платформы ЖХ-МС, описанной в настоящем документе.

[0048] **На Фиг. 3** показана чувствительность платформы с помощью анализа SEC-MS NISTmAb (10 мкг). Низкое потребление количества образца, введение 10 мкг образца NISTmAb приводит к интенсивности ТИС ~ E9. Превосходное качество данных благодаря эффективной десольватации с помощью газа десольватации, модифицированного ИПС. Чувствительное обнаружение видов с низкой численностью (*например*, виды HMW и LMW) без необходимости дегликозилирования. Точные измерения массы позволяют однозначно идентифицировать эти виды.

[0049] **На Фиг. 4А и 4В** показана надежность платформы, продемонстрированная 101 последовательным прогоном нативной SEC-MS NISTmAb.

[0050] **На Фиг. 5А и 5В** показан эффект снижения заряда, обеспечиваемый модификацией десольватирующего газа во время анализа нативной SCX-MS. На Фиг. 5А показано небольшое падение интенсивности ТИС, связанное с уменьшением заряда. На Фиг. 5В показан эффект снижения заряда, продемонстрированный антителом В.

[0051] **На Фиг. 6** показан анализ гетерогенных и/или лабильных биомолекул с помощью снижения заряда. На верхней панели представлены результаты нативного анализа SEC-MS имитатора ADC цистеина со снижением заряда, а на нижней панели - без снижения заряда. Как показано, уменьшение заряда предотвратило перекрытие состояний заряда благодаря улучшенному пространственному разрешению, что позволило проводить анализ образца с высокой неоднородностью по массе. Кроме того, снижение заряда помогло сохранить лабильные биомолекулы (не связанные ковалентно) во время процесса ионизации и свести к минимуму нежелательные события диссоциации.

[0052] **На Фиг. 7** показана платформа НЖХ-МС в соответствии с раскрытыми здесь вариантами реализации.

[0053] **На Фиг. 8А** показано УФ- и ТИС-следы, полученные в результате обессоливающего анализа SEC-MS mAb1 при различных скоростях потока;

[0054] **На Фиг. 8В** показан ТИС след от 90 обессоливающих циклов SEC-MS mAb2 при 0,8 мл/мин. Каждое инъекционное количество (0,1, 1 и 10 мкг) повторно анализировали 30 раз. На вставке показана увеличенная область, содержащая 4 цикла обессоливания SEC-MS.

[0055] **Фиг 9А и 9В** показывают обессоливающий SEC-MS анализ mAb1. На Фиг. 9А представлено сравнение интенсивности сигнала МС (левая ось ординат) и точности массы (правая ось ординат), достигнутой при использовании 150, 300, 450 и 600 mM ацетата аммония в качестве подвижной фазы (по три повторения анализа для каждого). На Фиг. 9В приведен пример необработанного масс-спектра mAb1, полученного с использованием 600 mM ацетата аммония, демонстрирующего успешное обнаружение различных гликоформ в результате макро- и микрогетерогенности N-гликозилирования Fc.

[0056] **На Фиг. 10А** показаны репрезентативные нативные масс-спектры mAb5, полученные при различных условиях снижения заряда.

[0057] **На Фиг. 10B и 10C** показана оценка различных органических модификаторов на способность к снижению заряда в режиме онлайн путем проведения анализа nSEC-MS и nIEX-MS образца смеси из четырех mAb. Интенсивность МС (левая ось ординат) и среднее состояние заряда (правая ось ординат) каждой молекулы mAb измеряют в трех повторениях и наносят на график для каждого условия.

[0058] **На Фиг. 11** показаны масс-спектры после деконволюции.

[0059] **На Фиг. 12A и 12B** показаны исходные масс-спектры, полученные в результате обессоливающего SEC-MS анализа mAb1 с использованием скорости потока подвижной фазы 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 и 0,8 мл/мин.

[0060] **На Фиг. 13A и 13B** показан ТИС девяти непрерывных нативных НИС-MS-анализов различных mAb с использованием стратегии разделения потока на нативной платформе LC-MS.

[0061] **На Фиг. 14A, 14B и 14C** показан анализ смеси mAb с помощью ACN/NH₃ с помощью nIEX-MS, показывающий (Фиг. 14A) nIEX-TIC, (Фиг. 14B) необработанные масс-спектры основных пиков каждого mAb и (Фиг. 14C) в увеличенном масштабе $z=7$ из необработанных масс-спектров.

[0062] **На Фиг. 15** показаны нативные масс-спектры mAb2, полученные на платформе нЖХ-МС после длительного анализа (> 24 часов) с использованием немодифицированного газа для десольватации (верхняя панель) или газа для десольватации, модифицированного ИПС (нижняя панель).

[0063] **На Фиг. 16-1 и 16-2** показан нативный анализ SCX-MS NISTmAb с количеством инъекции 10 мкг.

[0064] **На Фиг. 17** показана оценка надежности собственной платформы ЖХ-МС путем проведения непрерывного анализа с использованием nSEC-MS (вверху, рабочий цикл 24 мин) или nIEX-MS (внизу, рабочий цикл 30 мин) в течение > 24 часов каждый.

[0065] **На Фиг. 18** показана сводка вариантов размера и заряда, обнаруженных с помощью nSEC-MS и nIEX-MS анализов 10 мкг эталонного стандартного образца NISTmAb.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0066] Под описанием сущности настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания частных вариантов реализации и не предназначена для ограничения, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты реализации или признаки вариантов реализации могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем настоящего изобретения.

[0067] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной

области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В настоящем документе термин «около» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение «около 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[0068] Используемые здесь термины «включает», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «включать», «включает» и «содержащий» соответственно.

[0069] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящей спецификации, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылок.

Сокращения, используемые в дальнейшем

- [0070] ACN: Аетонитрил
- [0071] Asn: Аспарагин
- [0072] CQA: Критические Атрибуты Качества
- [0073] CV: Коэффициент Вариации
- [0074] EIC: Хроматограф Извлеченных Ионов
- [0075] ESI-MS: Масс-спектрометрия с Ионизацией Электрораспылением
- [0076] FA: Муравьиная Кислота
- [0077] FDA: Управление По Санитарному Надзору За Качеством Пищевых
Продуктов и Медикаментов
- [0078] FG: Полностью Гликозилированный
- [0079] FLR: Флуоресцентное Обнаружение
- [0080] HBA: 4-гидроксibenзойная Кислота
- [0081] HC: Тяжелая Цепь
- [0082] HIC: Хроматография Гидрофобного Взаимодействия
- [0083] HILIC: Жидкостная Хроматография Гидрофильного Взаимодействия
- [0084] HMW: Высокая Молекулярная Масса
- [0085] IEX: Ионообменная Хроматография
- [0086] IgG: Иммуноглобулин G
- [0087] IPA: Изопропанол
- [0088] LC: Легкая Цепь
- [0089] ЖХ-МС: Жидкостная Хроматография-Масс-Спектрометрия
- [0090] LMW: Низкомолекулярный Вес
- [0091] mAb: Моноклональное Антитело
- [0092] MS: Масс-Спектрометрия
- [0093] MW: Молекулярная Масса

- [0094] NCE: Нормализованная Энергия Столкновения
- [0095] NG: Негликозилированный
- [0096] nLC: Нативная Жидкостная Хроматография
- [0097] PA: Пропионовая Кислота
- [0098] PG: Частично Гликозилированный
- [0099] PK: Фармакокинетика
- [00100] PQA: Атрибут Качества Продукта
- [00101] PTM: Посттрансляционная Модификация
- [00102] RP-LC: Жидкостная Хроматография С Обращенной Фазой
- [00103] SPE: Твердофазная Экстракция
- [00104] SEC: Эксклюзионная Хроматография
- [00105] TCEP-HCl: Трис (2-карбоксиэтил) Фосфин Гидрохлорид
- [00106] TFA: Трифторуксусная Кислота
- [00107] TMT: Тандемная Массовая Метка
- [00108] UV: Ультрафиолет

Определения

[00109] Используемый в данном документе термин «белок» включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относится к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов для формирования одной функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других химерных белков, слитых с рецептором Fc, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антител, нанотела, рекомбинантные химеры антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных систем продукции на основе клеток, таких как баккуловирусыная система насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их производству, см. в Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and

challenges of non-human sialylation, “» (Biotechnol. Genet. Eng. Rev. (2012) 147-75). В некоторых вариантах реализации белки включают модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), PEG, полигистидин, FLAGtag, белок, связывающий мальтозу (MBP), белок, связывающий хитин (CBP), мус-эпитоп глутатион-S-трансферазы (GST), флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротейны, гликопротейны, мукопротейны, хромопротейны, фосфопротейны, металлопротейны и липопротейны; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

[00110] Вариант белка», или «белковый вариант», или «вариант», как используется в данном документе, может включать белок, который отличается от целевого белка на основании по меньшей мере одной модификации аминокислоты. Вариант белка может относиться к самому белку, композиции, содержащей белок, или аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Предпочтительно вариант белка имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным белком, например, от около одной до около десяти аминокислотных модификаций и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных модификаций по сравнению с исходным белком. Последовательность варианта белка в настоящем документе предпочтительно будет иметь по меньшей мере около 80% гомологии с последовательностью исходного белка и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% гомологии, более предпочтительно по меньшей мере около 95% гомологии. В некоторых вариантах реализации белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или их комбинации.

[00111] Термин «антитело», используемый в данном 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., «молекулами полноразмерного антитела»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из сменной области тяжелой цепи (HCVR или V_H) и постоянной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах реализации тяжелая цепь может быть изотипом IgG. В некоторых вариантах тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации, тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, необязательно включая химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из сменной области легкой цепи ("LCVR" или " V_L ") и постоянной области легкой цепи (C_L). В V_H и V_L областях можно дополнительно

выделить области гипервариабельности, 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 ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Для обзора структуры антител см. Lefranc et al., *Уникальная нумерация IMGT для переменных доменов иммуноглобулина и T-клеточного рецептора и V-подобных доменов суперсемейства Ig*, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003 г.); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

[00112] Термин «антитело» также включает «биспецифическое антитело», которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним различным эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, которое включает 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 связывать один и тот же антиген, но с разными эпитопами или с неперекрывающимися эпитопами. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют идентичные легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в U.S. Patent App. Pub. № 2010/0331527 (30 декабря 2010 г.).

[00113] Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или «фрагмент антитела»), относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , CL и $CH1$; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент - двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) F_d -фрагмент, состоящий из доменов V_H и $CH1$; (iv) F_v -фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), состоящий из домена V_H , (vi) выделенную CDR и (vii) scF_v , состоящий из двух доменов F_v -фрагмента, V_L и V_H , соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются, образуя одновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, источники Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[00114] Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных способов рекомбинантных ДНК, широко

известных в данной области (см. Sambrook et al., 1989). Способы получения антител человека у трансгенных мышей известны в данной области техники. С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сначала выделяют химерные антитела с высоким сродством к желаемому антигену, имеющие сменную область человека и постоянную область мышей. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит сменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные 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

[00115] Предусмотрено, что термин «антитело человека» включает антитело, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела (mAb) по данному изобретению могут содержать 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, в CDR3. В то же время термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, не предполагает включение mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты к FR последовательностям человека. Указанный термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Указанный термин не предполагает включение антител, выделенных из или полученных в организме субъекта-человека.

[00116] В дальнейшем, термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся, например, в облегчении, предупреждении и/или лечении заболевания или расстройства.

[00117] Используемый в данном документе термин «примесь» может включать любой нежелательный белок, присутствующий в биофармацевтическом продукте. Примеси могут включать технологические примеси и примеси, связанные с продуктом. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, частично охарактеризованную или неидентифицированную. Связанные с технологическим процессом примеси могут быть получены в результате производственного процесса и могут включать три основные категории: полученные из клеточного субстрата, полученные из клеточной культуры и полученные в дальнейшем. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, помимо прочего, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту

(геномную, векторную или тотальную ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточных культур, включают, помимо прочего, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Побочные примеси включают, помимо прочего, ферменты, реагенты для химической и биохимической обработки (например, бромид циана, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллический ион), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества. Связанные с продуктом примеси (например, прекурсоры, определенные продукты разложения) могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие во время производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами желаемого продукта в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий по выделению и характеристике, чтобы определить тип модификации (модификаций). Примеси, связанные с продуктом, могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических веществ, катализирующих расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, но не ограничиваются ими, дезамидированные, изомеризованные, несовпадающие S-S-связанные, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы также могут включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и более высокие кратные желаемому продукту (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

[00118] Термин «низкомолекулярная (LMW) белковая примесь лекарственного средства» включает, но не ограничивается ими, предшественники, продукты деградации, укороченные виды, протеолитические фрагменты, включая Fab-фрагменты, Fc-фрагменты или фрагменты тяжелой цепи, фрагменты лиганда или рецептора, H2L (2 тяжелых цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелых цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь). Примесь препарата низкомолекулярного белка может представлять собой любой вариант, который представляет собой неполную версию белкового продукта, например, один или несколько компонентов мультимерного белка. Термины «белковая примесь лекарственного средства», «примесь лекарственного средства» или «примесь продукта» могут использоваться как синонимы в описании. Примеси низкомолекулярных препаратов или продуктов обычно считаются молекулярными вариантами с такими свойствами, как активность, эффективность и безопасность, которые могут отличаться от свойств желаемого лекарственного продукта.

[00119] Дегградация белкового продукта является проблематичной при производстве белкового лекарственного препарата в системах культивирования клеток. Например, протеолиз белкового продукта может происходить из-за высвобождения протеаз в среде культивирования клеток. Добавки к среде, такие как растворимые

источники железа, добавленные для ингибирования металлопротеаз, или ингибиторы сериновых и цистеиновых протеаз, были введены в культуру клеток для предотвращения деградации (Clincke, M.-F., et al, BMC Proc. 2011, 5, стр. 115). С-концевые фрагменты могут быть расщеплены во время производства под действием карбоксильных пептидаз в культуре клеток (Dick, LW et al, Biotechnol Bioeng 2008; 100:1132-43).

[00120] Термин «высокомолекулярная (NMW) белковая примесь лекарственного средства» включает, но не ограничивается ими, тримеры и димеры mAb. Виды NMW можно разделить на две группы: 1) мономер с дополнительными легкими цепями (виды H2L3 и H2L4) и 2) мономер плюс Fab-фрагменты комплексы. Кроме того, после обработки ферментативным расщеплением IdeS образуются различные димеризованные фрагменты (Fab2-Fab2, Fc-Fc и Fab2-Fc).

[00121] «Посттрансляционная модификация» (PTM) относится к ковалентной модификации белков после биосинтеза белка. Посттрансляционные модификации могут иметь место на боковых цепях аминокислот или на С- или N-концах белка. PTM обычно вводятся специфическими ферментами или ферментативными путями. Многие из них происходят в месте специфической характерной белковой последовательности (например, сигнатурной последовательности) внутри белкового остова. Было зарегистрировано несколько сотен PTM, и эти модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. «Proteins» (2014), second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, помимо прочего, расщепление, удлинение N-конца, деградацию белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование остатков лизина альфа-биотином), амидирование С-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (присоединение ацетильной группы, обычно к N-концу белка), алкилирование (присоединение алкильной группы (например, метил, этил, пропил) обычно по остаткам лизина или аргинина), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, модификации, зависящие от витамина С (гидроксилирование пролина и лизина и карбоксиконцевое амидирование), зависящая от витамина К модификация, при которой витамин К является кофактором карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, что приводит к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток глутаминовой кислоты), глутамилированию (ковалентная связь остатка глутаминовой кислоты s), глицилирование (ковалентная связь остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, что приводит к образованию гликопротеина), изопренилирование (присоединение изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональности), фосфопантетеинилирование (присоединение 4'-фосфопантетеинильного остатка кофермента А, например, в биосинтезе жирной кислоты, поликетид, нерибосомального пептида и лейцина), фосфорилирование (добавление

фосфатная группа, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (присоединение сульфатной группы, обычно к остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают, помимо прочего, цитруллинирование (например, превращение аргинина в цитруллин путем деиминирования) и дезамидирование (например, превращение глутамина в глутамин). кислоты или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают, помимо прочего, образование дисульфидных мостиков (ковалентная связь двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Определенные посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, таких как ISGylation (ковалентная связь с белком ISG15 (интерферон-стимулируемый ген)), SUMOylation (ковалентная связь с белком SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитином). См. www.uniprot.org/docs/ptmlist для более подробного контролируемого словаря PTM, созданного UniProt.

[00122] Используемый в данном документе термин «гликопептид/гликопротеин» представляет собой модифицированный пептид/белок во время или после их синтеза с ковалентно связанными углеводами или гликаном. В некоторых вариантах реализации изобретения, гликопептид получают из моноклонального антитела, например, из протеазного гидролизата моноклонального антитела.

[00123] Используемый в данном документе термин «гликан» представляет собой соединение, содержащее одну или несколько единиц сахара, которые обычно включают глюкозу (Glc), галактозу (Gal), маннозу (Man), фукозу (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилнейраминую кислоту (NeuNAc) (Frank Kjeldsen, et al. Anal. Chem. 2003, 75, 2355-2361). Фрагмент гликана в гликопротеине, таком как моноклональное антитело, является важным признаком для определения его функции или расположения в клетке. Например, конкретное моноклональное антитело модифицировано специфическим фрагментом гликана.

[00124] Используемый в данном документе термин «образец» относится к смеси молекул, которая содержит, по крайней мере, молекулу анализируемого вещества, например, гликопептид, полученный из моноклонального антитела, который подвергается манипуляции в соответствии с методами изобретения, включая, например, разделение, анализ, извлечение, концентрирование или профилирование.

[00125] Используемые в данном документе термины «анализ» или «анализирование» используются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных методов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солубилизации, обнаружения и/или характеристики представляющих интерес молекул (например, пептидов). Примеры включают, но не ограничиваются ими, твердофазную экстракцию, твердофазную микроэкстракцию, электрофорез, масс-спектрометрию, например, ESI-MS, SPE HILIC или MALDI-MS, жидкостную хроматографию, например, высокоэффективную, например,

обращенная фаза, нормальная фаза или вытеснение по размеру, ионно-парная жидкостная хроматография, жидкостно-жидкостная экстракция, например, ускоренная жидкостная экстракция, сверхкритическая жидкостная экстракция, микроволновая экстракция, мембранная экстракция, экстракция по Сокслету, осаждение, осветление, электрохимическая обнаружение, окрашивание, элементный анализ, деградация по Эдмунду, ядерно-магнитный резонанс, инфракрасный анализ, проточный анализ, капиллярная электрохроматография, ультрафиолетовое обнаружение и их комбинации.

[00126] Термин «профилирование», используемый в данном документе, относится к любому из различных методов анализа, которые используются в комбинации для определения содержания, состава или характеристического соотношения белков, таких как пептид в образце.

[00127] «Приведение в контакт», как используется в данном документе, включает соединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе.

[00128] Используемый в данном документе термин «анализ интактной массы» включает нисходящие эксперименты, в которых белок характеризуется как интактный белок. Неповрежденный масс-анализ может свести подготовку проб к минимуму и сохранить информацию, которая иногда может быть потеряна в других стратегиях протеомики, таких как подключение нескольких РТМ.

[00129] «Анализ картирования пептидов», используемый в данном документе, включает эксперименты, в которых белок подвергается расщеплению с последующим разделением полученных пептидов и их анализом, предпочтительно с использованием ЖХ-МС. В некоторых вариантах реализации анализ картирования пептидов может применяться для подтверждения первичной последовательности белковых биофармацевтических препаратов, где белковая молекула может быть сначала гидролизована на небольшие пептидные фрагменты с использованием гидролизующего агента, а затем аминокислотная последовательность каждого пептидного фрагмента определяется анализом ЖХ-МС с учетом предсказанной последовательности кДНК и специфичности используемой протеазы. Данные анализа пептидного картирования также могут быть использованы для выявления и количественной оценки посттрансляционных модификаций, подтверждения дисульфидных связей и даже обнаружения событий замещения аминокислот, присутствующих на очень низких уровнях ($<0,1\%$) (Zeck et al. PloS one 2012, 7, e40328). Во время анализа пептидного картирования белковых биофармацевтических препаратов ЖХ-МС часто можно проводить в сочетании с ультрафиолетовым (УФ) обнаружением для получения так называемых УФ-отпечатков пальцев, которые сами по себе могут использоваться в качестве идентификационного анализа во время контроля качества (КК) и выпуска препаратов.

[00130] Используемый в данном документе термин «переваривание» относится к гидролизу одной или нескольких пептидных связей белка. Существует несколько подходов к расщеплению белка в образце с использованием соответствующего гидролизующего агента, например, ферментативное расщепление или неферментативное

расщепление. Используемый в данном документе термин «гидролизующий агент» относится к любому одному или комбинации из большого количества различных агентов, которые могут выполнять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу наружной мембраны T (OmpT), фермент, разрушающий иммуноглобулин *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназа и протеаза из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают использование высокой температуры, микроволнового излучения, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающие примеры включают этанол и ацетонитрил), расщепление иммобилизованными ферментами (IMER), ферменты, иммобилизованные на магнитных частицах, и ферменты, иммобилизованные на кристалле. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные методы переваривания белков, см. в Switazar et al., «Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments» (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Один или комбинация гидролизующих агентов могут расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфичным для последовательности образом, создавая предсказуемый набор более коротких пептидов.

[00131] Доступны несколько подходов, которые можно использовать для переваривания белка. Один из широко распространенных способов расщепления белков в образце включает использование протеаз. Доступно множество протеаз, и каждая из них имеет свои особенности с точки зрения специфичности, эффективности и оптимальных условий переваривания. Протеазы относятся как к эндопептидазам, так и к экзопептидазам, которые классифицируются на основе способности протеазы расщеплять неконцевые или концевые аминокислоты в пептиде. Кроме того, протеазы также относятся к шести различным классам - аспарагиновой, глутаминовой и металлопротеазам, цистеиновым, сериновым и треониновым протеазам, классифицированным по механизму катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» используются взаимозаменяемо для обозначения ферментов, которые гидролизуют пептидные связи. Протеазы также можно разделить на специфические и неспецифические протеазы. Используемый в настоящем документе термин «специфическая протеаза» относится к протеазе, обладающей способностью расщеплять пептидный субстрат на специфической аминокислотной боковой цепи пептида. Используемый в настоящем документе термин «неспецифическая протеаза» относится к протеазе со сниженной способностью расщеплять пептидный субстрат по специфической аминокислотной боковой цепи пептида. Предпочтение расщепления может быть определено на основе отношения количества конкретной аминокислоты в качестве сайта расщепления к общему количеству расщепленных аминокислот в последовательностях белка.

[00132] Белок необязательно может быть приготовлен перед характеристикой. В

некоторых типовых вариантах реализации приготовление белка включает стадию расщепления белка. В некоторых конкретных типовых вариантах реализации препарат белка включает стадию расщепления белка, при этом расщепление белка можно проводить с использованием трипсина.

[00133] В некоторых типовых вариантах реализации препарат белка может включать стадию денатурации белка, восстановления белка, забуферивания белка и/или обессоливания образца перед стадией расщепления белка. Эти этапы могут быть выполнены любым подходящим способом по желанию.

[00134] Чтобы обеспечить характеристику различных свойств белка с помощью анализа пептидного картирования или анализа интактной массы, можно выполнить широкий спектр анализов на основе ЖХ-МС.

[00135] Используемый в данном документе термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений, когда они обтекают или над неподвижной жидкостью или твердая фаза. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию и гидрофобную хроматографию.

[00136] Используемый в данном документе термин «масс-спектрометр» относится к устройству, способному обнаруживать определенные виды молекул и точно измерять их массы. Этот термин может означать включение любого молекулярного детектора, в который можно элюировать полипептид или пептид для обнаружения и/или характеристики. Масс-спектрометр состоит из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Роль источника ионов заключается в создании ионов газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы либо одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов зависит от области применения.

[00137] Используемый в данном документе термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к процессу ионизации распылением, при котором либо катионы, либо анионы в растворе переходят в газовую фазу посредством образования и десольватации при атмосферном давлении потока сильно заряженных частиц. капли, возникающие в результате приложения разности потенциалов между кончиком иглы эмиттера электрораспыления, содержащей раствор, и противоэлектродом. Существует три основных этапа производства ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. К ним относятся: (а) образование заряженных капель на кончике для инфузии ЭС; (б) усадка заряженных капель в результате испарения растворителя и повторные распада капель, приводящие к образованию небольших сильно заряженных капель, способных производить ионы в газовой фазе; и (с) механизм образования ионов газовой фазы из очень маленьких и сильно заряженных капель. Стадии (а)-(с) обычно происходят в области атмосферного давления аппарата.

[00138] Используемый в данном документе термин «источник ионизации электрораспылением» относится к системе ионизации электрораспылением, которая может быть совместима с масс-спектрометром, используемым для масс-анализа белка.

[00139] Нативная МС представляет собой особый подход, основанный на ионизации электрораспылением, при котором биологические аналиты распыляются из неденатурирующего растворителя. Он определяется как процесс, посредством которого биомолекулы, такие как большие биомолекулы и их комплексы, могут быть переведены из трехмерного функционального существования в конденсированной жидкой фазе в газовую фазу с помощью процесса масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS).

[00140] Термин «наноэлектрораспыление» или «нанораспыление», используемый в данном документе, относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, обычно сотен нанолитров в минуту раствора образца или ниже, часто без использования внешней подачи растворителя.

[00141] Используемый в данном документе термин «анализатор массы» относится к устройству, которое может разделять виды, то есть атомы, молекулы или кластеры, в зависимости от их массы. Неограничивающими примерами масс-анализаторов, которые можно использовать для быстрого секвенирования белков, являются времяпролетный (TOF), магнитно-электрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольная ионная ловушка (QIT), орбитальная ловушка, преобразование Фурье ионно циклотронный резонанс (FTICR), а также метод ускорительной масс-спектрометрии (AMS).

[00142] Используемый в данном документе термин «отношение массы к заряду» или « m/z » используется для обозначения безразмерной величины, образованной путем деления массы иона в единых атомных единицах массы на его зарядовое число (независимо от знака). В общем, состояние заряда зависит от: метода ионизации (так как ионизация электрораспылением, ESI имеет тенденцию способствовать многократной ионизации, которая не так часто встречается в MALDI), длины пептида (поскольку более длинные пептиды имеют больше групп, где могут быть дополнительные протоны), присоединены (основные остатки)), последовательность пептидов (поскольку некоторые аминокислоты (например, Arg или Lys) более восприимчивы к ионизации, чем другие), настройки прибора, pH растворителя и состав растворителя.

[00143] Используемый в данном документе термин «тандемная масс-спектрометрия» относится к методу, при котором структурная информация о молекулах образца может быть получена с использованием нескольких стадий массового отбора и массового разделения. Предпосылкой является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, а также что их можно заставить распасться некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа массового отбора. Многоступенчатая МС/МС, или MS_n, может быть выполнена путем сначала выбора и выделения иона-предшественника (MS₂), его фрагментации, выделения первичного иона-фрагмента (MS₃), его фрагментации,

выделения вторичного фрагмента (MS4) и т.д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал осколочного иона. Tandemная МС успешно выполнялась с широким спектром комбинаций анализаторов. Какие анализаторы следует комбинировать для определенного приложения, зависит от множества различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными категориями tandemных методов МС являются tandemные в пространстве и tandemные во времени, но существуют также гибриды, в которых tandemные во времени анализаторы соединяются в пространстве или с tandemными в пространстве анализаторами.

[00144] Tandemный масс-спектрометр в пространстве состоит из источника ионов, устройства активации прекурсорных ионов и как минимум двух масс-анализаторов без захвата. Конкретные функции разделения m/z могут быть разработаны таким образом, что в одной секции прибора ионы отбираются, диссоциируют в промежуточной области, а затем ионы-продукты передаются в другой анализатор для разделения m/z и сбора данных.

[00145] В tandemно-временном масс-спектрометре ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, изолированы, фрагментированы и разделены по m/z в одном и том же физическом устройстве.

[00146] «Целевая масс-спектрометрия», как используется в данном документе, представляет собой метод масс-спектрометрии, который использует несколько стадий tandemной масс-спектрометрии (MS n с $n=2$ или 3) для ионов определенной массы (m/z) в определенное время. Значения m/z и времени определены в списке включений, который получен из предыдущего анализа.

[00147] Используемый в данном документе термин «гибридный масс-спектрометр с квадрупольно-орбитальной ловушкой» относится к гибридной системе, созданной путем соединения квадрупольного масс-спектрометра с масс-анализатором с орбитальной ловушкой. Tandemный эксперимент во времени с использованием гибридного масс-спектрометра квадруполь-орбитап начинается с выброса всех ионов, кроме тех, которые находятся в выбранном узком диапазоне m/z из квадрупольного масс-спектрометра. Отобранные ионы могут быть введены в орбитальную ловушку и фрагментированы чаще всего с помощью низкоэнергетического CID. Фрагменты в пределах допустимого диапазона m/z ловушки должны оставаться в ловушке, и можно получить спектр МС-МС. Подобные гибридные системы можно использовать для быстрого секвенирования белков, такие как, помимо прочего, QIT-FTICR и Qq-FTICR.

[00148] Используемый в данном документе термин «секвенирование белка de novo» относится к процедуре определения аминокислотной последовательности пептида без использования информации, полученной из других источников. Благодаря высокому уровню чувствительности масс-спектрометрии этот метод может предоставить жизненно важную информацию, которая часто выходит за рамки возможностей обычных методов секвенирования.

[00149] Используемый в данном документе термин «покрытие белковой последовательности» относится к процентной доле белковой последовательности, покрытой идентифицированными пептидами. Процент покрытия можно рассчитать, разделив количество аминокислот во всех найденных пептидах на общее количество аминокислот во всей белковой последовательности.

[00150] Используемый в данном документе термин «база данных» относится к биоинформационным инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС-МС по всем возможным последовательностям в базе данных (базах данных). Неограничивающими примерами таких инструментов являются Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector (www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) или Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

Общее описание изобретения

[00151] Из вышеизложенного понятно, что существует потребность в усовершенствованных методах и системах для улучшения характеристики белков. Раскрытое изобретение отвечает этой потребности.

В данном документе раскрыта платформа ЖХ-МС с улучшенными характеристиками. В вариантах реализации собственная платформа ЖХ-МС объединяет эмиттер с несколькими соплами и модификацию газа для десольватации, тем самым создавая более надежную платформу.

[00152] Описанные здесь варианты реализации обеспечивают системы и способы быстрой и высокочувствительной характеристики белков в образце.

[00153] В некоторых типовых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена жидкостная хроматографическая масс-спектрометрическая система, содержащая (i) жидкостное хроматографическое устройство, (ii) источник ионизации электрораспылением и (iii) масс-спектрометрическое устройство.

[00154] В некоторых типовых вариантах реализации данное раскрытие обеспечивает систему модификатора 106, содержащую (i) контейнер 110, (ii) линию 112 впуска защитного газа и (iii) линию 114 выхода модифицированного газа десольватации, которая подается в излучатель ионизации электрораспылением с несколькими насадками 108. В некоторых вариантах реализации эмиттер ионизации электрораспылением представляет собой коммерчески доступный эмиттер, такой как эмиттер M3 (Newomics, Berkeley, CA).

[00155] В некоторых типовых вариантах реализации изобретение обеспечивает способ характеристики белка в образце, включающий (i) подачу образца на вход источника ионизации электрораспылением, (ii) генерирование ионов компонентов белка в

образце при выход источника ионизации электрораспылением и (iii) анализ ионов с использованием масс-спектрометра для идентификации компонентов белка для характеристики белка.

[00156] Ссылаясь на Фиг.1, раскрыта примерная собственная платформа ЖХ-МС, обеспечивающая надежный сигнал. Как показано на Фиг. 1, исходная платформа 100 ЖХ-МС включает аналитическую колонку 102, делитель 104, систему модификаторов 106, эмиттер 108 ионизации электрораспылением и устройство 118 масс-спектрометрии.

[00157] В вариантах реализации аналитическая колонка 102 представляет собой разделительную колонку для жидкостной хроматографии (ЖХ). Неограничивающие примеры устройства жидкостной хроматографии могут включать обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофильного взаимодействия и гидрофобную хроматографию. Жидкостная хроматография, включая ВЭЖХ, может использоваться для анализа пептидов, включая моноклональные антитела. Для изучения этих структур можно использовать 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 гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант NP-HPLC, который можно проводить с частично водными подвижными фазами, что позволяет разделять пептиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и многие белки в нормальной фазе. Порядок элюирования для HILIC от наименее полярного до наиболее полярного, противоположный порядку в ВЭЖХ с обращенной фазой. ВЭЖХ можно проводить, например, на системе ВЭЖХ от Waters (например, система ВЭЖХ Waters 2695 Alliance), Agilent, Perkin Elmer, Gilson и т.д.

[00158] В некоторых вариантах реализации ЖХ-анализ проводят с использованием колонки ACQUITY UPLC peptide BEH C18. Температуру колонки можно поддерживать на постоянном уровне в течение всего цикла хроматографии, например, с помощью промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах реализации, колонку поддерживают при температуре от около 18°C до около 70°C, *например*, от около 30°C до около 60°C, от около 40°C до около 50°C, *например*, при температуре около 20°C, около 25°C, около 30°C, около 35°C, около 40°C, около 45°C, около 50°C, около 55°C, около 60°C, около 65°C или около 70°C. В некоторых вариантах реализации температура колонки составляет около 40°C. В некоторых вариантах реализации время работы может составлять от около 15 до около 240 минут, например, от около 20 до около 70 минут, от около 30 до около 60 минут, от около 40 до около 90 минут, от около 50 минут до около 100 минут, около 60 минут. до около 120 мин, от около 50 до около 80 мин.

[00159] В некоторых вариантах реализации ЖХ-анализ включает колонка для эксклюзионной хроматографии (SEC) или система ионообменной хроматографии (IEX), сообщающаяся по текучей среде с системой нативной масс-спектрометрии. Колонки

подходят для использования с дегликозилированными белками. В одном варианте реализации колонка SEC представляет собой колонку Waters^{BEH®} SEC (4,6 × 300 мм). В одном варианте реализации колонка IEX представляет собой колонку с сильным катионообменом.

[00160] Колонка, такая как колонка SEC или IEX, находится в жидкостном сообщении с масс-спектрометром через аналитический делитель потока 104, который может регулировать скорость потока в масс-спектрометре.

[00161] В некоторых вариантах реализации подвижная фаза представляет собой водную подвижную фазу. Типичная водная подвижная фаза содержит 140 мМ ацетата натрия и 10 мМ бикарбоната аммония. УФ-следы обычно регистрируются при 215 и 280 нм.

[00162] В некоторых типовых вариантах реализации подвижная фаза, используемая для элюирования белка, может представлять собой подвижную фазу, которая может быть совместима с масс-спектрометром.

[00163] В некоторых типовых вариантах реализации подвижная фаза, используемая в устройстве для жидкостной хроматографии, может включать воду, ацетонитрил, трифторуксусную кислоту, муравьиную кислоту или их комбинацию.

[00164] В некоторых типовых вариантах реализации подвижная фаза может иметь скорость потока от около 0,1 мл/мин до около 0,8 мл/мин, например, от около 0,1 мл/мин до около 0,4 мл/мин в устройстве для жидкостной хроматографии. В одном аспекте скорость потока подвижной фазы в устройстве для жидкостной хроматографии может составлять около 0,1 мл/мин, около 0,15 мл/мин, около 0,20 мл/мин, около 0,25 мл/мин, около 0,30 мл/мин, около 0,35 мл/мин, около 0,4 мл/мин, около 0,45 мл/мин, около 0,50 мл/мин, около 0,55 мл/мин, около 0,60 мл/мин, около 0,65 мл/мин, около 0,70 мл/мин, около 0,75 мл/мин или около 0,80 мл/мин.

[00165] В некоторых типовых вариантах реализации подвижная фаза может содержать соли до около 600 мМ. В одном аспекте концентрация соли составляет около 100 мМ, около 150 мМ, около 200 мМ, 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ, около 500 мМ, около 550 мМ или около 600 мМ.

[00166] Понятно, что система не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых белков, примесей, подвижной фазы, масс-спектрометра, органического растворителя, кислоты, основания или хроматографической колонки.

[00167] В одном варианте реализации эксклюзионное разделение достигается при комнатной температуре с использованием изократического потока 0,2 мл/мин в течение 24 минут.

[00168] В одном варианте реализации напряжение для электрораспыления подается через тройник жидкостного перехода непосредственно перед эмиттером.

[00169] В некоторых типовых вариантах реализации, как показано на Фиг. 1, система 106 модификатора включает в себя контейнер 110, линию 112 впуска защитного газа, линию 114 выпуска защитного газа и колпачок 116.

[00170] В некоторых типовых вариантах реализации впускная линия 112 защитного газа может представлять собой тефлоновую трубку.

[00171] В некоторых типовых вариантах реализации впускная линия 112 защитного газа может представлять собой гибкую трубку из нержавеющей стали.

[00172] В некоторых типовых вариантах реализации впускной трубопровод 112 защитного газа может представлять собой трубу, изготовленную из полиэфиркетона.

[00173] В некоторых типовых вариантах реализации модифицированная линия 114 выпуска газа десольватации может представлять собой тефлоновую трубку.

[00174] В некоторых типовых вариантах реализации модифицированная линия 114 выпуска газа десольватации может представлять собой гибкую трубку из нержавеющей стали.

[00175] В некоторых типовых вариантах реализации модифицированная линия выпуска газа десольватации 114 может представлять собой трубу, изготовленную из полиэфиркетона.

[00176] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может содержать крышку 116. Колпачок 116 можно безопасно использовать с подвижной фазой.

[00177] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может содержать крышку 116, при этом крышка 110 может образовывать воздухонепроницаемое уплотнение между крышкой 116 и контейнером 110. Неограничивающие примеры крышек, которые можно использовать, включают Canary-Safe Cap от Analytical Sales, крышку бутылки Restek Eco-cap, крышку бутылки Restek Opti-cap и крышку бутылки VWR с инертной подвижной фазой.

[00178] В некоторых типовых вариантах реализации колпачок 116 может представлять собой навинчивающийся колпачок.

[00179] В некоторых типовых вариантах реализации колпачок 116 может быть изготовлен из политетрафторэтилена (ПТФЭ) материала.

[00180] В некоторых типовых вариантах реализации крышка 116 может дополнительно содержать уплотнительное кольцо для обеспечения воздухонепроницаемого соединения между крышкой и контейнером.

[00181] В некоторых типовых вариантах реализации крышка 116 в контейнере 110 может иметь по меньшей мере одно отверстие для трубки. В одном аспекте крышка 116 в контейнере 110 может иметь два порта для трубок.

[00182] В некоторых типовых вариантах реализации крышка 116 в контейнере может иметь по меньшей мере одно впускное отверстие 160.

[00183] В некоторых типовых вариантах реализации крышка 116 в контейнере 110 может иметь по меньшей мере одно выпускное отверстие.

[00184] В некоторых типовых вариантах реализации эмиттер 108 ионизации электрораспылением соединен с линией 114 выхода защитного газа.

[00185] В некоторых типовых вариантах реализации система 106 модификатора может содержать контейнер 110, имеющий крышку 116 с портом впускной линии и

портом выпускной линии, а также впускную линию 112 защитного газа, способную подавать защитный газ к порту впускной линии.

[00186] В некоторых типовых вариантах реализации система 106 модификатора может содержать контейнер 110, имеющий крышку 116 с портом впускной линии и портом выпускной линии, и модифицированную выпускную линию 114 газа десольватации, способную соединять порт выпускной линии с излучателем ионизации электрораспылением. 108.

[00187] В некоторых типовых вариантах реализации эмиттер 108 ионизации электрораспылением содержит несколько эмиттерных сопел, таких как по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь эмиттерных сопел, например два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь эмиттерных сопел.

[00188] В некоторых типовых вариантах реализации эмиттер 108 ионизации электрораспылением представляет собой эмиттер M3 от Newomics (Беркли, Калифорния), который включает в себя 8 эмиттерных сопел.

[00189] В некоторых типовых вариантах реализации защитный газ может подаваться источником защитного газа в контейнер 110, имеющий крышку 116 с портом впускной линии через впускную линию 112 защитного газа. Неограничивающие примеры газа оболочки включают воздух, азот, IPA, ACN и/или ACN/NH₃.

[00190] В некоторых типовых вариантах реализации защитный газ, который может подаваться источником защитного газа в контейнер, имеющий крышку с портом впускной линии через впускную линию 112 защитного газа, может представлять собой газообразный азот.

[00191] В некоторых типовых вариантах реализации эмиттер 108 ионизации электрораспылением может быть автоматизирован для выполнения аспирации образца, дозирования образца, доставки образца и/или для распыления образца.

[00192] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 имеет крышку 116 с портом впускной линии и впускной линией 112 защитного газа, при этом впускная линия 112 защитного газа может быть частично вставлена в порт впускной линии.

[00193] В некоторых типовых вариантах реализации крышка 116 с портом выпускной линии и модифицированной выпускной линией 114 газа десольватации, при этом модифицированная выпускная линия 114 газа десольватации может быть частично вставлена в порт выпускной линии.

[00194] В некоторых типовых вариантах реализации система 106 модификатора может быть сконфигурирована так, чтобы пропускать поток защитного газа из впускной линии 112 защитного газа через контейнер 110 в выпускную линию 114 газа десольватации, например, защитный газ представляет собой азот.

[00195] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер может быть окружен вторым контейнером. В некоторых конкретных типовых вариантах реализации второй контейнер может быть изготовлен из полиэтилена. В одном аспекте второй

контейнер может обеспечивать небьющуюся защиту стеклянных бутылок. В другом аспекте второй контейнер может иметь отверстие в верхней части.

[00196] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть изготовлен из боросиликатного стекла.

[00197] В некоторых типовых вариантах реализации объем контейнера 110 может варьироваться от около 10 мл до около 5000 мл. В одном аспекте объем контейнера 110 может составлять около 10 мл, около 20 мл, около 30 мл, около 40 мл, около 50 мл, около 60 мл, около 70 мл, около 80 мл, около 90 мл, около 100 мл, около 110 мл, около 120 мл, около 130 мл, около 140 мл, около 150 мл, около 160 мл, около 170 мл, около 180 мл, около 190 мл, около 200 мл, около 210 мл, около 220 мл, около 230 мл, около 240 мл, около 250 мл, около 260 мл, около 270 мл, около 280 мл, около 290 мл, около 300 мл, около 310 мл, около 320 мл, около 330 мл, около 340 мл, около 350 мл, около 360 мл, около 370 мл, около 380 мл, около 390 мл, около 400 мл, около 410 мл, около 420 мл, около 430 мл, около 440 мл, около 450 мл, около 460 мл, около 470 мл, около 480 мл, около 490 мл, около 1000 мл, около 1100 мл, около 1200 мл, около 1300 мл, около 1400 мл, около 1500 мл, около 1600 мл, около 1700 мл, около 1800 мл, около 1900 мл, около 2000 мл, около 2500 мл, около 3000 мл, около 3500 мл, около 4000 мл, около 4500 мл или около 5000 мл.

[00198] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть устойчивым к давлению контейнером.

[00199] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может иметь сопротивление давлению по меньшей мере около 0,5 бар манометрического давления. В одном аспекте контейнер 110 может иметь сопротивление давлению по меньшей мере около 0,5 бар манометрического давления, по меньшей мере около 0,6 бар манометрического давления, по меньшей мере около 0,7 бар манометрического давления, по меньшей мере около 0,8 бар манометрического давления, по меньшей мере около 0,9 бар манометрического давления, по крайней мере около 1 бар манометра, по крайней мере около 1,1 бар манометра, по крайней мере около 1,2 бар манометра, по крайней мере около 1,3 бар манометра, по крайней мере около 1,4 бар манометра, по крайней мере около 1,5 бар манометра, по крайней мере около 1,6 бар манометра, по крайней мере около 1,7 бар манометра, по крайней мере около 1,8 бар манометра, по крайней мере около 1,9 бар манометра или по крайней мере около 2,0 бар манометра.

[00200] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть заполнен по меньшей мере одним органическим растворителем. Неограничивающие примеры органических растворителей включают ацетонитрил, пропанол, изопропанол, воду и метанол.

[00201] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть заполнен по меньшей мере одной кислотой. Неограничивающие примеры кислоты включают уксусную кислоту, пропионовую кислоту и муравьиную кислоту.

[00202] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть заполнен по меньшей мере одним основанием. Неограничивающие примеры основания включают аммиак, диэтиламин, триэтиламин, N, N-диизопропилэтиламин (DIPEA) и пиперидин. В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть заполнен по меньшей мере одним органическим растворителем и по меньшей мере одной кислотой.

[00203] В некоторых типовых вариантах реализации контейнер 110 может быть заполнен по меньшей мере одним органическим растворителем и по меньшей мере одним основанием.

[00204] В некоторых типовых вариантах реализации система модификатора может быть сконфигурирована таким образом, чтобы обеспечивать поток защитного газа из впускной линии 112 защитного газа через контейнер 110, который может быть заполнен органическим растворителем и дополнительным химическим компонентом, в газ десольватации. выпускная линия 114.

[00205] В некоторых типовых вариантах реализации источник ионизации электрораспылением может обеспечивать электрораспыление со скоростью потока растворителя более чем около 1-5 мкл/мин. В одном аспекте источник ионизации электрораспылением может обеспечивать электрораспыление со скоростью потока растворителя более чем около 1 мкл/мин, более чем около 2 мкл/мин, более чем около 3 мкл/мин, более чем около 4 мкл/мин, более чем около 5 мкл/мин, более чем около 6 мкл/мин, более чем около 7 мкл/мин, более чем около 8 мкл/мин, более чем около 9 мкл/мин, более чем около 10 мкл/мин, более чем около 11 мкл/мин, более чем около 12 мкл/мин, более чем около 13 мкл/мин, более чем около 14 мкл/мин, более чем около 15 мкл/мин, более чем около 16 мкл/мин, более чем около 17 мкл/мин, более чем около 18 мкл/мин, более чем около 19 мкл/мин, более чем около 20 мкл/мин, более чем около 25 мкл/мин, более чем около 30 мкл/мин, более чем около 35 мкл/мин, более чем около 40 мкл/мин, более чем около 45 мкл/мин, более чем около 50 мкл/мин, более чем около 55 мкл/мин, более чем около 60 мкл/мин, более чем около 65 мкл/мин, более чем около 70 мкл/мин, более чем около 75 мкл/мин, более чем около 80 мкл/мин, более чем около 85 мкл/мин, более чем около 90 мкл/мин, более чем около 95 мкл/мин, более чем около 100 мкл/мин, более чем около 110 мкл/мин, более чем около 120 мкл/мин, более чем около 130 мкл/мин, более чем около 140 мкл/мин, более чем около 150 мкл/мин, более чем около 160 мкл/мин, более чем около 170 мкл/мин, более чем около 180 мкл/мин, более чем около 190 мкл/мин, более чем около 200 мкл/мин, более чем около 225 мкл/мин, более чем около 250 мкл/мин, более чем около 275 мкл/мин, более чем около 300 мкл/мин, более чем около 325 мкл/мин, более чем около 350 мкл/мин, более чем около 375 мкл/мин, более чем около 700 мкл/мин, более чем около 425 мкл/мин, более чем около 450 мкл/мин или более чем около 500 мкл/мин.

[00206] В некоторых вариантах реализации, чтобы приспособиться к широкому диапазону скоростей потока (0,1-0,8 мл/мин), используемому при разделении

аналитической шкалы, применяется стратегия разделения после колонки для снижения скоростей потока до диапазона менее 10 мкл/мин, например, менее 1 мкл/мин, менее 0,1 мкл/мин или менее 0,01 мкл/мин, которые могут быть легко обеспечены эмиттером с несколькими соплами, например эмиттером M3 для NSI (см. Фиг. 7). В некоторых вариантах реализации коэффициент разделения регулируется двумя фиксированными трубками разных размеров, такими как две трубки Viper разных размеров, соединенными с тройником, таким как тройник из нержавеющей стали. В некоторых вариантах реализации тройник из нержавеющей стали расположен после колонки, соединяя две трубки Viper с разными размерами (20 мкм × 15 см и 100 мкм × 65 см) для уменьшения различных аналитических потоков ($\leq 0,8$ мл/мин) до микропотока. диапазон (менее мкл/мин) для обнаружения нативного МС и отвести оставшийся высокий поток для обнаружения УФ (например, при 280 нм).

[00207] В некоторых типовых вариантах реализации нативный масс-спектрометр 118 может быть способен идентифицировать компоненты белка для его характеристики. Собственная система масс-спектрометрии может быть собственной системой масс-спектрометрии ESI.

[00208] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может представлять собой гибридный масс-спектрометр с квадрупольной орбитальной ловушкой. Гибридный масс-спектрометр Quadrupole-Orbitrap может быть Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer, Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer, Q Exactive™ BioPharma Platform, Q Exactive™ UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, масс-спектрометр Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, масс-спектрометр Q Exactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ и масс-спектрометр Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™.

[00209] В некоторых типичных вариантах реализации система масс-спектрометрии представляет собой масс-спектрометр Thermo Exactive EMR. Система масс-спектрометрии может также содержать детектор ультрафиолетового излучения.

[00210] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может представлять собой QIT-FTICR.

[00211] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может представлять собой Qq-FTICR.

[00212] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может быть tandemным масс-спектрометром.

[00213] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может представлять собой совмещенный во времени масс-спектрометр.

[00214] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может представлять собой tandemно пространственный масс-спектрометр.

[00215] В некоторых типовых вариантах реализации масс-спектрометр 118 может быть гибридным, в котором tandemный анализатор во времени может быть соединен в пространстве или с tandemным анализатором в пространстве.

[00216] В некоторых типовых вариантах реализации способ характеристики белка в образце может включать обнаружение или количественное определение белка в образце.

[00217] В одном околоте варианте белок может включать антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела или мультиспецифическое антитело.

[00218] В некоторых типовых вариантах реализации белок может представлять собой терапевтическое антитело.

[00219] В некоторых типовых вариантах реализации белок может представлять собой белок иммуноглобулина.

[00220] В одном типичном варианте реализации иммуноглобулиновый белок может представлять собой IgG1.

[00221] В одном типичном варианте реализации белок иммуноглобулина может представлять собой IgG4.

[00222] В некоторых типовых вариантах реализации белок может представлять собой биспецифическое антитело.

[00223] В некоторых типовых вариантах реализации белок может представлять собой фрагмент антитела, образованный при расщеплении антитела.

[00224] В одном типовом варианте реализации белок может представлять собой вариант белка.

[00225] В одном типовом варианте белок может быть посттрансляционно модифицированным белком.

[00226] В одном типовом варианте реализации посттрансляционно модифицированный белок может быть образован расщеплением, удлинением N-конца, деградацией белка, ацилированием N-конца, биотинилированием, амидированием C-конца, окислением, гликозилированием, йодированием, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование, алкилирование, метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, модификации, зависящие от витамина С, зависящие модификации от витамина К, глутамилирование, гликирование, гликозилирование, дегликозилирование, изопренилирование, липоилирование, фосфопантетеинилирование, фосфорилирование, сульфатирование, цитруллинирование, дезамидирование, образование дисульфидных мостиков, протеолитическое расщепление, ISGилирование, SUMOилирование или убиквитинирование (ковалентное связывание с белком убиквитином).

[00227] В одном типовом варианте реализации посттрансляционно модифицированный белок может образовываться при окислении белка.

[00228] В другом типовом варианте реализации продукт деградации может включать посттрансляционную модификацию терапевтического белка.

[00229] В другом типовом варианте реализации белок может быть продуктом деградации белка.

[00230] В еще одном типовом варианте белок может быть примесью, присутствующей в биофармацевтическом продукте.

[00231] В другом типовом варианте белок может быть примесью, обнаруженной во время производства биофармацевтического продукта.

[00232] В некоторых типовых вариантах реализации белок может представлять собой белок с pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте белок может представлять собой белок с pI около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около . около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1 около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

[00233] В некоторых типовых вариантах реализации белок может быть примесью, относящейся к продукту. Связанная с продуктом примесь может быть молекулярными вариантами, предшественниками, продуктами деградации, фрагментированным белком, расщепленным продуктом, агрегатами, формой посттрансляционной модификации или их комбинациями.

[00234] В некоторых конкретных типовых вариантах реализации белок может представлять собой связанную с процессом примесь. Связанная с процессом примесь может включать примеси, полученные в процессе производства, например, нуклеиновые кислоты и белки клеток-хозяев, антибиотики, сыворотку, другие компоненты среды, ферменты, химические и биохимические реагенты для обработки, неорганические соли, растворители, носители, лиганды. и другие вымываемые вещества, используемые в производственном процессе.

[00235] В некоторых конкретных типовых вариантах реализации белок может быть примесью. В одном околоте варианте количество примесей в образце может быть не менее двух.

[00236] Раскрытые системы и способы могут быть использованы для характеристики вариантов размера, вариантов заряда, связывания антитело-антиген, характеристики ПТМ, характеристики частично восстановленных и алкилированных mAb, характеристики димеров для совместно составленных лекарственных препаратов, характеристики обмена IgG4 Fab и характеристика гетерогенных образцов с использованием снижения заряда. Примеры посттрансляционных модификаций (PTM), которые могут быть обнаружены и идентифицированы и которые способствуют образованию кислотных вариантов, включают, помимо прочего, гликирование, глюкуронилирование, карбоксиметилирование, сиамирование, неконсенсусное гликозилирование в Fab-области. ПТМ, которые могут быть обнаружены и идентифицированы и которые способствуют основным вариантам, включают, помимо прочего, образование сукцинимиды, N-концевой глутамин (не преобразованный в пироглутамат), C-концевой Lys и не-/частично-гликозилированные виды.

[00237] 1. Варианты размера

[00238] В одном варианте реализации предложен способ характеристики вариантов размера примесей белкового лекарственного продукта, включающий разделение белковых компонентов образца белкового лекарственного продукта с помощью нативной SEC-хроматография с использованием водной подвижной фазы и анализ разделенных белковых компонентов с помощью масс-спектрометрии для характеристики высокомолекулярных видов, низкомолекулярных видов и промежуточных высокомолекулярных видов примесей белкового лекарственного продукта в образце белкового лекарственного продукта с использованием раскрытой платформы. В одном варианте реализации, подвижная фаза включает ацетат аммония и бикарбонат аммония. Использование раскрытой платформы избавляет от необходимости дегликозилирование образца белкового лекарственного препарата перед разделением и анализом.

[00239] В одном варианте реализации образец белкового лекарственного продукта берут или очищают из культуры клеток с подпиткой, непрерывной культуры клеток или перфузионной культуры клеток.

[00240] Примеры белковых лекарственных продуктов включают, но не ограничиваются антителом, слитым белком, рекомбинантным белком или их комбинацией.

[00241] Примеры примесей низкомолекулярного белкового лекарственного препарата включают, но не ограничиваются ими, предшественники, продукты деградации, укороченные соединения, протеолитические фрагменты, включая Fab, фрагменты лиганда или рецептора или фрагменты тяжелой цепи, свободная легкая цепь, полуантитело, H2L, H2, HL, HS или их комбинация.

[00242] Примеры высокомолекулярных примесей включают, но не ограничиваются тримерами mAb и димерами mAb.

[00243] Примеры промежуточных HMW включают, но не ограничиваются ими, мономер с дополнительными легкими цепями (виды H2L3 и H2L4), комплексы мономер плюс Fab-фрагменты, Fab2-Fab2, Fc-Fc и Fab2-Fc.

[00244] 2. Характеристика варианта заряда

[00245] В одном варианте реализации предлагается способ характеристики вариантов заряда примесей белкового лекарственного продукта, включающий стадии, необязательно, дегликозилирование образца белкового лекарственного препарата, необязательная обработка образца IdeS от *Streptococcus pyogenes*, разделяя белковые компоненты образца белкового лекарственного препарата нативной сильной катионообменной хроматографией с использованием водной подвижной фазы и анализируя разделенные белковые компоненты масс-спектрометрией охарактеризовать различные виды заряда примесей белкового лекарственного препарата в образце белкового лекарственного препарата. В одном варианте реализации, подвижная фаза включает ацетат аммония и бикарбонат аммония. Использование раскрытой платформы избавляет от необходимости дегликозилирование образца белкового лекарственного препарата перед характеристикой.

[00246] В одном варианте реализации образец белкового лекарственного препарата берут или очищают из клеточной культуры с подпиткой, непрерывной клеточной культуры или перфузионной клеточной культуры.

[00247] Примеры вариантов заряда включают, но не ограничиваются ими, гликирование, глюкуронилирование, карбоксиметилирование, сиамирование, неконсенсусное гликозилирование в области Fab. РТМ, которые могут быть обнаружены и идентифицированы, которые способствуют основным вариантам, включают, помимо прочего, образование сукцинимидов, N-концевой глутамин (не преобразованный в пироглутамат), C-концевой Lys и не-/частично гликозилированные виды.

[00248] Также раскрыты способы производства высокочистых белковых лекарственных препаратов. Некоторые варианты реализации обеспечивают способ получения антитела, включающий этапы культивирования клеток, продуцирующих антитело, например, в периодической культуре с подпиткой, получения образца из культуры клеток, характеристики и количественного определения низкомолекулярных, высокомолекулярных и промежуточных молекулярных масс. массы примесей в образце с использованием систем и способов, раскрытых в настоящем документе, и модификации одного или нескольких условий культивирования культуры клеток для уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных белковых примесей лекарственного средства, образующихся во время культивирования антитела. Как правило, условия изменяют так, чтобы содержание примесей белкового лекарственного средства находилось в диапазоне от 0,05% до 30,0%, предпочтительно от 0,05% до 15%, от 0,05% до 10%, от 0,05% до 5% или от 0,05% до 2% (вес/вес).

[00249] Одно или несколько условий клеточной культуры, которые изменяют для уменьшения количества примесей низкомолекулярного белкового лекарственного средства, выбирают из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации фактора роста, перемешивания, газа. парциальное давление, поверхностно-активные вещества или их комбинации.

[00250] В некоторых вариантах реализации клетки, продуцирующие антитело, представляют собой клетки яичника китайского хомячка. В других вариантах реализации клетки представляют собой клетки гибридомы.

[00251] В другом варианте реализации предложено антитело, полученное в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, которое содержит от 1 до 5%, от 5 до 10%, от 10 до 15%, от 15 до 20% примесей белкового лекарственного средства.

ПРИМЕРЫ

[00252] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного 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 погрешностей эксперимента 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 приблизительно 25 °С, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: Материалы и способы

[00253] **Подготовка образца.** Исходный образец NISTmAb использовали в концентрации 10 мкг/мкл.

[00254] **Нативный анализ SEC LC-MS.** Для нативного SEC LC-MS анализа NISTmAb 10 мкг NISTmAb отделяли с использованием колонки ACQUITY UPLC Protein BEH C18 (200Å, 1,7 мкм, 4,6 мм x 300 мм) (Waters, Милфорд, Массачусетс) для онлайн-анализа LC-MS на масс-спектрометр Q-Exactive UHMR. Для разделения подвижная фаза представляла собой 150 mM ацетата аммония в воде. Подробные параметры градиента ЖХ и МС включены в таблицы 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Градиент ЖХ для нативного анализа SEC LC-MS

Мобильная фаза	150 mM ацетат аммония в воде	
Колонка	Waters ACQUITY UPLC Protein BEH 200 Å, 1,7 мкм, колонка 4,6 мм x 300 мм	
Температура колонки	25 °C	
Градиент	Время (мин)	Поток (мл/мин)
	0,0	0,200
	23,0	0,200

Таблица 2. Параметры МС для нативного анализа SEC LC-MS

Параметры МС	Контрольный эксперимент	Модифицированный метод десольватации газом
Напряжение источника [кВ]	3,0	3,0
Капиллярная температура [°C]	320	320
S-линза RF уровень	200	200
Защитный газ [л/мин]	2,0	2,0
Диапазон сканирования [м/з]	2000-15000	2000-15000

[00255] **Нативный анализ SCX LC-MS.** Для анализа NISTmAb с помощью нативной SCX LC-MS 10 мкг NISTmAb отделяли с использованием YMC BioPro IEX SF 4,6×100 мм (YMC, Япония) для онлайн-анализа LC-MS на масс-спектрометре Q-Exactive UHMR. Для разделения подвижная фаза А представляла собой 20 mM ацетата аммония в воде при pH 5,6, подвижная фаза В представляла собой 150 mM ацетата аммония в воде. Подробные условия градиента ЖХ включены в Таблицу 3, а параметры МС такие же, как и в нативном анализе SEC-MS.

Таблица 3. Градиент ЖХ для нативного анализа SCX ЖХ-МС

Мобильная фаза	А: 20 mM ацетата аммония в воде, pH 5,6; В: 150 mM ацетата аммония в воде, pH 7,4		
Колонка	YMC BioPro IEX SF 4,6×100 мм, 5 мкм		
Температура колонки	45 °C		
Градиент	Время (мин)	% А	% В
	0	100	0
	2	100	0
	18	0	100
	22	0	100
	23	100	0
	30	100	0

[00256] **Модификация газа десольватации.** Поток защитного газа был направлен в баллон Duran с бутылкой (SCHOTT North America, Inc., Элмсфорд, Нью-Йорк) через Canary-Safe Cap (Analytical Sales and Services, Inc., Фландер, Нью-Джерси) с использованием 1/ 8-дюймовая трубка из ТЕФЛОНА (см. Фиг. 1). Выходящая из бутылки трубка была затем напрямую подключена к излучателю Newomics M3 в ионном источнике Thermo Scientific Ion Max. Для нативного интактного анализа МС во флакон переносили 200 мл изопропанола (IPA).

Пример 2. Чувствительность и надежность платформы нативной SEC-MS

[00257] Используя способы и материалы, описанные в примере 1, чувствительность раскрытой платформы была продемонстрирована путем проведения анализа NISTmAb методом SEC-MS. Нативный анализ SEC-MS выполняли на 10 мкг NISTmAb. Как показано на Фиг. 3, введение 10 мкг образца NISTmAb привело к интенсивности TIC ~E9, что демонстрирует низкое потребление количества образца с раскрытой платформой. Превосходное качество данных благодаря эффективной десольватации с помощью газа для десольватации, модифицированного IPA, также наблюдалось с раскрытой платформой. Чувствительное обнаружение видов с низкой численностью (например, видов NMW и LMW) было продемонстрировано без необходимости дегликозилирования. Точные измерения массы позволили однозначно идентифицировать эти виды. Кроме того,

на Фиг. 4А и 4В показана устойчивость платформы, продемонстрированная 101 последовательным запуском нативной SEC-MS NISTmAb, и относительное количество было почти одинаковым между первым и 101^{-м} запусками.

Пример 3: Эффективная модификация газа десольватации для снижения заряда

[00258] Были проведены исследования для определения влияния модификации газа десольватации во время анализа нативной SCX-MS. Как показано на Фиг. 5А и 5В, небольшое падение интенсивности ТИС было связано с уменьшением заряда, когда газ для десольватации был модифицирован IPA, ACN или ACN/NH₃. Как показано на Фиг. 6, снижение заряда помогает анализу гетерогенных и/или лабильных биомолекул. На верхней панели Фиг. 6 показан нативный анализ SEC-MS имитатора цистеина ADC с уменьшением заряда, тогда как на нижней панели - без восстановления. Снижение заряда предотвращает перекрытие зарядовых состояний благодаря улучшенному пространственному разрешению, что позволяет анализировать образцы с высокой неоднородностью по массе. Снижение заряда предотвращает перекрытие состояний заряда благодаря улучшенному пространственному разрешению, что позволяет анализировать образцы с высокой неоднородностью массы. Кроме того, снижение заряда помогло сохранить лабильные биомолекулы (не связанные ковалентно) во время процесса ионизации и свести к минимуму нежелательные события диссоциации.

Пример 4. Универсальная, чувствительная и надежная платформа нативной ЖХ-МС для анализа массы интактного белка

[00259] Дополнительные примеры универсальной, чувствительной и надежной собственной платформы ЖХ-МС в соответствии с раскрытыми здесь вариантами реализации представлены ниже.

[00260] За последние несколько лет переносы методов нативной (неденатурирующей) жидкостной хроматографии (nLC), таких как эксклюзионная хроматография (SEC), ионообменная хроматография (IEX) и хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), с масс-спектрометрией (MS) вызвал большой интерес к изучению размера, заряда и структурной неоднородности белковых лекарственных препаратов. Несмотря на наличие большого разнообразия методов nLC-MS, интегрированная платформа, которая может работать с различными приложениями, по-прежнему отсутствует. В этом примере описывается разработка новой платформы nLC-MS, которая может легко включать различные приложения nLC-MS и отличается большой универсальностью, чувствительностью и надежностью. В частности, разработанная платформа может выдерживать широкий диапазон скоростей потока ЖХ и высоких концентраций солей, что является ключом к достигнутой универсальности при использовании различных методов nLC. Кроме того, с помощью этой платформы можно было бы легко применять десольватационный газ, модифицированный легирующей примесью, для достижения собственного МС со снижением заряда, чтобы улучшить характеристику как гетерогенных, так и лабильных биомолекул. Наконец,

продемонстрировано, что эта платформа nLC-MS обладает высокой чувствительностью и надежностью и может регулярно применяться для характеристики белковых препаратов.

[00261] **Материалы.** Деионизированная вода обеспечивалась встроенной системой очистки воды MilliQ, установленной с фильтром MilliPak Express 20 (Millipore Sigma, Burlington, MA). Эталонный материал моноклональных антител NIST 8671 (NIST-mAb, гуманизированное моноклональное антитело IgG1κ) был приобретен в Национальном институте стандартов и технологий (Гейтерсберг, Мэриленд). Ацетат аммония (грейд ЖХ/МС) и миметик конъюгата антитела и лекарственного средства SigmaMAb (ADC) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Пептид N-гликозидаза F (PNGase F) была приобретена у New England Biolabs Inc (Ипсвич, Массачусетс). Буфер Invitrogen UltraPure 1 M Tris-HCl, pH 7,5, был получен от Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Ацетонитрил (ACN) (марка Optima LC/MS) был приобретен у Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA), гидроксид аммония (NH₃) (30%) был приобретен у JTBaker (Center Valley, PA). 2-пропанол (IPA) (чистота для ВЭЖХ) был приобретен у Honeywell (Маскегон, Мичиган). Все остальные моноклональные антитела, включая подклассы IgG1 и IgG4, были произведены в Regeneron (Тарритаун, Нью-Йорк).

[00262] **Подготовка образца.** Образец смеси mAb был приготовлен путем смешивания четырех моноклональных антител собственного производства в конечных концентрациях 5 мг/мл для каждого mAb. Одну аликвоту смеси обрабатывали PNGase F (1 миллиединица IUB на 10 мкг белка) в 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) при 45°C в течение 1 часа перед анализом nSEC-MS. Другая аликвота была непосредственно подвергнута анализу nIEX-MS без обработки образца. Все другие образцы mAb, в том числе имитатор SigmaMAb ADC, были разбавлены водой до концентрации 2-5 мг/мл перед вводом для анализа nLC-MS.

[00263] **Способ nLC-MS.** Все разделения ЖХ выполняли на системе УВЭЖХ UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия). Для анализа nSEC-MS использовали колонку Acquity BEH200 SEC (4,6 × 300 мм, 1,7 мкм, 200 Å) (Waters, Milford, MA) при комнатной температуре с изократическим элюированием 150 mM ацетата аммония при 0,2 мл/мин. Для анализа nIEX-MS использовали колонку BioPro IEX SF (4,6 мм × 100 мм, 5 мкм) (YMC Co., LTD., Киото, Япония) при 45°C с линейным градиентом от 20 mM ацетата аммония (pH 5,6, доведено уксусной кислотой) до 150 mM ацетата аммония (pH 6,8) за 16 минут при скорости 0,4 мл/мин. Для обессоливающего анализа SEC-MS использовали защитную колонку Acquity BEH200 SEC (4,6 × 30 мм, 1,7 мкм, 200 Å) (Waters, Milford, MA) при комнатной температуре с изократическим элюированием 150 mM ацетата аммония с следующие скорости потока: 0,1 мл/мин, 0,2 мл/мин, 0,4 мл/мин, 0,6 мл/мин или 0,8 мл/мин. Чтобы обеспечить обнаружение нативного МС в режиме онлайн, после колонки был применен тройник из нержавеющей стали, соединяющий две трубки Viper с разными размерами (20 мкм × 15 см и 100 мкм × 65 см) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), чтобы уменьшить различные аналитические потоки (≤ 0,8 мл/мин) до диапазона микропотоков (менее мкл/мин) для

нативного детектирования МС и перенаправить оставшийся высокий поток на УФ-детектирование (280 нм). Масс-спектрометр Thermo Q Exactive UHMR или Exactive Plus EMR, оснащенный источником ионов Nanospray Flex™ (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия), использовали для нативного МС анализа. Для достижения наноэлектрораспыления (NSI) с микропотоком был применен эмиттер Newomics Microfabricated Monolithic Multi-Nozzle (M3) (Berkley, CA). Для достижения естественного МС со снижением заряда используется газ десольватации, модифицированный легирующей примесью (2 л/мин, азот), что достигается путем пропускания потока газа через свободное пространство над давлением DURAN плюс бутылка (1 л) (SCHOTT, Северная Америка, Inc., Элмсфорд, штат Нью-Йорк), содержащий 200 мл различных модификаторов (например, IPA, ACN или 5% аммиака в ACN), был применен для помощи NSI (Фиг. 7). Все эксперименты в этом примере были выполнены с анализом нативной МС с ИПС, если не указано иное. Разрешение МС было установлено на 12 500 (UHMR) или 17 500 (ЭМИ), напряжение капиллярного распыления было установлено на 3,0 кВ, температура капилляра была установлена на 350 °С, уровень RF S-линзы был установлен на 200, энергия фрагментации в источнике была установлена на уровне 100 (или 50 для анализа имитации ADC), давление газа-ловушки HCD было установлено на уровне 3. Масс-спектры были получены с окном диапазона m/z от 2000 до 15000.

[00264] **Интегрированная платформа nLC-MS.** Для характеристики белковых препаратов с помощью nLC-MS использовались колонки аналитической шкалы (внутренний диаметр 2,1 мм или 4,6 мм), поскольку они имеют много преимуществ. Во-первых, по сравнению с форматом капиллярных колонок, доступен гораздо более широкий выбор колонок с аналитическим масштабом, что облегчает разработку методов, особенно для таких сложных молекул. Кроме того, колонки аналитической шкалы преобладают по надежности и пропускной способности и широко используются с оптическим детектированием в анализах контроля качества (КК). Выполняя анализ нЖХ-МС на идентичной аналитической колонке, хотя и с другими условиями подвижной фазы, все же с большей вероятностью можно получить результаты, сопоставимые с анализами контроля качества, по сравнению с использованием капиллярной колонки. Чтобы справиться с широким диапазоном скоростей потока (0,1-0,8 мл/мин), используемым при разделении аналитической шкалы, была применена стратегия разделения после колонки для снижения скорости потока до диапазона (<10 мкл/мин), который может быть легко размещается многосопловым эмиттером (M3) для NSI (Фиг. 7). Коэффициент разделения в основном контролировался двумя фиксированными трубками Viper разных размеров, соединенными с тройником из нержавеющей стали (Фиг. 7), и оставался неизменным для всех тестируемых методов НЖХ в этом исследовании. Следует отметить, что конструкция эмиттера M3 с несколькими соплами имеет отношение к успешному выполнению NSI при субмикрорасходах, поскольку она еще больше снижает расход за счет разделения субмикропотока на восемь сопел перед NSI. Между тем, применение NSI не только снижает жесткость исходных условий для мягкой ионизации, но и значительно повышает

чувствительность МС, а также устойчивость к высоким концентрациям солей, что является ключевым фактором для адаптации к широкому спектру различных методов НЖХ (например, SEC, IEX и HIC). Более того, в отличие от большинства других установок NSI, этот подход на основе эмиттера МЗ позволяет подавать газ десольватации к эмиттеру распыления через встроенную линию газа десольватации (Фиг. 7), что полезно для достижения улучшенного распыления, стабильность и эффективность десольватации. Кроме того, это дало возможность еще больше расширить универсальность платформы за счет модификации газа десольватации. Например, путем простого легирования газа десольватации летучими органическими модификаторами с возможностью снижения заряда (Фиг. 7) можно легко добиться снижения заряда в реальном времени для естественного МС-анализа. Поскольку эта платформа была построена со всеми легкодоступными частями без какой-либо настройки, ее можно легко обслуживать для обеспечения стабильной производительности. В следующих параграфах были проведены обширные оценки, чтобы продемонстрировать универсальность, чувствительность и надежность этой платформы nLC-MS.

[00265] **Универсальность платформы для интеграции nLC.** Когда для анализа nLC-MS используются разные методы НЖХ (например, SEC, IEX и HIC), концентрации летучих солей, используемых в подвижных фазах, и/или скорости потока ЖХ часто необходимо оптимизировать для достижения наилучших хроматографических характеристик. Следовательно, желательно, чтобы разработанная платформа nLC-MS могла работать с широким диапазоном скоростей потока и концентраций соли для различных приложений nLC-MS. Чтобы оценить устойчивость этой платформы nLC-MS к различным скоростям потока и концентрациям соли, было проведено два теста путем проведения нативного МС-анализа образца mAb1 после этапа быстрого оперативного обессоливания с использованием защитной колонки Waters BEH200 SEC (4,6 мм × 30 мм). Во-первых, с использованием 150 мМ ацетата аммония в качестве подвижной фазы и количества вводимого раствора 10 мкг, были протестированы пять различных скоростей потока в диапазоне от 0,1 до 0,8 мл/мин. Без изменения настроек разделения или параметров источника МС все ионные хроматограммы (TIC), полученные при пяти скоростях потока, продемонстрировали хорошую интенсивность сигнала, стабильность распыления, а также высокое сходство с соответствующими УФ-профилями (Фиг. 8А). В частности, относительные интенсивности пиков УФ и TIC обычно коррелируют друг с другом при различных скоростях потока, указывая на то, что чувствительность NSI-MS при более высоких скоростях потока не снижается из-за менее достаточной десольватации. Кроме того, все усредненные необработанные спектры МС, полученные при этих пяти условиях, демонстрировали высокосимметричные пики m/z и отличное отношение сигнал/шум (Фиг. 12А и 12В), что указывает на достаточную десольватацию даже при самой высокой испытанной скорости потока (0,8 мл/мин). Эти наблюдения показывают, что эта разработанная платформа nLC-MS может хорошо выдерживать скорость потока ЖХ от 0,1 до 0,8 мл/мин, что должно быть достаточным для большинства

приложений nLC-MS. Кроме того, стоит отметить, что успех работы с высокими скоростями потока на короткой колонке SEC для быстрого и эффективного обессоливания на этой платформе дал большие надежды в собственных приложениях для высокопроизводительного скрининга на основе MS. В качестве подтверждения концепции 2 мкл образцов mAb2 в трех различных концентрациях (0,05, 0,5 и 5 мкг/мкл) вводили повторно по 30 раз каждую и анализировали со скоростью 0,8 мл/мин. ТИС был представлен на Фиг. 8В. Из-за применяемой высокой скорости потока рабочий цикл между инъекциями составлял всего 42 секунды, что соответствует пропускной способности ~ 2050 образцов в день. Хотя достигнутая пропускная способность не так высока по сравнению с некоторыми платформами МС на основе прямой инфузии, этот подход, основанный на SEC-MS, преобладает при минимальной обработке образцов, что не только экономит время лабораторных исследований, но также снижает риски Артефакты, вызванные подготовкой. Кроме того, анализ 30 повторов продемонстрировал как превосходную чувствительность МС, так и повторяемость, о чем свидетельствуют низкие значения коэффициента вариации (CV 17%, 5% и 4% для количества инъекции 0,1, 1 и 10 мкг, соответственно). Более высокий CV для анализов инъекций 0,1 мкг, вероятно, был связан с постепенным снижением концентрации исходного белка (0,05 мкг/мкл) в результате потери образца, вызванной адсорбцией иглой при повторных инъекциях.

[00266] Во втором тесте, поддерживая скорость потока на уровне 0,4 мл/мин и изменяя концентрации ацетата аммония в подвижной фазе, устойчивость платформы к концентрациям соли также оценивалась с использованием того же метода обессоливания SEC-MS. Из практических соображений концентрации ацетата аммония в диапазоне от 150 мМ до 600 мМ были изучены на предмет влияния как на чувствительность МС, так и на качество спектра. Как показано на Фиг. 9А, высокая интенсивность МС постоянно достигалась при трехкратном анализе mAb1 при каждой концентрации соли (150, 300, 450 и 600 мМ). Хотя наблюдалось заметное снижение интенсивности МС наряду с увеличением концентрации соли, предположительно из-за менее эффективной ионизации при более высоких концентрациях соли, общий сигнал МС по-прежнему считался достаточным для большинства применений нЖХ-МС. Кроме того, тщательное изучение нативного МС-спектра mAb1, полученного при концентрации соли 600 мМ, продемонстрировало превосходное качество спектра с высокосимметричными пиками m/z и хорошим соотношением сигнал/шум (Фиг. 9В). Различные гликоформы, возникающие в результате макро- и микрогетерогенности N-гликозилирования Fc, могут быть хорошо разделены и надежно отнесены к массе с хорошей точностью. Наконец, следует отметить, что оцененный диапазон концентраций ацетата аммония (150-600 мМ) достаточен для использования в большинстве приложений nLC-MS, таких как nIEX-MS и nSEC-MS, большинство из которых были разработаны и зарегистрированы с использованием подвижных фаз, содержащих 20-200 мМ солей на основе аммония. Чтобы обеспечить анализ nHIC-MS с использованием концентраций соли в пределах тестируемого диапазона, можно применить стратегию подпитки и разделения потока, недавно

представленную нашей группой. Вкратце, вводя поток разбавителя (воды) после колонки, подвижные фазы НИС (до 3 М ацетата аммония) можно разбавить в шесть раз (до 500 мМ) до обнаружения нативной МС. Применяя эту стратегию, на этой платформе был проведен анализ nHIS-MS нескольких образцов mAb, и были последовательно получены высококачественные данные (Фиг. 13А и 13В). Таким образом, разработанная платформа nLC-MS может универсально применяться для поддержки большинства приложений nLC-MS.

[00267] **Универсальность платформы для онлайн-снижения затрат. Нативный МС-анализ.** Снижение заряда это стратегия, часто используемая для облегчения нативного МС-анализа лабильных белковых комплексов или сильно гетерогенных образцов белков. Благодаря уменьшению заряда нековалентные взаимодействия, присутствующие в белковых комплексах, могут быть лучше сохранены во время анализа нативной МС благодаря уменьшению кулоновского отталкивания. Кроме того, за счет смещения огибающей состояния заряда в сторону более высоких значений m/z можно значительно улучшить пространственное разрешение между соседними состояниями заряда и, следовательно, уменьшить сложность спектра. Наиболее распространенный подход к включению естественного МС со снижением заряда заключается в добавлении реагентов, снижающих заряд, таких как имидазол или триэтиламин (TEA), в общий раствор аналита перед ESI. Используя эту платформу, разработанную для nLC-MS, можно легко достичь естественного МС со снижением заряда в режиме онлайн путем легирования газа десольватации различными органическими модификаторами. Чтобы оценить эффект снижения заряда трех различных модификаторов (IPA, ACN и 5% (об./об.) аммиака в ACN), смесь четырех различных mAb с pI в диапазоне от 6,8 до 8,5 была проанализирована обеими nSEC-MS и nIEX-MS анализы с десольватационным газом, модифицированным допантом. Затем было рассчитано среднее состояние заряда каждого mAb при каждом условии снижения заряда и проведено сравнение с таковым из контрольных экспериментов, которые проводились с использованием немодифицированного азота в качестве десольватационного газа (Фиг. 10А-10С). Исследование показало, что, независимо от аналитов mAb (например, разный pI), условий растворения для NSI (например, разные pH и концентрация соли от градиента IEX) или методов nLC (например, SEC против IEX) наблюдался последовательный порядок снижения заряда: ACN/NH₃ (5% аммиака в ACN) приводил к наибольшему снижению заряда (~ 9,5 зарядов), за которым следовали ACN (~ 8 зарядов) и IPA. (~ 5 зарядов).

[00268] Снижение заряда также привело к соответствующему снижению общей интенсивности МС (Фиг. 10А-10С), что, вероятно, было связано с менее эффективной передачей и обнаружением ионов с большим значением m/z с помощью прибора Orbitrap. Тем не менее, даже в условиях наибольшего снижения заряда, достигаемых с помощью газа десольватации, модифицированного ACN/NH₃, общая интенсивность МС при анализе 5 мкг образцов mAb все еще может достигать уровня E8 с высококачественными спектрами МС (Фиг. 14А-14С). Стоит отметить, что, в отличие от TEA, который трудно

удалить после введения в инструменты для МС, снижение заряда с помощью этого подхода считается полностью безопасным. Интересно, что было обнаружено, что модификация газа десольватации с помощью IPA или ACN также может повысить эффективность десольватации во время NSI, тем самым сводя к минимуму образование аддуктов, которые имеют тенденцию образовываться в течение продолжительного анализа, что приводит к улучшению качества спектра (Фиг. 15) и более длительному анализу. срок спрей стабильность. Поэтому самый мягкий модификатор снижения заряда, IPA, применялся по умолчанию для всех приложений nLC-MS на этой платформе.

[00269] Способность добиваться снижения заряда нативного МС в режиме онлайн ценна для анализа лабильных и/или гетерогенных белковых препаратов. Например, Cys-связанные конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) часто создают проблемы для анализа интактного белка из-за их нестабильности в газовой фазе из-за отсутствия межцепочечных дисульфидных связей, а также из-за высокой неоднородности массы, возникающей из-за различного количества полезных нагрузок. Используя имитатор SigmaMab ADC в качестве модельной системы, были оценены преимущества применения онлайн-снижения заряда для нативного MS-анализа Cys-связанных ADC (Фиг. 6 и 11). Этот имитатор ADC состоит из смеси видов, нагруженных лекарственным средством, с 0-4 парами полезных нагрузок (~ 668 Да), конъюгированных в межцепочечной дисульфидной связи с остатками Cys из mAb IgG1. Без удаления N-гликозилирования Fc из молекулы анализа nSEC-MS проводили с онлайн-снижением заряда и без него. Было показано, что при анализе без снижения заряда диссоциация нековалентного комплекса ADC легко наблюдалась даже при приложении минимальной энергии в источнике (SID=50 эВ), что приводило к образованию высокозаряженных частиц легкой цепи (LC). и вид H2L с полосой заряда (Фиг. 6). Напротив, когда применялось снижение заряда с помощью ACN/NH₃, такие события диссоциации резко уменьшались даже при более высокой энергии источника (SID=100 эВ, оптимизировано для эффективной десольватации) (Фиг. 6). Путем расчета относительной интенсивности MS LC по сравнению с интактным ADC было оценено, что эта склонность к диссоциации снижается с 8,3% до 0,4% при снижении заряда. Эта повышенная стабильность комплекса ADC в газовой фазе, вероятно, связана с уменьшением кулоновского отталкивания при более низких состояниях заряда, а также с уменьшением внутренней энергии ионов за счет испарительного охлаждения (с помощью реагентов, снижающих заряд). Более того, из-за повышенной неоднородности массы, вызванной разным количеством полезных нагрузок, без снижения заряда оболочки состояния заряда разных видов DAR (соотношение лекарство-антитело) перекрываются в определенных областях m/z. Например, состояния заряда +30, +29 и +28 у видов DAR8 проявлялись в тех же m/z областях, что и состояния заряда +29, +28 и +27 у видов DAR0 соответственно (Фиг. 6). Такое перекрытие m/z могло создать трудности для спектральной деконволюции, и в этом случае виды DAR0 не были обнаружены после деконволюции (Фиг. 11, нижняя панель). Напротив, при уменьшении заряда с помощью ACN/NH₃ вся огибающая состояния заряда была смещена в области с

более высокими m/z , где пространственное разрешение между соседними состояниями заряда было значительно улучшено. В результате не наблюдалось перекрытия между состояниями заряда от разных видов DAR (например, $z=+20$ от DAR8 и $z=+19$ от DAR0) (Фиг. 6), что способствовало уверенной спектральной деконволюции (Фиг. 11, верхняя панель). Для Cys-связанных АЦП, чтобы точно измерить средний DAR и охарактеризовать распределение полезной нагрузки, важно свести к минимуму нежелательную диссоциацию цепи и спектральное перекрытие. Цепная диссоциация в газовой фазе, вероятно, приведет к недооценке среднего DAR из-за предпочтительной диссоциации видов с высоким DAR. Спектральное перекрытие приведет к неоднозначности или даже потере информации во время деконволюции. В этом примере, несмотря на то, что средние значения DAR, полученные при двух условиях, были сопоставимы (DAR=4,3 по методу снижения заряда по сравнению с DAR=4,2 по методу контроля), распределения полезной нагрузки были разными. Без снижения заряда виды DAR0 не наблюдались после деконволюции, тогда как относительное обилие видов с высоким DAR было занижено из-за их преимущественной диссоциации. Эти две причины повлияли на расчет среднего DAR в противоположных направлениях и привели к сопоставимому среднему DAR. Однако только в условиях снижения заряда были точно охарактеризованы как средний DAR, так и распределение полезной нагрузки этого имитатора Cys-ADC.

[00270] **Чувствительность платформы и динамический диапазон.** Углубленная характеристика гетерогенности белковых препаратов требует от аналитических методов как высокой чувствительности, так и большого динамического диапазона. Первый позволяет получить характеристику с минимальным потреблением образцов, а второй позволяет идентифицировать эти малочисленные варианты. Для оценки чувствительности и динамического диапазона разработанной платформы nLC-MS в качестве образца для тестирования использовался эталонный стандарт NISTmAb, который подвергался анализу как nSEC-MS, так и nIEX-MS. Без какой-либо обработки образца 10 мкг NISTmAb вводили в колонку Waters BEH200 SEC (4,6 мм × 300 мм) с последующим анализом нативной МС с помощью IPA. TIC из анализа nSEC-MS выявил два пика высокой молекулярной массы (HMW) и два пика низкой молекулярной массы (LMW), которые были отделены или частично отделены от основного пика (Фиг. 3). Основной пик, обнаруженный при общей интенсивности ионов $\sim 1\text{E}9$, был приписан мономеру NISTmAb. Пик 1 BM и Пик 2 BM, присутствующие в количестве $\sim 0,1\%$ и $\sim 1,3\%$ соответственно, на основе количественного определения на основе УФ, оба были отнесены к димерным формам NISTmAb, которые предположительно были разделены с помощью SEC из-за их различных конформаций. Примечательно, что даже при таких низких уровнях для этих двух димерных видов были получены высококачественные данные МС, демонстрирующие массовые пики с разрешением гликоформы после деконволюции (Фиг. 3, вставки). Кроме того, два пика LMW также продемонстрировали отличное качество спектра и были однозначно идентифицированы как два комплементарных фрагмента,

возникших в результате серии событий отсечения, происходящих в верхней шарнирной области (Фиг. 3, вставки). Затем был проведен анализ 10 мкг необработанного NISTmAb методом nIEX-MS с использованием известного метода сильного катионного обмена в этой платформе nLC-MS. Множественные виды с вариантами заряда, присутствующие на очень разных уровнях, включая одни и те же усеченные фрагменты mAb, были уверенно идентифицированы на основе высококачественных данных МС (Фиг. 16-1 и 16-2). Наконец, варианты размера и заряда в NISTmAb, идентифицированные этими двумя методами nLC-MS, были суммированы на Фиг. 18, а их относительное содержание количественно определено соответствующими УФ-пиками. Поскольку второстепенные виды могут быть легко обнаружены на уровнях до $\sim 0,02\%$, динамический диапазон около в четыре порядка может быть достигнут путем применения методов nSEC-MS и nIEX-MS на этой разработанной платформе nLC-MS с количеством ввода 10 мкг NISTmAb. Наконец, поскольку $0,02\%$ второстепенных видов из инъекции 10 мкг представляют собой абсолютное количество 2 нг на колонке, эта платформа также считается высокочувствительной и может быть полезной для приложений биоанализа на основе МС.

[00271] **Надежность платформы.** Надежность - еще одно важное соображение при разработке аналитических методов для рутинных применений в промышленных лабораториях. В частности, методы nLC-MS непрерывно вводят водные растворы солей в источник ионов МС, что приводит к трудностям в поддержании стабильности распыления и интенсивности сигнала в течение продолжительного времени анализа. Чтобы оценить, можно ли использовать разработанную платформу nLC-MS для непрерывного анализа и можно ли поддерживать стабильность спрея и чувствительность метода в течение длительного периода времени, как nSEC-MS, так и nIEX-MS анализ молекул mAb неоднократно выполняли в течение 24 часов, производя более 50 запусков каждый. Как показано на Фиг. 17, хорошая интенсивность и стабильность сигнала были достигнуты в течение 24 часов со значениями CV 6,0% и 4,1% для анализов nSEC-MS и nIEX-MS соответственно. Высокая надежность, достигнутая этой платформой nLC-MS, вероятно, связана как с применением эмиттера с несколькими соплами, так и с нативной МС с помощью ПА. Первый не только уменьшает размер капель, вводимых в NSI, но также снижает риск засорения из-за осаждения и накопления белка. Нативный МС с ИПС дополнительно повышает эффективность десольватации, вероятно, за счет снижения поверхностного натяжения капель.

[00272] **Заключение**

[00273] Разработка платформы nLC-MS, подходящей для промышленных лабораторных приложений, представляет большой интерес для биофармацевтического сообщества в связи с растущим интересом и спросом на применение различных методов nLC-MS для характеристики белковых препаратов. В этом примере раскрывается разработка новой платформы nLC-MS, которая может быть легко интегрирована с различными методами nLC и отличается большой универсальностью, чувствительностью и надежностью. Благодаря инновационным конструкциям было продемонстрировано, что

разработанная платформа может работать в широком диапазоне скоростей потока ЖХ (от 0,1 до 0,8 мл/мин) и выдерживать высокие концентрации солей (до 600 мМ в подвижной фазе), что в совокупности способствовало достижению универсальности. в размещении различных методов НЖК. Затем были исследованы различные десольватационные газы, модифицированные легирующей примесью, для достижения нативной МС со снижением заряда в режиме онлайн на этой платформе. Впоследствии тематическое исследование Cys-связанного миметика ADC продемонстрировало пригодность и преимущества применения нативного MS со снижением заряда для характеристики лабильных и/или гетерогенных белковых молекул. Кроме того, с помощью анализа nSEC-MS и nIEX-MS с использованием этой платформы была достигнута глубокая характеристика гетерогенности размера и заряда NISTmAb, которая продемонстрировала большой динамический диапазон и высокую чувствительность. Кроме того, эта платформа nLC-MS также оказалась очень надежной и, таким образом, пригодной для непрерывного анализа в течение длительного времени (> 24 часов). Наконец, настоящая платформа была построена со всеми коммерчески доступными деталями и, следовательно, может быть легко внедрена другими лабораториями для стабильной работы.

[00274] В целом, как показано здесь для анализа образцов моноклональных антител в различных тематических исследованиях, разработанный подход обеспечивает более эффективный способ по сравнению с традиционным подходом, чтобы лучше удовлетворять постоянно растущие потребности в характеристике моноклональных антител на различных этапах разработки лекарств.

[00275] Данное изобретение не предполагает ограничение объема конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут выявлены специалистами в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что указанные модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, включающая:

систему жидкостной хроматографии, способную разделять образец; а также

систему масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS), сообщаемая по текучей среде с системой жидкостной хроматографии, при этом система ESI-MS включает эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами, обеспечивающими введение модифицированного газа десольватации, и масс-спектрометр, причем масс-спектрометр сконфигурирован для приема ионов и определения отношения массы к заряду ионов.

2. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 1, отличающаяся тем, что газ десольватации модифицирован органическим растворителем и дополнительным химическим компонентом.

3. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 2, отличающаяся тем, что дополнительный химический компонент представляет собой кислоту.

4. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 3, отличающаяся тем, что кислота представляет собой трифторуксусную кислоту.

5. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 2, отличающаяся тем, что дополнительный химический компонент представляет собой основание.

6. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 5, отличающаяся тем, что основание представляет собой триэтиламин.

7. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 2-6, отличающаяся тем, что органическим растворителем является ацетонитрил.

8. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 2-7, отличающаяся тем, что защитный газ представляет собой азот.

9. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами включает восемь сопел.

10. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что система жидкостной хроматографии содержит колонку для эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

11. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что система жидкостной хроматографии содержит колонку для ионообменной хроматографии (ИЭХ).

12. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что система жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии дополнительно содержит аналитический делитель потока для регулирования скорости потока от жидкостного хроматографа к масс-спектрометру.

13. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по п. 12, отличающаяся тем, что аналитический делитель потока способен обеспечить электрораспыление со скоростью потока растворителя около от 1 до 5 мкл/мин.

14. Система нативной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что масс-спектрометр содержит масс-анализатор с орбитальной ловушкой.

15. Способ характеристики белка в разделенном компоненте образца, включающий:

подачу образца в систему жидкостной хроматографии, обеспечивающую разделение, получая тем самым разделенный компонент образца; а также

ионизацию разделенного компонента образца с использованием системы масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS), сообщаемой по текучей среде с системой жидкостной хроматографии, при этом система ESI-MS содержит эмиттер ионизации электрораспылением с несколькими соплами, обеспечивающими введение модифицированного газа десольватации, и масс-спектрометр, при этом масс-спектрометр сконфигурирован для приема ионов и определения отношения массы к заряду ионов для идентификации компонентов белка для характеристики белка.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что белок представляет собой антитело, гибридный белок, рекомбинантный белок или их комбинацию.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что моноклональное антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанного изотипа.

19. Способ по любому из пп. 15-18, отличающийся тем, что способ не требует дегликозилирования белка в образце перед подачей образца в систему жидкостной хроматографии.

20. Способ по любому из пп. 15-19, отличающийся тем, что способ предназначен для определения характеристик примесей с высокой и низкой молекулярной массой.

21. Способ по п. 15, отличающийся тем, что контейнер содержит органический растворитель и дополнительный химический компонент.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что дополнительный химический компонент представляет собой кислоту.

23. Способ по п. 22. отличающийся тем, что кислота представляет собой ТФК.

24. Способ по п. 21, отличающийся тем, что дополнительный химический компонент представляет собой основание.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что основание представляет собой триэтиламин.

26. Способ по любому из пп. 21-25, отличающийся тем, что органический растворитель представляет собой ацетонитрил.

27. Способ по любому из пп. 15-26, отличающийся тем, что излучатель ионизации электрораспылением с несколькими соплами включает в себя восемь сопел.

28. Способ по любому из пп. 15-27, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии содержит колонку для эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

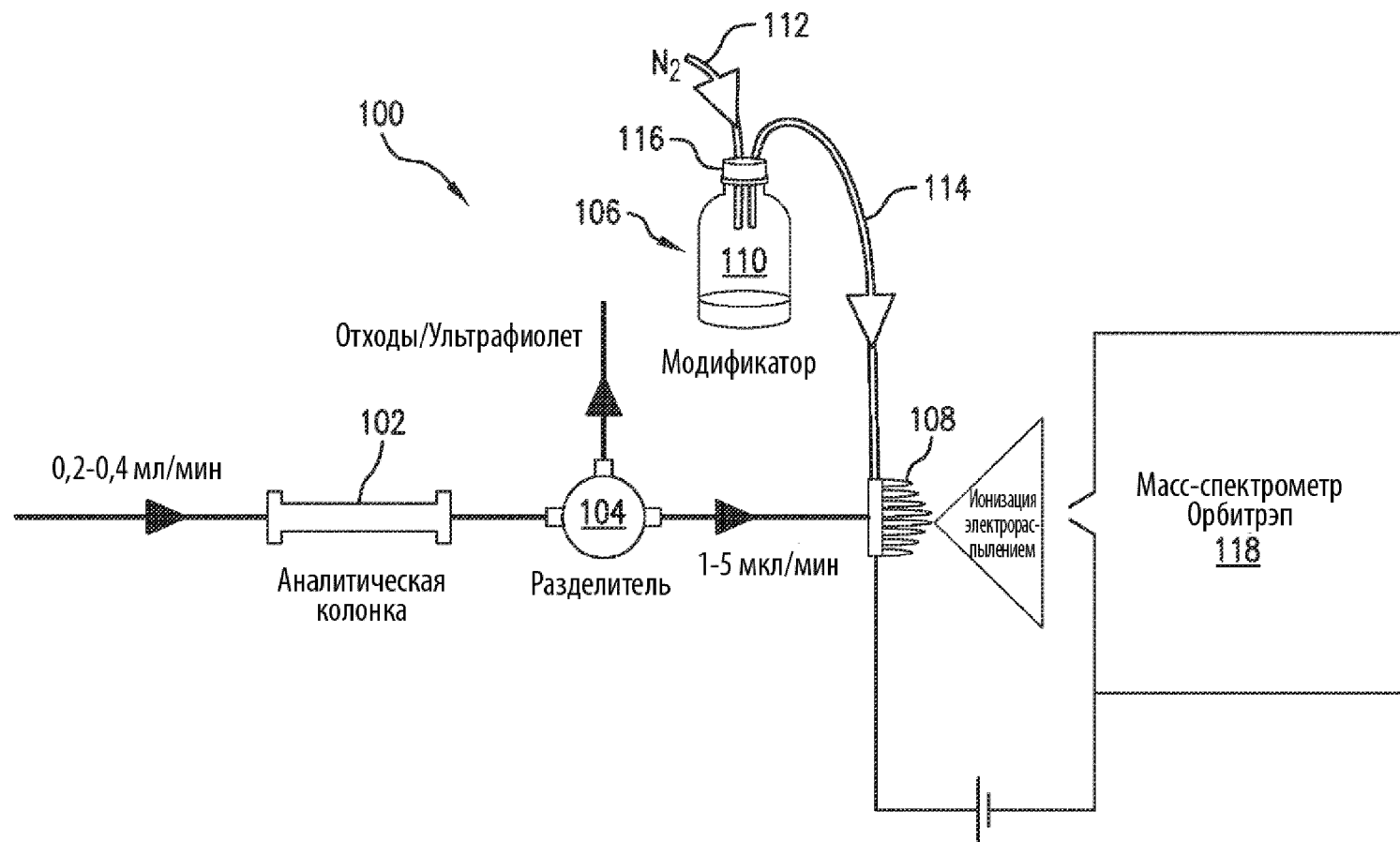
29. Способ по любому из пп. 15-27, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии содержит колонку для ионообменной хроматографии (ИЭХ).

30. Способ по любому из пп. 15-29, дополнительно включающий аналитический делитель потока для регулирования скорости потока от жидкостного хроматографа к масс-спектрометру.

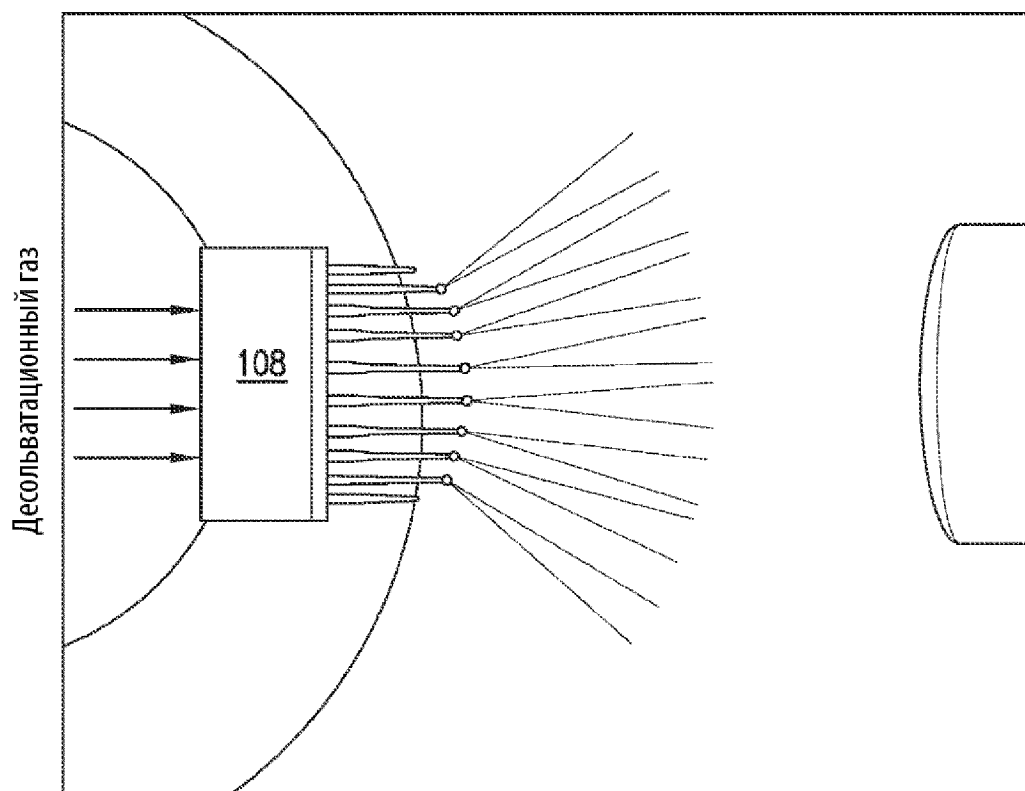
31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что аналитический делитель потока обеспечивает электрораспыление со скоростью потока растворителя около от 1 до 5 мкл/мин.

32. Способ по любому из пп. 15-31, отличающийся тем, что масс-спектрометр содержит масс-анализатор с орбитальной ловушкой.

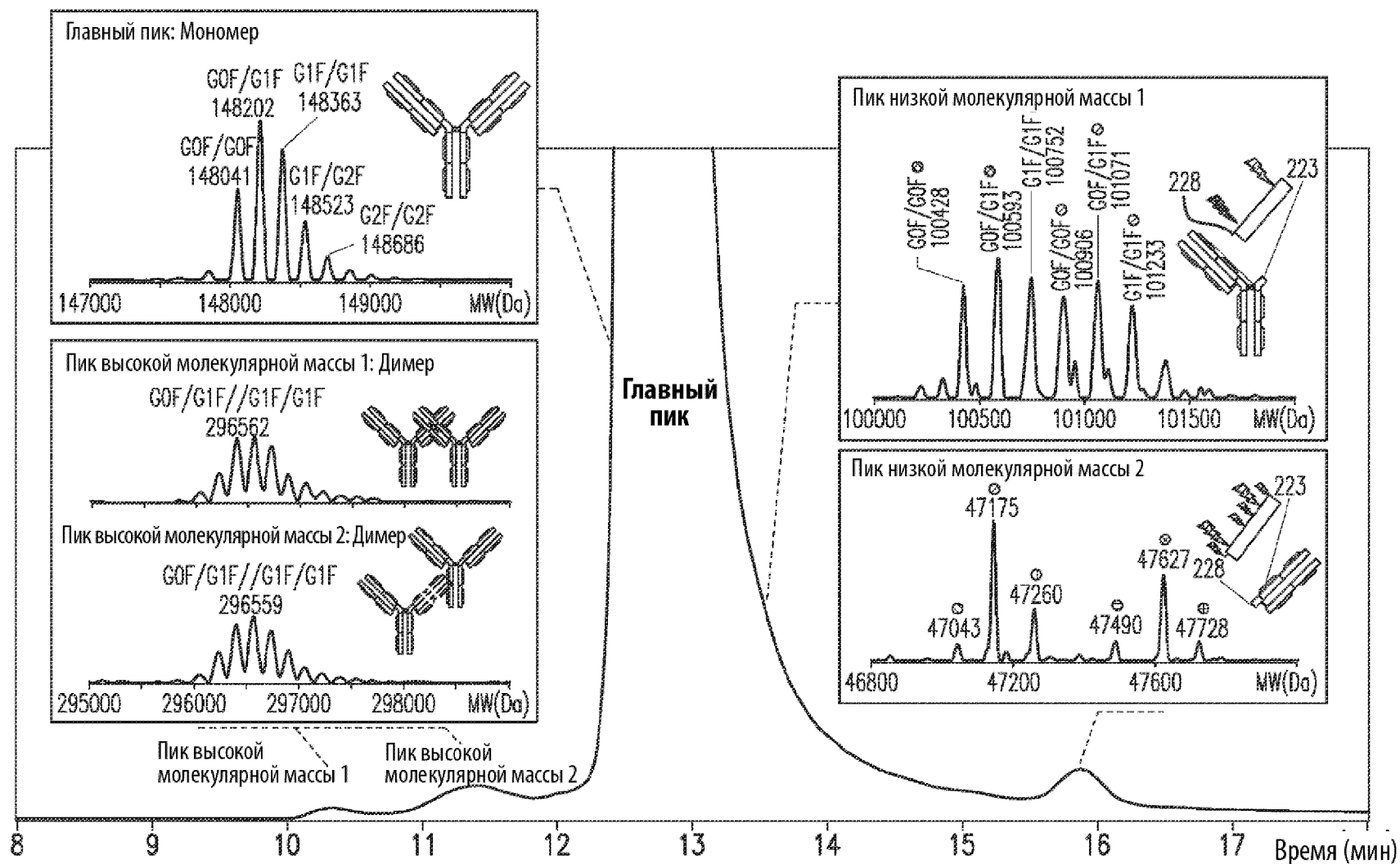
По доверенности



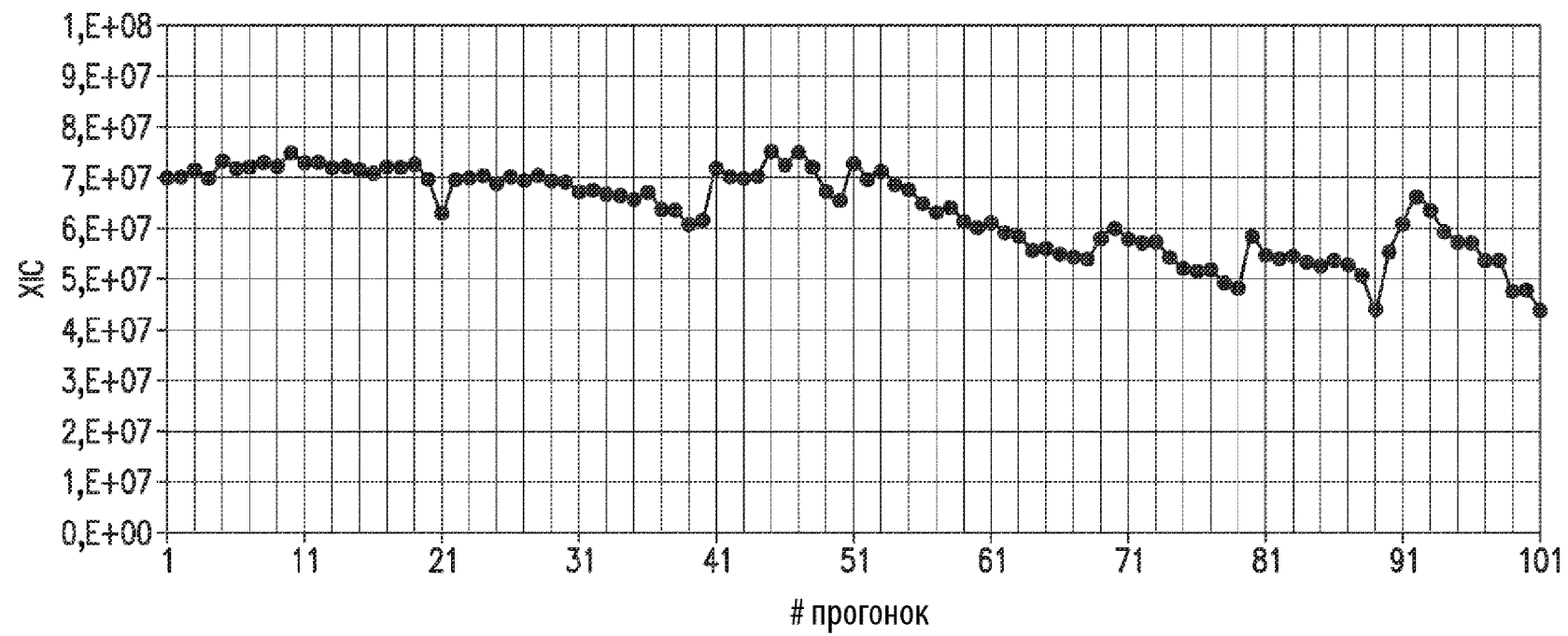
Фиг. 1



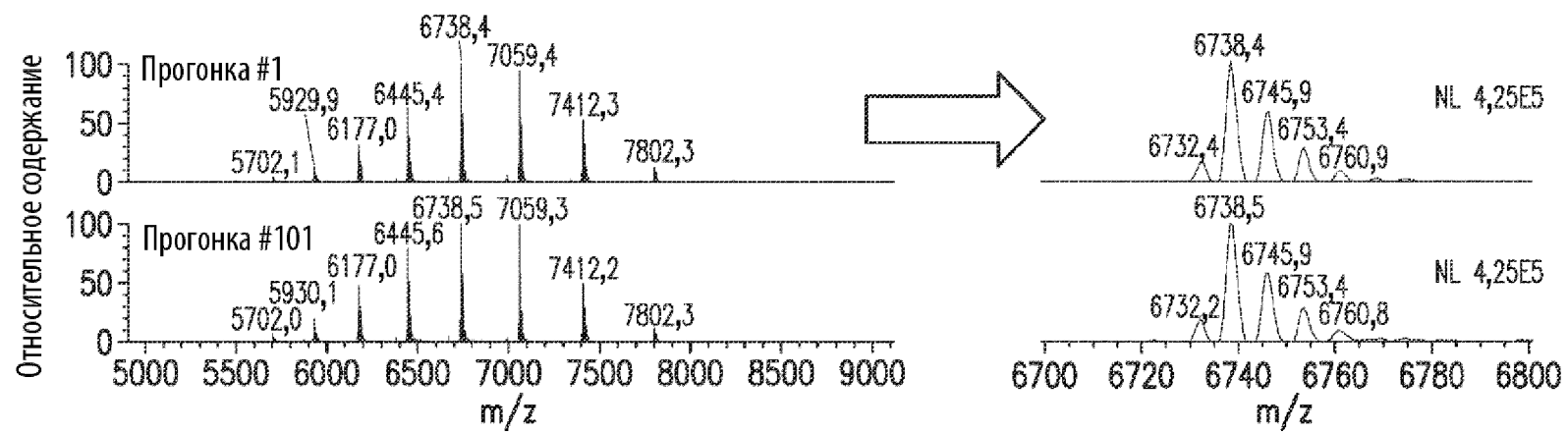
Фиг. 2



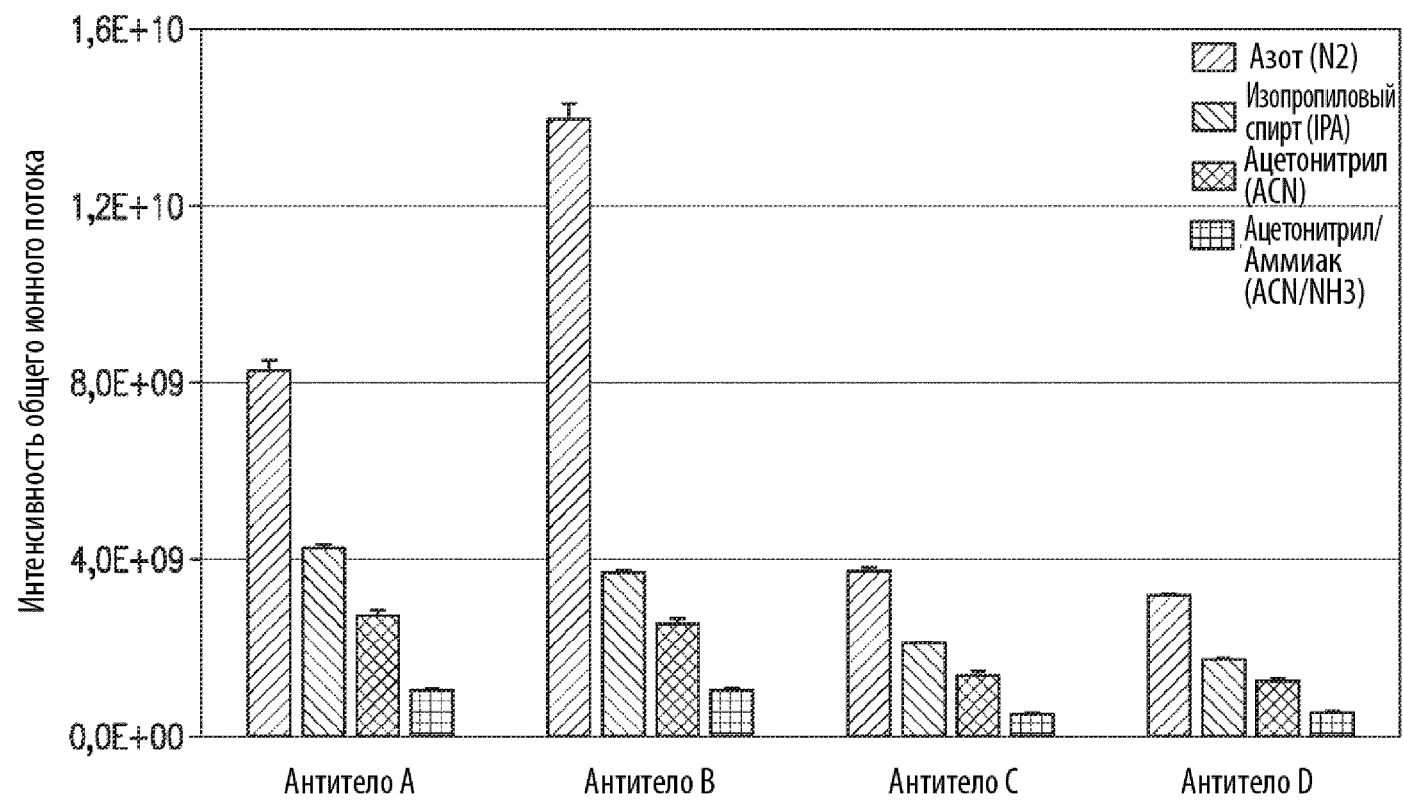
Фиг. 3



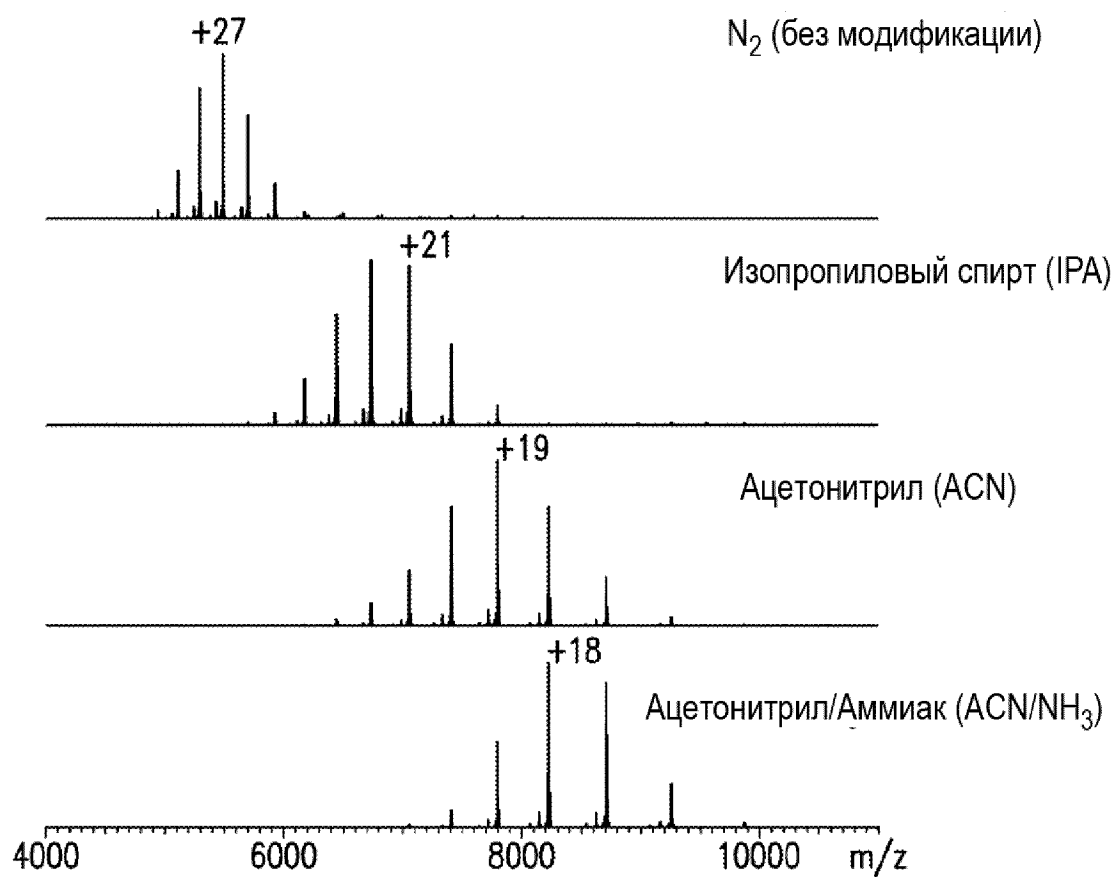
Фиг. 4А



Фиг. 4В

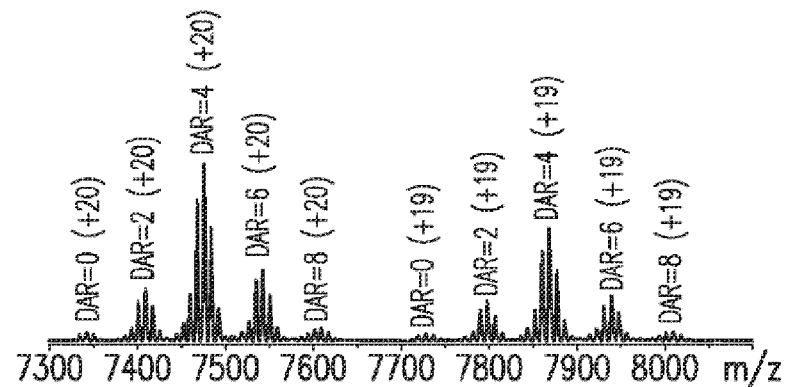
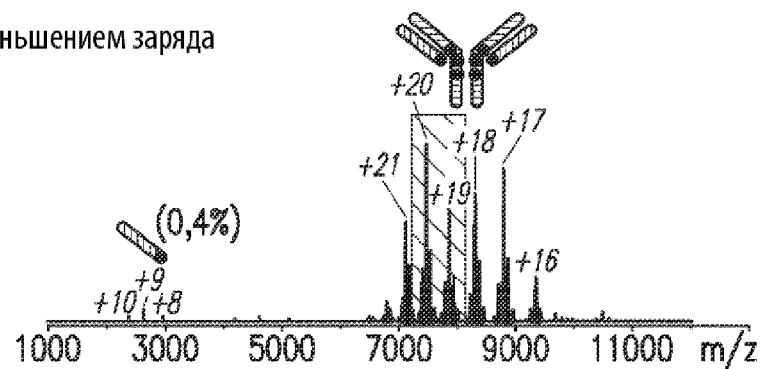


Фиг. 5А

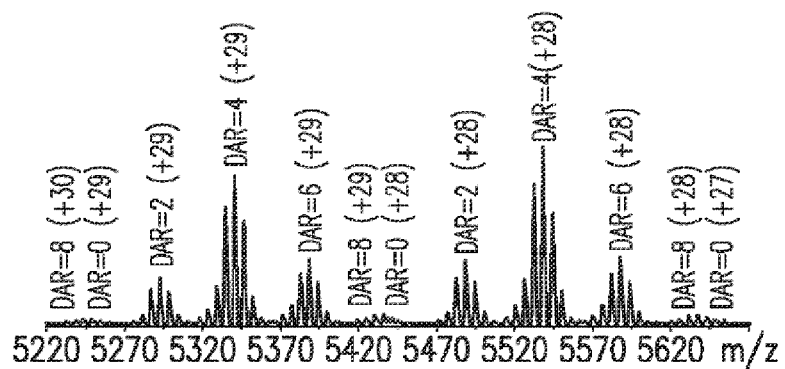
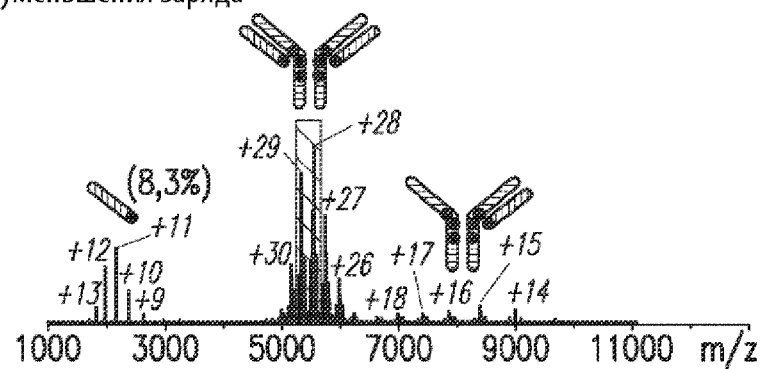


Фиг. 5В

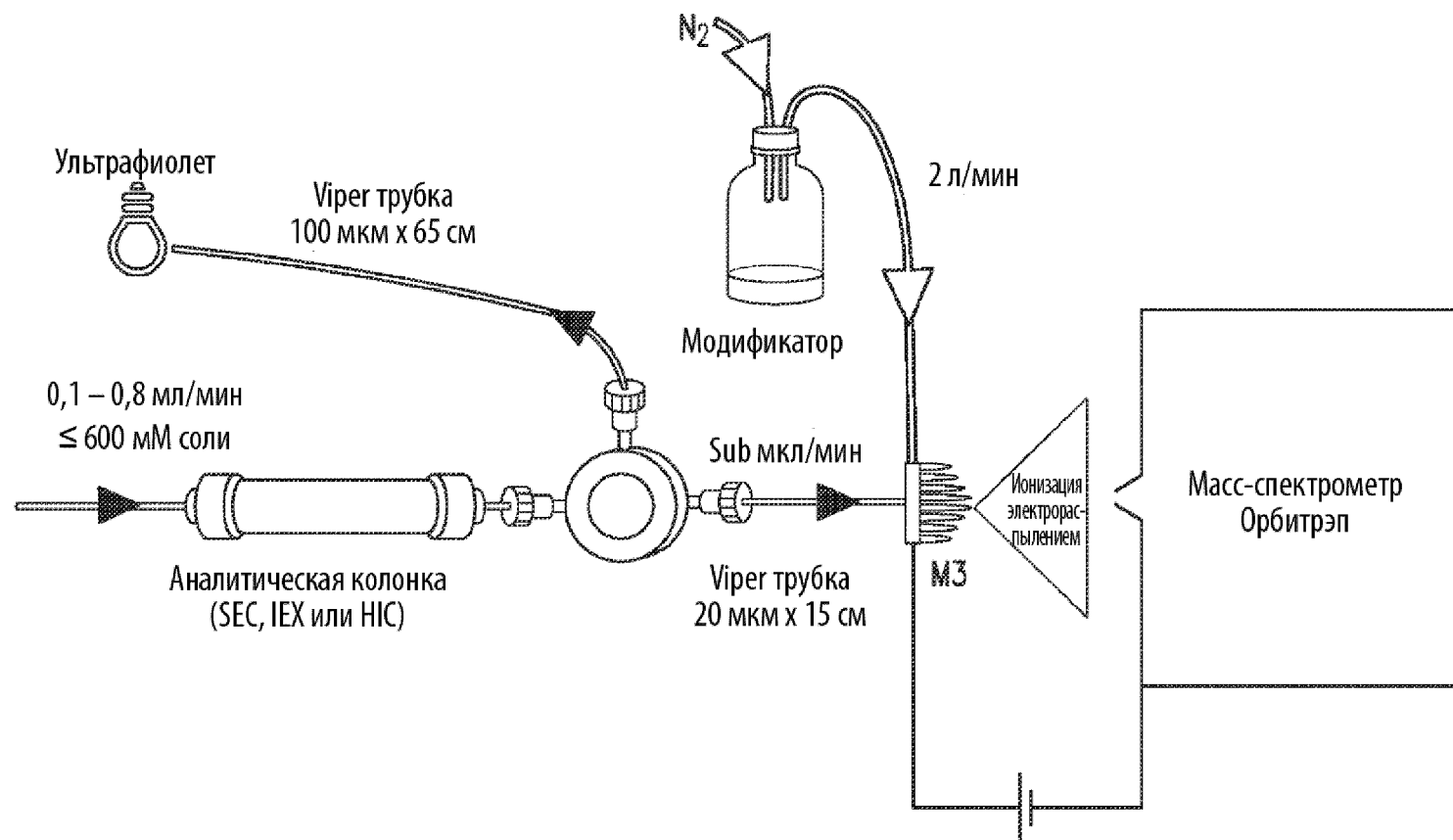
С уменьшением заряда



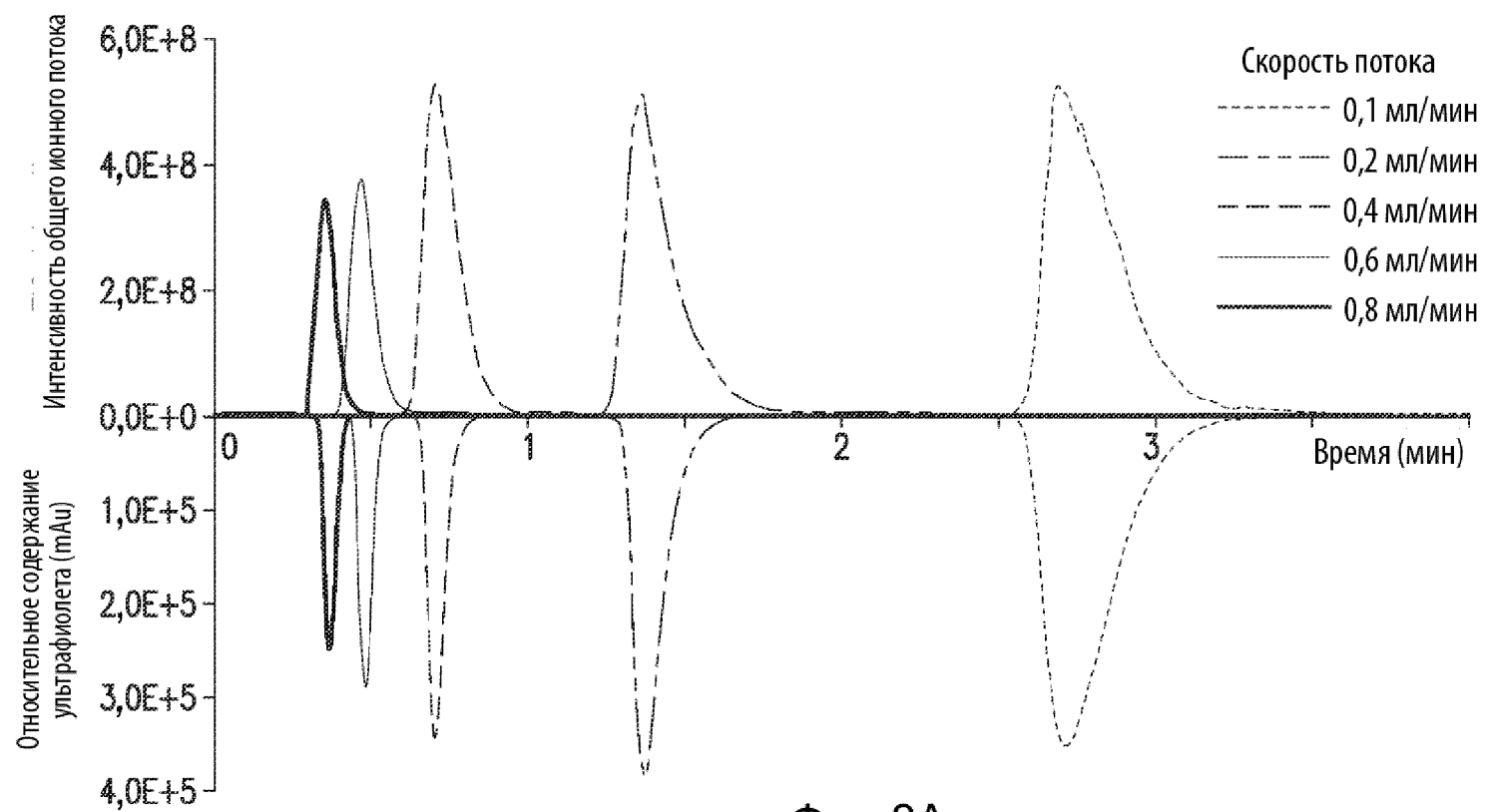
Без уменьшения заряда



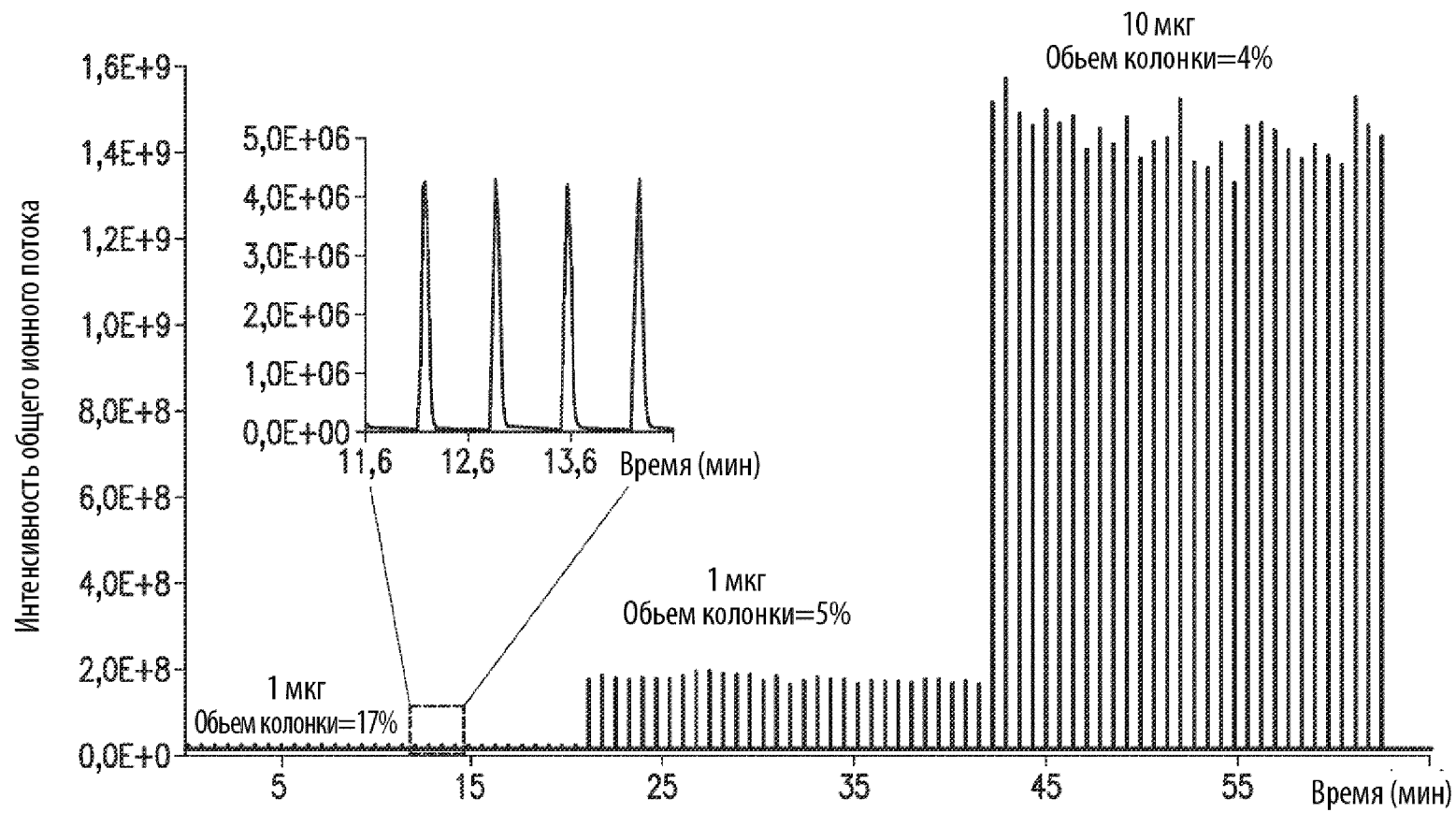
Фиг. 6



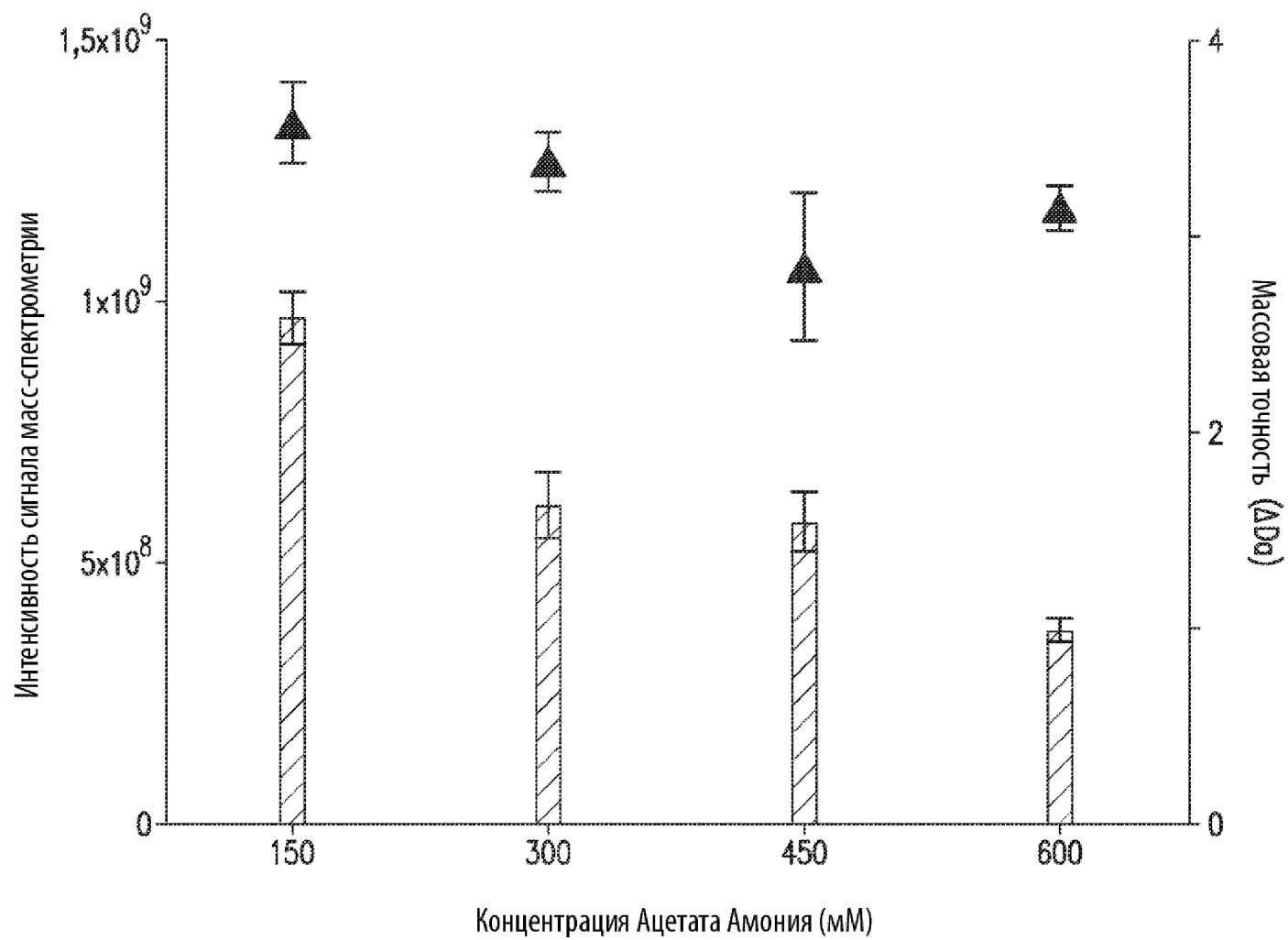
Фиг. 7



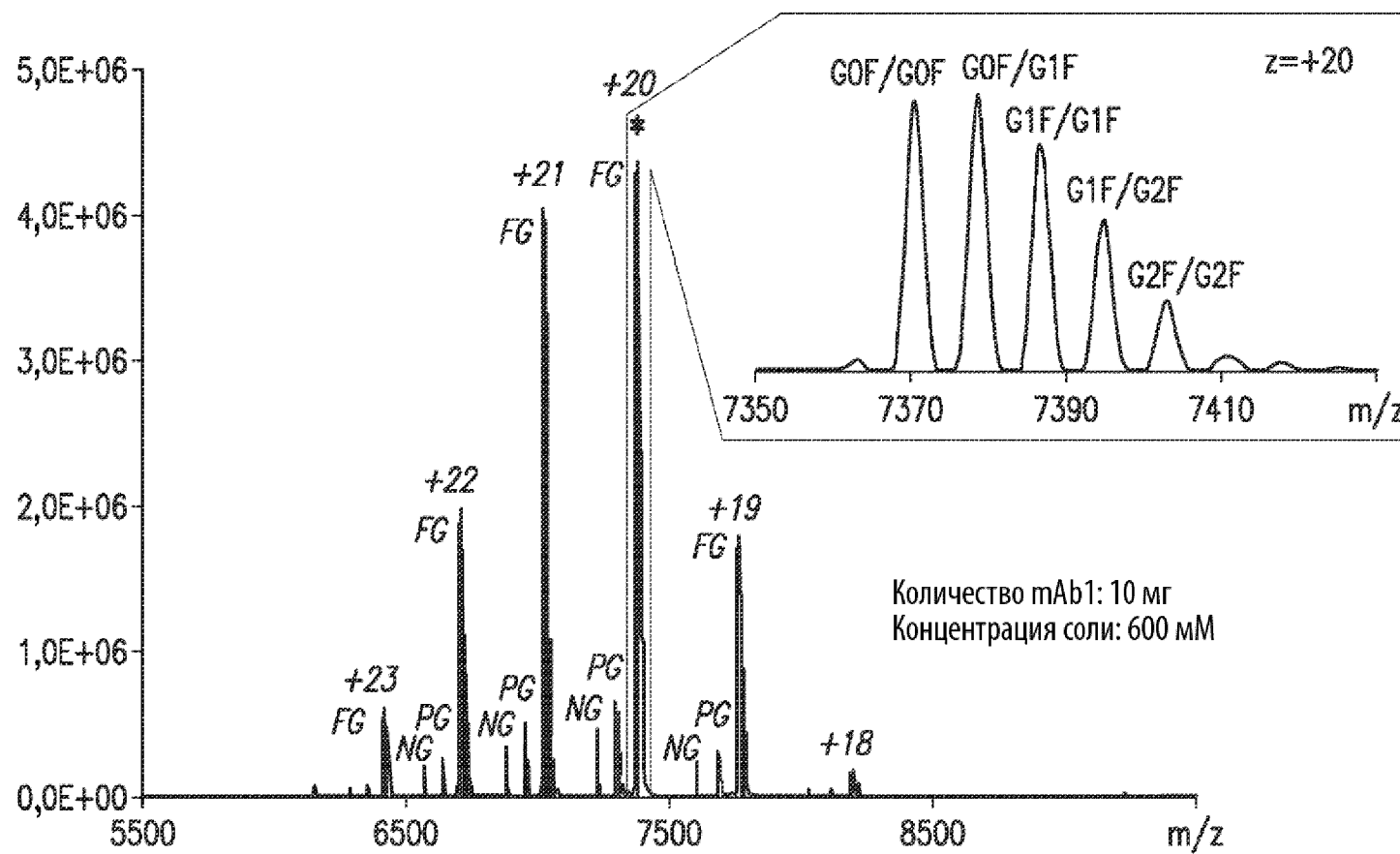
Фиг. 8А



Фиг. 8В

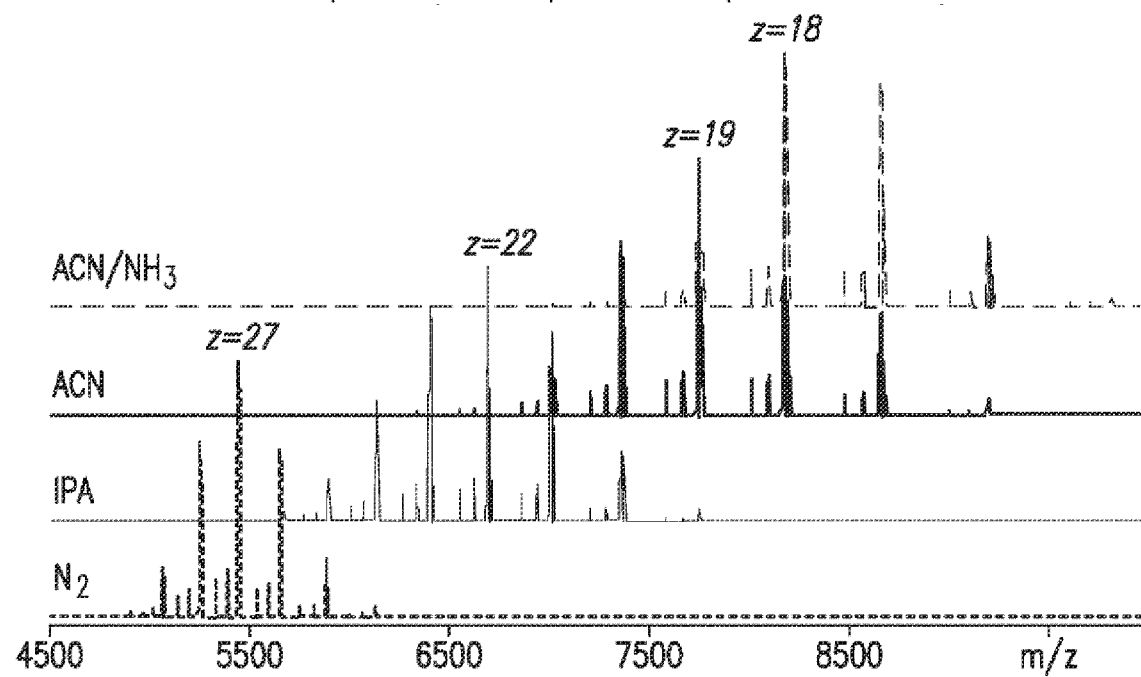


Фиг. 9А

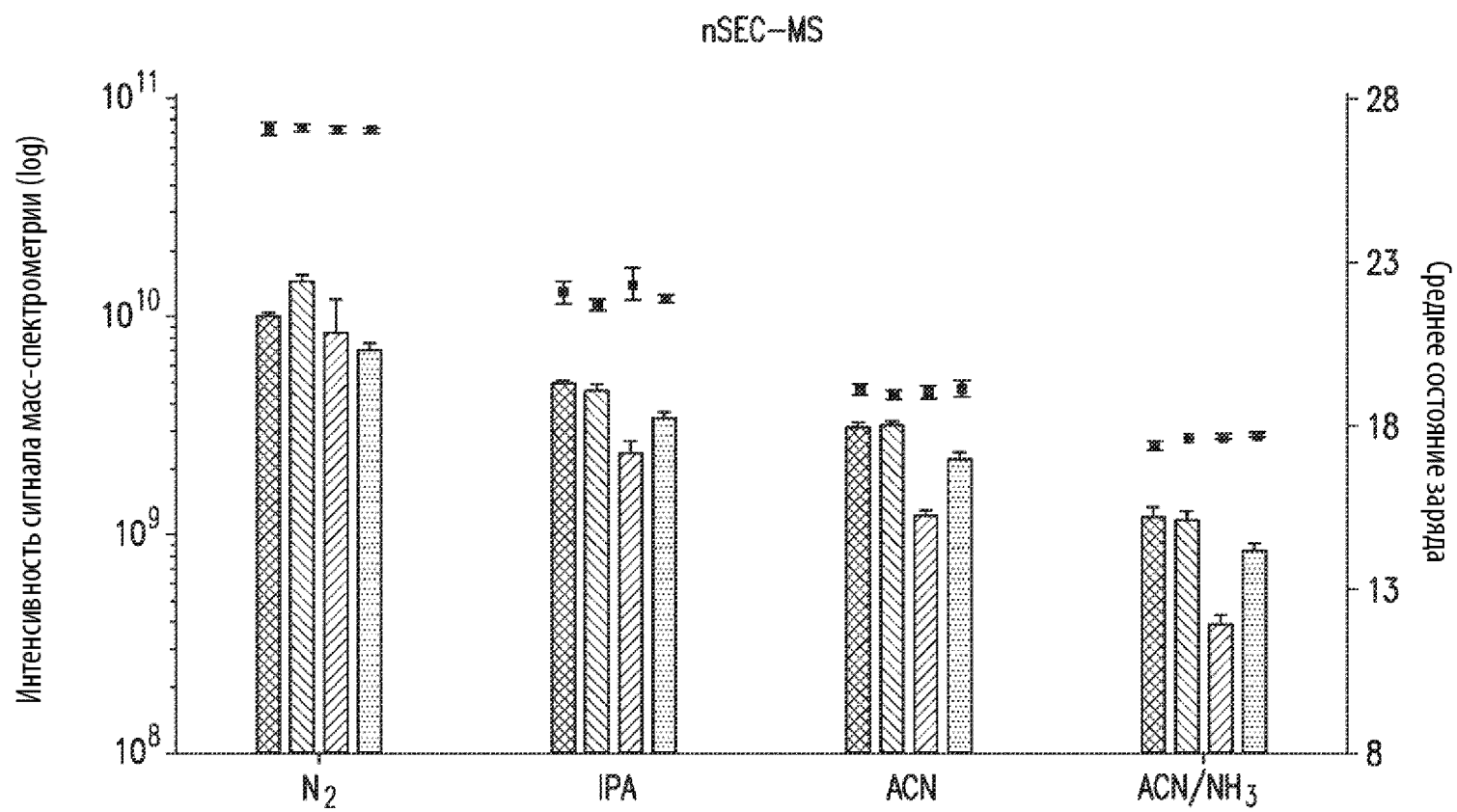


Фиг. 9В

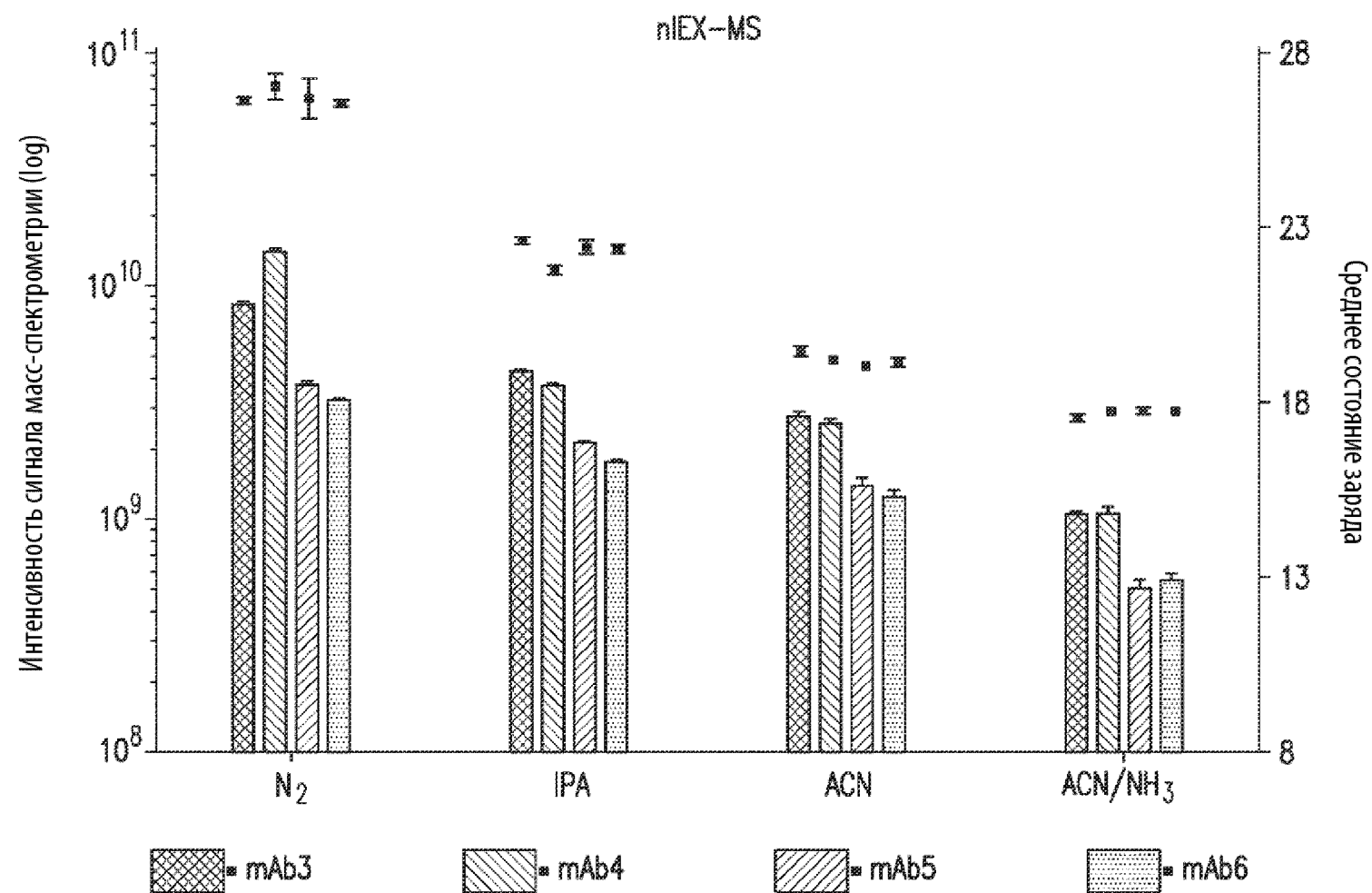
Необработанные спектры МС mAb5 при анализе nEX-MS



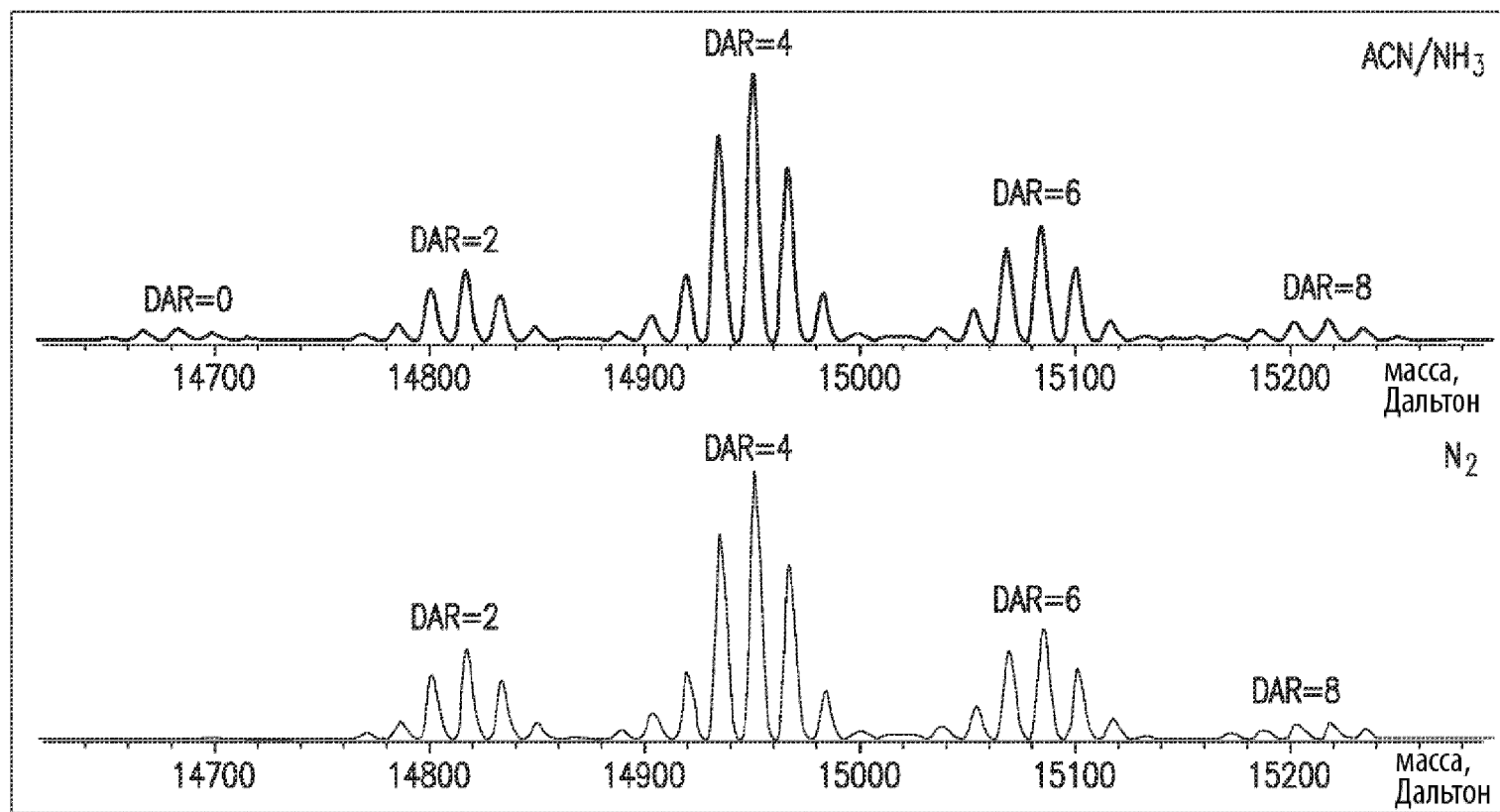
Фиг. 10А



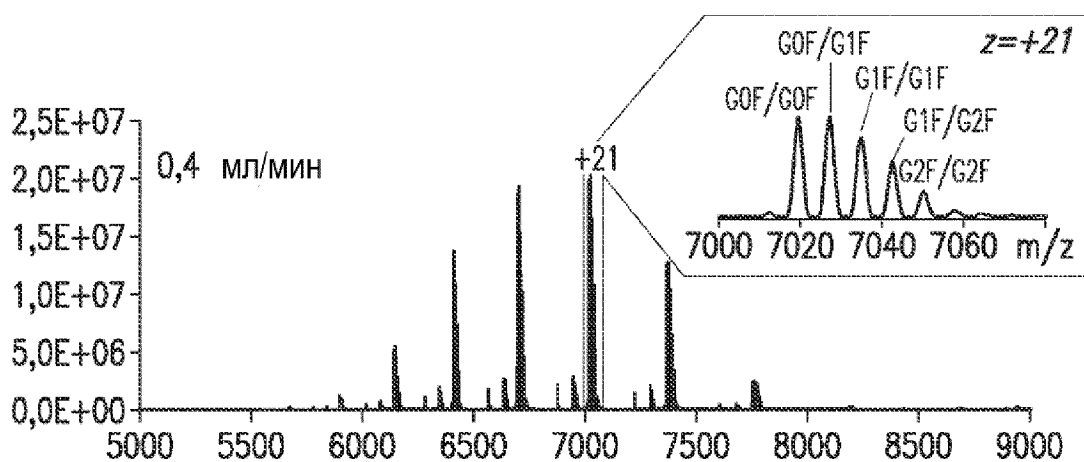
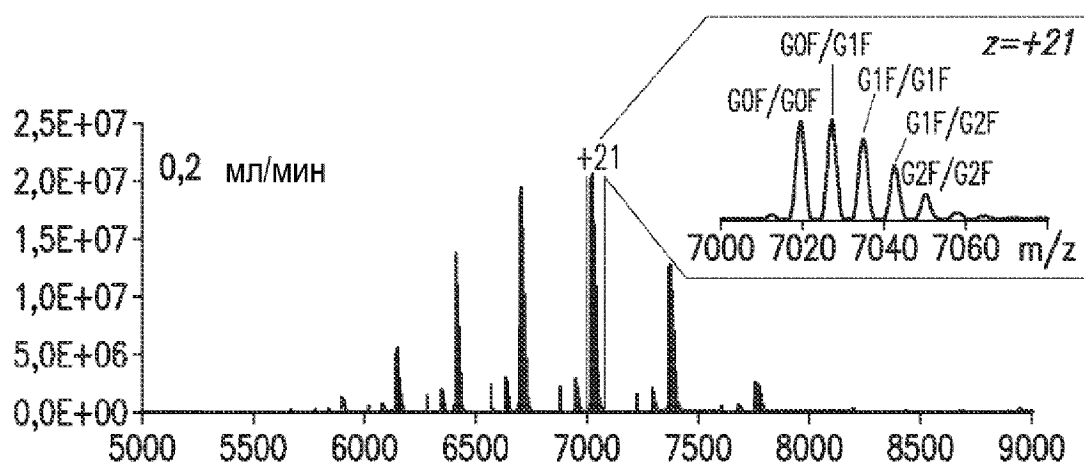
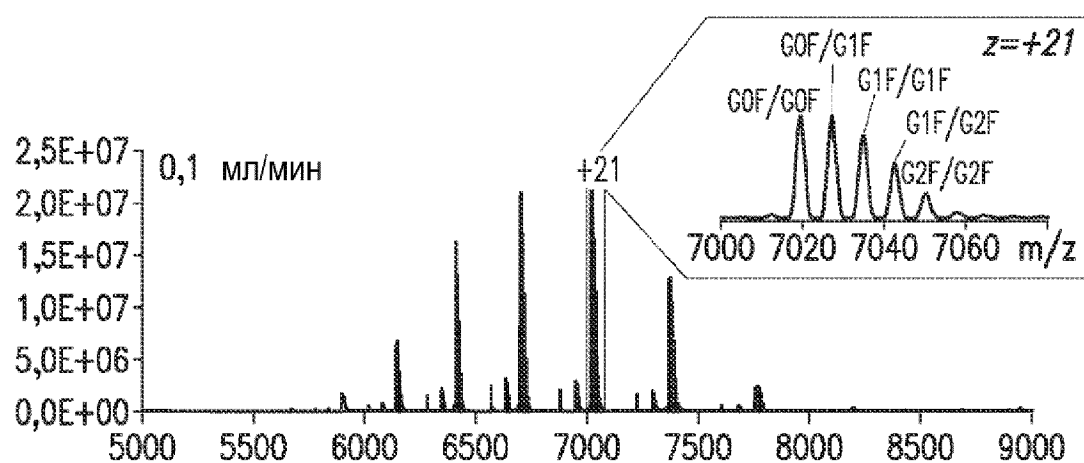
Фиг. 10В



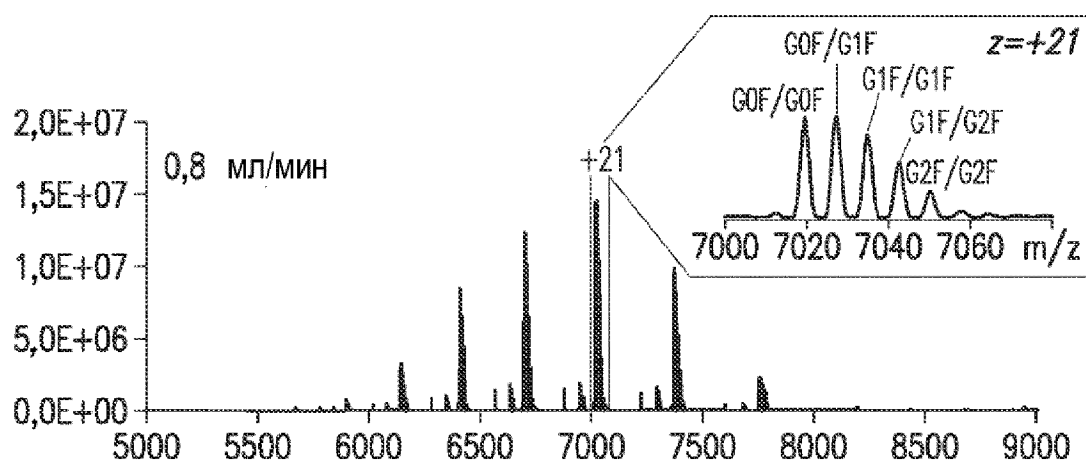
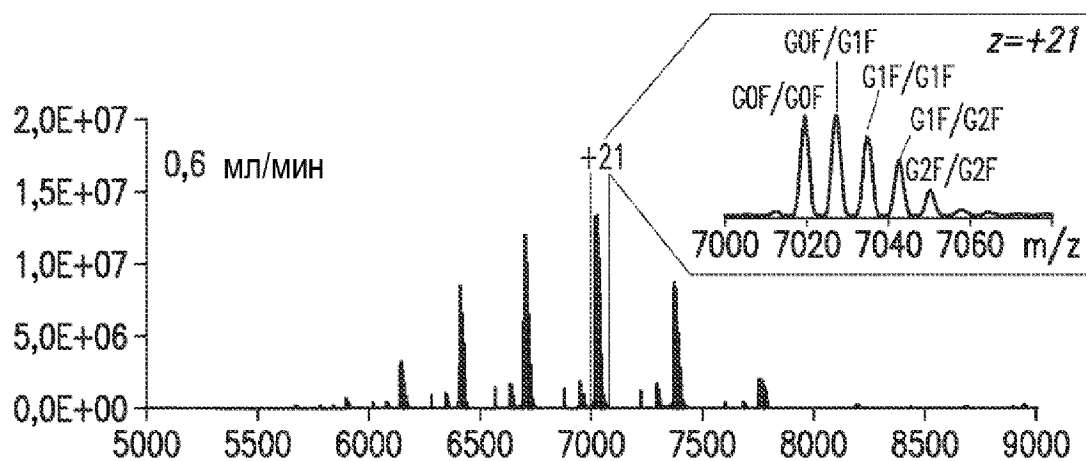
Фиг. 10С



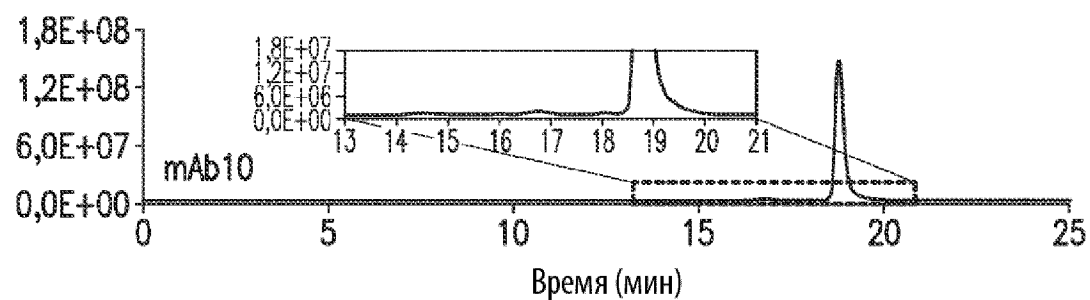
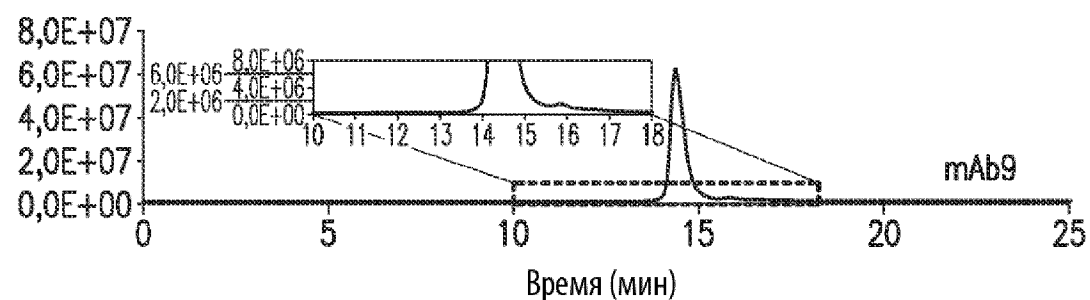
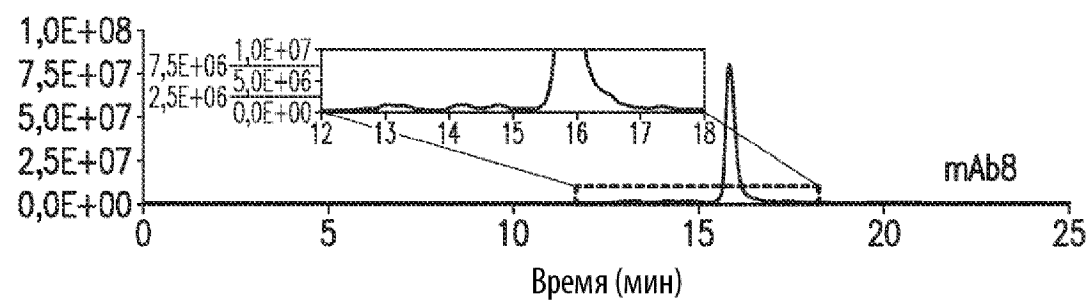
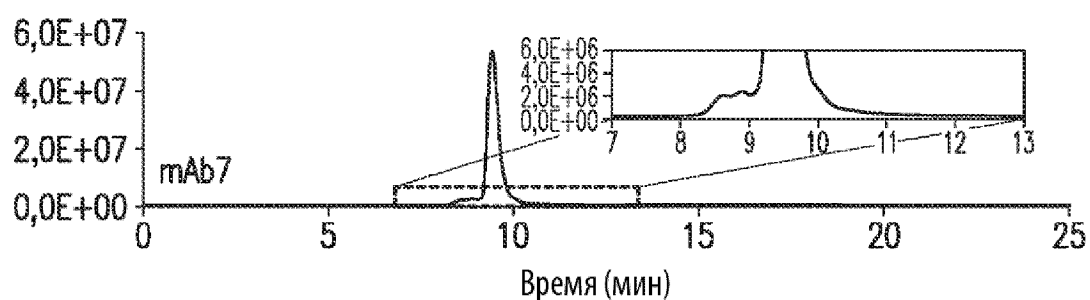
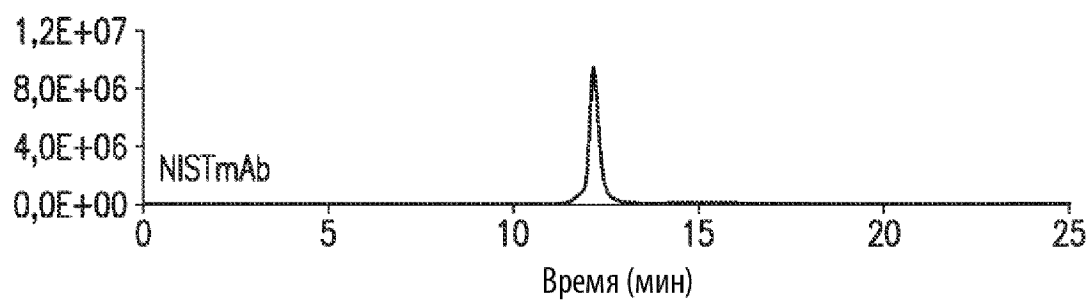
Фиг. 11



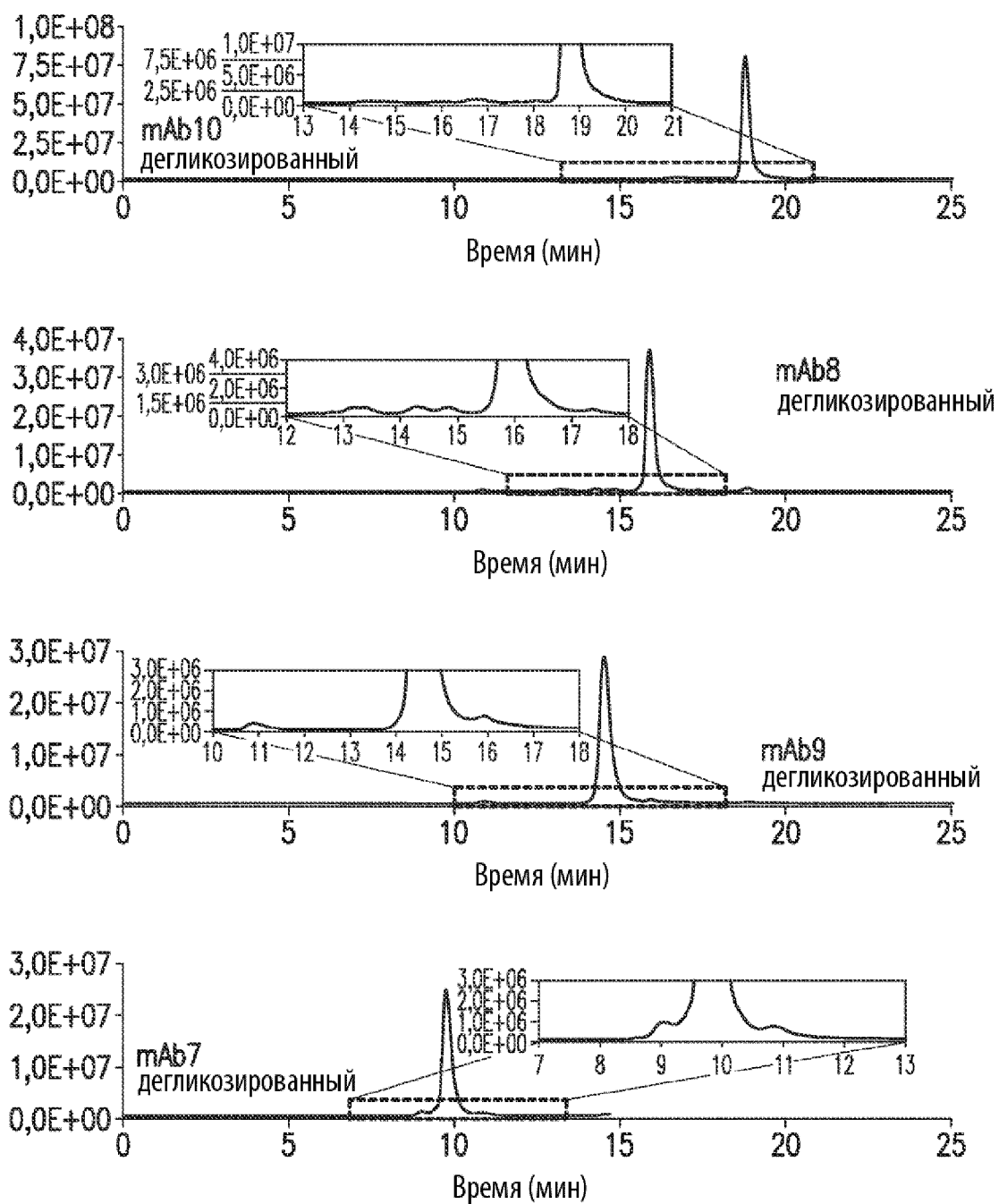
Фиг. 12А



Фиг. 12В

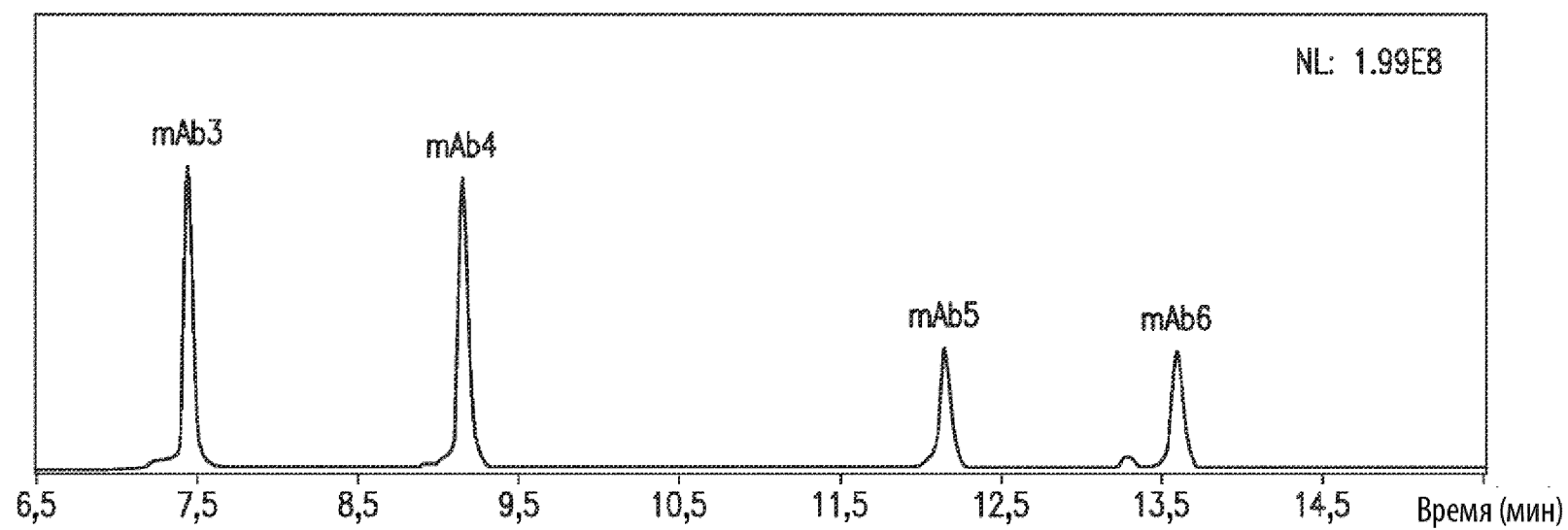


Фиг. 13А



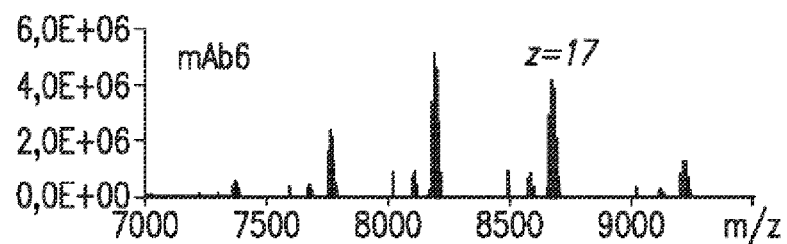
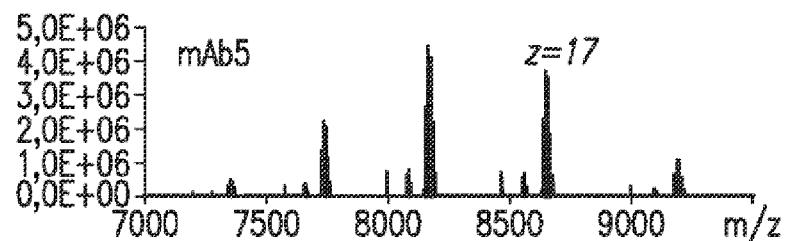
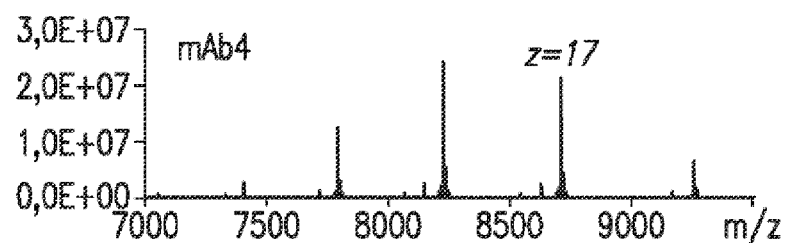
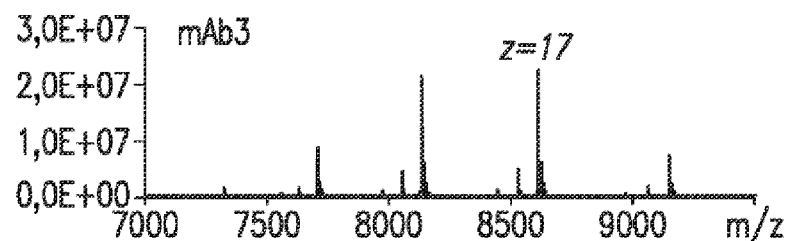
Фиг. 13В

ACN/NH₃ вспомогательной пИEX-TIC смеси mAb

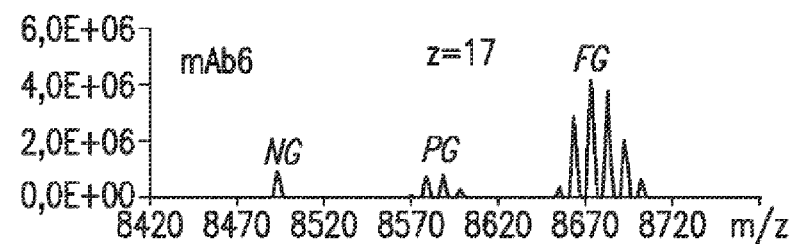
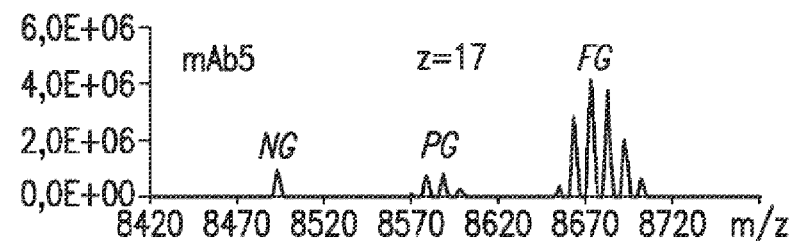
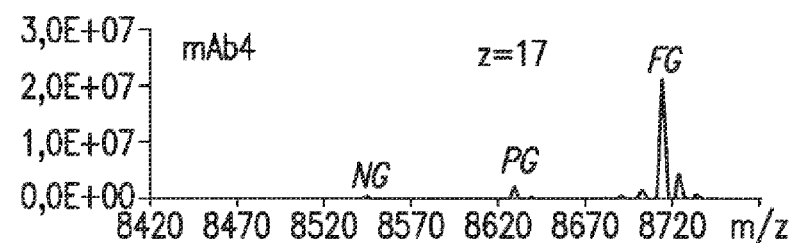
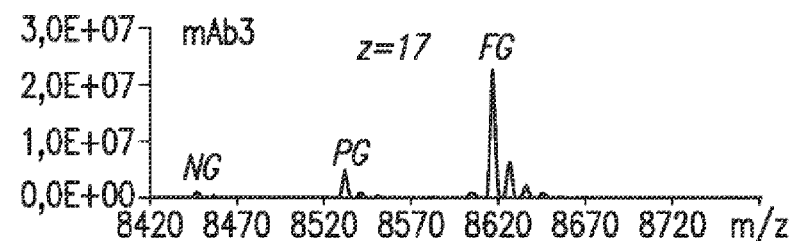


Фиг. 14А

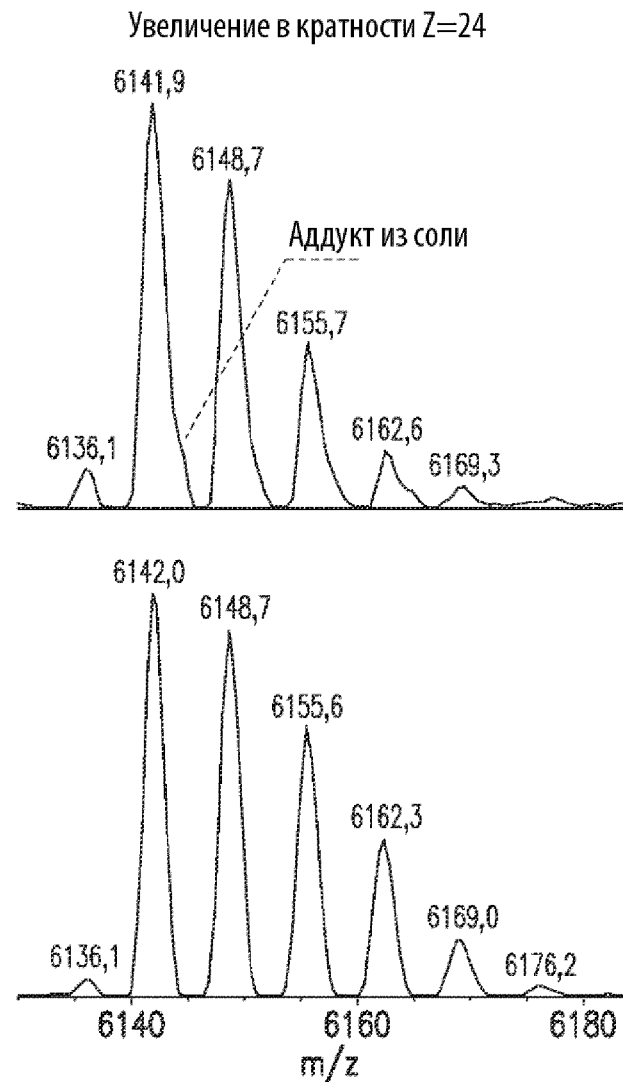
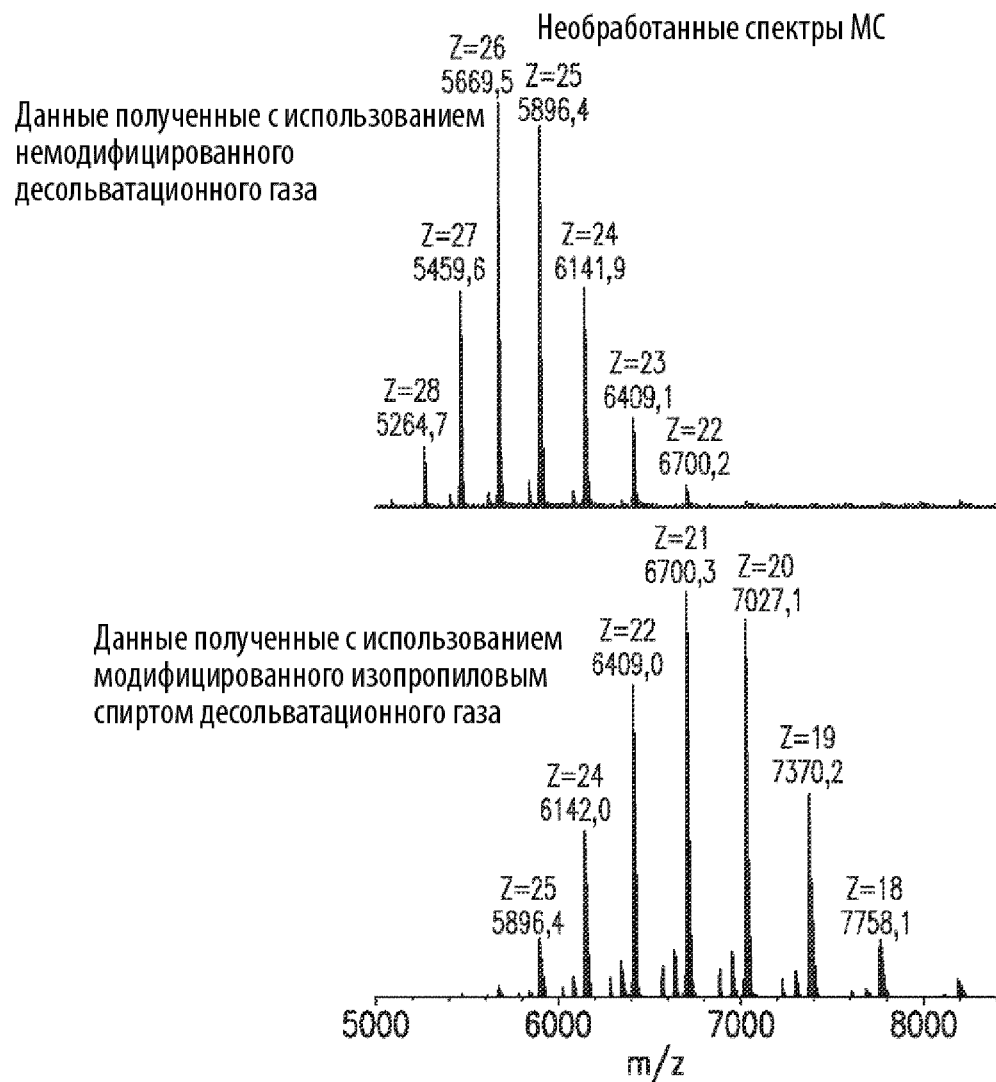
Необработанные спектры МС главного пика



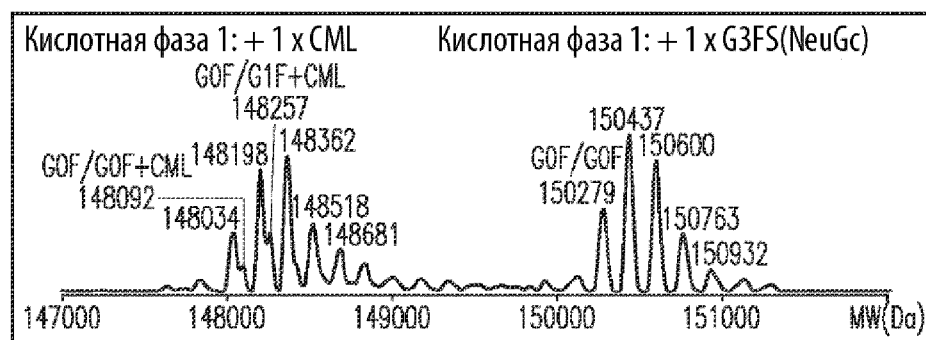
Фиг. 14В

Увеличение в кратности $Z=17$ 

Фиг. 14С



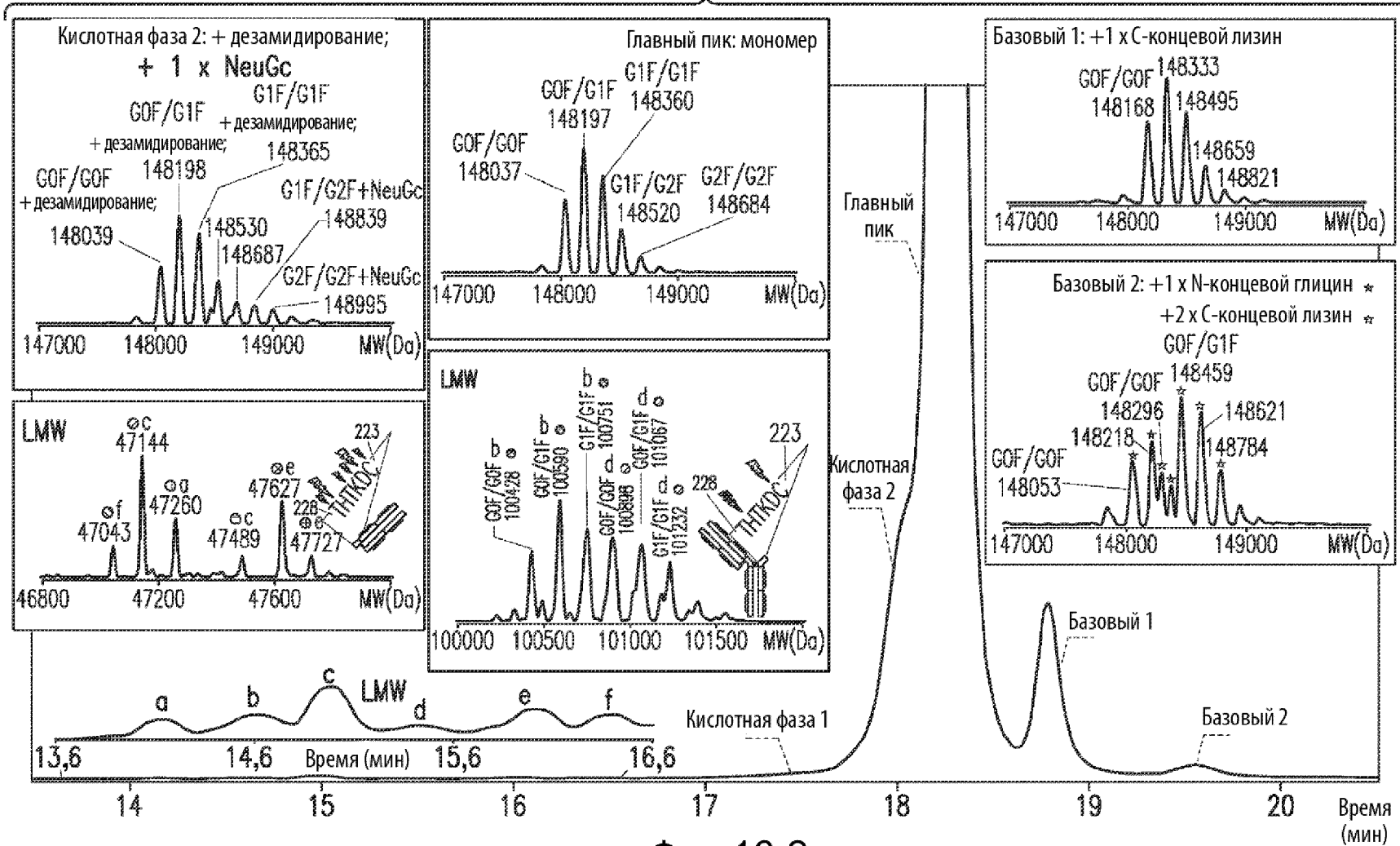
Фиг. 15



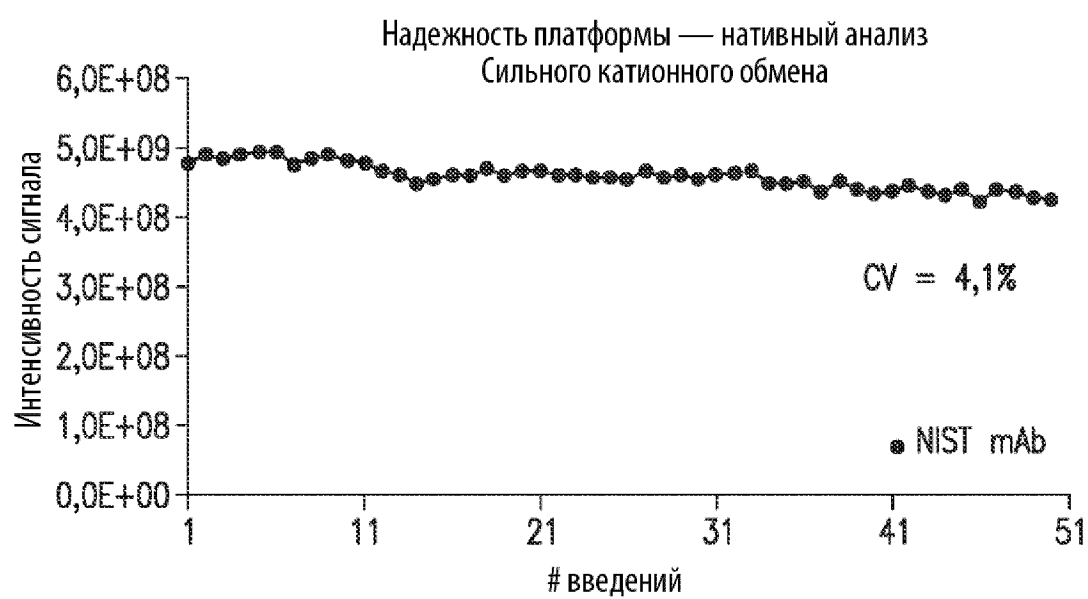
Продолжение на фиг. 16-2

Фиг. 16-1

Продолжение фиг. 16-1



Фиг. 16-2



Фиг. 17

nLC-MS анализ	ОИП/УФ Пики	Предложенный идентификатор	Относительное содержание
nSEC-MS	HMW1	NISTmAb димер	0,1%
	HMW2	NISTmAb димер	1,3%
	Главный	NISTmAb	98,2%
	LMW1	NISTmAb-Fab [LC+HC(1-223/227)]	
	LMW2	Fab [LC+HC(1-222~228)]	0,4%
nIEX-MS	a	Fab [LC+HC(1-224)]	0,02%
	b	NISTmAb-Fab [LC+HC(1-227)]	0,05%
	c	Fab [LC+HC(1-223)] & Fab [LC+HC(1-225)]	0,07%
	d	NISTmAb-Fab [LC+HC(1-223)]	0,04%
	e	Fab [LC+HC(1-227)] & Fab [LC+HC(1-228)]	0,06%
	f	Fab [LC+HC(1-222)]	0,13%
	Кислотная фаза 1	NISTmAb+CML (карбоксиметил); NISTmAb+G3FS	5,74%
	Кислотная фаза 2	NISTmAb + дезамидирование NISTmAb + NeuGc	6,43%
	Главный	NISTmAb	73,82%
	Базовый 1	NISTmAb + 1 не удаленный C-концевой лизин	9,12%
	Базовый 2	NISTmAb + 1 не удаленный N-концевой Q; NISTmAb + 2 не удаленных C-концевой лизин;	4,51%

Фиг. 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/015800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N30/72 G01N30/84 H01J49/16
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
H01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHUNHAI WANG ET AL: "Simple Approach for Improved LC-MS Analysis of Protein Biopharmaceuticals via Modification of Desolvation Gas", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 91, no. 4, 25 January 2019 (2019-01-25), pages 3156-3162, XP055689293, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05846 abstract page 3157, column 2, line penultimate - page 3158, column 1, line 1 page 3158, column 1, lines 29-35 page 3159, column 1, line 8 from bottom page 3159, column 2, line 4 from bottom - page 3160, column 1, line 4 page 3161, column 1, lines 25-42 -/-	1-20, 22-42



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2021

Date of mailing of the international search report

12/05/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bravin, Michel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/015800

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 3165, column 1, lines 5-13 figure 1 -----	
Y	Mao Pan ET AL: "Microflow LC-Nanospray MS for Targeted Proteomics", APPLICATION NOTE NEWOMICS INC , 2019, XP055800640, Retrieved from the Internet: URL:https://www.newomics.com [retrieved on 2021-05-03] page 1 page 2; table 1 -----	1-20, 22-42
Y	Silveira Joshua A ET AL: "Sensitivity Improvement for Bottom-up Proteomics using Silicon Microfluidic Chip-Based Multinozzle Emitter Arrays at Capillary Flow Rates", 66TH ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics June 3 - 7, 2018, San Diego, California ASMS 2018 Poster, 2018, XP055800650, Retrieved from the Internet: URL:https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/po-65308-lc-ms-capillary-flow-sensitivity-proteomics-asms2018-po65308-en.pdf [retrieved on 2021-05-03] the whole document -----	1-20, 22-42
Y	YUETIAN YAN ET AL: "Coupling Mixed-Mode Size Exclusion Chromatography with Native Mass Spectrometry for Sensitive Detection and Quantitation of Homodimer Impurities in Bispecific IgG", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 91, no. 17, 2 August 2019 (2019-08-02), pages 11417-11424, XP055658983, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02793 abstract page 11419, paragraph "mmSEC-MS Method" ----- -/--	14,16, 17,40,41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/015800

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANDREA F.G. GARGANO ET AL: "Capillary HILIC-MS: A New Tool for Sensitive Top-Down Proteomics", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 90, no. 11, 3 May 2018 (2018-05-03), pages 6601-6609, XP055689272, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00382 abstract page 6602, column 1, lines 6-28 -----	15,39
X,P	YAN YUETIAN ET AL: "Versatile, Sensitive, and Robust Native LC-MS Platform for Intact Mass Analysis of Protein Drugs", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, vol. 31, no. 10, 31 August 2020 (2020-08-31), pages 2171-2179, XP055799797, US ISSN: 1044-0305, DOI: 10.1021/jasms.0c00277 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jasms.0c00277> the whole document -----	1-20, 22-42