

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190032 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.12

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.28

(54) СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

(31) 62/724,700

(32) 2018.08.30

(33) US

(86) PCT/US2019/048526

(87) WO 2020/047067 2020.03.05

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

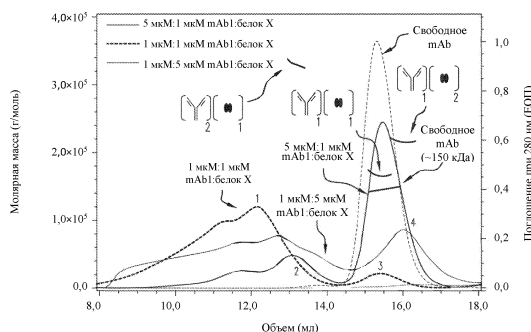
(72) Изобретатель:

Лю Нина, Роскони Майкл, Пайлс
Эрика (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены способы определения характеристик белковых комплексов, образованных между продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, и растворимыми лигандами. Раскрытые способы дают возможность определять размер, гетерогенность и конформацию белковых комплексов.



A1

202190032

202190032

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565865EA/022

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/724700, поданной 30 августа 2018 года и включенной посредством ссылки в ее полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к системам и способам определения характеристик белковых комплексов.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Моноклональные антитела (mAb) представляют собой развивающуюся терапевтическую область, в настоящее время на рынке представлено более 50 моноклональных антител. Комбинированная терапия более чем одним моноклональным антителом способна улучшить эффективность существующих средств монотерапии. Определенные растворимые вещества, особенно мультимерные вещества с несколькими повторяющимися эпитопами, могут связываться с двумя или более антителами, что приводит к образованию больших комплексов. Получение больших гетерогенных комплексов антител называется «модульным разнообразием». Большие комплексы антител могут быстро устраняться путем фагоцитоза, что приводит к снижению эффективности антитела. Большие белковые комплексы также могут увеличивать иммуногенность mAb.

Белковые комплексы могут варьировать по размеру от нанометровых до видимых частиц, что затрудняет определение их характеристик с помощью одной аналитической методики. Одной из наиболее распространенных методик определения размера частиц от ~1 нм до ~1 мкм является динамическое рассеяние света (DLS). DLS представляет собой аналитическую методику, применяемую для определения профиля распределения белков по размеру, которая подходит для высокопроизводительных задач (Zhоu, M., et al., ChemMedChem, 11:738-756 (2016)). Броуновское движение белков в растворе является причиной рассеяния света, при этом колебания интенсивности рассеянного света зависят от размера частиц. Таким образом можно определить средний радиус и ширину распределения в отношении полидисперсности. Тем не менее, результаты DLS зачастую смещены в сторону более крупных частиц, и для их разделения группы частиц должны отличаться в по меньшей мере три раза. Следовательно, только DLS не достаточно для анализа белковых комплексов.

Для получения более подробной информации, из-за обширного диапазона размеров белковых комплексов, при высокой полидисперсности многих агрегатных образцов необходимы способы на основе разделения. В настоящее время эксклюзионная хроматография (SEC) является наиболее часто применяемой методикой хроматографии для разделения белков (Brusotti, et al., Chromatographia, 81:3-23 (2018)). При SEC

разделение происходит в зависимости от гидродинамического объема или размера молекул. Молекулы меньшего размера удерживаются дольше, потому что они могут диффундировать в поры неподвижной фазы, тогда как молекулы большего размера элюируются первыми, потому что они проходят мимо пор. Тем не менее, недостатками SEC являются ее верхние пределы исключения молекулярной массы, адсорбция образца на неподвижной фазе, сдвиговое разрушение при высоких давлениях и скоростях потока и невозможность разделения аналитов на основе их состава.

Фракционирование в потоке под влиянием поля (FFF) является перспективной альтернативой SEC, если речь идет о разделении больших белков и полимеров с высокой молярной массой. При разделении образцов с помощью FFF используют потоковый способ разделения и фракционирования, при котором аналиты разделяются по лентообразному каналу за счет различий в их коэффициентах диффузии (Fraunhofer, W. and Winter, G., Eur. J. Pharm. Biopharm, 58:369-383 (2004)). FFF дает возможность разделять аналиты в широком диапазоне размеров (от нанометров до микрон). Открытый канал FFF способствует снижению потери образца, дает возможность использовать низкие значения давления и низкие значения скорости касательного движения. Хотя FFF применяют в комбинации с другими молекулярными методиками, такими как рассеяние света, для выявления белковых агрегатов, все еще существует растущая потребность в более полно определять характеристики в отношении гетерогенности и конформации белковых комплексов, в том числе комплексов mAb и растворимых лигандов.

Следовательно, цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способов идентификации продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, которые обладают способностью образовывать большие белковые комплексы.

Другая цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способов выявления и определения характеристик комплексов продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, и растворимых лигандов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предусмотрены способы определения характеристик белковых комплексов в образце. Один вариант осуществления предусматривает способ оценки стехиометрии и распределения по размеру белковых комплексов в образце путем фракционирования образца посредством проточного фракционирования в поперечном поле (A4F) и определения молярной массы, стехиометрии и распределения по размеру белковых комплексов в образце с помощью многоугольного рассеяния лазерного излучения (MALLS). В некоторых вариантах осуществления белковые комплексы содержат антитело или слитый белок, связанный со своим лигандом. Такой лиганд обычно является растворимым лигандом. Лиганд может быть мономерным или мультимерным. В одном варианте осуществления лиганд может представлять собой гомодимер или гетеродимер. В другом варианте осуществления белковые комплексы содержат комплексы антитело:лиганд или комплексы слитый белок:лиганд или состоят из них.

Другим вариантом осуществления предусмотрен способ отбора основного

продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем добавления первого продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, к его мишени или лиганду с получением комплексов белок:лиганд и добавления второго продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, к первым комплексам продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда с получением множества комплексов белок:лиганд. Данный способ предусматривает разделение комплексов белок:лиганд и определение молярной массы, стехиометрии и распределения по размеру комплексов белок лиганд посредством проточного фракционирования в поперечном поле - MALLS. Данный способ также предусматривает отбор продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, который образует меньшее количество больших комплексов белок:лиганд, в качестве основного целевого белкового лекарственного средства. Как правило, продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой растворимый лиганд. Лиганд может быть мономерным или мультимерным. В некоторых вариантах осуществления большие белковые комплексы являются гетерометрическими.

Другим вариантом осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая основной продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, отобранный с помощью описанного выше способа.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые способы можно применять для определения того, будут ли два отдельных антитела, нацеленных на один и тот же лиганд, образовывать большие гетерогенные комплексы.

Еще одним вариантом осуществления предусмотрен способ определения характеристик белковых комплексов, образованных между продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, и растворимыми лигандами, путем получения образца, содержащего продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, и его лиганд, с получением комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда. Данный способ предусматривает фракционирование белковых комплексов лекарственное средство:лиганд и анализ фракционированных белковых комплексов лекарственное средство:лиганд с помощью многоугольного рассеяния лазерного излучения для определения молярной массы и гетерогенности белковых комплексов. В одном варианте осуществления фракционирование общего белка производят посредством проточного фракционирования в поперечном поле. Концентрацию белка определяют в УФ/видимой части спектра.

Различия в конформации белковых комплексов, образованных разными продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, с одним и тем же лигандом, можно определить путем сравнения профиля/времени элюирования комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда, образованных различными продуктами, представляющими собой белковое лекарственное

средство. По различным профилям/значениям времени элюирования комплексов с одинаковой молярной массой видно, что комплексы могут иметь разные конформации или формы. В одном варианте осуществления каждый продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, и один и тот же растворимый лиганд анализируют отдельно для расчета молярной массы для каждого отдельного компонента, при этом молярную массу каждого компонента используют для определения расчетной стехиометрии указанных компонентов в каждом белковом комплексе.

Другим вариантом осуществления предусмотрен способ определения характеристик белковых комплексов, образованных между продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, и растворимыми лигандами, с помощью фракционирования комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда посредством проточного фракционирования в поперечном поле, анализа фракционированных комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда с помощью многоугольного рассеяния лазерного излучения с определением характеристик молярной массы, стехиометрии или обоих комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда и определения гетерогенности белковых комплексов путем сравнения размера каждого белкового комплекса с расчетным размером каждого отдельного компонента для определения компонентов, которые составляют каждый комплекс.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1А представляет собой иллюстрацию комплекса, образованного между одним антителом и одним лигандом. Фигура 1В представляет собой иллюстрацию комплекса, образованного между одним антителом и двумя лигандами. Фигура 1С представляет собой иллюстрацию комплекса, образованного между четырьмя антителами и пятью лигандами, что отображает «ручное проектирование».

Фигуры 2А-2В представляют собой иллюстрацию комплекса, образованного между антителом 1 (черным), двумя лигандами и антителом 2 (серым) в нелинейной конформации. Фигуры 2С-2D представляют собой иллюстрацию комплекса, образованного между антителом 1 (черным), двумя лигандами и антителом 2 (серым) в линейной конформации.

На фигуре 3А представлена хроматограмма, полученная по результатам SEC-MALLS-анализа Ab1, белка X и комбинаций Ab1 и белка X в молярных соотношениях 5:1, 1:1 и 1:5. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 280 нм (ЕОП). Фигура 3В представляет собой фрактограмму результатов анализа посредством проточного фракционирования в поперечном поле - MALLS (A4F-MALLS) комбинаций Ab1 и Ab2 в молярных соотношениях 5:1, 1:1 и 1:5. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль). На правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 4А представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS

основного соединения А (основного А), основного А+белка Y (1:3) и основного соединения В (основного В) + белка Y (1:3). Фигура 4В представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS основного А, основного А+белка Y (1:1) и основного В+белка Y (1:1). Фигура 4С представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS основного А, основного А+белка Y (3:1) и основного В+белка Y (3:1). На оси X представлено время (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигуры 5А и 5В представляют собой линейные графики титра антитела мыши к антителам человека в комплексах антител к белку Y с основным А (фигура 5А) и основным В (фигура 5В). На оси X представлено время (дни), а на оси Y представлена концентрация (мкг/мл).

Фигуры 6А и 6В представляют собой линейные графики, демонстрирующие процент гемолиза эритроцитов кролика с возрастающими концентрациями различных mAb к белку Z (фигура 6А) или комбинаций Ab3 и различных mAb к белку Z (фигура 6В). На оси X представлена концентрация mAb (Log [M]). На оси Y представлен процент гемолиза.

Фигура 7 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS свободного mAb1 к белку Z, белка Z и комбинации 1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z и белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 8 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS свободного mAb, комбинации 1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z и белка Z, комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, mAb5 к белку Z и белка Z, а также комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, mAb7 к белку Z и белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 9 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS комбинации свободного mAb, комбинации 1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z и белка Z, комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, комбинации mAb3 к белку Z и белка Z и комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, комбинации mAb6 к белку Z и белка Z, а также комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb6 к белку Z, mAb7 к белку и белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 10 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS комбинации свободного mAb, комбинации 1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z и белка Z, комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, mAb2 к белку Z и белка Z, а также комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, mAb COMP1 и белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса

(г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 11 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS комбинации свободного mAb, комбинации 1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z и белка Z, комбинации 0,5 мкМ:0,5 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z, mAb4 к белку Z и белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигуры 12А и 12В представляют собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS, или одновременного добавления (фигура 12А), или последовательного добавления (фигура 12В) 0,3 мкМ:1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z:mAb COMP1:белка Z, 1 мкМ:1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z:mAb COMP1:белка Z и 3 мкМ:1 мкМ:1 мкМ mAb1 к белку Z:mAb COMP1:белка Z. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 13 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS типичных mAb, белка W и комбинаций mAb и белка W в соотношениях 1 мкМ:1 мкМ. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 14 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS типичных mAb, белка W и комбинаций mAb2 и белка W, mAb3 и белка W, а также COMP1 и белка W в соотношениях 1 мкМ:1 мкМ. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 15 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS COMP2, белка W и комбинаций COMP2 и белка W в соотношениях 1 мкМ:1 мкМ. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

Фигура 16 представляет собой фрактограмму результатов анализа A4F-MALLS типичных mAb, белка W и комбинаций mAb4 и белка W, а также COMP3 и белка W в соотношениях 1 мкМ:1 мкМ. На оси X представлено время элюирования (минуты). На левой оси Y представлена молярная масса (г/моль), а на правой оси Y представлена оптическая плотность при 215 нм (ЕОП).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено описанными в данном документе композициями и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку таковые могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания определенных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. При этом при практическом осуществлении или апробировании настоящего изобретения можно применять любые композиции, способы и материалы, аналогичные описанным в данном документе или эквивалентные им. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки в ее полном объеме.

Использование терминов в единственном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие и единственное число, и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было индивидуально упомянуто в данном документе.

Использование термина «приблизительно» предназначено для описания значений либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно $\pm 10\%$; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно $\pm 5\%$; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно $\pm 2\%$; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно $\pm 1\%$. Предполагается, что предыдущие диапазоны будут понятны из контекста, и каких-либо дополнительных ограничений не предполагается. Все описанные в данном документе способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любых видов примеров или иллюстративных фраз (например, «такой как»), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для того, чтобы лучше проиллюстрировать настоящее изобретение, а не для формулирования ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакая фраза в настоящем описании не должна толковаться как указание, что какой-либо незаявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

«Белок» относится к молекуле, содержащей два или больше аминокислотных остатка, связанных друг с другом посредством пептидной связи. Белок включает полипептиды и пептиды и может также включать продукты модификаций, таких как гликозилирование, липидное присоединение, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксिलирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая

лекарственные средства на основе белков, и белки включают, помимо прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и, как правило, вводятся в клетку с помощью методик генной инженерии (например, таких как посредством последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, последовательности без интронов и т. д.), причем в клетке генетический материал может находиться в виде эписомы или может быть интегрирован в геном клетки.

«Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, содержащей четыре полипептидные цепи, - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL 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 отсылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии данного антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различным эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в патенте США № 8586713, который включен в настоящую заявку посредством ссылки.

«Слитые белки, содержащие фрагмент Fc» включают часть белка или все из двух или более белков, которые в иных случаях не найдены в природе вместе, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая Fc-домен), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins», в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, стр. 10.19.1-10.19.11, 1992. «Рецепторные Fc-слитые белки» включают в себя один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следует CH2- и CH3-домены иммуноглобулина. В некоторых

вариантах осуществления Fc-слитый белок включает в себя две или более различных рецепторных цепи, которые связываются с одним или более лигандом(-ами). Например, Fc-слитый белок представляет собой белок Trap, такой как, например, IL-1 Trap или VEGF Trap.

Используемый в данном документе термин «растворимый лиганд» относится к полярным или заряженным лигандам, которые не могут легко пересекать плазматическую мембрану клетки. Большинство растворимых лигандов связываются с внеклеточными доменами рецепторов на клеточной поверхности.

«A4F» представляет собой проточное фракционирование в поперечном поле, представляющее собой методику фракционирования, в которой разделение аналитов осуществляют за счет взаимодействия образца с внешним перпендикулярным физическим полем.

Термин «многоугловое рассеяние света» (MALS) описывает методику измерения света, рассеянного образцом на множество углов. Ее применяют для определения как абсолютной молярной массы, так и среднего размера молекул в растворе путем выявления того, как они рассеивают свет. Чаще всего применяют направленное световое излучение от источника лазерного излучения, и в данном случае методику можно назвать многоугловым рассеянием лазерного излучения (MALLS). На практике термины MALS и MALLS используются взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин «броуновское движение» относится к непрерывному движению суспендированных в жидкости частиц.

II. Способы определения характеристик белковых комплексов

Комбинированная терапия моноклональными антителами стала перспективной терапевтической стратегией для лечения таких заболеваний, как рак и воспалительные состояния, в которых вовлечено множество сигнальных путей. Кроме того, в случае если одна только монотерапия не полностью подавляет этот путь, - введение более чем одного моноклонального антитела, нацеленного на один и тот же путь, могло бы быть полезным для полного блокирования путей, вовлеченных в патогенез заболеваний. Тем не менее, связывание терапевтических mAb с растворимыми мультимерными целями может приводить к образованию больших гетерогенных комплексов. Помимо других факторов, на иммуногенность и время выведения антител могут влиять размер, форма и конформация белкового комплекса. Анализ белковых комплексов важен для получения представления о фармакокинетике mAb во время разработки лекарственных средств.

Поэтому предусмотрены способы и системы для определения характеристик белковых комплексов. Одним вариантом осуществления предусмотрен способ оценки стехиометрии и распределения по размеру гетерогенных комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда в образце путем фракционирования образца посредством проточного фракционирования в поперечном поле и определения молярной массы, стехиометрии и распределения по размеру гетерогенных белковых комплексов в образце с помощью многоуглового рассеяния

лазерного излучения. Как правило, белковые комплексы состоят из белка, который специфически связывается с представляющим интерес белком, также называемым мишенью или лигандом. В одном варианте осуществления белок, который специфически связывается с целью, представляет собой антитело или слитый белок.

В случае если антитело или слитый белок объединяются с их мишенью или лигандом *in vivo* или *in vitro* - может образовываться гетерогенная смесь антитело:лиганд или слитый белок:лиганд. В одном варианте осуществления связывание терапевтических белков, таких как моноклональные антитела (mAb) или слитые белки, с растворимыми мультимерными мишенями приводит к образованию больших гетерогенных комплексов или больших гетеромерных комплексов. Например, большие белковые комплексы можно охарактеризовать как белковые комплексы, характеризующиеся соотношением белок:лиганд, выбранным из группы, состоящей из 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или [2:2]_n. Большие гетерогенные комплексы относятся к комплексам, образованным между несколькими мультимерными молекулами лигандов и несколькими молекулами продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Термин «большой гетеромерный комплекс» относится к лиганду, связываемому двумя разными продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, например, двумя разными антителами, двумя разными слитыми белками или антителом и слитым белком, которые связываются с одним и тем же лигандом, но в разных участках.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ идентификации продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, которые образуют большие гетерогенные комплексы с растворимыми мишенями *in vivo*, *in vitro* или в как *in vivo*, так и *in vitro*. Данный способ предусматривает получение образца, содержащего продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, и его растворимый лиганд, с получением комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда, фракционирование образца для разделения комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда и анализ фракционированных комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда с помощью многоугольного рассеяния лазерного излучения для определения размера и гетерогенности белковых комплексов. В одном варианте осуществления образец белка фракционируют посредством проточного фракционирования в поперечном поле.

Ниже представлены дополнительные подробности раскрытых способов и систем.

А. Системы для определения характеристик белковых комплексов

В одном варианте осуществления система включает в себя систему проточного фракционирования в поперечном поле (A4F) и систему многоугольного рассеяния лазерного излучения (MALLS). Примером коммерчески доступной системы A4F является система для разделения Eclipse™ 3+ A4F. Примером коммерчески доступной системы MALLS является прибор для измерения рассеяния лазерного излучения HELEOS® II от Wyatt Technology Dawn. Система обычно включает в себя детектор в УФ/видимой части

спектра и/или рефрактометрический детектор. Иллюстративным коммерчески доступным детектором в УФ/видимой части спектра является УФ-детектор Agilent 1260 Infinity. Иллюстративным коммерчески доступным рефрактометрическим детектором является рефрактометрический детектор Optilab® T-гEX. В одном варианте осуществления система A4F включает короткий канал для A4F, оснащенный разделителем 350W и гидрофильной мембраной NADIR® из PES (PESH) с MWCO 4 кДа. В другом варианте осуществления короткий канал для A4F оснащен спейсером 490W и мембраной Nadir® из регенерированной целлюлозы с MWCO 10 кДа. Иллюстративные подвижные фазы включают 10 mM фосфат и 500 mM NaCl при pH 7,0. Тем не менее, преимущество разделения на A4F по сравнению с разделением колоночной хроматографией заключается в том, что нет никаких ограничений в отношении типа подвижной фазы или жидкости-носителя, которые можно было бы использовать. В одном варианте осуществления образцы разделяют с помощью линейного градиента на протяжении 60 минут. В одном варианте осуществления программа для контроля потока и поперечных потоков в канале специально оптимизирована для достижения требуемого разрешения в каждом конкретном случае. Необходимо понимать, что специалист в данной области сможет изменить и оптимизировать профиль элюирования в соответствии с разрешением, необходимым для конкретного образца, разделяемого с помощью A4F.

Как правило, образец вводят во входное отверстие для образцов канала для A4F. Затем образец фокусируют, давая возможность жидкости-носителю протекать в канал как из входного, так и из выходного отверстий, встречаясь в определенной точке канала, как правило, рядом с входным отверстием для образцов, с образованием зоны фокусировки. Во время периода фокусировки частицы из введенного образца удерживаются в этой зоне фокусировки, что делает возможной релаксацию перед фракционированием. На заключительной стадии происходит фракционирование частиц. По мере продвижения частиц по каналу перпендикулярное разделительное поле поперечного потока толкает молекулы по направлению к дну канала. По мере их накопления у дна канала они подвергаются действию встречной диффузии обратно в канал против поля поперечного потока. Степень, до которой молекулы могут диффундировать обратно в канал, определяется их естественным броуновским движением, характеристикой, определяемой коэффициентом поступательной диффузии, который, в свою очередь, связан с размером и формой, которые являются уникальными для каждой отдельной частицы. Обычно частицы меньшего размера имеют более высокий коэффициент диффузии, чем частицы большего размера, и могут диффундировать в канал выше, проходя через поле поперечного потока. Скорость ламинарного потока в канале неоднородна. Он движется по параболической траектории, при этом скорость потока увеличивается по направлению к центру канала и уменьшается по направлению к верхней и нижней стенкам канала. Следовательно, скорость, с которой будут проноситься частицы, будет зависеть от их положения в канале. Частицы с более высокой диффузией, расположенные вблизи центра канала, будут перемещаться с большей скоростью. Частицы большего размера в мелком,

медленно движущемся потоке вблизи нижней стенки накопителя канала перемещаются с более низкой скоростью потока и элюируются позже, чем частицы меньшего размера. Это приводит к аккуратному разделению частиц по их массе с порядком элюирования от наименьших к самым большим.

По мере протекания образца через канал для A4F ведущая часть образца выходит из канала через выпускное отверстие. Детектор многоуглового рассеяния лазерного излучения (MALLS) сообщается по текучей среде с системой для A4F и принимает образец из выходного отверстия для A4F. В некоторых вариантах осуществления образец сначала проходит через детектор в УФ/видимой части спектра для измерения концентрации образца в зависимости от оптической плотности. Система MALLS фокусирует луч поляризованного света (или лазер) на молекулу образца, и рассеянный свет выявляют с помощью фотодетектора.

С помощью многоуглового рассеяния света (MALS) измеряют свет, рассеиваемый образцом, содержащим молекулы, частицы или белковые комплексы. Это рассеяние зависит от оптической конфигурации установки, и при типичной реализации на опыте свет затем выявляют под одним или несколькими разными углами. В случае решения с одним углом рассеяния тремя наиболее популярными схемами являются 90 градусов (также называемое прямоугольным рассеянием света или RALS), 7 градусов (также называемое малоугловым рассеянием света или LALS) или 173 градуса (также называемое неинвазивным обратным рассеянием или NIBS). В случае многоугловой установки, в принципе, есть такие, у которых углы являются фиксированными (такие чаще всего называют установкой MALS или MALLS), и такие, у которых углы являются изменяемыми (такие обычно называют гониометром или спектрометром рассеяния света). MALS обычно относится к системе с несколькими фиксированными углами, которую используют как часть установки для разделения частиц, например A4F. Наиболее распространенное применение MALS представлено в качестве детектора абсолютной молярной массы в сочетании с детектором концентрации (по типу RI или одноволнового УФ-излучения).

MALS можно применять для измерения следующего: M_w - средневзвешенная молярная масса белкового комплекса; R_g - средний радиус белкового комплекса и A_2 - растворимость белка в растворе.

В. Способы определения характеристик белковых комплексов

Раскрытые системы и способы можно применять для определения характеристик белковых комплексов, например, комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда в образце. Одним вариантом осуществления предусмотрен способ оценки стехиометрии и распределения по размеру гетерогенных белковых комплексов в образце путем фракционирования образца посредством проточного фракционирования в поперечном поле (A4F) и определения молярной массы, стехиометрии и распределения по размеру белковых комплексов в образце с помощью многоуглового рассеяния лазерного излучения (MALLS), причем комплексы содержат

комплексы антитело:лиганд или комплексы слитый белок:лиганд или состоят из них. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой растворимый лиганд. Как правило, антитело представляет собой моноклональное антитело. В одном варианте осуществления белковый комплекс характеризуется соотношением его антитела или слитого белка и лиганда. В неограничивающем примере соотношение антитела или слитого белка и лиганда может быть выбрано из группы, состоящей из 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, 2:2, 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или $[2:2]_n$. Следует понимать, что соотношение антитела или слитого белка и лиганда будет зависеть от конкретных тестируемых антитела или слитого белка и лиганда.

1. Смеси белковых комплексов

Для определения характеристик белковых комплексов молярную массу можно определять экспериментально для каждого компонента комплекса для расчета ожидаемой молярной массы комплексов с различными значениями стехиометрии. В одном варианте осуществления каждый белок и лиганд в смеси анализируют отдельно для определения молярной массы для каждого компонента. В одном варианте осуществления продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, и его лиганд смешивают с получением комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда, а затем определяют характеристики этих комплексов. Фракционированные комплексы продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда подвергают A4F-MALLS для определения молярной массы комплексов. Расчетные значения фракционированных комплексов затем сравнивают с экспериментально определенными молярными массами отдельных компонентов для определения вероятного стехиометрического соотношения отдельных компонентов, присутствующих в каждом комплексе. В одном варианте осуществления способы дают возможность выявлять 1:1 комплекс продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда. В другом варианте осуществления способы дают возможность выявлять любое соотношение продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда. В неограничивающем примере способы дают возможность выявлять комплекс продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда с соотношением 1:0, 0:1, 2:1, 1:2, 2:2, 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или $[2:2]_n$. Следует понимать, что соотношение антитела или слитого белка и лиганда будет зависеть от конкретных тестируемых антитела или слитого белка и лиганда. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит несколько различных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, образующих комплекс с общим растворимым лигандом.

а. Лиганды

Лиганд в комплексе продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда может являться мономерным или мультимерным лигандом. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой растворимый лиганд. В некоторых вариантах осуществления растворимые лиганды соответствуют внеклеточным частям

трансмембранных белков, включая без ограничения трансмембранные рецепторные белки.

Мономерные лиганды содержат лишь один белок или одну белковую единицу. Мультимерные лиганды могут быть, например, димерными, тримерными и т. д., содержащими несколько белков или белковых субъединиц. Например, лиганды могут быть гомодимерами или гетеродимерами. В некоторых вариантах осуществления мультимерные лиганды связываются с более чем одной молекулой продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. На фигуре 1А показан иллюстративный 1:1 комплекс антитело:лиганд. На фигуре 1В показан иллюстративный 1:2 комплекс антитело:лиганд, а на фигуре 1С показан пример эффекта «ручное проектирование», при котором каждое плечо внутреннего антитела связывается с разным лигандом, создавая большой гетерогенный комплекс.

В одном варианте осуществления большой гетерогенный комплекс продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда имеет размер 500 кДа или больше. В другом варианте осуществления гетерогенный комплекс продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда имеет размер 500-4000 кДа. В другом варианте осуществления большой гетерогенный комплекс продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда характеризуется соотношением продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство и лиганда, составляющим 3:2, 2:3, 4:4 или 6:6.

В одном варианте осуществления раскрытые способы применяют для определения того, будет ли основной продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, предназначенный для целенаправленного воздействия на мультимерный лиганд, образовывать большие гетерогенные комплексы продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда.

В одном варианте осуществления раскрытые способы можно применять для определения того, будет ли мультимерный лиганд образовывать комплексы с более чем одним продуктом, представляющим собой белковое лекарственное средство, или слитым белком. Комплексы, которые могут быть образованы, характеризуются без ограничения соотношениями белок:лиганд 1:0, 0:1, 2:1, 1:2, 2:2, 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или $[2:2]_n$. На фигурах 1А-1С показаны иллюстративные комплексы, которые могут быть образованы между мультимерным лигандом и моноклональным антителом.

в. Комбинация нескольких mAb

Все большую популярность набирает комбинированная терапия с использованием нескольких продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, для целенаправленного воздействия на один и тот же путь или один и тот же лиганд. В некоторых вариантах осуществления раскрытые способы можно применять для дифференцировки различных комбинаций антител, целенаправленно воздействующих на один и тот же лиганд, исходя из стехиометрии и распределений по размеру белковых комплексов, образованных продуктами, представляющими собой белковое лекарственное

средство. При смешивании двух продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, вместе с мономерным лигандом продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство, способны к образованию гетеромерного комплекса. Гетеромерный комплекс, как определению в данном документе, относится к двум различным продуктам, представляющим собой белковое лекарственное средство, связывающим такую же целевую молекулу. Кроме того, каждое из двух плечей одного и того же антитела обладает способностью связывать два лиганда, которые также могут быть связаны вторым антителом с образованием гетеромерного комплекса. На фигурах 2A-2D показаны типичные гетеромерные комплексы. На фигурах 2A и 2C показаны комплексы, образованные при связывании одного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство (черным), или антитела с двумя лигандами, и при этом один из лигандов также связывается вторым уникальным продуктом, представляющим собой белковое лекарственное средство (серым). Если серый белок связан с другим лигандом, который затем связывается с черным белком, - могут образовываться гетерогенные комплексы большего размера, как представлено на фигурах 2B и 2D.

2. Отбор основного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство

Другим вариантом осуществления предусмотрен способ отбора основного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем добавления первого продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, к первому образцу, содержащему мишень первого продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением гетерогенных комплексов белок:лиганд и добавления второго продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, ко второму образцу, содержащему мишень, с образованием комплексов белок:лиганд. Способ предусматривает разделение гетерогенных комплексов белок:лиганд и определение распределения по размеру и стехиометрии гетерогенных комплексов белок:лиганд посредством проточного фракционирования в поперечном поле - многоугольного рассеяния лазерного излучения. Способы также предусматривают отбор продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, который образует меньшее количество гетерогенных комплексов белок:лиганд, в качестве основного целевого белкового лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой растворимый лиганд. Растворимый лиганд может представлять собой мономерный лиганд или мультимерный лиганд. Как правило, продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. Белковый комплекс можно охарактеризовать как белковый комплекс с соотношением антитела или слитого белка к лиганду, которое выбрано из группы, состоящей из без ограничения 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, 2:2, 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или [2:2]_n. Другим вариантом осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая основной продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, отобранный с

помощью представленного выше способа.

3. Определение размера и формы белковых комплексов

В одном варианте осуществления раскрытые способы можно применять для определения размера белковых комплексов. Смесь продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, и необязательно растворимых лигандов разделяют с помощью фракционирования A4F. Затем с помощью анализа MALLS могут быть определены размер и стехиометрия белковых комплексов. При анализе MALLS луч поляризованного света (или лазер) фокусируют на молекулу образца и рассеянный свет выявляют с помощью фотодетектора. Рассеянный свет одновременно выявляют под разными углами. Интенсивность рассеянного света под каждым углом пропорциональна молярной массе комплекса. В одном варианте осуществления для определения концентрации каждого белкового комплекса применяют спектрометрию в УФ/видимой части спектра.

В другом варианте осуществления форму/конформацию белкового комплекса, образованного между различными продуктами, представляющими собой белковое лекарственное средство, и общим лигандом, можно дифференцировать с помощью раскрытых способов. Различия во времени элюирования или профиле элюирования между комплексами с одинаковой молярной массой свидетельствуют о различии в форме или конформации белковых комплексов. Комплексы с одинаковой или схожей молярной массой, но с разным временем элюирования, указывают на то, что комплекс с более медленным временем элюирования имеет увеличенный гидродинамический объем из-за различия в форме или конформации комплекса.

Гетерогенность молярной массы и размера у белковых комплексов можно использовать для прогнозирования клиренса продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления, чем крупнее белковый комплекс, тем быстрее продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, выводится из организма.

С. Белки в белковых комплексах

В одном варианте осуществления один из белков в белковом комплексе является продуктом, представляющим собой белковое лекарственное средство, или является представляющим интерес белком, подходящим для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, белок в белковых комплексах может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Белки в этих комплексах могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант или любой белковый продукт, подлежащий

очистке и стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления белок в белковых комплексах представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, двухспецифическую четырехвалентную молекулу, подобную иммуноглобулину G, называемую иммуноглобулином с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело содержит химерный шарнир. В еще одних вариантах осуществления антитело содержит химерную Fc. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к рецептору запрограммированной гибели клетки 1 (например, антитела к PD1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду-1 запрограммированной гибели клетки (например, антитело к PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела к Dll4, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитело к ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, антитело к AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитело к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитело к PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела к компоненту системы комплемента 5 (например, антитело к C5, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитело к EGFR, как описано в патенте США № 9132192, или антитело к EGFRvIII, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитело к пропротеинконвертазе субтилизин/кексин-9 (например, антитело к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела к фактору-8 роста и дифференцировки (например, антитело к GDF8, также известное как антитело к миостатину, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитело к GCGR, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитело к IL4R, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или патентах США

№№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитело к IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитело к IL33, как описано в патентах США №№ 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитело к RSV, как описано в публикации заявки на патент США № 9447173), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитело к CD3, как описано в патентах США №№ 9447173 и 9447173 и в заявке на патент США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитело к CD20, как описано в патентах США № 9657102 и US20150266966A1 и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитело к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело к MERS, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитело к LAG3 или антитело к CD223), антитела к фактору роста нервной ткани (например, антитело к NGF, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к белку Y. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 и к CD20 (как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела к CD3 и к муцину-16 (например, биспецифического антитела к CD3 и к Muc16) и биспецифического антитела к CD3 и к простат-специфическому мембранному антигену (например, биспецифическое антитело к CD3 и к PSMA). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адотрастуумаба, алемтуумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевациумаба, безлтоксумаба, блинатумаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капроумаба пендетиды, цертолизумаба пегола, цемиплиумаба, цетуксимаба, деносуумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотуумаба, эмицизумаб-kxwh, эмтанзина алирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голиумаба, гуселькумаба, ибритумаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-дидиба, ипилиумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутуумаба, окрелизумаба, офатумаба, оларатуумаба, омализумаба, панитумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуциумаба, ранибизумаба, раксикакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастуумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления белок в комплексах представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют СН2- и СН3-домены IgG. В некоторых вариантах осуществления рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепи, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, IL-1 Trap (например, рилонацепт, который содержит область, связывающую лиганд IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc-фрагментом hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в данный документ посредством ссылки) или VEGF Trap (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, которые содержат Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc-фрагментом hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой слитый белок ScFv-Fc, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающего(-их) домена(-ов), таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи антитела, соединенного с Fc-фрагментом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Анализ A4F, по сравнению с фракционированием SEC, обеспечивает превосходное разрешение для образцов, содержащих большие гетерогенные комплексы.

Способы

Буфер для подвижной фазы для SEC-MALLS

Для анализа SEC-MALLS композиция буфера для подвижной фазы для SEC представляла собой 10 mM фосфата натрия, 500 mM хлорида натрия, pH 7,0, и профильтрованная (через 0,2 мкм фильтр) перед применением.

Анализ SEC-MALLS

Система для SEC-MALLS состояла из колонки Superose 6 GL (10 мм x 300 мм; GE Healthcare, кат. № 17-5172-01), соединенной с системой для HPLC Agilent 1200 Series, оснащенной детектором на диодной матрице, работающим в ультрафиолетовом (UV) спектре, прибора для измерения рассеивания лазерного излучения (LS) miniDawn TREOS® от Wyatt Technology и детектора дифференциального рефрактометра (RI) Optilab® T-rEX. Детекторы были подключены последовательно в следующем порядке: UV-LS-RI. Детекторы LS и RI калибровали в соответствии с инструкциями, предоставленными компанией Wyatt Technology.

Каждые определенные количества mAb к белку X объединяли с рекомбинантным белком X и разбавляли в 1X DPBS, pH 7,4, с получением следующих молярных соотношений: 5 мкМ mAb к белку X : 1 мкМ белка X, 1 мкМ mAb к белку X : 1 мкМ белка X и 1 мкМ mAb к белку X : 5 мкМ белка X. Все образцы инкубировали при температуре

окружающей среды в течение 2 часов и до введения в колонку хранили в нефилтрованном состоянии при 4°C. Перед введением каждого образца колонку предварительно уравнивали буфером для подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1) при скорости потока 0,3 мл/мин. Отдельно вводили бычий сывороточный альбумин (BSA; 2 мг/мл; навеска образца 150 мкг) и включали его в качестве контроля пригодности системы.

На протяжении всего фракционирования использовали буфер для подвижной фазы для SEC-MALLS (10 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Вводили каждый образец (100~200 мкг) и подвергали его элюированию со скоростью потока 0,3 мл/мин. BSA фракционировали с использованием тех же параметров.

Буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS

Для анализа SEC-MALLS композиция буфера для подвижной фазы для SEC представляла собой 10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0, и профильтрованная (через 0,2 мкм фильтр) перед применением.

A4F-MALLS

Система для A4F-MALLS состояла из системы для разделения Eclipse™ 3+ A4F, соединенной с системой для HPLC Agilent 1200 Series, оснащенной детектором на диодной матрице, работающим в ультрафиолетовом (UV) спектре, прибора для измерения рассеивания лазерного излучения (LS) Dawn HELEOS® II от Wyatt Technology и детектора дифференциального рефрактометра (RI) Optilab® T-rEX. Детекторы были подключены последовательно в следующем порядке: UV-LS-RI. Детекторы LS и RI калибровали в соответствии с инструкциями, предоставленными компанией Wyatt Technology.

Каждые определенные количества mAb к белку X объединяли с рекомбинантным белком X и разбавляли в 1X DPBS, pH 7,4, с получением следующих молярных соотношений: 5 мкМ mAb к белку X : 1 мкМ белка X, 1 мкМ mAb к белку X : 1 мкМ белка X и 1 мкМ mAb к белку X : 5 мкМ белка X. Все образцы инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 часов и хранили в нефилтрованном виде при 4°C до введения в короткий канал Eclipse™, снабженный разделительной фольгой W350 (толщина разделителя 350 мкм, ширина разделителя 2,2 см) и с использованием мембраны Nadir из регенерированной целлюлозы с MWCO 10 кДа. Перед введением каждого образца канал предварительно уравнивали буфером для подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Отдельно вводили бычий сывороточный альбумин (BSA; 2 мг/мл; навеска образца 10 мкг) и включали его в качестве контроля пригодности системы.

Способ фракционирования состоял из четырех стадий: введения, фокусировки, элюирования и стадии «отмывки» канала. На протяжении всего фракционирования использовали буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS (10 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Каждый образец (7 мкг) вводили со скоростью 0,2 мл/мин. в течение 1 мин., а затем фокусировали в течение 2 мин. со скоростью потока в

фокусе 1,5 мл/мин. Образец элюировали при скорости потока в канале 1,0 мл/мин. с линейным градиентом поперечного потока от 3,0 мл/мин. до 0 мл/мин. в течение 45 минут. В конце поперечный поток удерживали на уровне 0 мл/мин. в течение дополнительных 5 мин. для отмывки канала. BSA фракционировали с использованием тех же параметров.

Анализ данных MALLS

Данные анализировали с помощью программного обеспечения ASTRA V (версии 5.3.4.14 от Wyatt Technology). Данные переводили в уравнение, которое связывало избыточное рассеянное световое излучение с концентрацией растворенного вещества и средневзвешенной молярной массой M_w (Wyatt, 1993; Kendrick, 2001).

$$\text{Уравнение 1: } \frac{K^*c}{R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c,$$

где c обозначает концентрацию растворенного вещества, $R(\theta, c)$ обозначает коэффициент Рэлея избытка растворенного вещества в зависимости от угла рассеяния и концентрации, M_w обозначает молярную массу, $P(\theta)$ описывает угловую зависимость рассеянного светового излучения (~ 1 для частиц с радиусом вращения < 50 нм), A_2 обозначает второй вириальный коэффициент в разложении на множители осмотического давления (которым можно пренебречь, поскольку измерения проводили на разбавленных растворах) и

$$\text{уравнение 2: } K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2,$$

где n_0 обозначает показатель преломления растворителя, N_A означает число Авогадро, λ_0 означает длину волны падающего светового излучения в вакууме и dn/dc означает удельное приращение показателя преломления для растворенного вещества.

Молярная масса мономера BSA служила для оценки калибровочных констант детекторов рассеяния светового излучения и дифференциального показателя преломления во время сбора данных (проверка пригодности системы). Относительное стандартное отклонение (% RSD) от средней молярной массы BSA, определенное с помощью детекторов UV и RI, составляло $\leq 5,0\%$.

Коэффициенты нормализации для детекторов рассеяния светового излучения, объема задержки между детекторами и условий размывания зоны рассчитывали, исходя из хроматограмм BSA, полученных для используемых условий A4F-MALLS. Эти значения применяли в отношении файлов с данными, собранными для всех остальных образцов, для корректировки этих условий.

Значение dn/dc и коэффициент экстинкции при 215 нм или 280 нм (скорректированный на гликозилирование) определяли экспериментально с использованием анализа белковых конъюгатов, реализация которого представлена в программном обеспечении Astra. Скорректированный коэффициент экстинкции и значение dn/dc использовали для анализа всех образцов комплексов белок-белок.

Результаты

Из результатов SEC-MALLS-анализа образцов было видно плохое разрешение комплексов более высокого порядка (объем элюирования=8-14 мл) и невозможность дифференцировки промежуточных комплексов (фигура 3А, таблица 1). Напротив, из результатов A4F-MALLS-анализа образцов было видно превосходное разрешение комплексов более высокого порядка (время элюирования=11-30 мин.) и явная дифференцировка промежуточных комплексов (фигура 3В, таблица 2).

Таблица 1. Примерная молярная масса и удерживаемый объем для комплексов mAb:белок X

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4	
		Комплексы более высокого порядка		[Интактное антитело] ₂ : [Белок X] ₁ Комплекс		[Интактное антитело] ₁ : [Белок X] ₁ Комплекс		[Интактное антитело] ₁ : [Белок X] ₂ Комплекс	
		EV, мин.	M _w , кДа	EV, мин.	M _w , кДа	EV, мин.	M _w , кДа	EV, мин.	M _w , кДа
mAb1:белок X	5:1	9,0-12,6	~390-1000	13,1	331	NA	NA	NA	NA
mAb1:белок X	1:1	8,0-13,4	~400-3000	NA	NA	15,4	167	NA	NA
mAb1:белок X	1:5	8,5-13,8	~430-2000	NA	NA	NA	NA	16,0	216

EV: объем элюирования; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных; мин.: минуты; кДа: килодальтон;

Таблица 2. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок X

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4		Пик 5	
		[Интактное антитело] ₁ : [Белок X] ₁₋₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₂ : [Белок X] ₁ Комплекс		[Интактное антитело] ₃ : [Белок X] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₄ : [Белок X] ₃ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
mAb1:белок X	5:1	NA	NA	10,8	321	12,4	498	13,7	674	14,6	830-1190
mAb1:белок X	1:1	NA	NA	10,7	333	12,5	515	13,7	671	14,6	780-1620

mAb1:бело к X	1:5	9,4	191	NA	NA	11,8	461	13,3	600	14,4	720- 118 0
------------------	-----	-----	-----	----	----	------	-----	------	-----	------	------------------

R_t: время удержания; **M_w:** средневзвешенная молярная масса; **NA:** нет данных; **мин.:** минуты; **кДа:** килодальтон;

Пример 2: Комплексы с антителами к белку Y.

Способы

Буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS

1X DPBS, pH 7,4, получали путем разбавления 500 мл 10X DPBS водой степени чистоты для HPLC до общего объема 4,9 л. В качестве противомикробного средства добавляли раствор 0,0025% (вес/об.) азида натрия. Медленно добавляли соляную кислоту (12 М) с небольшими приращениями по объему для доведения pH до 7,4 перед доведением конечного объема до 5,0 л. Конечное измеренное значение pH буфера составляло 7,4. Получали свежий буферный раствор и фильтровали его (через 0,2 мкм фильтр) перед использованием.

Анализ A4F-MALLS

Каждое из определенных количеств mAb к белку Y (основное A и основное B) объединяли с рекомбинантным человеческим белком Y и разбавляли в 1X DPBS, pH 7,4, с получением следующих молярных соотношений: 1 мкМ mAb и белка Y : 3 мкМ hActA, 1 мкМ mAb и белка Y : 1 мкМ белка Y и 3 мкМ mAb и белка Y : 1 мкМ белка Y. Все образцы инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 часов и хранили в нефилтрованном виде при 4°C до введения в короткий канал Eclipse™, снабженный разделительной фольгой W490 (толщина разделителя 490 мкм, ширина разделителя 2,2 см) и с использованием мембраны Nadir из регенерированной целлюлозы с MWCO 10 кДа. Перед введением каждого образца канал предварительно уравнивали 1X DPBS буфером, pH 7,4. Отдельно вводили бычий сывороточный альбумин (BSA; 2 мг/мл; навеска образца 10 мкг) и включали его в качестве контроля пригодности системы.

Способ фракционирования состоял из четырех стадий: введения, фокусировки, элюирования и стадии «отмывки» канала. На протяжении всего фракционирования использовали буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS (1X DPBS, pH 7,4). Каждый образец (10 мкг) вводили со скоростью 0,2 мл/мин. в течение 1 мин., а затем фокусировали в течение 2 мин. со скоростью потока в фокусе 1,5 мл/мин. Образец элюировали при скорости потока в канале 1,0 мл/мин. с линейным градиентом поперечного потока от 1,2 мл/мин. до 0 мл/мин. в течение 20 минут. Наконец, поперечный поток удерживали на уровне 0 мл/мин. в течение дополнительных 5 мин. для отмывки канала. BSA фракционировали с использованием тех же параметров.

Титр мышинных антител к человеческим антителам

Титры мышинных антител к человеческим антителам (МАНА) определяли с помощью сэндвич-метода ELISA, специфичного для выявления мышинового IgG к mAb A или mAb B. Вкратце: mAb A или mAb B в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) пассивно адсорбировали на микротитровальном планшете в

течение ночи при 4°C с последующей блокировкой неспецифического связывания посредством 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Серийные разбавления образцов сыворотки получали в буфере для разбавления (0,5% BSA в PBS), начиная с 1:100. Следовательно, соответствующий фактор разбавления (100) принимали за нижний предел выявления в анализе (LOD). Затем образцы вносили в планшет, покрытый mAb А или mAb В (100 мкл/лунка), и инкубировали 16-18 часов при 4°C. Для определения фонового сигнала в анализ включали лунки с добавлением только буфера для разбавления. Затем захваченные на планшете МАНА, специфические к mAb А или mAb В, выявляли с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела к мышиному Fcγ в количестве 40 нг/мл. Для выявления активности HRP использовали хромогенный субстрат для HRP, т. е. 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB); и полученную оптическую плотность при 450 нм (OD₄₅₀) считывали на многорежимном планшет-ридере Perkin Elmer Victor X4. Данные по сигналу связывания относительно фактора разбавления анализировали методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism и рассчитывали титры. Титр МАНА определяли как рассчитанный фактор разбавления образца сыворотки, соответствующий сигналу связывания, эквивалентному удвоенному фоновому сигналу анализа.

Результаты

Два основных mAb образовывали явно разные комплексы с белком Y. Во всех протестированных условиях mAb основное-А образовывало с белком Y менее гетерогенные комплексы меньшего размера, чем mAb основное-В (фигуры 4А-4С, таблицы 3-5).

Таблица 3. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Y

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3	
		[Интактное антитело] ₁ : [Белок Y] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Y] ₃ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
Основное -А: белок Y	1:3	10,1	216	NA	NA	13,1	~500-1000
Основное -В: белок Y	1:3	10,1	219	12,5	390	14,3	~550-2000

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных; мин.: минуты; кДа: килодальтон;

Таблица 4. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Y

Образец	Молярное соотношение	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4
		[Интактное	[Интактное	[Интактное	Комплексы

	(моль:моль)	антитело] ₂ : [Белок Y] ₁₋₂ Комплекс		антитело] ₂₋₃ : [Белок Y] ₃₋₄ Комплекс		антитело] ₄ : [Белок Y] ₃ Комплекс		более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
Основное- А: белок Y	1:1	11,9	348	13,5	589	NA	NA	16,5	~850- 1400
Основное- В: белок Y	1:1	NA	NA	14,0	449	15,3	636	16,4	~815- 2300

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных;
мин.: минуты; кДа: килодальтон;

Таблица 5. Примерная молярная масса и время удержания для комплексов mAb:белок Y

Образец	Молярное соотношени е (моль:моль)	Пик 1		Пик 2	
		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Y] ₁ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
Основное-А: белок Y	3:1	11,3	265	13,0	~400-900
Основное-В: белок Y	3:1	11,6	307	12,9	~480-1600

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных;
мин.: минуты; кДа: килодальтон;

Размер и гетерогенность комплексов антител к белку Y хорошо коррелировали с РК-результатами наблюдений на мышах (фигура 5А-5В). Комплексы большего размера, наблюдаемые в случае основного-В с белком Y, имели корреляцию с более быстрым клиренсом (фигура 5В).

Пример 3. Комплексы с антителами к человеческому белку Z.

Способы

Получение образцов

Образцы получали в 1X DPBS, pH 7,4, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов перед фракционированием общего белка с помощью A4F-MALLS. Были задействованы следующие образцы:

1 mM mAb1 к белку Z+вторичное mAb (0,5 мкМ+0,5 мкМ) + 1 мкМ дополнительного белка Z (7 комбинаций) или 1 mM mAb6 к белку Z+mAb7 к белку Z (0,5 мкМ+0,5 мкМ) + 1 мкМ дополнительного белка Z. Перечень вторичных антител можно найти в таблице 6.

Таблица 6. Номенклатура образцов

Тестируемые вторичные mAb	Номенклатура комбинации с mAb1 к белку Z
mAb2 к белку Z	Комбинация с mAb2
mAb3 к белку Z	Комбинация с mAb3
mAb4 к белку Z	Комбинация с mAb4
mAb5 к белку Z	Комбинация с mAb5
mAb6 к белку Z	Комбинация с mAb6
mAb7 к белку Z	Комбинация с mAb7
mAb COMP1	Комбинация с COMP1

Анализ A4F-MALLS

Все образцы инкубировали при температуре окружающей среды в течение всего 2 часов и хранили в нефльтрованном виде при 4°C до введения в короткий канал Eclipse™, снабженный разделительной фольгой W350 (толщина разделителя 350 мкм, ширина разделителя 2,2 см) и с использованием мембраны из гидрофильного PES (PESH) с MWCO 4 кДа. Перед введением каждого образца канал предварительно уравнивали буфером для подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Отдельно вводили BSA (2 мг/мл; навеска образца 10 мкг) и включали его в качестве контроля пригодности системы.

Способ фракционирования состоял из четырех стадий: введения, фокусировки, элюирования и стадии «отмывки» канала. На протяжении всего фракционирования использовали буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Каждый образец (7 мкг комплекса или 4 мкг отдельного компонента) вводили со скоростью 0,2 мл/мин. и фокусировали в течение 5 мин. со скоростью потока в фокусе 1 мл/мин. Образец элюировали при скорости потока в канале 1 мл/мин. с линейным градиентом поперечного потока от 2 мл/мин. до 0 мл/мин. в течение 45 минут. В конце поперечный поток удерживали на уровне 0 мл/мин. в течение дополнительных 5 мин. для отмывки канала. BSA фракционировали с использованием тех же параметров.

Анализ гемолиза RBC

Анализ альтернативных путей (AP) гемолиза использовали в качестве показателя активации комплемента для оценки способности mAb к белку Z блокировать лизис эритроцитов кролика (RbRBC). Основой анализа является лизис эритроцитов кролика с помощью мембраноатакующего комплекса, с помощью которого активацию комплемента измеряют экспериментально.

Требуемое количество RbRBC промывали в буфере GVB-Mg²⁺/EGTA и ресуспендировали при 2×10⁸ клеток/мл. Для тестирования эффективности либо одного mAb к C5, либо комбинации нескольких mAb к C5 нормальную сыворотку человека разбавляли до 50-96% в буфере GVB-Mg²⁺/EGTA для достижения конечной концентрации 25-48% при добавлении к RBC. Для измерения активности гемолиза использовали

круглодонные 96-луночные планшеты. В 96-луночный планшет высевали всего 100 мкл RbRBC (2×10^8 клеток/мл) при 37°C с последующим добавлением 100 мкл разбавленной сыворотки. Клетки аккуратно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30-120 минут. По истечении времени инкубации клетки осаждали центрифугированием при 1250 x g при 4°C. Всего 100 мкл супернатанта переносили на свежий плоскодонный 96-дюймовый планшет и считывали при 412 нм на микропланшетном ридере Spectramax. Расчет процента гемолиза производили так, как описано ниже.

Процент гемолиза рассчитывали по значениям оптической плотности с помощью следующего уравнения:

$$\text{уравнение 3: \%гемолиза} = 100 \times \frac{(\text{экспериментальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}{(\text{максимальный лизис клеток} - \text{фоновый лизис клеток})}.$$

В данном уравнении «фоновый лизис клеток» означает OD на уровне A412 нм от клеток, инкубированных только в буфере GVB-Mg²⁺/EGTA, не содержащем сыворотку. «Максимальный лизис клеток» означает OD на уровне A412 нм от клеток, обработанных водой. Максимальное ингибирование лизиса рассчитывали как разницу между нижним и верхним значениями на кривой, выраженную в процентах от верхнего значения. Данные представлены как среднее значение+стандартная ошибка среднего.

Результаты

mAb1 к белку Z (основное mAb к белку Z) в сочетании с mAb COMP1 или другими mAb к белку Z полностью блокировали гемолиз RBC кролика посредством активации альтернативного пути (фигура 6В, таблица 8) по сравнению со средствами монотерапии, которые не полностью блокировали гемолиз (фигура 6А, таблица 7). Поскольку все комбинации mAb1 к белку Z:mAb к белку Z полностью блокировали гемолиз RBC кролика, то важно было определить, существуют ли различия в образовании комплексов, такие как размер, форма и ориентация, которые могут дать представление о фармакокинетике (РК) mAb во время разработки лекарственных средств, такой как иммуногенность и/или опосредованный мишенью клиренс.

Таблица 7. Эффект антител к белку Z в отношении гемолиза RBC кролика

ID белка	AP, IC50 [M]	AP, IC80 [M]	% максимального ингибирования лизиса
mAb1 к белку Z	8,896e-008	1,970e-007	81,25
mAb2 к белку Z	8,366e-008	1,813e-007	88,66
mAb3 к белку Z	5,252e-008	9,390e-008	59,24
mAb4 к белку Z	4,942e-008	5,963e-008	36,63
mAb5 к белку Z	7,419e-008	1,467e-007	77,83
mAb6 к белку Z	9,346e-008	2,260e-007	62,80
mAb7 к белку Z	7,424e-008	1,414e-007	76,21

mAb COMP1	6,291e-008	1,185e-007	61,14
mAb COMP2	4,568e-008	5,600e-008	88,83

Таблица 8. Эффект комбинаций антител к белку Z в отношении гемолиза RBC кролика

ID белка	AP, IC50 [M]	AP, IC80 [M]	% максимального ингибирования лизиса
mAb1 к белку Z+mAb2 к белку Z	7,182e-008	7,528e-008	97,59
mAb1 к белку Z+mAb3 к белку Z	7,709e-008	8,749e-008	98,11
mAb1 к белку Z+mAb4 к белку Z	9,751e-008	1,064e-007	98,16
mAb1 к белку Z+mAb5 к белку Z	9,571e-008	1,051e-007	98,10
mAb1 к белку Z+mAb6 к белку Z	7,737e-008	8,461e-008	97,29
mAb1 к белку Z+mAb7 к белку Z	8,353e-008	9,432e-008	98,14
mAb1 к белку Z+mAb COMP1	7,372e-008	7,776e-008	98,26
mAb1 к белку Z+mAb COMP2	7,306e-008	8,017e-008	98,07

В отсутствие вторичных mAb, mAb1 к белку Z образовывало канонические 1:1 и 1:2 комплексы с белком Z при смешивании в эквимольных количествах (фигура 7, таблица 9).

Таблица 9. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2	
		[Интактное антитело] ₁ : [Белок Z] ₁ Комплекс		[Интактное антитело] ₁ : [Белок Z] ₂ Комплекс	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
mAb1:белок Z	1:1	13,7	341	15,3	499

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; мин.: минуты; кДа: килодальтон;

Большинство комбинаций вторичных mAb с mAb1 к белку Z благоприятствовало

более образованию хорошо выраженных комплексов меньших размеров, которые соответствовали гетеромерному 2:2 комплексу mAb:белок Z (фигуры 8 и 9 и таблицы 10-12).

Таблица 10. Молярная масса комплекса mAb:белок Z

Комплекс mAb: белок Z	Теоретическая молярная масса (кДа)
1:0	150
0:1	195
1:1	345
2:1	495
1:2	540
2:2	690
3:2	840
2:3	885
4:4	1380
6:6	2070

Таблица 11. Примерная молярная масса и время удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4	
		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Z] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₄ : [Белок Z] ₄ Комплекс		[Интактное антитело] ₆ : [Белок Z] ₆ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
mAb1:mAb5: белок Z	0,5:0,5:1	16,0	684	18,5	1342	20,1	1876	21,5	~2250-3560
mAb1:mAb7: белок Z	0,5:0,5:1	16,1	688	18,5	1327	20,1	1866	21,5	~2380-4250

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; мин.: минуты; кДа: килодальтон.

Таблица 12. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4	
		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Z] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₄ : [Белок Z] ₄ Комплекс		[Интактное антитело] ₆ : [Белок Z] ₆ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа

mAb1:mAb3:белок Z	0,5:0,5:1	16,4	685	18,4	1262	NA	NA	20,2	~1700 -2700
mAb1:mAb6:белок Z	0,5:0,5:1	15,7	686	17,7	1320	19,4	1850	20,6	~2300 -3800
mAb6:mAb7:белок Z	0,5:0,5:1	15,8	688	17,8	1334	19,3	1872	20,6	~2300 -3600

Хотя комбинация mAb1 к белку Z/mAb3 к белку Z образовывала с белком Z комплексы схожего размера, различия во времени/профиле элюирования давали возможность предположить, что образованные комплексы имели различия по форме/ориентации по сравнению с другими комбинациями (фигура 9). Комбинации mAb1 к белку Z с mAb2 к белку Z и mAb COMP1 способствовали образованию с белком Z гетерогенных комплексов большего размера, что свидетельствовало о «модульном разнообразии» (фигура 10, таблица 13).

Таблица 13. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4	
		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Z] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₄ : [Белок Z] ₄ Комплекс		[Интактное антитело] ₆ : [Белок Z] ₆ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
mAb1:mAb2:белок Z	0,5:0,5:1	15,5	665	19,2	1304	21,9	1901	23,6	~2300-4100
mAb1:COMP1:белок Z	0,5:0,5:1	15,4	714	18,8	1346	21,5	2002	24,2	~2500-5000

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; мин.: минуты; кДа: килодальтон.

Комбинация mAb4 к белку Z и mAb1 к белку Z продемонстрировала пониженную тенденцию к образованию гетеромерных комплексов с белком Z (фигура 11, таблица 14). Присутствие свободных mAb и 1:1 частиц mAb:белок Z указывало на неполное образование гетеромерных комплексов с белком Z. Также были заметны смеси гомомерных и гетеромерных комплексов с белком Z.

Таблица 14. Примерная молярная масса и время удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1	Пик 2	Пик 3
		[Интактное антитело] ₂ : [Белок Z] ₂ Комплекс	[Интактное антитело] ₄ : [Белок Z] ₄ Комплекс	Комплексы более высокого порядка

		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
mAb1:mAb4: белок Z	0,5:0,5:1	15,9	650	19,1	1288	20,6	~1700- 2300

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; мин.: минуты; кДа: килодальтоны

Пример 4. Порядок добавления не оказывал значительного влияния на молярную массу и распределение комплексов, образованных между mAb1 к белку Z, mAb COMP1 и белком Z.

Способы

Для определения того, влиял ли порядок добавления на образование комплекса, получали эквимоларные комбинации mAb COMP1 и белка Z в 1X DPBS, pH 7,4, с получением молярного соотношения 1 мкМ mAb COMP1 : 1 мкМ белка Z и оставляли для инкубации при температуре окружающей среды в течение 1 ч. После инкубации добавляли различные количества mAb1 к белку Z к предварительно образованным комплексам mAb COMP1:белок Z и разбавляли их в 1X DPBS, pH 7,4, с получением следующих молярных соотношений: 0,3 мкМ mAb1 к белку Z:1 мкМ mAb COMP1:1 мкМ белка Z, 1 мкМ mAb1 к белку Z:1 мкМ mAb к белку Z:1 мкМ белка Z и 3 мкМ mAb1 к белку Z:1 мкМ mAb COMP1:1 мкМ белка Z, и инкубировали их в течение дополнительного часа до введения в прибор. После этого использовали способы анализа A4F-MALLS из примера 3.

Результаты

Между mAb1 к белку Z, mAb COMP1 и белком Z образовывались схожие по молярной массе и распределению комплексы независимо от того, добавляли ли mAb1 к белку Z одновременно (фигура 12А, таблица 15) или последовательно (фигура 12В, таблица 15) к другим компонентам. Небольшой сдвиг по времени элюирования, наблюдаемый между двумя наборами данных, свидетельствовал о варьировании, присущем данному способу, и не считался необычным.

Таблица 15. Примерная молярная масса и значения времени удержания для комплексов mAb:белок Z

Образец	mAb1: COMP1: белок Z Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4	
		[Интактное антитело] ₁ : [Белок Z] ₁ Комплекс		[Интактное антитело] ₁ : [Белок Z] ₂ Комплекс		[Интактное антитело] ₂₋₃ : [Белок Z] ₂₋₃ Комплекс		Комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
Одновремен ное добавление	3:1:1	NA	NA	14,5	537	16,7	89	18,0	~1200- 1950
	1:1:1	NA	NA	14,6	523	16,7	793	18,6	~1400-

									2300
	0,3:1:1	13,3	344	15,0	541	16,6	750	18,4	~1000-1800
Последовательное добавление	3:1:1	NA	NA	15,6	500	18,0	817	20,0	~1200-1800
	1:1:1	NA	NA	15,7	496	18,0	806	20,0	~1500-2400
	0,3:1:1	14,2	380	16,4	663	17,9	818	19,9	~1500-2600

Пример 5: Комплексы с антителом к белку W

Способы

Буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS

Буфер для подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1) получали путем объединения 1,4 г одноосновного моногидрата фосфата натрия, 10,7 г двухосновного гептагидрата фосфата натрия и 500 мл 5 М хлорида натрия; затем объем раствора доводили до 5,0 л водой со степенью чистоты для HPLC. Конечный измеренный pH буфера составлял 7,0. Перед применением буфер для подвижной фазы фильтровали (через 0,2 мкм фильтр).

Анализ A4F-MALLS

Система для A4F-MALLS состояла из системы для разделения Eclipse™ 3+ A4F, соединенной с системой для HPLC Agilent 1200 Series, оснащенной детектором на диодной матрице, работающим в ультрафиолетовом (UV) спектре, прибора для измерения рассеивания лазерного излучения (LS) Dawn HELEOS® II от Wyatt Technology и детектора дифференциального рефрактометра (RI) Optilab® T-rEX. Детекторы были подключены последовательно в следующем порядке: UV-LS-RI. Детекторы LS и RI калибровали в соответствии с инструкциями, предоставленными компанией Wyatt Technology.

Каждое определенное количество mAb к белку W объединяли с белком W и разбавляли в 1X DPBS, pH 7,4, с получением эквимольного соотношения: 1 мкМ mAb к белку W:1 мкМ белка W. Все образцы инкубировали при температуре окружающей среды в течение 2 часов и хранили в нефилтрованном виде при 4°C до введения в короткий канал Eclipse™, снабженный разделительной фольгой W350 (толщина разделителя 350 мкм, ширина разделителя 2,2 см) и с использованием мембраны из регенерированной целлюлозы с MWCO 10 кДа. Перед введением каждого образца канал предварительно уравнивали буфером для подвижной фазы (10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7,0 ± 0,1). Отдельно вводили бычий сывороточный альбумин (BSA; 2 мг/мл; навеска образца 10 мкг) и включали его в качестве контроля пригодности системы.

Способ фракционирования состоял из четырех стадий: введения, фокусировки,

элюирования и стадии «отмывки» канала. На протяжении всего фракционирования использовали буфер для подвижной фазы для A4F-MALLS (10 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH $7,0 \pm 0,1$). Каждый образец (7 мкг) вводили со скоростью 0,2 мл/мин. в течение 1 мин., а затем фокусировали в течение 3 мин. со скоростью потока в фокусе 1,0 мл/мин. Образец элюировали при скорости потока в канале 1,0 мл/мин. с линейным градиентом поперечного потока от 3,0 мл/мин. до 0 мл/мин. в течение 25 минут. В конце поперечный поток удерживали на уровне 0 мл/мин. в течение дополнительных 5 мин. для отмывки канала. BSA фракционировали с использованием тех же параметров.

Результаты:

A4F-MALLS использовали для оценки относительного распределения размеров комплексов, образованных между белком W, димерным многодоменным лигандом и несколькими антителами к белку W, которые специфически связываются с различными доменами внутри лиганда. Теоретическая молярная масса и прогнозируемая стехиометрия потенциальных комплексов антител с белком W представлены в таблице 16.

Таблица 16. Теоретическая молярная масса комплексов mAb:белок W

mAb:белок W Комплекс	Молярная масса (кДа)
1:0	146
0:1	146
1:1	292
1:2 ¹	438
2:2	584
2:3 ¹	730
3:3	876
3:4 ¹	1022
4:4	1168

¹ Неравные соотношения (например, 1:2 и 2:1) не могут быть дифференцированы, поскольку они будут иметь одинаковую MW.

В целом, из панели различных mAb, mAb1, нацеленное на домен A, образовывало наиболее высокую долю комплексов более низкого порядка, при этом, в случае сочетания в эквимоларных соотношениях, преобладали частицы, представляющие собой дискретный 1:1 и 2:2 комплекс с белком W (пик 2: ~289 кДа и пик 3: ~562 кДа, фигура 13, таблица 17).

Таблица 17. Молярные массы и значения времени удержания комплексов человеческого белка W с mAb1, нацеленным на домен A

Образ	Молярное	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5
-------	----------	-------	-------	-------	-------	-------

ец	соотношение (моль:моль)	Свободное mAb/белок W		[mAb] ₁ : [Белок W] ₁ Комплекс		[mAb] ₂ : [Белок W] ₂ Комплекс		[mAb] ₃ : [Белок W] ₃ Комплекс		Гетеромерные комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин	M _w , кДа	R _t , мин	M _w , кДа	R _t , мин	M _w , кДа	R _t , мин	M _w , кДа	R _t , мин.	M _w , кДа
Белок W	-	9,6	1476	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
mAb1	-	9,5	145	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
mAb1: белок W	1:1	9,3	146	10, 7	289	12,6	562	13,7	824	14,5	~1000- 2000

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных; мин.: минуты; кДа: килодальтон.

Каждое из mAb, нацеленных на домен В (mAb2, mAb3 и COMP1), преимущественно образовывало дискретный 2:2 комплекс с белком W (пик 3: ~563-580 кДа, фигура 14, таблица 18), при этом mAb2 и COMP1 давали наиболее однородное распределение комплексов относительно других протестированных mAb. В то время как COMP2, нацеленное на домен А, преимущественно благоприятствовало образованию смеси 1:2 и 2:2 комплексов с белком W (пик 3: ~550 кДа, фигура 15, таблица 19) также наблюдалась умеренная степень крупных гетерогенных комплексов. Это свидетельствовало о том, что в отличие от mAb1, которое также нацелено на домен А, COMP2 связывалось с уникальным эпитопом на белке W, что давало возможность образовывать расширенные решетки антитело-антиген в процессе, называемом «модульным разнообразием». В этом образце наблюдали отчетливый пик (пик 4) с молярной массой примерно 835 кДа, за которым следовала серия частиц, дававших широкий пик с низким разрешением (пик 5) с широким распределением молярной массы в диапазоне ~1000-1900 кДа (фигура 15, таблица 19).

Таблица 18. Молярные массы и значения времени удержания комплексов человеческого белка W с различными mAb, нацеленными на домен В.

Образец	Моляр	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5
---------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

	ное соотно- шение (моль: моль)	Свободное mAb/белок W		[mAb] ₁ : [Белок W] ₁ Комплекс		[mAb] ₂ : [Белок W] ₂ Комплекс		[mAb] ₃ : [Белок W] ₃ Комплекс		Гетеромерн ые комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин. .	M _w , кДа
Белок W	-	9,6	147	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
mAb2	-	9,6	152	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
mAb2:бело к W	1:1	9,4	144	10,9	283	13,2	574	13,9	731	15,4	~1000 -1900
mAb3:бело к W	1:1	9,3	144	10,7	26,8	12,9	563	14,0	831	14,6	~1000 -1900
COMP1:бел ок W	1:1	9,4	143	10,8	298	13,0	580	13,9	765	15,0	~1000 -1900

R_t: время удержания; M_w: средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных;
мин.: минуты; кДа: килодальтон.

Таблица 19. Молярные массы и значения времени удержания комплексов человеческого белка W с COMP2, нацеленным на домен A

Образец	Моляр ное соотно- шение (моль: моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4		Пик 5	
		Свободн ый белок W		Свободное mAb		[mAb] ₁₋₂ : [Белок W] ₂ Комплекс		[mAb] ₂₋₃ : [Белок W] ₃ Комплекс		Гетеромерн ые комплексы более высокого порядка	
		R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин. .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа	R _t , мин .	M _w , кДа
Белок W	-	9,6	147	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

COMP2	-	10,5	12 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
COMP2:белок W	1:1	ND	ND	9,4	147	13,1	550	15,2	835	16,9	~1000 -1900

R_t : время удержания; M_w : средневзвешенная молярная масса; NA: нет данных; мин.: минуты; кДа: килодальтон.

Исходя из рассчитанных молярных масс отдельных компонентов, пик 4, вероятно, представлял собой комплексы, содержащие по меньшей мере 3 молекулы mAb, координирующих 2-3 молекулы белка W, тогда как пик 5 соответствовал гетерогенному распределению гетеромерных комплексов более высокого порядка, состоящих из ≥ 3 молекул mAb, координирующих ≥ 4 молекул белка W (таблица 18). Напротив, mAb, нацеленные на домен C (mAb4 и COMP3), давали широкое распределение больших гетерогенных комплексов (с молярной массой в диапазоне ~700-8000 кДа) с mAb4, что свидетельствовало о наиболее обширном «модульном разнообразии» среди панели протестированных mAb (фигура 16, таблица 20).

Таблица 20. Молярные массы и значения времени удержания комплексов человеческого белка W с различными mAb, нацеленными на домен C

Образец	Молярное соотношение (моль:моль)	Пик 1		Пик 2		Пик 3	
		Свободное mAb/белок W		[mAb] ₁₋₂ : [Белок W] ₂ Комплекс		Гетеромерные комплексы более высокого порядка	
		R_t , мин.	M_w , кДа	R_t , мин.	M_w , кДа	R_t , мин.	M_w , кДа
Белок W	-	9,6	147	ND	ND	ND	ND
mAb4	-	9,5	148	ND	ND	ND	ND
mAb4:белок W	1:1	9,5	158	ND	ND	28,5	1400-4000
COMP3:белок W	1:1	9,7	161	13,9	528	14,6	700-8000

Хотя в вышеприведенном описании настоящее изобретение было описано применительно к некоторым вариантам его осуществления и было приведено много подробностей с целью иллюстрации, специалистам в данной области будет очевидно, что настоящее изобретение допускает дополнительные варианты осуществления, и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов настоящего изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Настоящее изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или основных атрибутов, и соответственно следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предыдущее описание, которое указывает на объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки стехиометрии и распределения по размеру белковых комплексов в образце, предусматривающий:

фракционирование образца посредством проточного фракционирования в поперечном поле (A4F); и

определение молярной массы, стехиометрии и распределения по размеру белковых комплексов в образце с помощью многоугольного рассеяния лазерного излучения (MALLS), где гетерогенные комплексы состоят из гетерогенных комплексов антитело:лиганд или гетерогенных комплексов слитый белок:лиганд.

2. Способ по п. 1, где лиганд представляет собой растворимый лиганд.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где антитело представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Способ отбора основного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, предусматривающий:

добавление первого продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, к первому образцу, содержащему мишень первого продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением гетерогенных комплексов белок:лиганд;

добавление второго продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, ко второму образцу, содержащему такую же мишень, с образованием комплексов белок:лиганд;

разделение гетерогенных комплексов белок:лиганд и определение распределения по размеру и стехиометрии гетерогенных комплексов белок:лиганд посредством проточного фракционирования в поперечном поле - многоугольного рассеяния лазерного излучения; и

отбор продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, который образует меньшее количество комплексов белок:лиганд, в качестве основного целевого белкового лекарственного средства.

6. Способ по п. 5, где отбираемый продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, образует меньшее количество комплексов на основе продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, характеризующихся соотношением продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда, составляющим 3:2, 2:3, 4:4, 6:6 или [2:2]_n.

7. Способ по п. 5 или п. 6, где лиганд представляет собой растворимый лиганд.

8. Способ по любому из пп. 5-7, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок.

9. Способ по любому из пп. 5-7, где отбираемый продукт, представляющий собой

белковое лекарственное средство, образует комплексы на основе продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, характеризующиеся соотношением продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда, выбранным из группы, состоящей из 1:0, 0:1, 1:1, 1:2 и 2:1.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая основной продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, выбранный согласно любому из пп. 5-9.

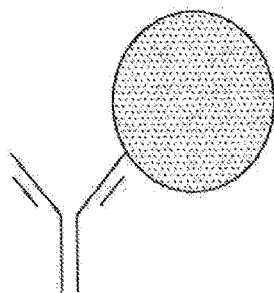
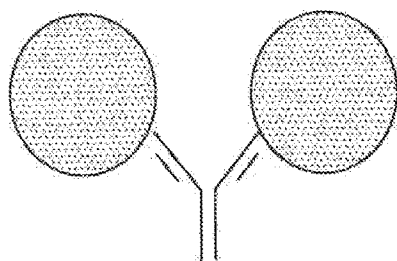
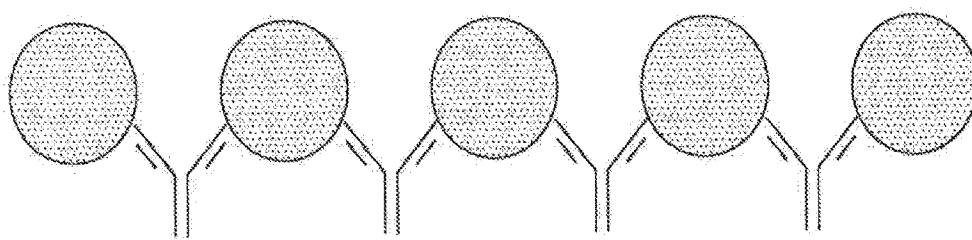
11. Способ определения характеристик белковых комплексов, образованных между продуктом, представляющим собой белковое лекарственное средство, и его лигандом, предусматривающий:

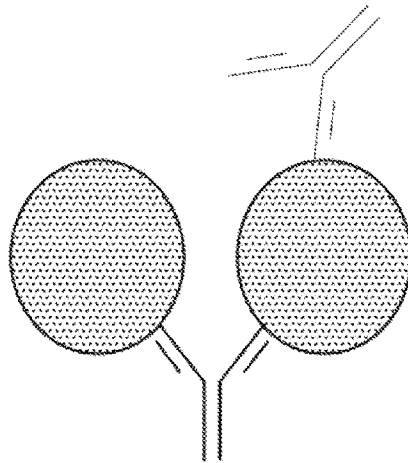
объединение продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и его лиганда в растворе с получением образца, содержащего комплексы продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда;

фракционирование образца посредством проточного фракционирования в поперечном поле; и

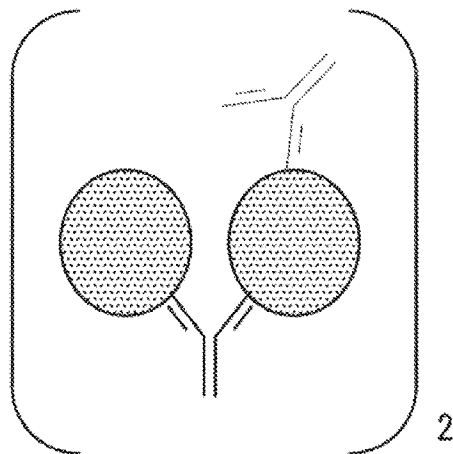
подвергание фракционированных комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда многоугловому рассеянию лазерного излучения с определением характеристик стехиометрии и размера комплексов продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и лиганда.

По доверенности

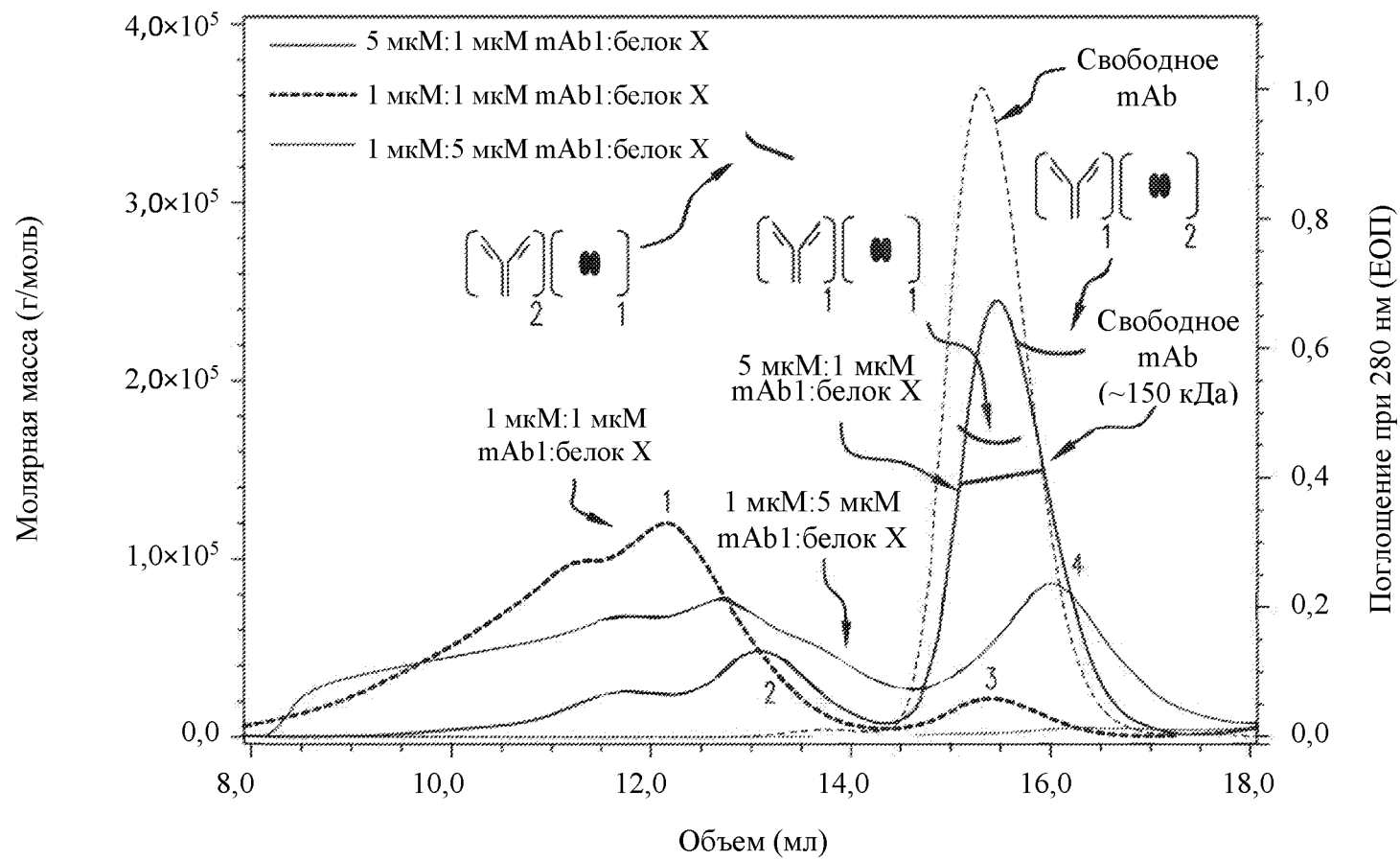
**ФИГ. 1А****ФИГ. 1В****ФИГ. 1С**



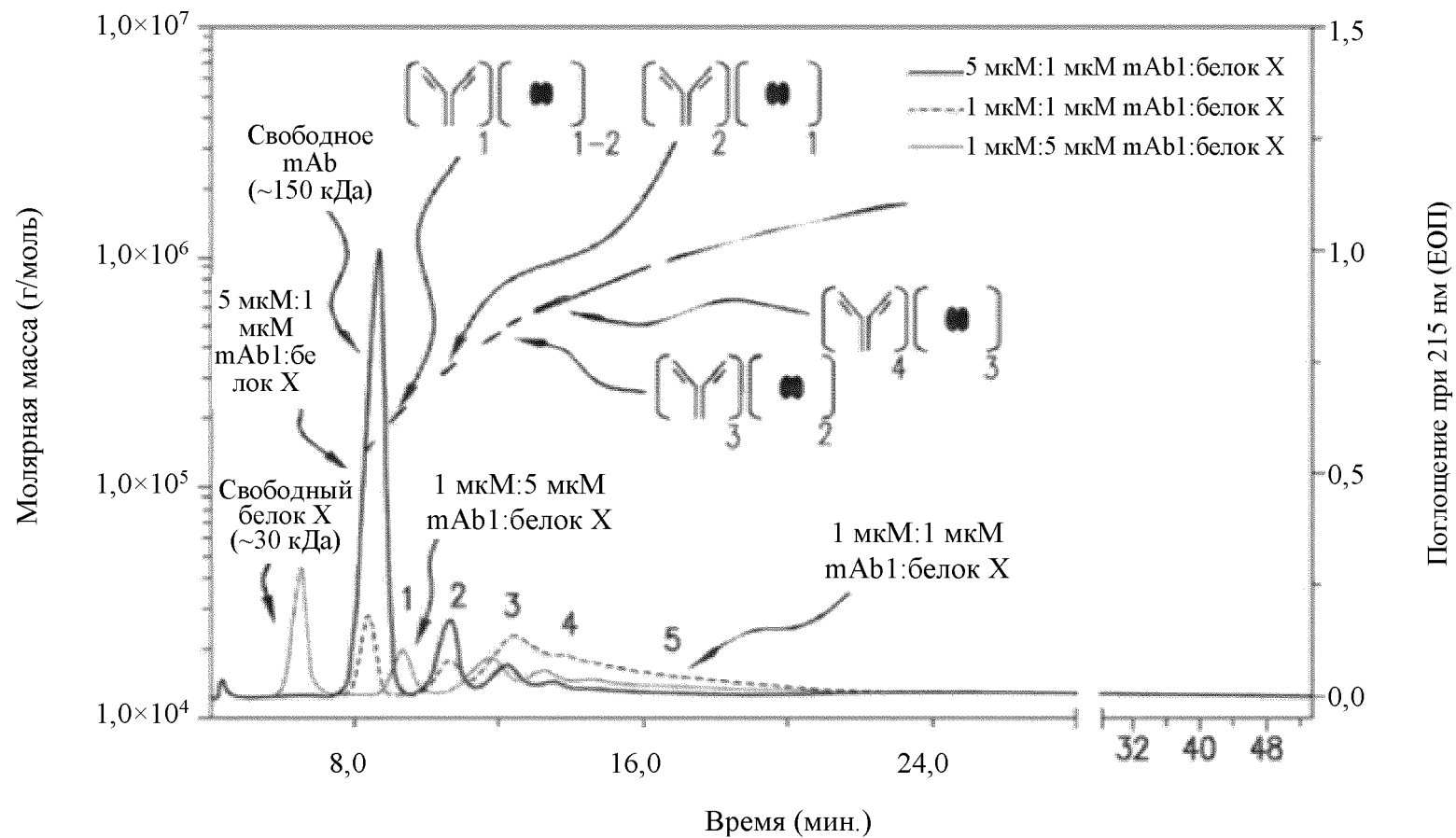
ФИГ. 2А



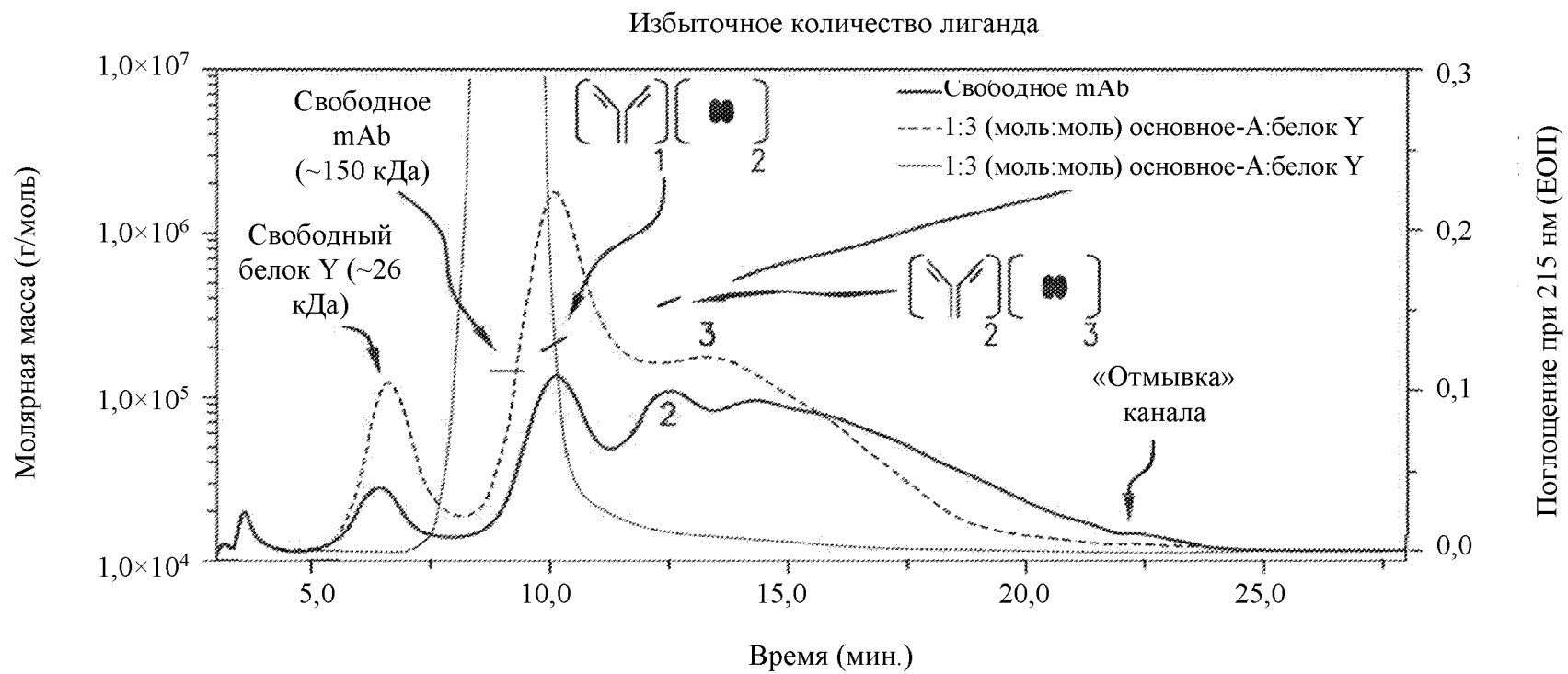
ФИГ. 2В



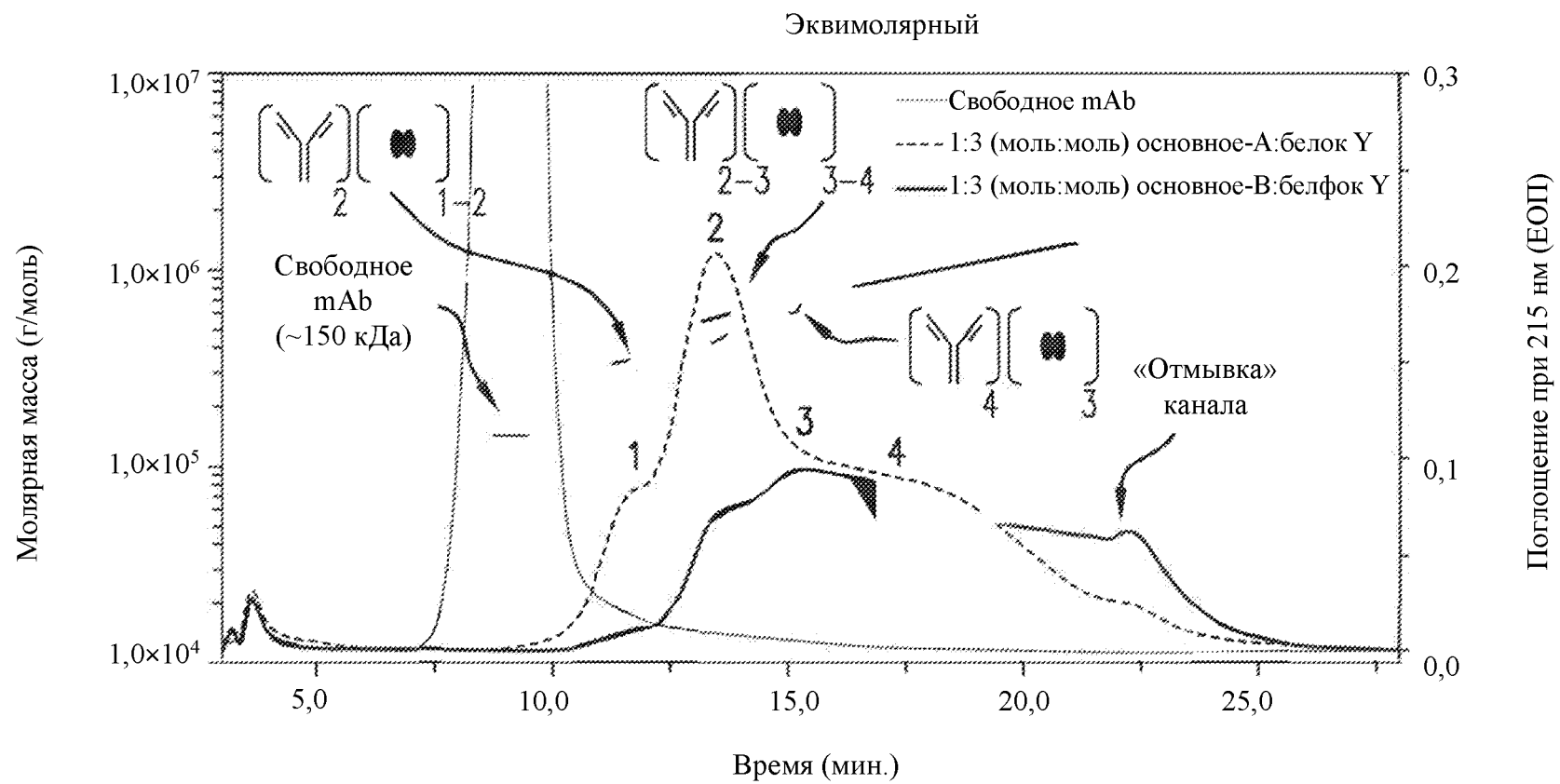
ФИГ. 3А



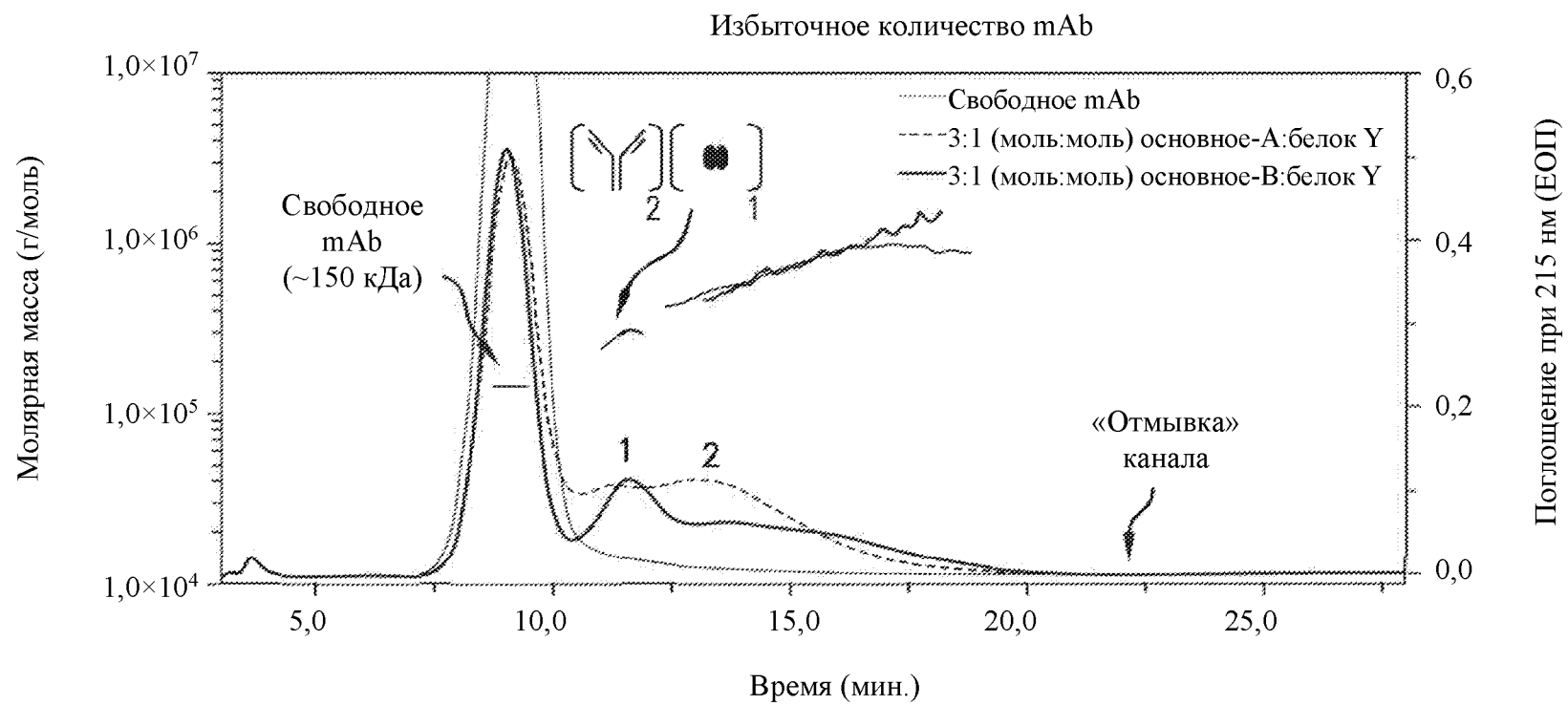
ФИГ. 3В



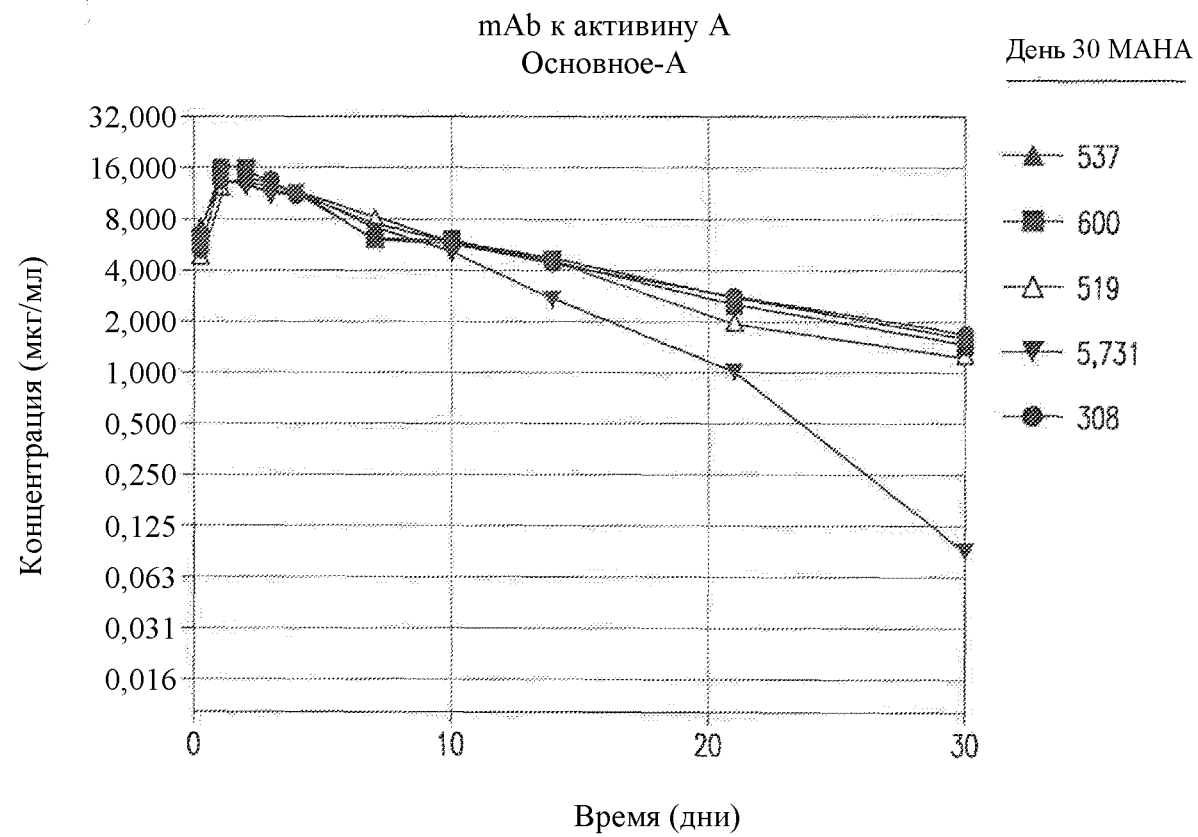
ФИГ. 4А



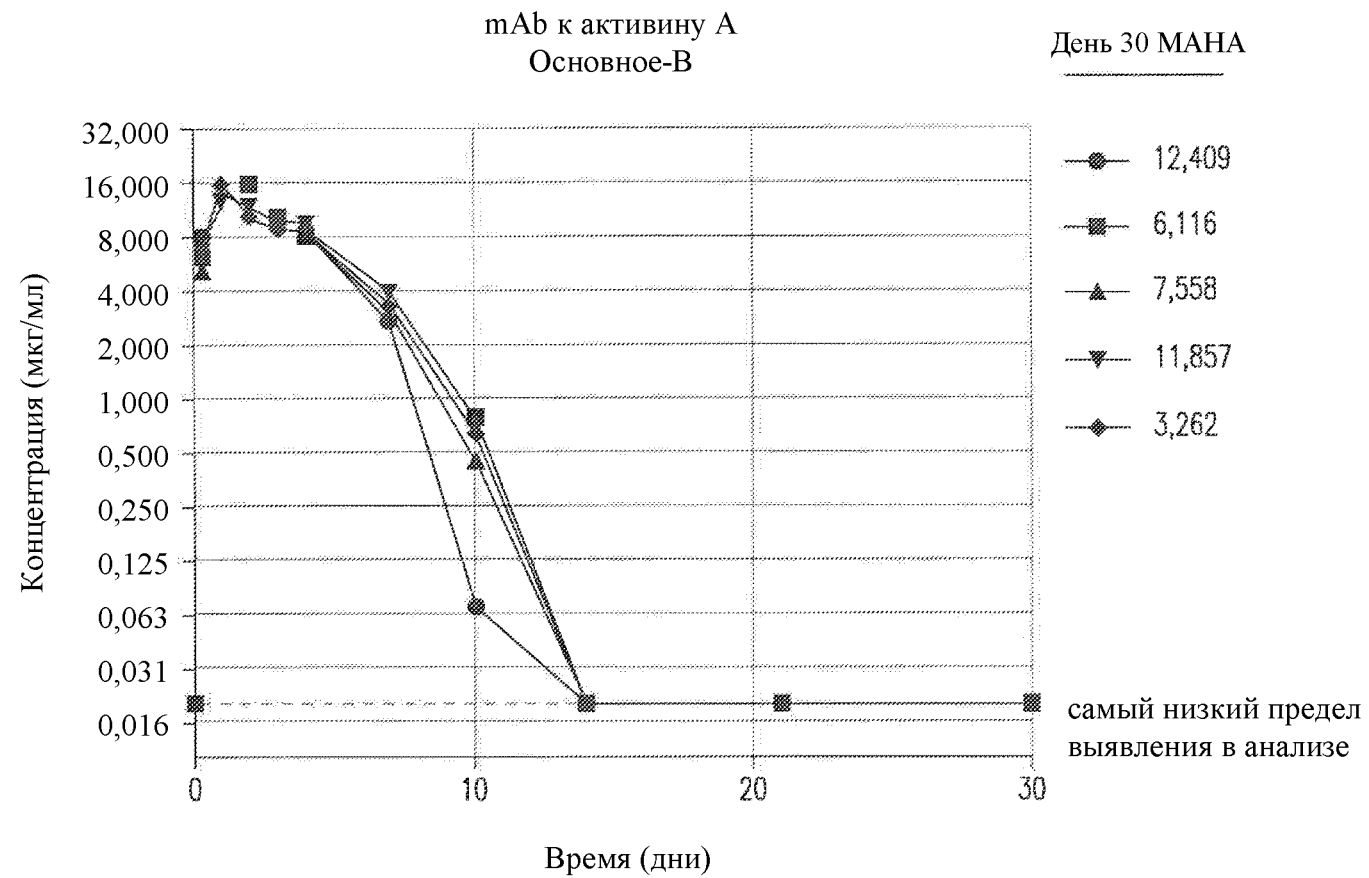
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



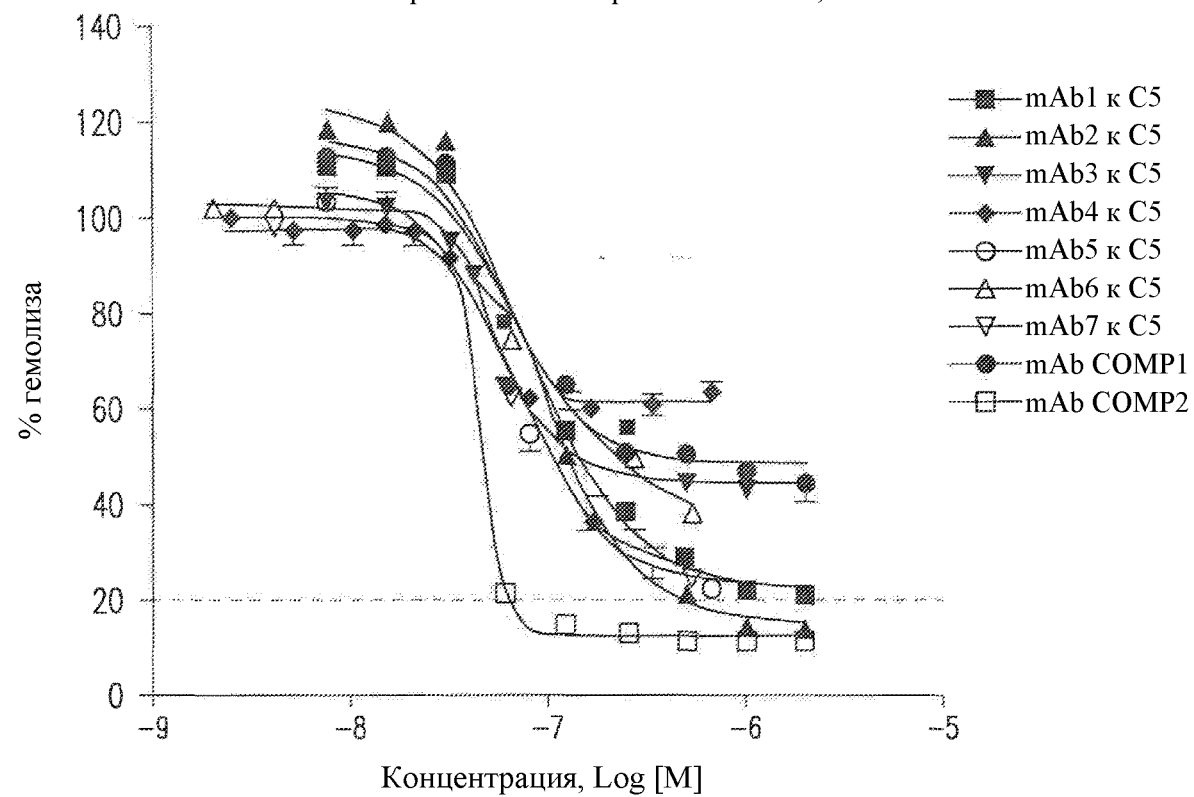
ФИГ. 5А



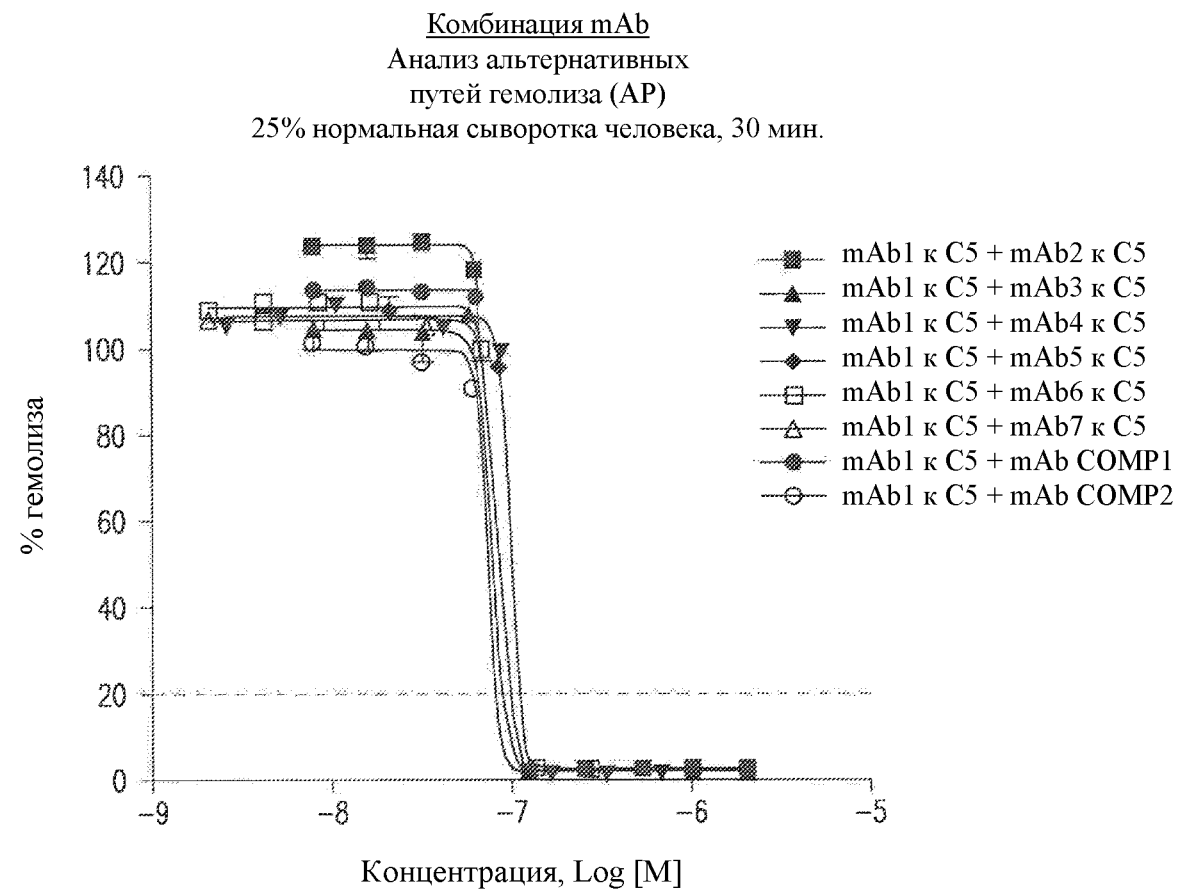
ФИГ. 5В

Одиночные mAb
Анализ альтернативных
путей гемолиза (AP)

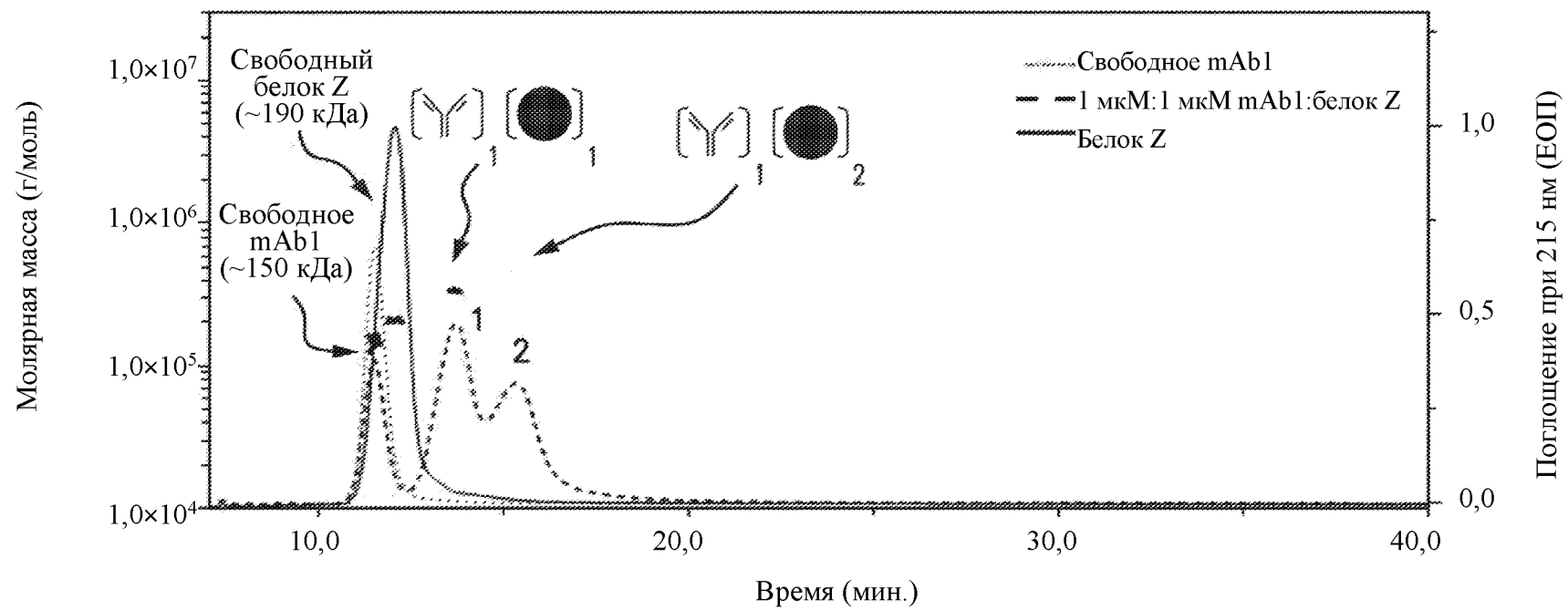
25% нормальная сыворотка человека, 30 мин.



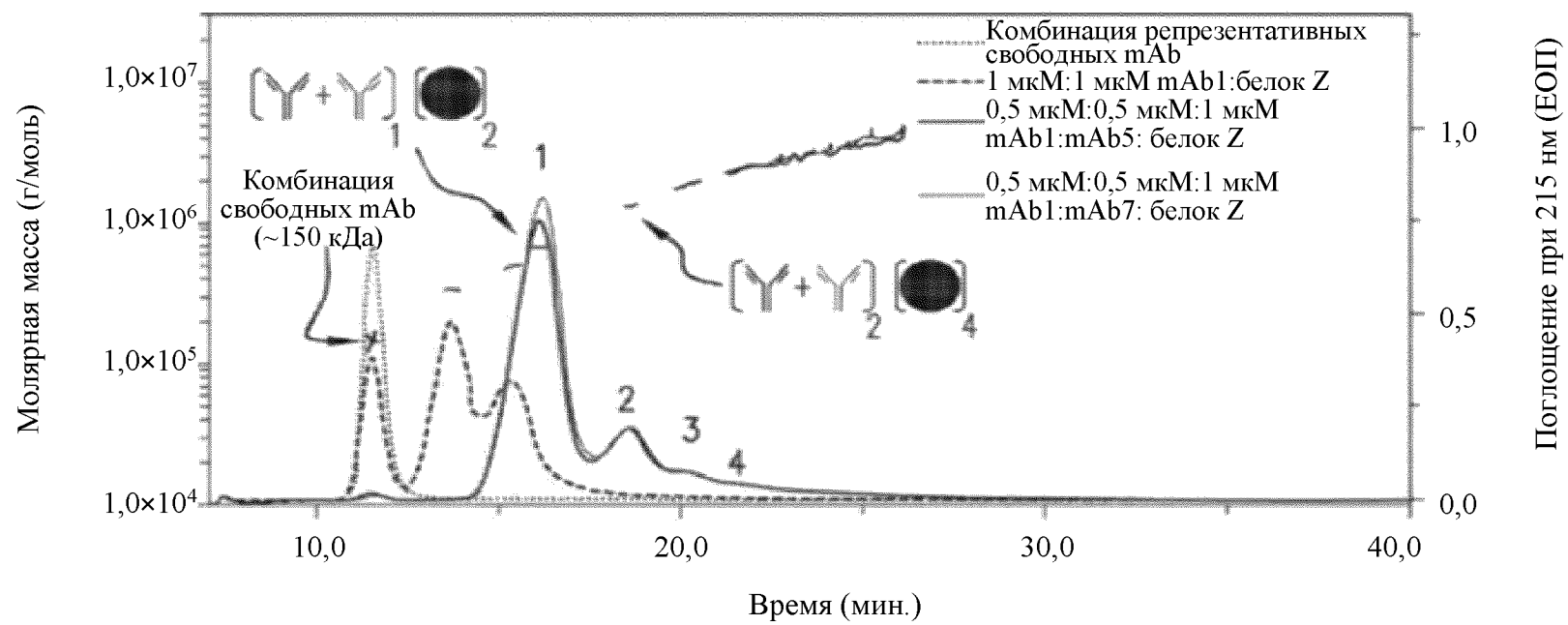
ФИГ. 6А



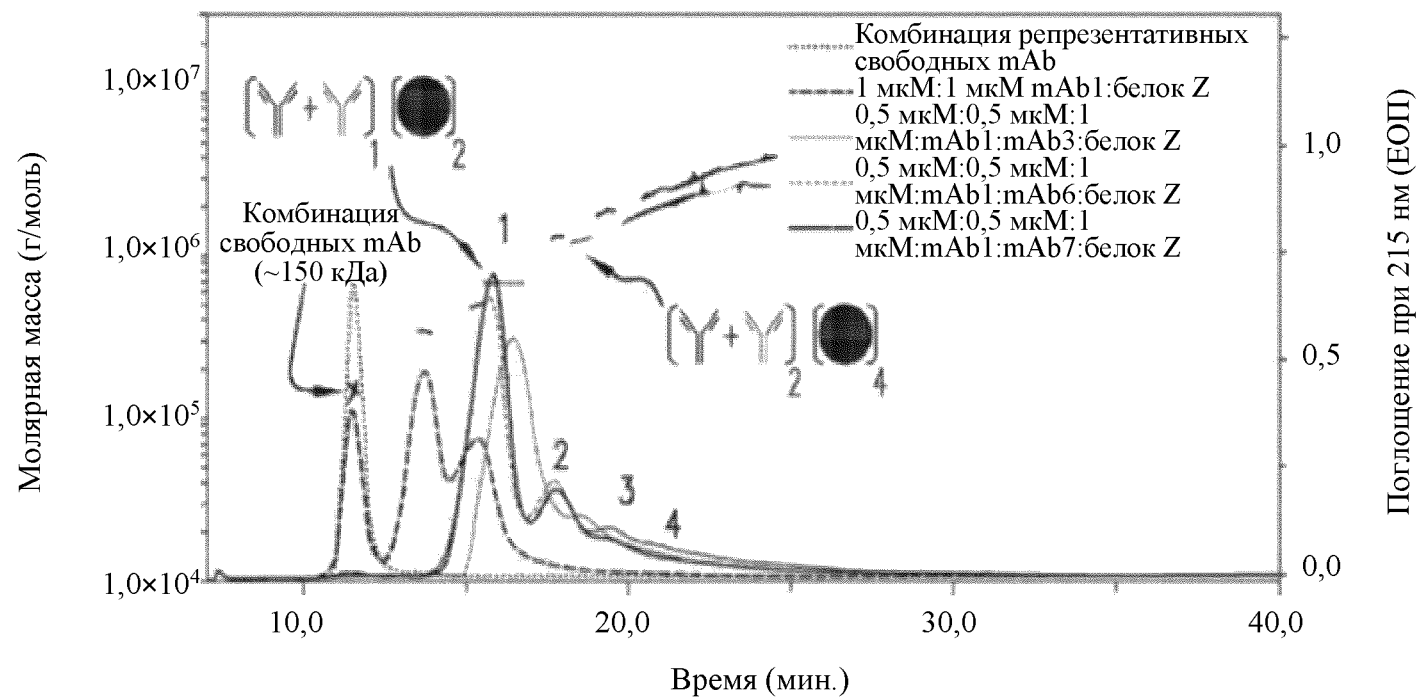
ФИГ. 6В



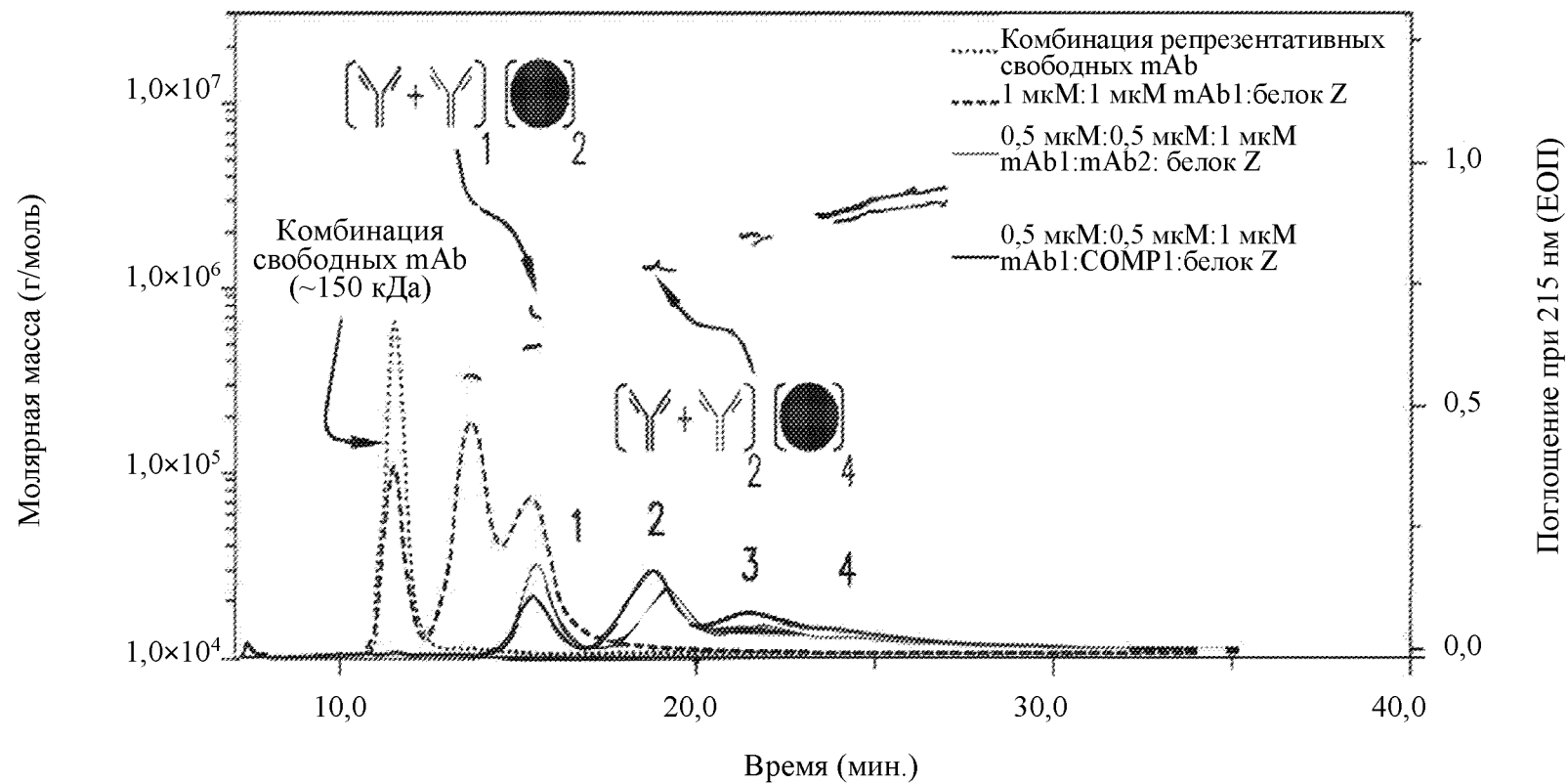
ФИГ. 7



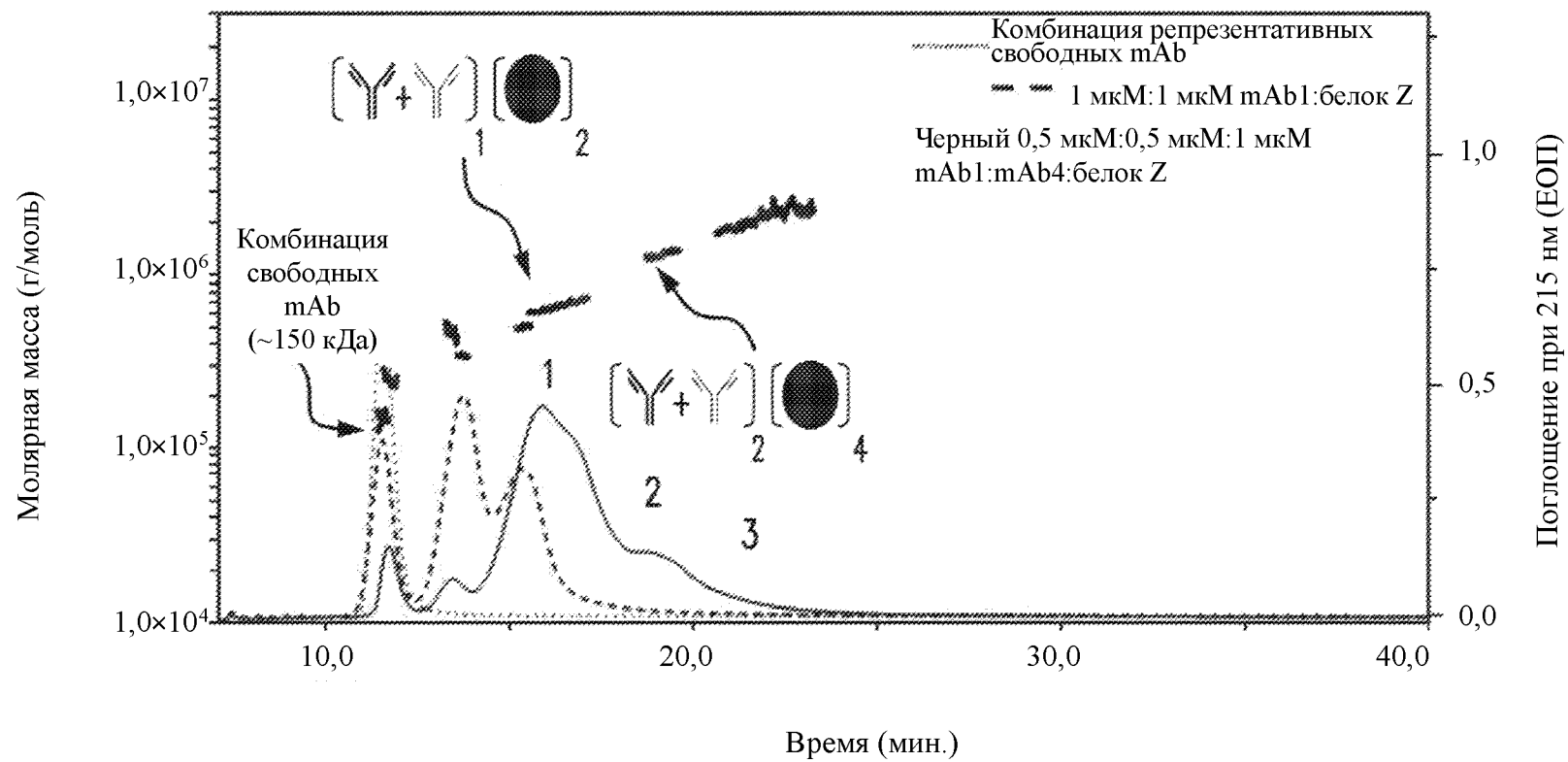
ФИГ. 8



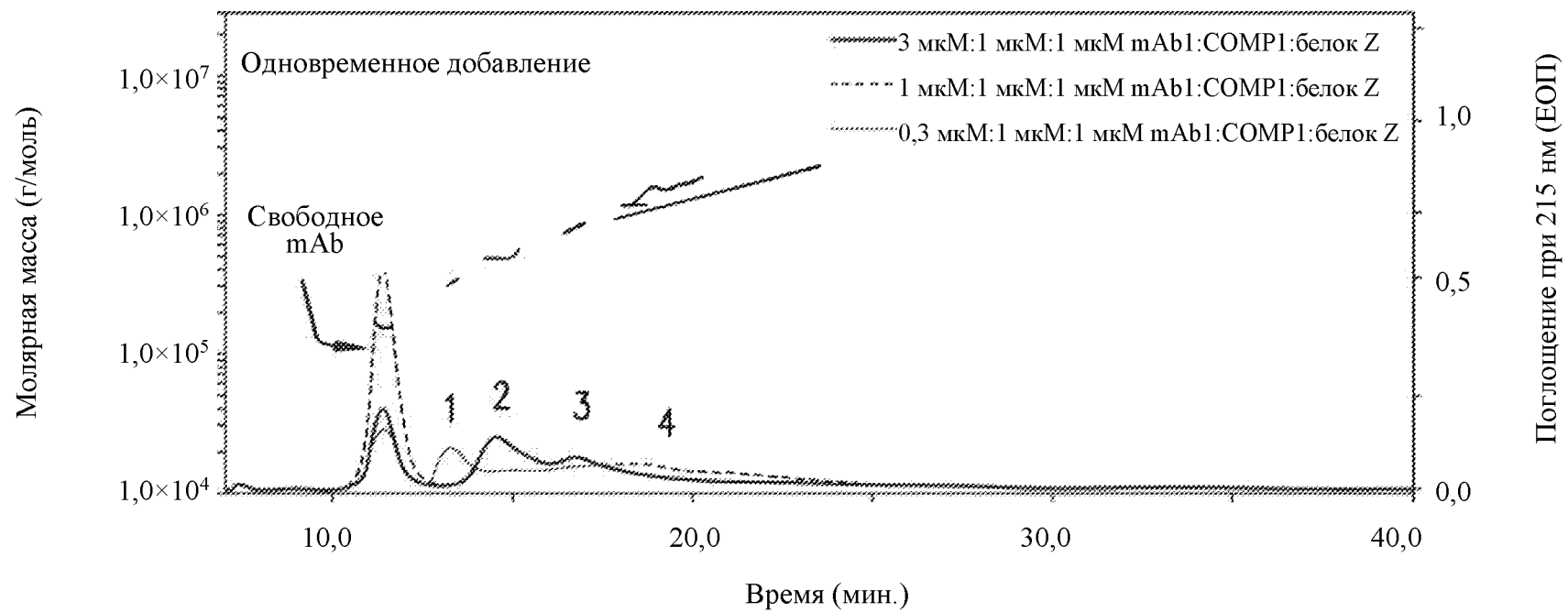
ФИГ. 9



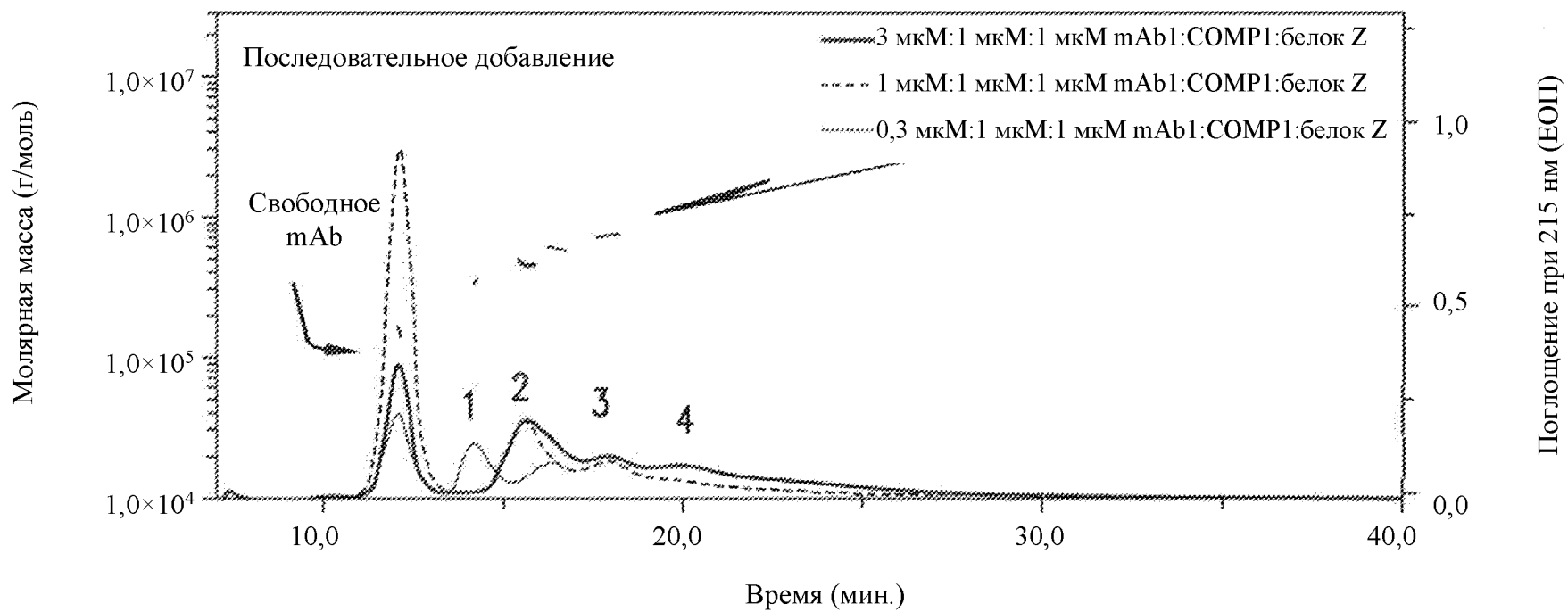
ФИГ. 10



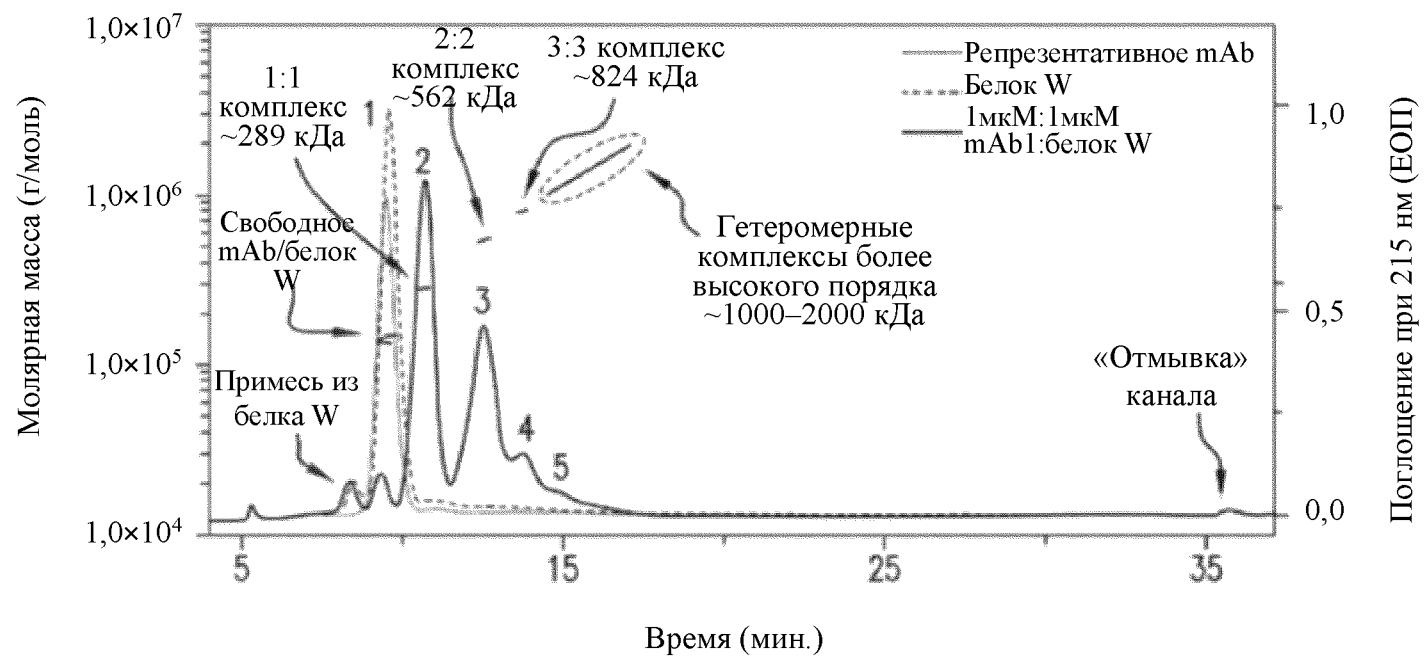
ФИГ. 11



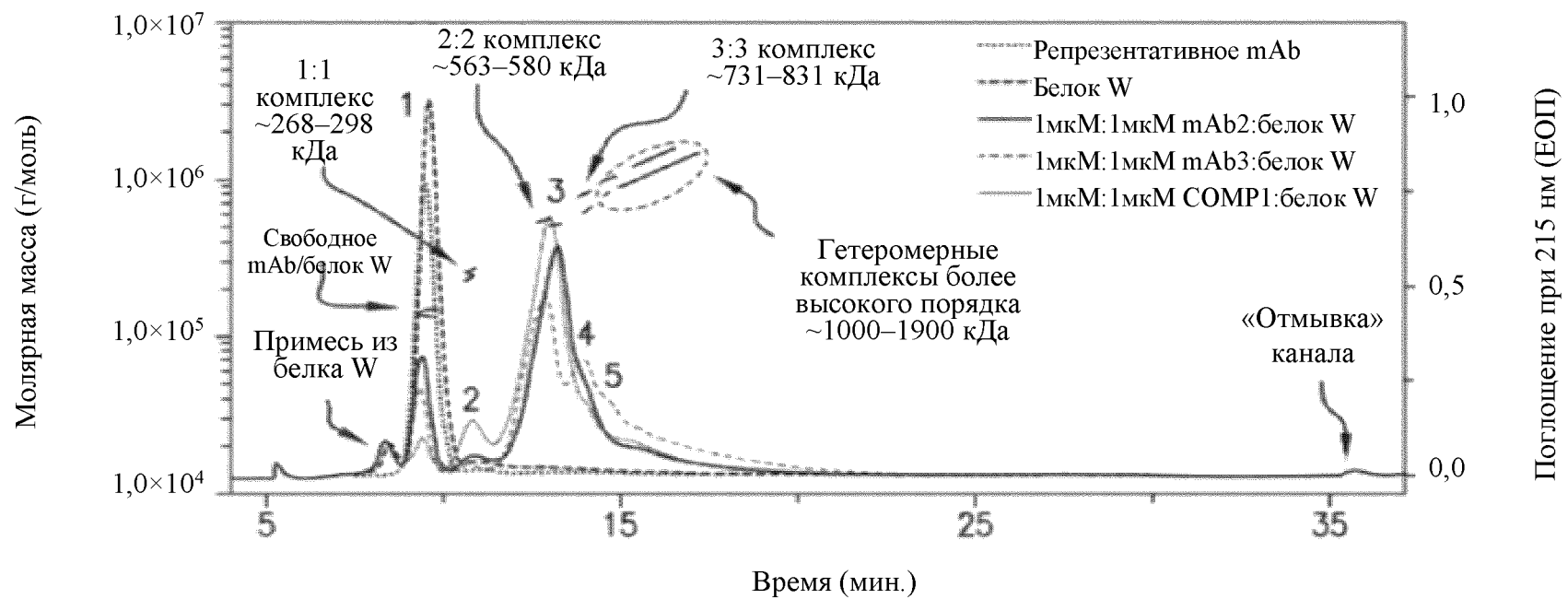
ФИГ. 12А



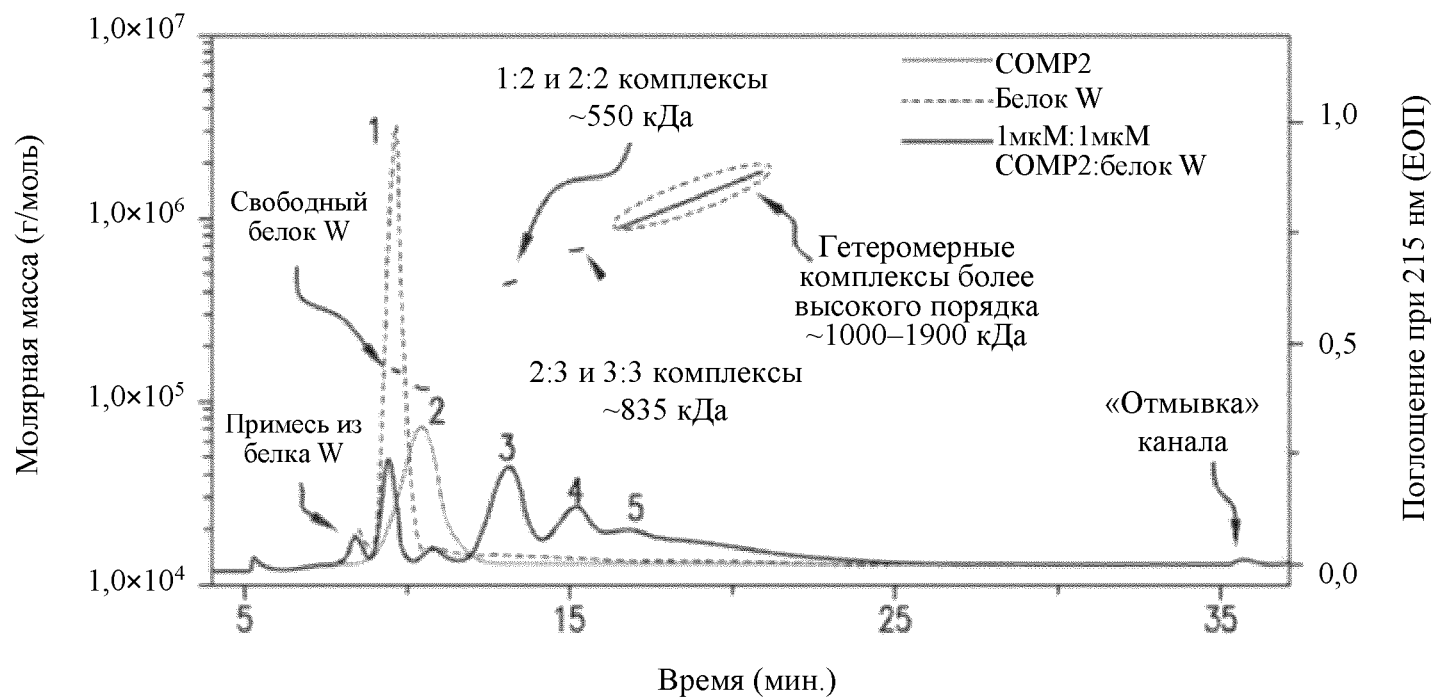
ФИГ. 12В



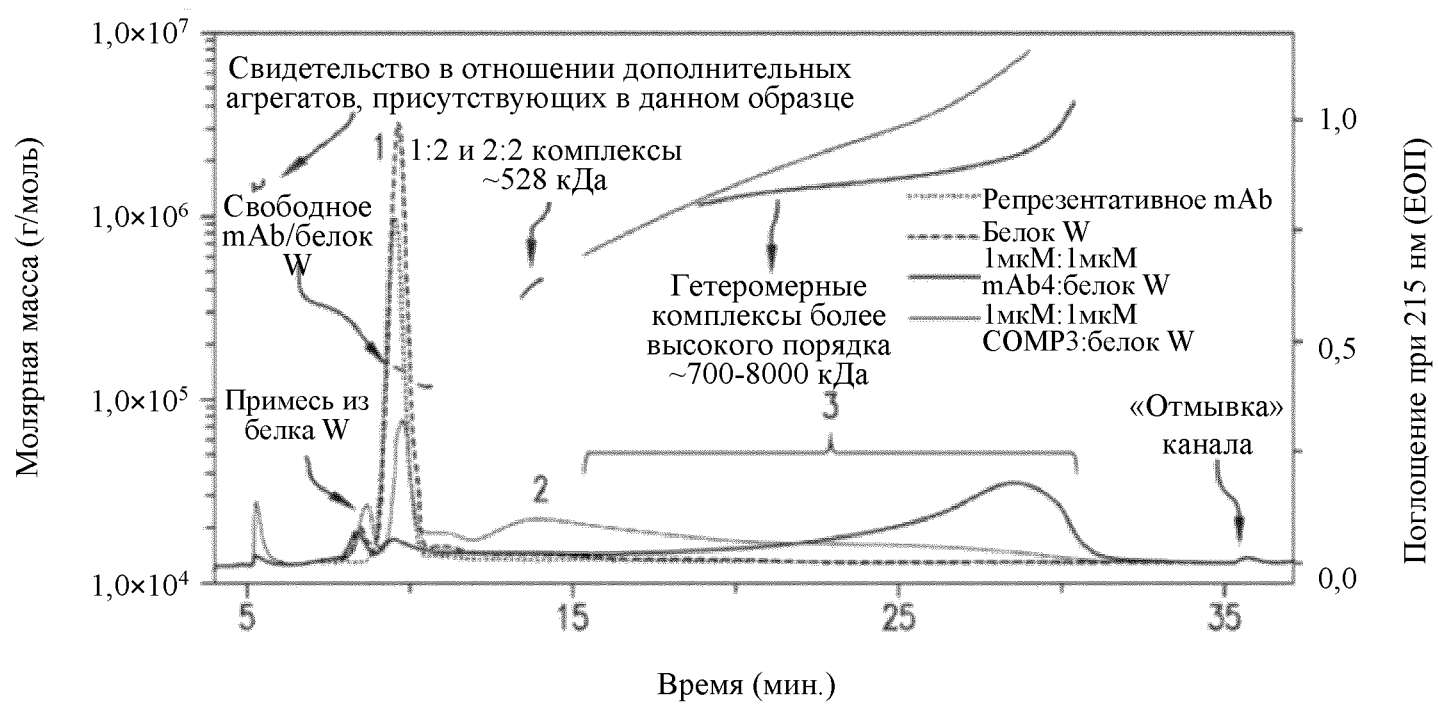
ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16