

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190505 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.25

(51) Int. Cl. G01N 33/543 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.12

(54) ВЫБОР ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ IN VIVO

(31) 62/718,307; 62/865,446

(72) Изобретатель:

(32) 2018.08.13; 2019.06.24

Ким Дороти, Марлоу Майкл (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/046104

(74) Представитель:

(87) WO 2020/036845 2020.02.20

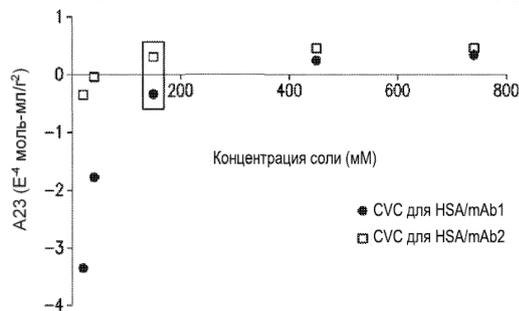
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В изобретении описан способ определения воздействия неспецифических взаимодействий в моделируемых условиях in vivo. Способ включает в себя (a) приведение в контакт раствора, содержащего биологически значимый агент молекулярного краудинга и молекулу-мишень, с биосенсором, причем поверхность биосенсора содержит захватывающую молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью; (b) предоставление возможности молекуле-мишени связываться с захватывающей молекулой и (c) определение количества молекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии.



A1

202190505

202190505

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566867EA/18

ВЫБОР ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ IN VIVO

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[001] Данная заявка включает в себя посредством ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10470WO01-Sequence.txt, созданного 12 августа 2019 г., размером 1466 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Настоящее изобретение относится к биофармацевтическим препаратам, а также к определению поведения терапевтических биомолекул, таких как антитела, в близких к физиологическим условиям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] Подходящий анализ равновесия связывания *in vitro* обязательно ограничивается концентрациями около константы диссоциации, как правило, порядка микромоляр и менее. В таких условиях белки ведут себя по существу как идеальные молекулы, и любые неспецифические взаимодействия можно легко игнорировать. Повышение концентрации белка до произвольных высоких значений приводит к макромолекулярному краудингу, когда образование комплексов более не является линейным по отношению к концентрации белка, а уравнения связывания, полученные на основании закона действия масс, лучше экспрессируются с точки зрения термодинамической активности, чем с точки зрения концентрации (Neal, B. L, D. Asthagiri and A. M. Lenhoff (1998). "Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins." *Biophys J* 75(5): 2469-2477). Величина коэффициента активности зависит от состава всего раствора; неидеальность возникает не только из-за повышенных уровней белка как такового, но также из-за присутствия невзаимодействующих макромолекул и соразтворенных веществ.

[004] Понимание неспецифических взаимодействий между белками в неидеальных условиях, которые в значительной степени отличаются от условий, обычно используемых для характеристики *in vitro*, является ключевым для получения более полной картины функции белка в биологическом контексте. Таким образом, в настоящее время существует потребность в способах определения воздействия неспецифических взаимодействий биологических молекул в моделируемых условиях *in vivo*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ определения воздействия неспецифических взаимодействий в моделируемых условиях *in vivo*, причем способ включает в себя: (a) приведение в контакт раствора, содержащего биологически значимый агент молекулярного краудинга и молекулу-мишень, с биосенсором, причем поверхность биосенсора содержит захватывающую молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью; (b) предоставление возможности молекуле-мишени

связываться с захватывающей молекулой и (с) определение количества молекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии.

[006] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя сравнение количества биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с контрольным пороговым значением, которое позволяет отличить биомолекулу-мишень, имеющую притягивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе, от биомолекулы-мишени, имеющей отталкивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе.

[007] В различных вариантах осуществления способа контрольное пороговое значение представляет собой величину связывания, нормализованную к величине связывания в идеальном, разбавленном или наполовину разбавленном растворе.

[008] В различных вариантах осуществления способа биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сывороточный альбумин человека (human serum albumin, HSA).

[009] В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин человека присутствует в физиологически значимой концентрации.

[0010] В некоторых вариантах осуществления сывороточный альбумин человека присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л.

[0011] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций биологически значимого агента молекулярного краудинга.

[0012] В различных вариантах осуществления способа биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания при двух или более уровнях pH, например, для определения зависимости связывания от pH.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания при двух или более концентрациях соли, например, для определения зависимости связывания от соли.

[0015] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит моноклональное антитело, а захватывающая молекула содержит антиген, который специфически связывается с моноклональным антителом.

[0016] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит антиген, а захватывающая молекула содержит моноклональное антитело, который специфически связывается с антигеном.

[0017] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, а захватывающая молекула содержит лиганд, который специфически связывается с рецептором или его лиганд-связывающим фрагментом.

[0018] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит лиганд, а захватывающая молекула содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, который специфически связывается с лигандом.

[0019] В различных вариантах осуществления способа захватывающая молекула связана с поверхностью сенсора посредством линкера.

[0020] В различных вариантах осуществления способа линкер содержит биотин и стрептавидин или авидин. [0021] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антитело к Fc IgG.

[0022] В различных вариантах осуществления способа антитело к Fc IgG представляет собой антитело к Fc IgG человека.

[0023] В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ выбора биомолекулы в моделируемых условиях *in vivo*, причем способ включает в себя: (a) приведение в контакт раствора, моделирующего условия *in vivo*, с биосенсором, причем поверхность биосенсора содержит захватывающую молекулу, которая специфически связывается с биомолекулами-мишенями из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул-мишеней, и причем раствор дополнительно содержит биологически значимый агент молекулярного краудинга и первую биомолекулу-мишень, выбранную из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул-мишеней; (b) предоставление возможности первой биомолекуле-мишени связываться с захватывающей молекулой и (c) определение количества первой биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии.

[0024] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя: (a) приведение в контакт второго раствора, моделирующего условия *in vivo*, с биосенсором, причем второй раствор дополнительно содержит биологически значимый агент молекулярного краудинга и вторую биомолекулу-мишень, выбранную из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул; (b) предоставление возможности второй биомолекуле-мишени связываться с захватывающей молекулой; (c) определение количества второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии и (d) сравнение количества первой биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, с количеством второй биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, чтобы определить, какая из первой биомолекулы и второй биомолекулы обладает большей величиной связывания.

[0025] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя сравнение количества первой и/или второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с контрольным пороговым значением, которое позволяет отличить биомолекулу-мишень, имеющую притягивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе, от биомолекулы-мишени, имеющей отталкивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе.

[0026] В различных вариантах осуществления способа пороговое значение

представляет собой величину связывания, нормализованную к величине связывания в идеальном, разбавленном или наполовину разбавленном растворе.

[0027] В различных вариантах осуществления способа биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сывороточный альбумин человека (human serum albumin, HSA).

[0028] В различных вариантах осуществления способа сывороточный альбумин человека присутствует в физиологически значимой концентрации.

[0029] В различных вариантах осуществления способа сывороточный альбумин человека присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л.

[0030] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций биологически значимого агента молекулярного краудинга.

[0031] В различных вариантах осуществления способа биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

[0032] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания при двух или более уровнях pH для определения зависимости связывания от pH.

[0033] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций соли для определения зависимости связывания от соли.

[0034] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит моноклональное антитело, а захватывающая молекула содержит антиген, который специфически связывается с моноклональным антителом.

[0035] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит антиген, а захватывающая молекула содержит моноклональное антитело, которое специфически связывается с антигеном.

[0036] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, а захватывающая молекула содержит лиганд, который специфически связывается с рецептором или его лиганд-связывающим фрагментом.

[0037] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит лиганд, а захватывающая молекула содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, который специфически связывается с лигандом.

[0038] В различных вариантах осуществления способа захватывающая молекула связана с поверхностью сенсора посредством линкера.

[0039] В различных вариантах осуществления способа линкер содержит биотин и стрептавидин или авидин. [0040] В различных вариантах осуществления способа молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антитело к Fc IgG.

[0041] В различных вариантах осуществления способа антитело к Fc IgG

представляет собой антитело к Fc IgG человека.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0042] На Фиг. 1 изображен график, показывающий зависимость от ионной силы перекрестных взаимодействий mAb1/HSA и mAb2/HSA, измеренных с помощью CG-MALS. Перекрестные вириальные коэффициенты (A_{23}) определяли с помощью CG-MALS для взаимодействий между 10 г/л HSA и 10 г/л mAb1 (·) или mAb2 (□) в присутствии возрастающих концентраций NaCl в фосфатном буфере. Отрицательные значения SVC указывают на притягивающие силы между молекулами, тогда как положительные значения SVC указывают на отталкивающие силы между молекулами. Прямоугольником отмечена физиологическая ионная сила, где значения SVC для mAb1 и mAb2 являются отрицательными и положительными, соответственно.

[0043] На Фиг. 2 изображен график, показывающий профили элюирования слабой катионообменной хроматографии для mAb и HSA. Каждое mAb и HSA оценивали с помощью аналитической хроматографии на слабой катионообменной колонке, уравновешенной с помощью 200 mM MES, 20 mM NaCl, pH 6,5. Применяли градиент от 20-500 mM NaCl, который обозначен пунктирной линией в виде процента от 1 M раствора NaCl. Показаны типичные профили элюирования для HSA, mAb1 и mAb2.

[0044] На Фиг. 3А и 3В изображены графики, показывающие связывание mAb с биотинилированным антигеном при 137 mM NaCl в отсутствие HSA, как измерено с помощью BLI. Связывание mAb1 (Фиг. 3А) и mAb2 (Фиг. 3В) с биотинилированным антигеном наблюдали с помощью биослойной интерферометрии в присутствии физиологической концентрации соли в фосфатном буфере. Изменение длины волны в нанометрах (ответ, нм) наносят на график как функцию времени для отображения изменений толщины биослоя вследствие событий связывания. Этапы ассоциации и диссоциации показаны для mAb 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ и 40 нМ. Пунктирные линии обозначают необработанные данные, а сплошные линии обозначают сглаженные кривые. Кривые данных выравниваются на этапе ассоциации mAb, а эталонные данные вычтены из всех кривых образцов.

[0045] На Фиг. 4А и 4В изображены графики, показывающие, что воздействие HSA на связывание mAb с антигеном, как измерено с помощью BLI, является зависимым от ионной силы. Связывание 40 нМ mAb1 и mAb2 с биотинилированным антигеном в отсутствие и в присутствии HSA наблюдали с помощью биослойной интерферометрии при 10 (Фиг. 4А) и 137 mM NaCl (Фиг. 4В) в фосфатном буфере. Изменение длины волны (отклик, нм) как функция времени указывает на события связывания, и показаны только этапы ассоциации и диссоциации mAb. Биотинилированный антиген загружали в наконечники со стрептавидином, как описано выше. Связывание mAb1 оценивали в отсутствие и в присутствии 10 г/л HSA, связывание mAb2 также оценивали в отсутствие и в присутствии 10 г/л HSA. Использовали как минимум 0,1 г/л HSA для предотвращения неспецифического связывания с биосенсорным наконечником. Кривые данных выравниваются на этапе ассоциации mAb после исходного измерения в эквивалентных

концентрациях HSA. Кривые для образцов, содержащих 10 г/л HSA, были скорректированы с учетом изменений сигнала при переходе от ассоциации к диссоциации вследствие изменения показателя преломления раствора.

[0046] На Фиг. 5А и 5В изображены графики, показывающие, что воздействие HSA на связывание mAb с антигеном, как измерено с помощью BLI, является зависимым от ионной силы и mAb-специфическим. Связывание mAb1 (·) и mAb2 (r) с биотинилированным антигеном в присутствии возрастающих концентраций HSA наблюдали с помощью биослойной интерферометрии при 10 (Фиг. 5А) и 137 (Фиг. 5В) mM NaCl. Нормализованный отклик (на связывание в присутствии 0,1 г/л HSA) показан как функция концентрации HSA. Пунктирной линией обозначен нормальный уровень при 1,0, чтобы продемонстрировать взаимосвязь точек данных с этой линией. Использовали как минимум 0,1 г/л HSA для предотвращения неспецифического связывания с биосенсорным наконечником. Эксперименты проводили в трех повторностях, и показаны среднее значение и стандартное отклонение. Проводили однофакторный дисперсионный анализ для каждой концентрации HSA, и р-значения < 0,05 обозначены звездочкой. Все данные обобщены в таблицах 2-4.

[0047] На Фиг. 6А-6D изображен набор графиков, показывающих воздействие Фиколла 70 на связывание mAb с антигеном, как измерено с помощью BLI. Связывание mAb1 (·) и mAb2 (⊥) с биотинилированным антигеном в присутствии возрастающих концентраций Фиколла 70 наблюдали с помощью биослойной интерферометрии при 10 mM (Фиг. 6А) и 137 mM (Фиг. 6В) NaCl. Нормализованный отклик (на связывание в присутствии 0,1 г/л Фиколла 70) показан как функция концентрации Фиколла 70. Пунктирной линией на Фиг. 6А и 6В обозначен нормальный уровень при 1,0, чтобы продемонстрировать взаимосвязь точек данных с этой линией. Эксперименты проводили в трех повторностях, и показаны среднее значение и стандартное отклонение. Проводили однофакторный дисперсионный анализ для каждой концентрации HSA, и р-значения < 0,05 обозначены звездочкой. Все данные обобщены в таблицах 5-7. Медленная кинетика связывания требовала увеличения периода времени для ассоциации mAb с антигеном в присутствии очень высоких концентраций Фиколла 70 (200 г/л и выше, Фиг. 6С и 6D). Связывание mAb с биотинилированным антигеном в присутствии 300 г/л Фиколла наблюдали с помощью биослойной интерферометрии при 10 mM (Фиг. 6С) и 137 mM (Фиг. 6D) NaCl. Выровненные отклики в нм для mAb1 и mAb2 в отсутствие Фиколла 70 показаны как функция времени для увеличенного времени ассоциации (~3 часа). Добавление 300 г/л Фиколла 70 к mAb1 и mAb2 демонстрирует сравнительно медленную кинетику связывания.

[0048] На Фиг. 7 изображен график, показывающий, что погружение биосенсора в раствор HSA приводит к увеличению сигнала в экспериментах биослойной интерферометрии. Репрезентативная сенсограмма для связывания mAb1 с наконечником со стрептавидином, загруженным биотинилированным антигеном в присутствии 137 mM NaCl. После исходного измерения (0-120 сек) загружают биотинилированный антиген в

присутствии 0,1 г/л HSA и дают уравниваться (этап А), сенсор погружают в 10 г/л HSA (этап В), сенсор погружают в 10 г/л HSA+40 нМ mAb1 (этап С) и сенсор погружают в исходный буфер (этап D). Величина усиления сигнала, наблюдаемого на этапе В, является аналогичной усилению сигнала, наблюдаемому для такой же экспериментальной установки с загруженным биотином стрептавидином (антиген отсутствует), что указывает на то, что сигнал обусловлен показателем преломления высокой белковой концентрации HSA, а не событием специфического связывания с биосенсорным наконечником (данные не показаны).

[0049] На Фиг. 8А-8Н изображен набор графиков, показывающих измерения аффинности с помощью наконечников с антителом к Fc IgG человека. Репрезентативные сенсограммы биослойной интерферометрии представлены для mAb1 с немеченным антигеном в присутствии 10 мМ (Фиг. 8А) и 137 мМ NaCl (Фиг. 8В); mAb1 с биотинилированным антигеном в присутствии 10 мМ (Фиг. 8С) и 137 мМ NaCl (Фиг. 8D); mAb2 с немеченным антигеном в присутствии 10 мМ (Фиг. 8Е) и 137 мМ NaCl (Фиг. 8F); mAb2 с биотинилированным антигеном в присутствии 10 мМ (Фиг. 8G) и 137 мМ NaCl (Фиг. 8H). Биосенсорные наконечники загружали антителом для достижения отклика ~ 0,6 нм. Этап ассоциации антигена был от 100-300 сек, а этап диссоциации составлял 600-750 сек.

[0050] На Фиг. 9 изображен график, показывающий, что mAb3 не связывается с антигеном и не наблюдается никаких изменений сигнала BLI. Связывание mAb3 с биотинилированным антигеном в присутствии возрастающих концентраций HSA наблюдалось с помощью биослойной интерферометрии в присутствии 10 (·) и 137 (∩) мМ NaCl. Наблюдаемый сигнал (в нм), в отличие от нормализованного отклика, представлен как функция концентрации HSA. Эксперименты проводили в двух повторностях, и показаны среднее значение и стандартное отклонение.

[0051] На Фиг. 10 изображен набор схем, демонстрирующих различия между идеальным, разбавленным и наполовину разбавленным растворами.

[0052] На Фиг. 11 изображен набор схем, демонстрирующих, что наполовину разбавленные растворы не являются эквивалентами концентрированным растворам.

[0053] На Фиг. 12 изображена схема, показывающая общую систему биослойной интерферометрии для измерения взаимодействий антител в присутствии агентов молекулярного краудинга и антигена в соответствии с раскрытыми вариантами осуществления.

[0054] На Фиг. 13 изображена схема, показывающая общую систему биослойной интерферометрии для измерения взаимодействий антител в присутствии агентов молекулярного краудинга и FcRn в соответствии с раскрытыми вариантами осуществления.

[0055] На Фиг. 14 изображен график, показывающий воздействие HSA на связывание антитела с FcRn.

[0056] На Фиг. 15А и 15В изображены графики, показывающие кривые доза-ответ

воздействия HSA в присутствии разных концентраций соли.

[0057] На Фиг. 16 изображен график, показывающий кривые доза-ответ воздействия HSA для двух разных антител +/- FA.

[0058] На Фиг. 17 изображено выравнивание последовательностей дикого типа и мутации YTE.

[0059] На Фиг. 18 изображен график, показывающий кривую доза-ответ воздействия HSA на связывание mAb к C5 с FcRn.

[0060] На Фиг. 19 изображен график, показывающий кривую доза-ответ воздействия HSA на связывание mAb к вирусу Зика с FcRn.

[0061] На Фиг. 20 изображен набор графиков, показывающих кривые доза-ответ воздействия HSA на мутантов с увеличенным временем полужизни.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0062] Перед тем как продолжить описание настоящего изобретения, необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут комбинироваться друг с другом, и такие комбинации в явном виде охватываются объемом настоящего изобретения.

[0063] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается средним специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин «около» касательно конкретного цитируемого числового значения означает, что данное значение может отличаться от цитируемого значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает в себя 99 и 101, и все значения между ними (*например*, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т. д.).

[0064] Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в этом описании, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Сокращения, используемые в данном документе

[0065] AUC: аналитическое ультрацентрифугирование

[0066] ЯМР: ядерный магнитный резонанс

[0067] MALS: многоугловое статическое рассеяние света

[0068] CG-MALS: многоугловое рассеяние света с градиентом состава

[0069] HSA: сывороточный альбумин человека

[0070] mAb: Моноклональные антитела

[0071] BLI: биослойная интерферометрия

[0072] SA: стрептавидин

[0073] CVC: перекрестный вириальный коэффициент

[0074] MBP: мальтозосвязывающий белок

[0075] FcRn: неонатальный рецептор Fc [0076] FelD1: основной кошачий аллерген

Определения

[0077] Термин «антитело», используемый в данном документе, предназначен для обозначения иммуноглобулиновых молекул, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т. е. «полными молекулами антител»), а также их мультимерами (*например*, IgM) или их антигенсвязывающими фрагментами. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может представлять собой изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь является изотипом IgG1 или IgG4, необязательно включая в себя химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, например, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Обзор структуры антител см. в Lefranc et al., IM GT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, 27(1) Dev Comp Immunol. 55-77 (2003); и M. Potter, Structural correlates of Immunoglobulin diversity, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

[0078] Термин антитело также охватывает «биспецифическое антитело»¹, включающее в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими различными эпитопами. Одна половина биспецифического антитела, включающая в себя одну тяжелую цепь, одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может

связывать один и тот же антиген, но разными эпитопами или не перекрывающимися эпитопами. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют одинаковые легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в публ. заявки на патент США № 2010/0331527(30 декабря, 2010 г.).

[0079] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «антигенсвязывающий фрагмент») относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела, включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241 : 544-546), который состоит из домена VH; (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области VL и VH создают пару с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[0080] Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

[0081] «Fc-слитые белки» содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), было описано, например, у Ashkenazi et al., (1991) 88 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 10535; Byrn et al., (1990) 344 Nature 677; и Hollenbaugh et al., (1992) “Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins”, в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11. «Рецепторные Fc-слитые белки» включают в себя один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которым следуют домены CH₂ и CH₃ иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушку ИЛ-1 (например, рилоноцепт, который содержит область, связывающую лиганд ИЛ-1R_{АСР}, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R₁, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004), или ловушку ФРЭС (например, афлиберцепт, который содержит Ig-подобный домен-2 рецептора ФРЭС Flt1, слитого с Ig-подобным

доменом 3 рецептора ФРЭС Flk1, слитого с Fc из hIgG1; см. патент США № 7087411 (выданный 8 августа 2006 г.) и патент США № 7279159 (выданный 9 октября 2007 г.).

[0082] Термин «антитело человека» предназначено для включения в себя антител, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в данном документе, не предназначен для включения в себя mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Этот термин включает в себя антитела, рекомбинантно полученные в организме отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Данный термин не включает в себя антитела, выделенные у человека-субъекта или полученные от него.

[0083] «Биослойная интерферометрия» или «BLI» представляет собой не использующую метки технологию для измерения биомолекулярных взаимодействий (см., например, Current Biosensor Technologies in Drug Discovery. Cooper, M. A Drug Discovery World, 2006, 68-82 и Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis Rich, R. L ; Myszka, D G. Analytical Biochemistry, 2007, 361, 1-6). BLI представляет собой оптический аналитический способ, который анализирует интерферограмму света, отраженного от двух поверхностей, например, слоя иммобилизованных биомолекул на наконечнике биосенсора и внутреннего слоя сравнения. Изменение количества биомолекул-мишеней, связанных с наконечником биосенсора, вызывает сдвиг в интерферограмме, который может быть измерен в режиме реального времени.

[0084] Связывание между захватывающей молекулой, иммобилизованной на поверхности наконечника биосенсора, и биомолекулой-мишенью в растворе приводит к увеличению толщины наконечника биосенсора, что вызывает сдвиг длины волны. Типичные приборы для BLI можно приобрести коммерчески, например, у ForteBio, г. Фримонт, штат Калифорния.

[0085] Термин «приведение в контакт», используемый в данном документе, относится к размещению в непосредственной физической ассоциации. Приведение в контакт может происходить *in vitro*, например, с образцами, такими как биологические образцы, содержащие биомолекулу-мишень, такую как антитело.

Общее описание

[0086] С точки зрения биологической среды кровь является сложным густым раствором, состоящим из сотен различных молекул. Понимание неспецифических взаимодействий между белками в подобных неидеальных условиях является ключевым для получения более полной картины функции белка в биологическом контексте.

Измерение активности белка в густой среде имеет, таким образом, первостепенное значение, и для изучения поведения молекул в густых растворах ранее использовались такие способы, как аналитическое ультрацентрифугирование (AUG) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР) (Heddi, B. & Phan, A. T. Structure of human telomeric DNA in crowded solution. *J Am Chem Soc* 133, 9824-9833, doi:10.1021/ja200786q (2011), Martorell, G., Adraver, M., Kelly, G., Temussi, P. A. & Pastore, A. A natural and readily available crowding agent: NMR studies of proteins in hen egg white. *Proteins* 79, 1408-1415, doi:10.1002/prot.22967 (2011), Rivas, G., Fernandez, J. A. & Minton, A. P. Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment, and biological significance *Biochemistry* 38, 9379-9388, doi:10.1021/bi990355z (1999), Rivas, G. & Minton, A. P. Non-ideal tracer sedimentation equilibrium: a powerful tool for the characterization of macromolecular interactions in crowded solutions. *Journal of molecular recognition : JMR* 17, 362-367, doi:10.1002/jmr.708 (2004), Pielak, G. J. et al. Protein nuclear magnetic resonance under physiological conditions *Biochemistry* 48, 226-234, doi:10.1021/bi8018948 (2009), Wright, R. T., Hayes, D. B., Stafford, W. F., Sherwood, P. J. & Correia, J. J. Characterization of therapeutic antibodies in the presence of human serum proteins by AU-FDS analytical ultracentrifugation. *Analytical biochemistry* 550, 72-83, doi:10.1016/j.ab.2018.04.002 (2018)). Однако такие способы обладают некоторыми недостатками; AUG занимает много времени и на эксперименты могут уходить дни, а ЯМР имеет ограничения в отношении ионной силы образцов и потребления материалов.

[0087] Воздействие макромолекулярного краудинга на термодинамические и кинетические свойства белков является удивительно сложным и его трудно спрогнозировать (Elcock, A. H. Prediction of functionally important residues based solely on the computed energetics of protein structure *J Mol Biol* 312, 885-896, doi:10.1006/jmbi.2001.5009 (2001), Candotti, M. & Orozco, M. The Differential Response of Proteins to Macromolecular Crowding. *PLoS Comput Biol* 12, e1005040, doi:10.1371/journal.pcbi.1005040 (2016), Minton, A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media *The Journal of biological chemistry* 276, 10577-10580, doi:10.1074/jbc.R100005200 (2001), Zimmerman, S. B. & Minton, A. P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 27-65, doi:10.1146/annurev.bb.22.060193.000331 (1993)). Основным и неизбежным последствием является стерическая эксклюзия, также называемая эффектом исключенного объема, которая, как правило, обеспечивает больший потенциал для ассоциации макромолекул с целью увеличения объема, доступного для всех молекул. Различные физико-химические свойства белков, включая размер, форму, поверхностные свойства и свойства присущего заряда, а также состояние сольватации способствуют общим неспецифическим взаимодействиям. Более того, электростатические взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса, анизотропия заряда (моменты локального диполя) и гидрофобные взаимодействия

модулируют общий эффект, возможно противоположным образом. Наконец, неспецифические взаимодействия в значительной степени зависят от условий раствора (например, pH и ионной силы; инертных соразтворенных веществ) и в определенных случаях могут изменяться с чисто отталкивающих взаимодействий на притягивающие взаимодействия (Zhang, Z., Witham, S. & Alexov, E. On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys Biol* 8, 035001, doi: 10.1088/1478-3975/8/3/035001 (2011), Elcock, A. H. & McCammon, J A Calculation of weak protein-protein interactions: the pH dependence of the second virial coefficient. *Biophys J* 80, 613-625, doi:10.1016/S0006-3495(01)76042-0 (2001), Blanco, M A , Perevozchikova, T , Martorana, V , Manno, M & Roberts, C. J. Protein-protein interactions in dilute to concentrated solutions: alpha-chymotrypsinogen in acidic conditions *J Phys Chem B* 118, 5817-5831, doi: 10.1021/jp412301h (2014)). Таким образом, в растворе, содержащем иначе не взаимодействующие белки, неидеальность, которая обусловлена высокой концентрацией белков, может приводить к заметному уровню гетероассоциации или может поддерживать более высоко дисперсное распределение растворенных веществ.

[0088] Последствия термодинамической неидеальности многообразны. С точки зрения получения и состава антител, когда конечная презентация молекулы часто превышает 100 г/л, было продемонстрировано, что неидеальность меняет различные характеристики белкового раствора, включая вязкость, растворимость, фазовое разделение и самоассоциацию (Salmas, B. A. et al. Understanding and modulating opalescence and viscosity in a monoclonal antibody formulation. *J Pharm Sci* 99, 82-93, doi: 10.1002/jps.21797 (2010), Connolly, B. D. et al. Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions: high-throughput analysis using the diffusion interaction parameter. *Biophys J* 103, 69-78, doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.047 (2012), Liu, J., Nguyen, M D., Andya, J D & Shire, S J Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution *J Pharm Sci* 94, 1928-1940, doi:10.1002/jps.20347 (2005), Raut, A. S. & Kalonia, D. S. Pharmaceutical Perspective on Opalescence and Liquid-Liquid Phase Separation в Protein Solutions *Mol Pharm* 13, 1431-1444, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00937 (2016)). В отношении специфических сред биологических систем, включая внутриклеточную среду, внеклеточный матрикс и циркулирующую кровь, макромолекулярный краудинг влияет не только на равновесие связывания, но также и на скорости реакции, укладку и изомеризацию белка, взаимодействия белок-белок, а также на общий клеточный гомеостаз (Spitzer, J. From water and ions to crowded biomacromolecules: in vivo structuring of a prokaryotic cell. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 491-506, вторая страница таблицы содержания, doi: 10.1128/MMBR.00010-11 (2011), van den Berg, J., Boersma, A J. & Poolman, B. Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 15, 309-318, doi:10.1038/nrmicro.2017.17 (2017), Zhou, H. X., Rivas, G. & Minton, A P Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Ann Rev Biophys* 37, 375-397, doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817 (2008). Например, для теоретического

моделирования клеточного осмотического равновесия, которое влияет на осмотический транспорт в клетку и из нее, необходимо учитывать неидеальную внутриклеточную термодинамику, обусловленную густой клеточной средой (Ross-Rodriguez, L. U., Elliott, J. A. & McGann, L. E. Non-ideal solution thermodynamics of cytoplasm. *Biopreserv Biobank* 10, 462-471, doi: 10.1089/bio.2012.0027 (2012)). Кроме того, макромолекулярный краудинг может влиять на клеточную патологию: было продемонстрировано, что в густых средах происходит ускоренное амилоидное образование (Hatters, D. M., Minton, A. P. & Howlett, G. J. Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II. *The Journal of biological chemistry* 277, 7824-7830, doi:10.1074/jbc.M110429200 (2002), Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T. & Lansbury, P. T., Jr Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291, doi: 10.1038/418291a (2002), Munishkma, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N. & Fink, A. L. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *Journal of molecular recognition : JMR* 17, 456-464, doi:10.1002/jmr.699 (2004)). Состав физиологических сред часто создает помехи для аналитических методов, обычно используемых для определения вириальных коэффициентов. Таким образом, феномен термодинамической неидеальности и обусловленные им последствия имеют как практическое, так и биологическое значение.

[0089] Биотерапевтические белки, такие как моноклональные антитела, обычно вводятся в высоких концентрациях в кровь, которая по своей природе представляет собой сложный и густой раствор со значительным содержанием белка. Воздействие макромолекулярного краудинга и полученная в результате белковая неидеальность могут приводить к заметному уровню неспецифической гетероассоциации в подобном физиологическом ландшафте (см. Фиг. 11 и 12). Поэтому разработка способа для понимания неспецифических взаимодействий между белками в таких неидеальных условиях краудинга, которые в значительной степени отличаются от условий, обычно используемых для характеристики *in vitro*, является важной для получения более полной картины функции белка в биологическом контексте. С этой целью настоящее изобретение относится к разработке модельной системы для изучения воздействий молекулярного краудинга на взаимодействие биологически активных молекул (например, антител, биспецифических антител, слитых белков, слитых белков Fc-рецептора) с их распознаваемыми партнерами по связыванию, например, на взаимодействия антитело-антиген или рецептор-лиганд. Как описано в данном документе, путем определения взаимодействий, *например*, связывания, между этими молекулами в растворе, который имитирует среду *in vivo*, можно получить информацию о поведении этих молекул, прежде чем запускать дорогостоящие исследования *in vivo* и/или клинические исследования. Такую информацию можно использовать для принятия обоснованных решений о том, какие молекулы или соединения следует рассматривать в качестве прототипов для будущих терапевтических агентов.

[0090] Сывороточный альбумин человека (HSA) является одним из наиболее

распространенных белков в системе кровообращения человека, составляя примерно половину содержания белка в плазме крови. Относительное содержание HSA и его роль во многочисленных биологических процессах явились причиной изучения его потенциальных взаимодействий с биотерапевтическими средствами и, что более важно, изучения того, как эти взаимодействия могут повлиять на биологическую активность таких биотерапевтических средств у субъекта. Кроме того, так как альбумин имеет отрицательный заряд при физиологическом уровне pH, это создает возможность для неспецифических электростатических взаимодействий между HSA и биотерапевтическими средствами, несущими общий положительный заряд, или большими положительными поверхностями, подвергающимися воздействию растворителя.

[0091] Неспецифические взаимодействия между сывороточным альбумином человека (HSA) и двумя рекомбинантными моноклональными антителами (mAb), а также влияние таких взаимодействий на связывание mAb с антигеном, продемонстрированы в данном документе. С помощью биослойной интерферометрии (BLI) оценивали воздействие HSA на связывание mAb с антигеном в присутствии физиологических концентраций HSA с целью показать, что такие неспецифические взаимодействия оказывают функциональное влияние на взаимодействия mAb-антиген. Важно отметить, что замена Фиколла 70 (агент, используемый во многих экспериментах молекулярного краудинга) на HSA не дала аналогичных результатов. Это демонстрирует, что HSA оказывает воздействие, выходящее за рамки молекулярного краудинга, например, вследствие электростатических взаимодействий. Описанные в данном документе данные *in vitro* демонстрируют, что высокие концентрации HSA в сыворотке крови, вероятно, приводят к неспецифическим взаимодействиям с mAb *in vivo*, оказывая потенциальное влияние на их аффинность к антигену, а также с другими функционально значимыми белками, включая Fc-рецепторы. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что способы на основе BLI, описанные в данном документе, могут использоваться для определения влияния неспецифических взаимодействий белок-белок на специфические биологически значимые взаимодействия, обеспечивая прямой способ для оценки событий связывания в условиях краудинга.

[0092] Аспекты настоящего описания относятся к способу определения воздействия неспецифических взаимодействий на поведение биомолекул, такое как специфическое связывание антитела с антигеном и/или его эпитопом, в условиях, которые имитируют условия *in vivo*. Например, способы, описанные в данном документе, могут использоваться для того, чтобы спрогнозировать, будет ли потенциальная терапевтическая биомолекула, такая как моноклональное антитело, вступать в неспецифические взаимодействия *in vivo*, которые могут ингибировать ее функцию, например, путем снижения эффективной концентрации и, таким образом, эффективности потенциальной терапевтической биомолекулы. Таким образом, в данном документе описан способ оценки воздействия неспецифических взаимодействий в моделируемых условиях *in vivo* (пример системы см. на Фиг. 12). В вариантах осуществления способ

включает в себя приведение в контакт раствора, содержащего биологически значимый агент молекулярного краудинга и биомолекулу-мишень, с биосенсором. Поверхность биосенсора включает в себя захватывающую молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью, так что связывание биомолекулы-мишени с биосенсором (опосредованное захватывающей молекулой) можно оценить и/или определить. В различных вариантах осуществления биосенсор оставляли инкубироваться в растворе в течение времени, достаточного для связывания биомолекулы-мишени с захватывающей молекулой, например, при достижении равновесия. Количество биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, затем определяли с помощью, *например*, биослойной интерферометрии (см., например, Фиг. 4А и 4В). В вариантах осуществления количество биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, сравнивают с контролем, таким как пороговое значение, которое позволяет отличить биомолекулу-мишень, имеющую притягивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе, от биомолекулы-мишени, имеющей отталкивающие неспецифические взаимодействия с другими молекулами в растворе. Биомолекула-мишень ниже порогового значения, которая имеет неспецифическое притяжение, может быть менее желательной, чем биомолекула выше порогового значения, которая не проявляет (или проявляет в меньшей степени) такие неспецифические взаимодействия. Таким образом, способ может использоваться для идентификации биомолекул-мишеней, которые лучше подходят для условий *in vivo*, которые могут быть обнаружены у субъекта, которому вводится идентифицированная биомолекула-мишень. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение представляет собой нормализованный отклик, например, нормализованный по раствору, который не содержит или содержит очень малое количество агента молекулярного краудинга, и/или по идеальному, разбавленному или наполовину разбавленному раствору. В некоторых вариантах осуществления биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сывороточный альбумин человека (HSA), а величина связывания нормализована к связыванию, которое наблюдается при низкой концентрации HSA, такой как от около 0,0001 г/л HSA до 0,1 г/л HSA, например, в условиях, которые близки или имитируют условия идеального, разбавленного или наполовину разбавленного раствора. В этом примере пороговое значение будет установлено как 1, что соответствует отсутствию общих притягивающих или отталкивающих сил. Молекула с нормализованным откликом менее 1 может считаться такой, которая имеет неспецифические взаимодействия с биологически значимым агентом молекулярного краудинга, например, с HSA, и можно пересмотреть возможность проведения дополнительных исследований с целью оценки терапевтического потенциала. И наоборот, молекула с нормализованным откликом более 1 может считаться такой, которая не имеет значительных неспецифических взаимодействий с биологически значимым агентом молекулярного краудинга, например, с HSA, и может рассматриваться как имеющая больший терапевтический потенциал, что требует дополнительной оценки. В вариантах

осуществления HSA присутствует в растворе в физиологически значимой концентрации. В других вариантах осуществления (таких как описаны выше или в данном документе в связи с HSA) агент молекулярного краудинга выбран из IgG, трансферрина, фибриногена, IgA, α 2-макроглобулина, IgM, α 1-антитрипсина, гаптоглобина, α 1-кислого гликопротеина, аполипопротеина A-1, аполипопротеина A-11, плазмы, сыворотки или любых других белковых компонентов, присутствующих в образцах крови или сыворотки.

[0093] В определенных вариантах осуществления HSA присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л, такой как около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/л HSA, например, около 35-50, 25-40 или 10-80 г/л HSA. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют при различных концентрациях биологически значимого агента молекулярного краудинга, например, от около 1 г/л до около 100 г/л HSA, например, чтобы определить отклик молекулы-мишени на повышение концентраций HSA (см., например, Фиг. 5А и 5В). В вариантах осуществления способ включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций агента молекулярного краудинга, например, чтобы создать кривую зависимости ответа от дозы.

[0094] В вариантах осуществления HSA загружен жирной кислотой (ЖК), например, чтобы определить воздействие ЖК. В некоторых вариантах осуществления раствор включает в себя физиологические компоненты (или дополнительные физиологические компоненты), такие как IgG, трансферрин, фибриноген, IgA, α 2-макроглобулин, IgM, α 1-антитрипсин, гаптоглобин, α 1-кислый гликопротеин, аполипопротеин A-1, аполипопротеин A-11 или любые другие белковые компоненты, присутствующие в образцах крови или сыворотки. В вариантах осуществления биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

[0095] В вариантах осуществления раствор имеет физиологический уровень pH, такой как один уровень pH, приблизительно равный нейтральному pH. Однако подразумевается, что способы могут осуществляться при множестве уровней pH. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания при двух или более уровнях pH для определения зависимости связывания от pH.

[0096] В вариантах осуществления раствор имеет физиологическую концентрацию соли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций соли для определения зависимости связывания от соли.

[0097] Описанные способы могут использоваться для определения связывания пары биологически значимых молекул в условиях, которые имитируют неспецифические взаимодействия среды *in vivo*. В вариантах осуществления молекула-мишень содержит моноклональное антитело, а захватывающая молекула содержит антиген, который специфически связывается с моноклональным антителом, например, с высокой

аффинностью. В вариантах осуществления молекула-мишень содержит антиген, такой как иммуноген на основе белка, а захватывающая молекула содержит моноклональное антитело, которое специфически связывается с антигеном. В определенных вариантах осуществления биологическая молекула-мишень представляет собой набор мутантных моноклональных антител с увеличенным временем полужизни. В определенных вариантах осуществления молекула-мишень содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, а захватывающая молекула содержит лиганд, который специфически связывается с рецептором или его лиганд-связывающим фрагментом. В определенных вариантах осуществления молекула-мишень содержит лиганд, а захватывающая молекула содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, который специфически связывается с лигандом.

[0098] Аспекты данного описания дополнительно относятся к способу выбора биомолекулы в моделируемых условиях *in vivo*. Описанный способ можно использовать для скрининга набора биомолекул, такого как набор потенциально пригодных терапевтических моноклональных антител, для дополнительного изучения, например, в доклинических или клинических исследованиях. В вариантах осуществления способ включает в себя приведение в контакт раствора, содержащего биологически значимый агент молекулярного краудинга и молекулу-мишень (такую как первая биомолекула-мишень), с биосенсором. Поверхность биосенсора включает в себя захватывающую молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью, так что связывание биомолекулы-мишени с биосенсором (опосредованное захватывающей молекулой) можно оценить и/или определить. В вариантах осуществления первая биомолекула-мишень выбрана из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул-мишеней. Биосенсор оставляют инкубироваться в растворе в течение времени, достаточного для связывания биомолекулы-мишени с захватывающей молекулой, например, при достижении равновесия. Количество биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, затем определяют с помощью биослойной интерферометрии.

[0099] В вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя приведение в контакт раствора, например, второго раствора, моделирующего условия *in vivo*, с биосенсором, причем второй раствор включает в себя вторую биомолекулу-мишень, выбранную из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул. Биосенсор оставляют инкубироваться в растворе в течение времени, достаточного для связывания второй биомолекулы-мишени с захватывающей молекулой, например, при достижении равновесия. Количество второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, затем определяют с помощью биослойной интерферометрии. В вариантах осуществления количество второй биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, сравнивают с количеством первой биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, с целью определить, какая из первой биомолекулы и второй биомолекулы демонстрирует большую степень связывания, например, чтобы классифицировать эти биомолекулы (например, антитела, биспецифические антитела или слитые белки) с точки

зрения их соответствующего связывания с захватывающей молекулой в биологически значимом агенте молекулярного краудинга. Предполагается, что этот процесс можно повторять для любого количества биомолекул из набора интересующих биомолекул, такого как набор интересующих моноклональных антител. Классификацию можно использовать, чтобы выбрать моноклональные антитела из набора для проведения дальнейшего анализа. В определенных вариантах осуществления биомолекулу выбирают, исходя из совместимости *in vivo*. В вариантах осуществления второй раствор, или третий, четвертый и т.д., является идентичным первому раствору за исключением присутствия отдельных биомолекул-мишеней. Таким образом, способы, описанные в данном документе, можно использовать для сравнения связывания двух или более биомолекул-мишеней, таких как два или более моноклональных антител, выбранных из набора моноклональных антител, специфичных для захватывающей молекулы. В вариантах осуществления количество первой и/или второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой можно сравнить с контролем, как описано выше.

[00100] В определенных вариантах осуществления биологически значимый агент молекулярного краудинга (например, HSA) присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л, такой как около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/л, например, около 35-50, 25-40 или 10-80 г/л. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют при различных концентрациях биологически значимого агента молекулярного краудинга, например, от около 1 г/л до около 100 г/л, например, чтобы определить отклик молекул-мишеней на повышение концентраций агента молекулярного краудинга. В вариантах осуществления способ включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций агента молекулярного краудинга, например, чтобы создать кривую зависимости ответа от дозы.

[00101] В вариантах осуществления агент молекулярного краудинга представляет собой HSA или HSA загружен жирной кислотой (ЖК), например, чтобы определить воздействие ЖК. В вариантах осуществления раствор включает в себя физиологические компоненты или дополнительные физиологические компоненты, такие как IgG, трансферрин, фибриноген, IgA, α 2-макроглобулин, IgM, α 1-антитрипсин, гаптоглобин, α 1-кислый гликопротеин, аполипопротеин А-1, аполипопротеин А-11 или любые другие белковые компоненты, присутствующие в образцах крови или сыворотки. В вариантах осуществления биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

[00102] В вариантах осуществления раствор имеет физиологический уровень pH, такой как один уровень pH, приблизительно равный нейтральному pH. Однако подразумевается, что способы могут осуществляться при множестве уровней pH. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания при двух или более уровнях pH для определения зависимости связывания от pH.

[00103] В вариантах осуществления раствор имеет физиологическую концентрацию соли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций соли для определения зависимости связывания от соли.

[00104] Захватывающие молекулы могут быть присоединены к биосенсорам посредством любого количества способов, включая ковалентное присоединение и/или химическое сшивание. Биомолекулы-мишени могут затем быть присоединены к биосенсору посредством специфического связывания с захватывающим зондом. Манипуляции с биосенсорами, реагентами и реакционными сосудами могут выполняться с помощью робота. Захват биомолекул-мишеней биосенсором основывается на специфическом распознавании молекул-мишеней, включая, например, специфическую аффинность антитела к антигену. Выбранные захватывающие молекулы иммобилизуют на подходящем субстрате любым способом, доступным специалисту в данной области техники. Например, захватывающие молекулы могут быть непосредственно связаны с выбранной функциональной группой на субстрате. Альтернативно, захватывающие молекулы могут быть опосредованно связаны с субстратом посредством линкера или спейсера. Как показано на Фиг. 12, стрептавидин связан с поверхностью биосенсора, а захватывающая молекула привлекается на биосенсор посредством связывания стрептавидина с биотином (биотинилированный антиген в примере, показанном на Фиг. 12). В некоторых случаях выбранная захватывающая молекула может быть иммобилизована посредством связи со стрептавидином (или биотином) и последующего присоединения к субстрату с помощью биотинового (или стрептавидинового) фрагмента, который ковалентно связан с субстратом. В определенных вариантах осуществления захватывающая молекула связана с поверхностью сенсора посредством линкера. В определенных вариантах осуществления линкер содержит биотин и стрептавидин или авидин. В примере молекула-мишень представляет собой антитело, такое как гуманизированное антитело, а захватывающая молекула представляет собой антитело к Fc IgG, такое как антитело к Fc IgG человека.

ПРИМЕРЫ

[00105] Следующие примеры приводятся с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы по данному изобретению, однако они не претендуют на ограничение объема того, что авторы рассматривают как свое изобретение. Были предприняты меры для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температура, и *т. д.*), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны быть учтены. Если не указано иное, части целого представляют собой массовые доли, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура равна около 25 °С, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Измерение воздействия молекулярного краудинга на функцию белка с

помощью биослойной интерферометрии.

[00106] Несмотря на высокую сложность на молекулярном уровне, отклонение от идеальности, которое наблюдается при умеренно высоких уровнях концентрации белка (порядка 10 г/л), может быть удобно выражено с помощью второго осмотического вириального коэффициента (Neal, B. L, Asthagiri, D & Lenhoff, A. M. *Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins*. *Biophys J* 75, 2469-2477, doi:10.1016/S0006-3495(98)77691-X (1998)). Первый (B_{22}) и перекрестный (B_{23}) вириальные коэффициенты характеризуют слабые, неспецифические взаимодействия белок-белок в растворах, содержащих один или несколько видов белков, соответственно. Многоугловое статическое рассеяние света (MALS) - это первый принципиальный аналитический метод, позволяющий определять молярную массу различных макромолекул, включая белки, в идеальном пределе. Методы статического рассеяние света, таким образом, широко используются для определения второго вириального коэффициента, который отображает общие взаимодействия (белок-белок и белок-растворенное вещество) и эффекты исключенного объема для всех видов в растворе, исходя из зависимости молярной массы от концентрации (Alford, J. R., Kendrick, B. S., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. *Measurement of the second osmotic virial coefficient for protein solutions exhibiting monomer-dimer equilibrium*. *Analytical biochemistry* 377, 128-133, doi:10.1016/j.ab.2008.03.032 (2008)). При многоугловом рассеянии света с градиентом состава (CG-MALS) детектор рассеяния света помещается ниже автоматической системы шприцевой помпы, способной при необходимости одновременно вводить до трех разных растворов, каждый из которых содержит разные молекулы (Some, D , Kenrick, S. in *Protein Interactions* (ed Jianfeng Cai) (InTech, 2012)). В таком пакетном режиме определяется средневзвешенная молярная масса всех растворенных веществ в растворе, которая может обеспечить количественный анализ взаимодействий связывания при ограниченном предшествующем уровне техники. Было разработано несколько вариантов реализации CG-MALS с целью охарактеризовать специфические и неспецифические взаимодействия между белками и другими макромолекулами. В случае неспецифических взаимодействий белок-белок система CG-MALS обладает преимуществом, которое заключается в получении первого вириального коэффициента, а также перекрестного вириального коэффициента в ходе одного эксперимента. Надежность этого метода, а также хорошо зарекомендовавший себя используемый алгоритм анализа обеспечивают эффективное и относительно простое определение характеристик взаимодействий в белковых растворах в некотором диапазоне концентраций (Some, D , Pollastrini, J. & Cao, S *Characterizing Reversible Protein Association at Moderately High Concentration Via Composition-Gradient Static Light Scattering*. *J Pharm Sci* 105, 2310-2318, doi:10.1016/j.xphs.2016.05.018 (2016))

[00107] Метод CG-MALS является очень удобным для определения степени и характера неспецифических взаимодействий между двумя видами; однако анализ данных становится более трудоемким и менее точным для таких систем, когда концентрации превышают 10 г/л. Это привело к поиску альтернативного способа, который мог бы

расширить диапазон концентраций до физиологически значимых, а также расширить исследования для включения влияния неспецифических взаимодействий на события специфического функционального связывания. Биослойная интерферометрия (BLI) представляет собой не использующую метки оптическую технологию для измерения специфических взаимодействий макромолекул, включая определение кинетических свойств и аффинности связывания (Abdiche, Y., Malashock, D., Pinkerton, A. & Pons, J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, *the Octet Analytical biochemistry* 377, 209-217, doi:10.1016/j.ab.2008.03.035 (2008), Fang, Y., Li, G. & Feme, A. M. Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 55, 314-322, doi:10.1016/j.vascn.2006.11.001 (2007), Rich, R. L & Myszka, D. G Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature. *Journal of molecular recognition : JMR* 20, 300-366, doi:10.1002/jmr 862 (2007)). BLI анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от внутреннего эталонного слоя, а также от слоя иммобилизованного белка на наконечнике биосенсора (т.е. биослоя). События связывания повышают количество молекул на биослое, вызывая изменение интерференционной картины, которое можно отслеживать в реальном времени. Данный способ используется для оценки взаимодействий белок-белок (Shah, N. B & Duncan, T M. Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e51383, doi: 10 3791/51383 (2014)), взаимодействий белок-лиганд (Frenzel, D. & Willbold, D. Kinetic titration series with bilayer interferometry. *PloS one* 9, e106882, doi:10.1371/journal_pone.0106882 (2014)), взаимодействий белок-нуклеиновая кислота (Park, S et al. Structural Basis for Interaction of the Tandem Zinc Finger Domains of Human Muscleblind with Cognate RNA from Human Cardiac Troponin T *Biochemistry* 56, 4154-4168, doi:10.1021/acs.biochem.7b00484 (2017), Sultana, A. & Lee, J E. Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by bilayer interferometry. *Current protocols in protein science* 79, 19 25 11-26, doi:10.1002/0471140864.ps1925s79 (2015)) и скрининга малых молекул и пептидов (Wartchow, C. A. et al. Biosensor-based small molecule fragment screening with bilayer interferometry *Journal of computer-aided molecular design* 25, 669-676, doi: 10.1007/s10822-011- 9439-8 (2011)), среди прочего.

[00108] В данном документе описаны способы измерения влияния неспецифических взаимодействий на взаимодействия mAb с антигеном в густых растворах с использованием сывороточного альбумина человека (HSA), чтобы продемонстрировать эти принципы в упрощенной системе. Альбумин составляет значительную часть объемной доли в сыворотке при физиологическом диапазоне концентраций 35-50 г/л и является отрицательно заряженным при физиологическом pH, что может привести к электростатическому притяжению (или отталкиванию) с биотерапевтическими средствами, несущими общий положительный (или отрицательный) заряд или поверхность, подвергающуюся воздействию растворителя. С этой целью были

изучены неспецифические взаимодействия между HSA и двумя рекомбинантными полностью человеческими моноклональными антителами IgG4 (mAb1 и mAb2), которые связываются с одним и тем же антигеном, сначала в бинарной (HSA и mAb) системе с помощью CG-MALS, а затем в тройной (HSA, mAb, антиген) системе с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Такие mAb очень похожи своими последовательностями, за исключением определяющей комплементарности области (CDR), которая нацелена на разные эпитопы на антигене. Используя хорошо зарекомендовавшие себя методы рассеяния света, бинарная система продемонстрировала, что неспецифические взаимодействия между HSA и mAb в присутствии субфизиологических концентраций белка зависят от ионной силы, а также являются mAb-специфическими. С целью дальнейшего изучения воздействия таких взаимодействий на функциональные свойства mAb BLI использовали нестандартным образом для оценки связывания mAb с антигеном в присутствии концентраций HSA в диапазоне от низких до физиологических. Результаты BLI коррелировали с данными CG-MALS, а это демонстрирует, что такое новое применение BLI в присутствии высоких концентраций HSA позволяет непосредственно оценивать влияние неспецифических взаимодействий, обусловленных краудингом, на высоко специфичное функциональное взаимодействие, такое как связывание антитела с антигеном. Результаты, представленные в данном документе, демонстрируют, что высокие концентрации HSA в сыворотке крови приводят к неспецифическим взаимодействиям с mAb, оказывая потенциальное влияние на функцию антитела. В то время как воздействие особенно очевидно при низкой ионной силе, оно уменьшается при физиологической ионной силе для этого конкретного набора mAb; однако такая тенденция не обязательно распространяется на все остальные системы mAb:антиген. Используя данный подход на ранней стадии разработки биотерапевтических средств, можно с легкостью определить воздействие неспецифических взаимодействий; с другой стороны, такого рода изучение может также снять опасения в отношении непредвиденных последствий *in vivo*. Используя платформу BLI с адаптированным анализом в простой контролируемой системе, авторы изобретения продемонстрировали, что функциональное влияние неспецифических взаимодействий можно определить путем введения этапа изучения многообразия последствий, к которым могут приводить молекулярный краудинг и неидеальность белка в более сложных растворах.

[00109] Получение материалов и реагентов. Все моноклональные антитела, используемые в данном исследовании, имели высокую чистоту и были изготовлены компанией Regeneron Pharmaceuticals, Inc. в подразделении доклинического производства и технологических разработок (Гарритаун, штат Нью-Йорк, США). Все антитела являются полностью человеческими молекулами IgG4 и содержат мутацию S108P в шарнирной области, чтобы воссоздать шарнирную последовательность IgG1 для стабилизации образования димера IgG4. Антитела были получены из запатентованной компанией Regeneron клеточной линии, клонированной из клеток яичника китайского хомячка.

Лиофилизированный сывороточный альбумин человека (HSA), Фиколл 70 и компоненты раствора были получены от компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США) или VWR (Раднор, штат Пенсильвания, США) и имели наивысшее качество.

[00110] Мономерный HSA получали путем растворения лиофилизированного HSA в фосфатном буфере (1,8 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Na_2HPO_4 , 2,7 мМ KCl, pH 7,4), дополненном 10 мМ NaCl и очищенном на эксклюзионной колонке HiLoad 26/100 Superdex 200 (GE Healthcare, Литл Чалфонт, Великобритания), уравновешенной в том же буфере. После очистки HSA концентрировали до около 100-130 г/л, используя центробежное фильтрующее устройство с отсечением 10 кДа (Amicon, Биллерика, штат Массачусетс, США). Для эксперимента CG-MALS антитела получали аналогичным образом. Концентрацию HSA определяли с помощью спектрофотометра SoloVPE при $УФ_{\lambda=280\text{нм}}$, используя коэффициент экстинкции $35\,700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Для измерений VLI исходный раствор (1 г/л) mAb получали путем разбавления состава с высокой концентрацией mAb (> 50 г/л) фосфатным буфером, дополненным 10 мМ NaCl, и использовали при конечной концентрации 40 нМ в равновесных экспериментах. Концентрации белка определяли при $УФ_{\lambda=280\text{нм}}$, используя коэффициент экстинкции $103\,555\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для mAb1 и $100\,700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для mAb2. Исходный раствор (600 мМ) Фиколла 70 получали путем растворения лиофилизированного Фиколла 70 в фосфатном буфере, дополненном 10 мМ NaCl, и осторожного вращения в течение ночи, чтобы способствовать сольubilизации. Антиген биотинилировали гидразидом биотина (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс, США) в соответствии с протоколом мечения производителя.

[00111] Гликопротеиновый антиген биотинилировали на одном гликане гидразидом биотина (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс, США) в соответствии с протоколом мечения производителя. Вкратце, раствор 8 г/л метапериодата натрия (Sigma-Aldrich) получали с использованием 0,1 М ацетата натрия, pH 4,7, и смешивали с антигеном, вращая в фольге при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем гасили 1% (об./об.) глицерином. Окисленный антиген элюировали через колонку Superdex 75 Increase 10/300 (GE Healthcare, Литл Чалфонт, Великобритания) в 0,1 М фосфате натрия, pH 6,0. Фракции, содержащие антиген, объединяли и концентрировали, а затем инкубировали с 10-кратным молярным избытком гидразида биотина в течение 2 часов при комнатной температуре. Меченный антиген элюировали через ту же колонку, уравновешенную фосфатным буфером при pH 7,4, дополненным 10 мМ NaCl.

[00112] Слабая катионообменная хроматография. Слабую катионообменную хроматографию проводили на колонке для жидкостной хроматографии ProPac WCX-10 (4 мм x 250 мм) (Thermo Fisher), уравновешенной 200 мМ MES, 20 мМ NaCl, pH 6,5. Белки инъецировали в чистом виде и 10 мкг каждого образца наносили на колонку в системе ACQUITY UPLC (Waters, Милфорд, штат Массачусетс, США) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Градиент в диапазоне от 20 до 500 мМ NaCl использовали для элюирования белка.

[00113] Многоугловое рассеяние света с градиентом состава (CG-MALS). Все

белки диализовали в течение ночи в присутствии соответствующего буфера; все буферы пропускали через фильтр 0,02 мкм, а все образцы белка пропускали через шприцевые фильтры 0,1 мкм Anotop 25 Plus (Уолтем, Мейдстон, Великобритания) и дегазировали под вакуумом при ~25 мм. рт.ст. в течение 10 минут перед использованием. Исходные белковые растворы вручную разбавляли до приблизительно 10 г/л перед фильтрацией. Система градиентного состава Calypso в сочетании с фотометром MALS miniDAWN TREOS и встроенным дифференциальным рефрактометром Optilab T-rEX (система Calypso и оба детектора от компании Wyatt Technology, Санта-Барбара, штат Калифорния, США) использовалась для сбора измерений статического рассеяния света HSA, mAb и их смесей, используя схему перекрестного градиента. Вкратце, насосная система Calypso была запрограммирована на автоматическое разбавление и введение HSA в концентрациях от 1 до 10 г/л с шагом повышения 1 г/л (10 введений, или этапов). При введении неразбавленного (10 г/л) HSA концентрацию HSA снижали на 10%, а концентрацию mAb повышали на 10% (перекрестный период) в серии из десяти введений. После введения неразбавленного mAb (10 г/л) его концентрацию снижали с шагом уменьшения 1 г/л в серии из девяти введений. Хотя такая концентрация не отображает физиологические условия, это максимальная оптимальная концентрация, рекомендованная для определения перекрестного вириального коэффициента. На каждом этапе болюс объемом 2 мл соответствующим образом разбавленного/смешанного образца вводили для полного насыщения проточных кювет детектора; данные получали в течение 90 секунд в условиях равновесия, прежде чем создать и вводить последующую концентрацию/смесь. Измерения на исходном уровне получали сразу же до и после программы градиента. После подтверждения отсутствия значительного рассеяния света с угловой зависимостью в анализе использовали только данные от детектора рассеяния света под углом 90°. Управление прибором, получение данных, а также анализ данных (Some, D., Kenrick, S. in Protein Interactions (ed Jianfeng Cai) (In Tech, 2012), Some, D. Light-scattering- based analysis of biomolecular interactions *Biophys Rev* 5, 147-158, doi: 10.1007/s12551-013- 0107-1 (2013)) выполняли с помощью программного обеспечения Calypso (Wyatt Technology).

[00114] Биослойная интерферометрия. Испытания биослойной интерферометрии проводились с помощью Octet Red96 с биосенсорными наконечниками (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния, США Menlo Park, CA), покрытыми стрептавидином (SA, номер по кат. 18-5019) или антителом к Fc IgG человека (АНС, номер по кат. 18-5064). 96-луночные планшеты заполняли 200 мкл раствора (буфер, антиген, HSA или mAb) и перемешивали со скоростью 1000 об./мин, все эксперименты проводились с контролируемой температурой при 25°C. Более высоких температур избегали из-за испарения растворов. Во всех тестах наконечники с SA или антителом к Fc человека гидратировали в фосфатном буфере, pH 7,4, дополненном низкой (10 mM NaCl) или физиологической (137 mM NaCl) концентрацией соли, в течение 20 минут при комнатной температуре. Все описанные буферы и растворы образца содержали 0,1 г/л HSA, если не указано иное.

Вычитание исходного уровня выполняли при погружении наконечников в буфер в отсутствие аналита.

[00115] Стандартные эксперименты, измеряющие связывание антигена с загруженными антителом наконечниками, проводились с использованием наконечников АНС. После исходного измерения наконечников АНС в фосфатном буфере, содержащем низкую или физиологическую концентрацию соли, дополненном 0,1 г/л HSA, в течение 2 минут наконечники инкубировали в 2,5 мкг/мл антитела до получения отклика $\sim 0,6$ нм. Загруженные антителом наконечники затем погружали в буфер для удаления избыточного mAb в течение 2 мин с последующим этапом ассоциации в течение 100-300 сек в присутствии различных концентраций немеченного антигена, как правило, 2,5-50 нМ. Наконечники погружали в буфер на 750 сек для проведения этапа диссоциации. Такой же процедуры придерживались для биотинилированного антигена в присутствии 10 мМ и 137 мМ NaCl для обоих mAb.

[00116] Стандартные тесты связывания, измеряющие связывание антитела с загруженными антигеном наконечниками, проводились с использованием наконечников со стрептавидином. После исходного измерения наконечников со стрептавидином в фосфатном буферном растворе с низкой или физиологической концентрацией соли, содержащем 0,1 г/л HSA, в течение 2 минут наконечники инкубировали в 5 мкг/мл биотинилированного антигена до получения отклика $\sim 0,6$ нм. Загруженные антигеном наконечники затем погружали в буфер для удаления избыточного антигена в течение 2 мин с последующим этапом ассоциации в течение 900 сек в присутствии различных концентраций немеченного антигена, как правило, 2,5-50 нМ. Наконечники погружали в буфер на 1800-3600 сек для проведения этапа диссоциации. Такой же процедуры придерживались для 10 мМ и 137 мМ NaCl для обоих mAb.

[00117] Для проведения анализа связывания mAb с антигеном в равновесном состоянии в присутствии до 50 г/л HSA потребовался дополнительный этап инкубации в HSA. После загрузки антигена сенсоры погружали в лунки, содержащие 0,1-50 г/л HSA для уравнивания в течение ~ 15 мин с последующей 2-минутной инкубацией в свежем растворе с таким же составом для определения нового исходного уровня вследствие незначительного увеличения сигнала при инкубации HSA (см. Фиг. 7, этап B). Сенсоры затем погружали в лунки, содержащие 40 нМ mAb плюс 0,1-50 г/л HSA, в течение 20 минут в качестве второго этапа ассоциации. Во всех равновесных экспериментах в качестве показателя использовали ответный сигнал (нм) после завершения этапа ассоциации связывания mAb с антигеном. Ни в одном из экспериментов, измеряющих связывания mAb с антигеном в присутствии HSA $> 0,1$ г/л, не проводили кинетический анализ. Данные нормализовали к 1,0, разделив необработанный отклик (в нм), полученный для каждой концентрации HSA, на необработанный отклик связывания mAb с антигеном в присутствии 0,1 г/л HSA. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) проводили с использованием программного обеспечения JMP (SAS Institute, Кэри, Северная Каролина,

США) для каждого условия с целью оценки статистической значимости различий между mAb1 и mAb2 путем определения p-значений.

[00118] Эксперименты, включающие в себя Фиколл 70, проводили аналогичным образом, заменив HSA на Фиколл 70. В экспериментах, включающих в себя 200 г/л или выше Фиколла 70, вследствие повышенной вязкости требовалось более длительное время ассоциации для связывания mAb с антигеном (~1,7-3 часа), чтобы достичь равновесия.

[00119] *Зависимость от ионной силы неспецифических взаимодействий mAb1/HSA и mAb2/HSA.* Неспецифические взаимодействия между HSA и каждым mAb при разных значениях ионной силы изучали с помощью многоуглового рассеяния света с градиентом состава (CG-MALS), которое является хорошо известным подходом для определения перекрестного вириального коэффициента (CVC). Данный подход использовали для определения как степени, так и характера неспецифических взаимодействий между HSA и mAb перед проведением анализа методом BLI, чтобы наилучшим образом интерпретировать данные. Исходя из строгих принципов термодинамики, несколько исследователей указали, что вириальный коэффициент, определенный на основании статического рассеяния света, не является сам по себе чистым, или перекрестным параметром взаимодействия, а скорее связан со взаимодействиями белка и соразтворенного вещества (т.е. буфера или электролита) (Alford, J. R., Kendrick, B. S., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. Measurement of the second osmotic virial coefficient for protein solutions exhibiting monomer- dimer equilibrium. *Analytical biochemistry* 377, 128-133, doi: 10.1016/j.ab.2008.03.032 (2008), Deszczynski, M., Harding, S. E. & Winzor, D. J. Negative second virial coefficients as predictors of protein crystal growth: evidence from sedimentation equilibrium studies that refutes the designation of those light scattering parameters as osmotic virial coefficients. *Biophys Chem* 120, 106-113, doi:10.1016/j.bpc.2005.10.003 (2006), Winzor, D. J., Deszczynski, M., Harding, S. E. & Wills, P. R. Nonequivalence of second virial coefficients from sedimentation equilibrium and static light scattering studies of protein solutions. *Biophys Chem* 128, 46-55, doi:10.1016/j.bpc.2007.03.001 (2007)). Таким образом, предпочтительным будет обозначить вириальный коэффициент из анализа рассеяния света как A_2 , чтобы отличать его от моляльного состояния (B_{22}). При условии что белки не являются высокозаряженными, а соразтворенные вещества представляют собой простые буферы и электролиты, числовые различия между A_2 (используемый в данном документе) и B_{22} являются минимальными. Аналогичным образом, CVC из измерений рассеяния света, или A_{23} , является индикатором характера и степени неспецифических взаимодействий между двумя видами, его измеряют для взаимодействий mAb1/HSA и mAb2/HSA в буферных растворах, содержащих 10-750 mM NaCl (Фиг. 1). Отрицательное значение A_{23} указывает на притягивающие силы между двумя видами, тогда как положительное значение указывает на отталкивающие силы. При концентрации 10 mM NaCl как mAb1/HSA, так и mAb2/HSA продемонстрировали притягивающие силы, при этом более сильное взаимодействие наблюдалось между mAb1/HSA по сравнению с mAb2/HSA. Данный феномен уменьшался

при увеличении ионной силы. При физиологической ионной силе (~137 mM NaCl) неспецифические взаимодействия между mAb1 и HSA были слегка притягивающими, а между mAb2 и HSA - слегка отталкивающими. Это показывает зависимость неспецифических взаимодействий с HSA как от ионной силы, так и от mAb. Чтобы определить роль электростатики в этих взаимодействиях, молекулы оценивали с помощью ионообменной хроматографии.

[00120] Хроматографические методы демонстрируют, что mAb1 и mAb2 имеют различные поверхностные свойства. Поверхностные свойства mAb1 и mAb2 были изучены с целью определить, может ли отличающаяся степень неспецифического взаимодействия с HSA быть обусловлена взаимодействиями дальнего порядка заряд-заряд между молекулами. Затем проводили слабую катионообменную хроматографию, чтобы более конкретно оценить поверхностные свойства двух mAb. Эти эксперименты показали, что время удерживания у mAb1 (~13 мин) было намного большим, чем у mAb2 (~6 мин), что указывает на более сильные взаимодействия с заряженной смолой колонки (Фиг. 2). Аналогично, оценивали хроматографический профиль для HSA, который элюировали при очень малом времени удерживания (~2 мин) по сравнению с двумя mAb, что указывает на более кислый характер поверхностного заряда. Оценка mAb с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий показала минимальные отличия объема элюции (данные не показаны), указывая на то, что отличия неспецифических взаимодействий между mAb и HSA скорее являются электростатическими по своей природе, а не обусловлены гидрофобным взаимодействием. Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что поверхностные свойства каждого mAb могут играть важную роль в степени и характере неспецифических взаимодействий с HSA. С целью дальнейшей оценки этих взаимодействий, а также их влияния на функциональные свойства mAb использовали биослойную интерферометрию, чтобы изучить аффинность связывания mAb с антигеном в отсутствие и в присутствии HSA.

[00121] Два mAb связываются с биотинилированным антигеном с аналогичной аффинностью связывания, используя биослойную интерферометрию. Чтобы оценить воздействие физиологически значимых уровней HSA на связывающие свойства двух mAb, использовали биослойную интерферометрию (BLI) для отслеживания ассоциации mAb с их общим антигеном. Чтобы испытать систему и реагенты проводили стандартные эксперименты по измерению аффинности, используя биосенсорные наконечники с антителом к Fc IgG человека (АНС) и загружая mAb1 или mAb2 на наконечник, и измеряли связывание с антигеном (Фиг. 8А-8Н) (немодифицированным или биотинилированным антигеном) в присутствии низкой и физиологической концентрации соли. Данные этих экспериментов обобщены в таблице 1 и демонстрируют высокое сходство с полученными ранее данными поверхностного плазмонного резонанса (ППР) Віасоге (данные не показаны) по отношению к k_{on} , k_{off} и K_D .

[00122] Таблица 1. Параметры кинетики связывания, полученные на основании кинетических анализов, выполненных с помощью BLI с использованием биосенсорных

наконечников с антителом к Fc человека

| Биосенсор | Лиганд | Аналит | Соль | K_a ($\times 10^5$ 1/Мс) | K_d ($\times 10^4$ 1/с) | K_D ($\times 10^9$ М) |
|-----------|--------|------------|--------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| АНС | mAb1 | антиген | 10 мМ | 12,0±0,2 | 6,0±0,05 | 0,5±0,009 |
| АНС | mAb1 | антиген | 137 мМ | 7,2±0,1 | 4,8±0,04 | 0,7±0,01 |
| АНС | mAb1 | Vi-антиген | 10 мМ | 9,7±0,07 | 2,0±0,02 | 0,2±0,002 |
| АНС | mAb1 | Vi-антиген | 137 мМ | 3,8±0,03 | 2,1±0,02 | 0,6±0,06 |
| АНС | mAb2 | антиген | 10 мМ | 4,6±0,04 | 0,9±0,02 | 0,2±0,006 |
| АНС | mAb2 | антиген | 137 мМ | 3,0±0,02 | 3,2±0,02 | 1,1±0,09 |
| АНС | mAb2 | Vi-антиген | 10 мМ | 3,0±0,01 | 1,3±0,006 | 0,4±0,002 |
| АНС | mAb2 | Vi-антиген | 137 мМ | 1,3±0,006 | 5,6±0,005 | 0,4±0,004 |

[00123] Стандартные эксперименты по измерению avidности проводили с биосенсорными наконечниками, загруженными антигеном, чтобы определить связывание с антителом. С этой целью антиген сайт-специфически биотинилировали и загружали на покрытый стрептавидином биосенсорный наконечник. Иммуобилизовав вместо mAb меньший антиген, изменение отклика (в нм) в результате связывания антитела дало более выраженный сигнал и, таким образом, обеспечило лучшее соотношение сигнал/шум. На Фиг. 3 показаны результаты стандартного теста BLI, выполненного с целью определить аффинность связывания для каждого mAb в условиях идеального раствора. Медленная кинетика диссоциации не позволяет дать точную оценку кажущейся K_D , однако прочное связывание указывает на субнаномолярную функциональную avidность связывания, что соответствует данным ППР Viacore (не показаны).

[00124] Установив, что кинетические тесты связывания, выполненные в условиях идеального раствора и в экспериментальных условиях, дают сопоставимые результаты с ранее проведенными исследованиями ППР Viacore (данные не показаны) и что полученные реагенты являются полностью активными, изучили связывание mAb с биотинилированным антигеном в присутствии высоких физиологически значимых концентраций HSA. Благодаря уровню отклика связывания с антигеном в присутствии концентрации 40 нМ mAb, которая позволяет отслеживать уменьшение и увеличение сигнала и значительно ниже приблизительной физиологической концентрации дозирования ~550 нМ, данная концентрация была выбрана для всех последующих экспериментов связывания.

[00125] Общее воздействие HSA на связывание mAb с антигеном зависит от ионной силы и является mAb-специфическим. Чтобы изучить воздействие HSA на связывание mAb с антигеном, проводили тест BLI в условиях неидеального раствора и анализировали данные конечной точки в равновесном состоянии. Отслеживая уровень отклика в равновесном состоянии (нм) после длительного (20 мин) этапа ассоциации с каждым mAb, определяли достигнутый уровень связывания с антигеном в присутствии HSA в равновесном или почти равновесном состоянии. Кинетический анализ (скорость ассоциации и диссоциации) не проводили из-за характера avidности и дополнительной

сложности, обусловленной возрастающими концентрациями HSA. Был также проведен контрольный анализ только с HSA в отсутствие антитела (данные не показаны), чтобы продемонстрировать, что HSA не взаимодействует с антигеном. На Фиг. 4 показаны сенсограммы для mAb1 и mAb2 в присутствии и в отсутствие 10 г/л HSA при 10 мМ или 137 мМ NaCl. Эти данные качественно показывают разницу воздействия HSA при двух значениях ионной силы для двух mAb, демонстрируя как зависимость от ионной силы, так и различия взаимодействий mAb с HSA. При низкой концентрации соли HSA сильнее влияет на mAb1, чем на mAb2, что отражается в разнице отклика при добавлении HSA. При физиологической концентрации соли воздействие 10 г/л HSA на взаимодействие любого из mAb с антигеном является минимальным. Эти результаты коррелируют с данными CG-MALS, описанными выше, и демонстрируют потенциальное воздействие на функциональные свойства mAb.

[00126] Влияние возрастающих концентраций HSA дополнительно проиллюстрировано при низкой и физиологической концентрации соли (Фиг. 5), где уровень отклика в равновесном состоянии различных концентраций HSA был нормализован к уровню 0,1 г/л HSA. При 10 мМ NaCl у mAb2 наблюдалось умеренное снижение отклика (т.е. ослабление связывания с антигеном) в присутствии возрастающих концентраций HSA (~20%), тогда как mAb1 демонстрировал более резкое снижение (~40%; Фиг. 5A, таблица 2). При 137 мМ NaCl оба mAb продемонстрировали умеренное усиление связывания с антигеном в присутствии концентраций HSA ниже 20 г/л; в присутствии более высоких концентраций HSA воздействие HSA на связывание с антигеном было сильнее в случае mAb1 по сравнению с mAb2 (Фиг. 5B, таблица 3). В сравнении с откликом связывания mAb в отсутствие HSA (отмечен пунктирной линией на Фиг. 5B) сигнал mAb1 был на ~10% слабее, тогда как сигнал mAb2 был на ~6% сильнее в присутствии физиологического диапазона концентраций HSA (35-50 г/л, таблица 4). Наблюдаемые события связывания были специфичными для связывания с антигеном; контрольное mAb (mAb3), которое не связывается с этим антигеном, не продемонстрировало увеличение сигнала, или связывания, в присутствии от 0,1 до 50 г/л HSA (Фиг. 9).

[00127] Таблица 2. Нормализованные значения для отклика связывания в присутствии HSA в 10 мМ NaCl.

| HSA (г/л) | mAb1 | | mAb2 | |
|-----------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,1 | 1,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 1,0 | 0,82 | 0,04 | 0,98 | 0,03 |
| 10,0 | 0,62 | 0,03 | 0,91 | 0,04 |
| 20,0 | 0,58 | 0,03 | 0,85 | 0,04 |
| 35,0 | 0,58 | 0,02 | 0,86 | 0,02 |

| | | | | |
|------|------|------|------|------|
| 50,0 | 0,59 | 0,05 | 0,80 | 0,01 |
|------|------|------|------|------|

[00128] Таблица 3. Нормализованные значения для отклика связывания в присутствии HSA в 137 мМ NaCl.

| HSA (г/л) | mAb1 | | mAb2 | |
|-----------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,1 | 1,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 1,0 | 1,07 | 0,01 | 1,08 | 0,01 |
| 10,0 | 1,09 | 0,01 | 1,10 | 0,01 |
| 20,0 | 1,01 | 0,01 | 1,07 | 0,02 |
| 35,0 | 0,93 | 0,02 | 1,06 | 0,01 |
| 50,0 | 0,92 | 0,02 | 1,06 | 0,02 |

[00129] Таблица 4. Обобщенные результаты дисперсионного анализа ANOVA для mAb1 и mAb2 в HSA.

| HSA (г/л) | Концентрация соли (мМ) | р-значение |
|-----------|------------------------|------------|
| 0,1 | 10 | - |
| 1,0 | 10 | 0,0052* |
| 10,0 | 10 | <,0001* |
| 20,0 | 10 | 0,0009* |
| 35,0 | 10 | <,0001* |
| 50,0 | 10 | 0,0022* |
| 0,1 | 137 | - |
| 1,0 | 137 | 0,1374 |
| 10,0 | 137 | 0,2435 |
| 20,0 | 137 | 0,0035* |
| 35,0 | 137 | 0,0003* |
| 50,0 | 137 | 0,0010* |

* обозначает р-значение < 0,05

[00130] Агент молекулярного краудинга Фиколл 70 не оказывает такого же воздействия на связывание mAb с антигеном. Чтобы определить, вызвано ли наблюдаемое воздействие HSA на связывание mAb с антигеном неспецифическими взаимодействиями между mAb и HSA или более общим воздействием макромолекулярного краудинга, связывание mAb с антигеном оценивали в присутствии эквивалентных концентраций Фиколла 70, высокорастворимого полисахарида, часто используемого в качестве агента молекулярного краудинга (Zhou, H. X., Rivas, G. & Minton, A. P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences *Annu Rev Biophys* 37, 375-397, doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817 (2008)). Фиколл 70 представляет собой бесцветный полимер ~70 кДа, который специфически не взаимодействует с белками. Незначительные изменения или их отсутствие наблюдали в отношении нормализованного отклика связывания mAb1 и mAb2 с антигеном при 10 и

137 мМ NaCl в присутствии концентрации Фиколла 70, эквивалентной концентрациям, используемым в экспериментах с HSA (0-50 г/л, Фиг. 6). Связывание также оценивали в присутствии концентраций Фиколла 70, в большей степени отражающих концентрации, использованные в исследованиях краудинга (100-300 г/л, Фиг. 6). Как и ожидалось, медленная кинетика связывания mAb с антигеном в присутствии таких концентраций Фиколла 70, в частности, в случае mAb1, требовала продления фазы ассоциации для достижения уровней отклика в почти равновесном состоянии (общее время было ограничено до ~3 часов с целью предотвратить любое испарение растворов в лунках; Фиг. 6C и 6D). Как при низкой, так и при физиологической концентрации соли минимальное и очень похожее воздействие на связывание антигена наблюдалось в присутствии всех концентраций Фиколла. Эти данные позволяют предположить, что воздействие на связывание антигена, наблюдаемое с HSA, скорее всего является следствием электростатических взаимодействий между HSA и mAb, а не более общего феномена эффекта исключенного объема.

[00131] Таблица 5. Нормализованные значения для отклика связывания в присутствии Фиколла 70 в 10 мМ NaCl.

| Фиколл 70 (г/л) | mAb1 | | mAb2 | |
|-----------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,1 | 1,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 1,0 | 0,99 | 0,01 | 1,02 | 0,06 |
| 10,0 | 0,96 | 0,01 | 1,04 | 0,11 |
| 20,0 | 0,94 | 0,00 | 0,98 | 0,01 |
| 35,0 | 0,95 | 0,01 | 0,97 | 0,03 |
| 50,0 | 0,94 | 0,01 | 0,96 | 0,00 |
| 100,0 | 0,89 | 0,01 | 0,96 | 0,00 |
| 200,0 | 0,87 | 0,02 | 0,95 | 0,01 |
| 300,0 | 0,93 | 0,02 | 1,04 | 0,01 |

[00132] Таблица 6. Нормализованные значения для отклика связывания в присутствии Фиколла 70 в 137 мМ NaCl

| Фиколл 70 (г/л) | mAb1 | | mAb2 | |
|-----------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,1 | 1,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 |
| 1,0 | 0,86 | 0,04 | 1,10 | 0,10 |
| 10,0 | 0,90 | 0,02 | 1,13 | 0,07 |
| 20,0 | 1,00 | 0,04 | 1,08 | 0,02 |

| | | | | |
|-------|------|------|------|------|
| 35,0 | 0,97 | 0,02 | 1,09 | 0,03 |
| 50,0 | 1,01 | 0,02 | 1,11 | 0,06 |
| 100,0 | 0,93 | 0,01 | 0,96 | 0,00 |
| 200 0 | 0,94 | 0,05 | 1,05 | 0,01 |
| 300,0 | 0,91 | 0,02 | 1,01 | 0,01 |

[00133] Таблица 7. Обобщенные результаты дисперсионного анализа ANOVA для mAb1 и mAb2 в Фиколле.

| Фиколл (г/л) | Концентрация соли (мМ) | p-значение |
|--------------|------------------------|------------|
| 0,1 | 10 | - |
| 1,0 | 10 | 0,5394 |
| 10,0 | 10 | 0,2182 |
| 20,0 | 10 | 0,0010* |
| 35,0 | 10 | 0,1414 |
| 50,0 | 10 | 0,0072* |
| 100,0 | 10 | 0,0009* |
| 200 0 | 10 | 0,0050* |
| 300,0 | 10 | 0,0011* |
| 0,1 | 137 | - |
| 1,0 | 137 | 0,0172* |
| 10,0 | 137 | 0,0046* |
| 20,0 | 137 | 0,0251* |
| 35,0 | 137 | 0,0069* |
| 50,0 | 137 | 0,0674 |
| 100,0 | 137 | 0,0070* |
| 200,0 | 137 | 0,0222* |
| 300,0 | 137 | 0,0011* |

* обозначает p-значение < 0,05

[00134] Макромолекулярный краудинг широко распространен в биологии. Возникающие в результате неидеальные взаимодействия между белками в густых растворах предположительно сильно влияют на поведение и функцию белков (Minton A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *The Journal of biological chemistry* 276, 10577- 10580, doi: 10.1074/jbc.R100005200 (2001), Hu, Z., Jiang, J. & Rajagopalan, R. Effects of macromolecular crowding on biochemical reaction equilibria: a molecular thermodynamic perspective *Biophys J* 93, 1464-1473, doi:10.1529/biophysj. 107 104646 (2007), Wei, J., Dobnikar, J., Curk, T. & Song, F. The Effect of Attractive Interactions and Macromolecular Crowding on Crystallins Association. *PloS one* 11, e0151159, doi:10.1371 /journal pone 0151159 (2016)). Специфический характер этих в высшей степени нелинейных воздействий часто трудно предсказать, о чем свидетельствуют расхождения в выводах, сделанных в нескольких отчетах. (Kuznetsova, I M , Turoverov, K. K. & Uversky, V. N. What macromolecular crowding can do to a protein, *int J Mol Sci* 15, 23090-23140, doi:10.3390/ijms151223090 (2014), Minton, A. P. Implications of macromolecular crowding for protein assembly *Curr Opin Struct Biol* 10, 34-39 (2000)). Ограниченное количество исследований с использованием

различных агентов макромолекулярного краудинга продемонстрировали значительное влияние на равновесные константы и скорости реакций, часто порядка нескольких логарифмов (Minton, A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media *The Journal of biological chemistry* 276, 10577-10580, doi:10.1074/jbc.R100005200 (2001), Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. & Uversky, V. N. What macromolecular crowding can do to a protein *Int J Mol Sci* 15, 23090-23140, doi:10.3390/ijms151223090 (2014), Minton, A. P. Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol* 295, 127-149 (1998), Kim, J. S. & Yethiraj, A. Effect of macromolecular crowding on reaction rates: a computational and theoretical study. *Biophys J* 96, 1333-1340, doi:10.1016/j.bpj.2008.11.030 (2009), Jiao, M., Li, H. T., Chen, J., Minton, A. P. & Liang, Y. Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria *Biophys J* 99, 914-923, doi:10.1016/j.bpj.2010.05.013 (2010)). Все вместе это указывает на потребность в методах, способных легко предоставлять информацию про воздействие неидеальности в условиях, с высокой точностью имитирующих физиологические среды. В данном документе изучалось, каким образом физиологические концентрации альбумина влияют на функцию моноклональных антител, с помощью двух взаимодополняющих методов: CG-MALS и BLI. CG-MALS, мощный и хорошо зарекомендовавший себя инструмент, позволяющий измерять перекрестный вириальный коэффициент между двумя видами, использовали для получения первоначального понимания неспецифических взаимодействий в системах. Затем использовали метод BLI, адаптировав анализ в равновесном состоянии к условиям неидеального раствора, чтобы сначала реплицировать результаты CG-MALS, а затем расширить эти наблюдения путем проведения равновесных измерений связывания с антигеном в присутствии физиологических концентраций HSA. В то время как ортогональные методы, такие как AUC с обнаружением флуоресценции, могут измерять специфические взаимодействия в неидеальных условиях (Wright, R. T., Hayes, D. B., Stafford, W. F., Sherwood, P. J. & Correia, J. J. Characterization of therapeutic antibodies in the presence of human serum proteins by AU-FDS analytical ultracentrifugation *Analytical biochemistry* 550, 72-83, doi: 10.1016/j.ab.2018.04.002 (2018), Wright, R. T., Hayes, D., Sherwood, P. J., Stafford, W. F. & Correia, J. J. AUC measurements of diffusion coefficients of monoclonal antibodies in the presence of human serum proteins. *Eur Biophys J*, doi:10.1007/s00249-018-1319-x (2018)), BLI обладает преимуществом как удобный и высокопроизводительный метод оценки взаимодействий связывания со свойственной ему гибкостью с целью протестировать множество различных условий при высоких концентрациях агентов краудинга, таким образом, этот метод может предоставить информацию о связывании в различных средах в результате небольшой серии экспериментов. Такой подход является простым и эффективным способом исключения mAb или других молекул из рассмотрения в процессе скрининга на ранних стадиях исследования.

[00135] Физико-химическая сложность доступных для растворителя площадей поверхности, представленных различными белками, играет фундаментальную роль в разнообразии неспецифических макромолекулярных взаимодействий. В присутствии умеренных концентраций белка (≤ 10 г/л), когда эффект исключенного объема является менее выраженным, электростатика предположительно является доминирующей межмолекулярной силой (Elcock, A. H. & McCammon, J. A. Calculation of weak protein-protein interactions: the pH dependence of the second virial coefficient. *Biophys J* 80, 613-625, doi: 10.1016/S0006-3495(01)76042-0 (2001)). В соответствии с этим мнением с помощью CG-MALS было показано, что как mAb1, так и mAb2 при разных экспериментально наблюдаемых основных изоэлектрических точках (отличающихся приблизительно на 0,65 единиц pH) взаимодействуют с HSA, обладающим кислотной изоэлектрической точкой. Такие взаимодействия не являются специфическими, наоборот - это неспецифические взаимодействия между HSA и каждым антителом. Было показано, что для обоих антител величина взаимодействий с HSA уменьшается при увеличении ионной силы, что дополнительно позволяет предположить, что основная сила между молекулами является электростатической, так как электростатические взаимодействия могут быть эффективно подвергнуты скринингу при возрастающей ионной силе (Roberts, D. et al. Specific ion and buffer effects on protein-protein interactions of a monoclonal antibody *Mol Pharm* 12, 179-193, doi: 10.1021/mp500533c (2015); Roberts, D. et al. The role of electrostatics in protein-protein interactions of a monoclonal antibody *Mol Pharm* 11, 2475-2489, doi:10.1021/mp5002334 (2014)). Интересно отметить, что в присутствии почти физиологической ионной силы mAb1 продолжало демонстрировать притягивающие взаимодействия с HSA, тогда как mAb2 демонстрировало несколько отталкивающие взаимодействия с HSA. В то время как двухкомпонентная система, используемая в CG-MALS, не полностью отражает сложность физиологических условий и по техническим причинам использует концентрации ниже физиологических, этот анализ позволяет предположить, что степень и характер неспецифических взаимодействий между белками может влиять на биологическую функцию. Так как антитела отличаются только по CDR, возможно, что разница слабых взаимодействий с HSA обусловлена этой областью. Более того, такие неспецифические взаимодействия являются зависимыми от белка, указывая на потенциально широкий спектр функционального и структурного поведения в физиологической среде, и возможно объясняют случайные различия, наблюдаемые между результатами *in vitro* и фармакокинетическими и клиническими результатами. Молекулярно-динамическое моделирование синтетических и белковых агентов краудинга показало, что воздействие краудинга на структуру, динамику и взаимодействия белков в пределах биологической сети может способствовать временным взаимодействиям, которые могут влиять на функциональность (Candotti, M. & Orozco, M. The Differential Response of Proteins to Macromolecular Crowding. *PLoS Comput Biol* 12, e1005040, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005040 (2016)). Действительно, было выдвинуто предположение, что давление эволюционного отбора минимизирует неспецифические взаимодействия белок-белок для

уменьшения сложности и потенциала белковой разнородности (Johnson, M. E. & Hummer, G. Nonspecific binding limits the number of proteins in a cell and shapes their interaction networks *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 603-608, doi: 10.1073/pnas.1010954108 (2011), Deeds, E. J., Ashenberg, O., Gerardin, J & Shakhnovich, E. I. Robust protein-protein interactions in crowded cellular environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14952-14957, doi: 10.1073/pnas.0702766104 (2007)). Кроме того, несколько несвязанных исследований позволяют предположить, что электростатика является основной движущей силой неспецифических взаимодействий (Elcock, A. H Prediction of functionally important residues based solely on the computed energetics of protein structure. *J Mol Biol* 312, 885-896, doi: 10.1006/jmbi.2001.5009 (2001), Zhang, Z., Witham, S & Alexov, E. On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys Biol* 8, 035001, doi: 10.1088/1478-3975/8/3/035001 (2011), Gunasekaran, K. et al. Enhancing antibody Fc heteradimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *The Journal of biological chemistry* 285, 19637-19646, doi:10.1074/jbc.M110.117382 (2010), Persson, B. A., Jonsson, B. & Lund, M. Enhanced protein steering: cooperative electrostatic and van der Waals forces in antigen-antibody complexes. *J Phys Chem B* 113, 10459-10464, doi:10.1021/jp904541g (2009), Wlodek, S. T., Shen, T. & McCammon, J. A. Electrostatic steering of substrate to acetylcholinesterase: analysis of field fluctuations. *Biopolymers* 53, 265-271, doi:10.1002/(SICI)1097-0282(200003)53:3<265::AID-BIP6>3.0.CO;2-N (2000)). Данные CG-MALS и хроматографии, представленные в данном документе, дополнительно расширяют эти исследования и подчеркивают важность понимания свойств поверхностного заряда белков и потенциального воздействия электростатических взаимодействий, возникающих вследствие таких зарядов. В данном документе было продемонстрировано, что неспецифические взаимодействия могут влиять на функциональные взаимодействия, такие как события связывания антитела с антигеном.

[00136] Благодаря использованию метода тест-полосок вместо микрофлюидики биослойная интерферометрия в большей степени способствует изучению влияния неспецифических взаимодействий, вызванных высокими концентрациями растворенных веществ, на высокоспецифичные функциональные взаимодействия, такие как связывание антитела с антигеном. Иммобилизовав антиген и использовав растворы mAb, которые содержали возрастающие концентрации HSA, авторы изобретения смогли расширить условия, используемые для CG-MALS, чтобы изучить повышенную концентрацию HSA и использовать способ для определения системы тройного взаимодействия, хоть и с привязкой к авидности. Важно отметить, что как было показано, влияние физиологических концентраций HSA на связывание с антигеном было сильнее в случае mAb1, чем mAb2, при низкой ионной силе, тогда как в присутствии физиологических уровней соли воздействие HSA в значительной степени уменьшалось. Несмотря на то что степень различия между mAb при физиологической ионной силе значительно меньше, чем наблюдалось в присутствии 10 мМ соли, она является статистически значимой при 20 г/л и выше, учитывая прецизионность в пределах повторов. Хотя текущие технические

проблемы испарения растворов требуют проведения испытаний BLI при температуре окружающей среды, а не при физиологической температуре, что находится в стадии разработки, это ясно указывает на то, что описанный в данном документе метод BLI способен реплицировать и дополнять данные, полученные методами рассеяния света, которые также проводились при температуре окружающей среды по техническим причинам. Более того, неспецифические взаимодействия, наблюдаемые при CG-MALS в присутствии низкой ионной силы, действительно оказывают функциональное влияние на взаимодействия антитела с антигеном, и такое воздействие, по-видимому, стабилизируется при умеренной концентрации HSA; например, 50 г/л HSA не оказывает заметно большего влияния на связывание, чем 35 г/л. Остается неясным, является ли это общей тенденцией для большинства терапевтических mAb или других биотерапевтических средств, и требуется проведение дальнейшего изучения. Исследование, проведенное с использованием биосенсорной платформы KinExA, которая тестировала ассоциацию mAb с их нативными неочищенными антигенами в сыворотке (Bee, C., Abdiche, Y. N., Pons, J & Rajpal, A. Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *PloS one* 8, e80501, doi:10.1371/journal.pone.0080501 (2013)), продемонстрировало, что некоторые mAb обладают одинаковой кажущейся аффинностью в буфере или сыворотке, тогда как другие имеют различия в кажущейся аффинности. Эти результаты расширяют наше понимание макромолекулярного краудинга, опосредованного соразтворенными веществами белков. Несколько белков, включая лизозим, РНКазу А, альбумин и восстановленный цитозоль *E. coli*, использовали в качестве агентов макромолекулярного краудинга, часто с получением противоположных результатов. Например, было обнаружено, что самостоятельная ассоциация апомиоглобина усиливается в густых растворах РНКазы А, а не в густых растворах HSA (Zorrilla, S., Rivas, G., Acuna, A. U. & Lilio, M. P. Protein self-association in crowded protein solutions: a time-resolved fluorescence polarization study *Protein Sci* 13, 2960-2969, doi:10.1110/ps.04809404 (2004)). И наоборот, димеризация мутанта A34F GB1 усиливалась в присутствии 100 г/л БСА и снижалась в присутствии 50 г/л лизозима (Kyne, C & Crowley, P B Short Arginine Motifs Drive Protein Stickiness in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *Biochemistry* 56, 5026- 5032, doi:10.1021/acs.biochem.7b00731 (2017)). Авторы изобретения указывают на отличия зарядового состояния относительно зарядового состояния у A34F, как на основную движущую силу наблюдаемых различий между константами диссоциации. Более того, слабые гетеровзаимодействия в концентрированных растворах БСА/домен SH3 замедляли трансляционную диффузию обоих белков намного сильнее, чем ожидается от вязкости раствора (Rothe, M. et al. Transient binding accounts for apparent violation of the generalized Stokes-Einstein relation in crowded protein solutions. *Phys Chem Chem Phys* 18, 18006-18014, doi:10.1039/c6cp01056c (2016)). Вероятно, это вызвано временными событиями связывания в сроки, сопоставимые или более короткие, чем трансляционная диффузия. Вместе с представленными в данном документе результатами будет очевидно, что

временные взаимодействия могут также влиять на высокоаффинные (нМ-пМ) взаимодействия, такие как события связывания антитела с антигеном.

[00137] Синтетические полимеры, такие как ПЭГ, декстран или Фиколл, часто используются в качестве агентов краудинга; однако целью исследования является, как правило, укладка или стабильность белка (Candotti, M. & Orozco, M. The Differential Response of Proteins to Macromolecular Crowding. *PLoS Comput Biol* 12, e1005040, doi:10.1371/journal.pcbi.1005040 (2016), McGuffee, S. R. & Elcock, A. H Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm. *PLoS Comput Biol* 6, e1000694, doi: 10 1371/journal.pcbi 1000694 (2010), Mittal, S & Singh, L R. Denatured state structural property determines protein stabilization by macromolecular crowding: a thermodynamic and structural approach. *PloS one* 8, e78936, doi:10 1371/journal.pone.0078936 (2013), Zhou, H. X. Polymer crowders and protein crowders act similarly on protein folding stability *FEBS Lett* 587, 394-397, doi:10.1016/j.febslet.2013.01.030 (2013), Batra, J. Xu K Qin, S. & Zhou, H. X. Effect of macromolecular crowding on protein binding stability: modest stabilization and significant biological consequences. *Biophys J* 97, 906-911, doi:10.1016/j.bpj.2009.05.032 (2009), Senske, M. et al. Protein stabilization by macromolecular crowding through enthalpy rather than entropy. *J Am Chem Soc* 136, 9036-9041, doi: 10.1021/ja503205y (2014), Hong, J. & Gierasch, L. M. Macromolecular crowding remodels the energy landscape of a protein by favoring a more compact unfolded state. *J Am Chem Soc* 132, 10445-10452, doi: 10.1021/ja103166y (2010)). Было опубликовано относительно немного исследований касательно воздействия, которое полимеры оказывают на гетерогенные взаимодействия белок-белок (Candotti, M & Orozco, Ml. The Differential Response of Proteins to Macromolecular Crowding. *PLoS Comput Biol* 12, e1005040, doi: 10.1371/journal.pcbi. 1005040 (2016), Jiao, M., Li, H T , Chen, J , Minton, A P & Liang, Y. Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria. *Biophys J* 99, 914-923, doi: 10.1016/j bpj 2010.05.013 (2010), Phillip, Y. & Schreiber, G. Formation of protein complexes in crowded environments--from in vitro to in vivo. *FEBS Lett* 587, 1046-1052, doi:10.1016/j febslet.2013.01 007 (2013), Kozer, N., Kuttner, Y. Y., Haran, G. & Schreiber, G. Protein-protein association in polymer solutions: from dilute to semidilute to concentrated. *Biophys J* 92, 2139-2149, doi: 10.1529/biophysj.106 097717 (2007)). Опять же относительно истинного воздействия синтетических полимеров нет четкого согласованного мнения, и похоже, что общий исход является специфичным для представляющей интерес системы. Schreiber и коллеги продемонстрировали минимальное воздействие ПЭГ и декстрана на взаимодействия между барназом и барстаром или между β -лактамазой и ее белковым ингибитором, в то время как Liang вместе с сотрудниками продемонстрировали значительное воздействие полимерного краудинга на ассоциацию каталазы с супероксиддисмутазой (Jiao, M., Li, H. T., Chen, J., Minton, A. P. & Liang, Y. Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria. *Biophys J* 99, 914-923, doi: 10.1016/j.bpj.2010.05.013 (2010), Phillip, Y., Sherman, E , Haran, G & Schreiber, G Common crowding agents have only a small

effect on protein-protein interactions *Biophys J* 97, 875-885, doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.026 (2009)). Несмотря на то что влияние высокой концентрации HSA на связывание антитела с антигеном может быть обусловлено просто эффектами исключенного объема, аналогичные эксперименты, проведенные в присутствии полисахарида Фиколла 70 вместо HSA, дали разные результаты, демонстрируя незначительное воздействие на связывание или его отсутствие даже при высоких концентрациях. Разница является особенно очевидной при низкой ионной силе, что демонстрирует значительное mAb-специфическое снижение активности связывания в присутствии HSA. В густых растворах с Фиколлом воздействие является минимальным и одинаковым для двух mAb. Это указывает на то, что воздействие HSA нельзя объяснить только влиянием исключенного объема; сложность биологических систем (т.е. поверхностные свойства белков) играет значительную роль в биологических процессах. Исследования с дополнительными представляющими интерес системами, вероятно, помогут уточнить модель макромолекулярного краудинга белков.

[00138] Не удивительно, что высокие концентрации Фиколла (100 г/л и выше) замедляли кажущееся связывание обоих антител, оцениваемое по времени, требуемому для достижения равновесного состояния; однако воздействие было более сильным в случае mAb1, чем mAb2. Это указывает на дополнительное белок-специфичное воздействие на связывающие свойства системы в присутствии концентраций Фиколла, аналогичных концентрациям, использованным в обычных исследованиях краудинга в дополнение к высокой вязкости раствора. Точная причина различного воздействия высокой концентрации Фиколла на два mAb не ясна, но она может заключаться в различных предпочтительных взаимодействиях: связывании или исключении (Arakawa, T. & Timasheff, S. N. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch Biochem Biophys* 224, 169-177 (1983), Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9721-9726, doi:10.1073/pnas.122225399 (2002)). Следует отметить, что воздействие Фиколла на каждое mAb было достаточно постоянным при низкой и высокой ионной силе. Предыдущие исследования позволяют предположить, что Фиколл может переменным образом влиять на термическую стабильность и конформационную динамику молекул (Qu, Y & Bolen, D W. Efficacy of macromolecular crowding in forcing proteins to fold. *Biophys Chem* 101-102, 155-165 (2002), Sasahara, K., McPhie, P. & Minton, A P Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. *J Mol Biol* 326, 1227-1237 (2003), Stagg, L, Zhang, S. Q., Cheung, M. S. & Wittung-Stafshede, P Molecular crowding enhances native structure and stability of alpha/beta protein flavodoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18976-18981, doi:10.1073/pnas.0705127104 (2007), Tokuriki, N. et al. Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Protein Sci* 13, 125-133, doi: 10.1110/ps.03288104 (2004)), а различия между CDR двух mAb могут способствовать различным индуцированным Фиколлом эффектам на структуру или динамику, оказывая сопутствующее воздействие на

связывание. Исследование с использованием мальтозосвязывающего белка (MBP) показало, что Фиколл может связываться с белком и конкурировать со связыванием природного лиганда мальтозы (Miklos, AC, Sumpter, M. & Zhou, H. X. Competitive interactions of ligands and macromolecular crowders with maltose binding protein. PloS one 8, e74969, doi:10.1371/journal.pone.0074969 (2013)). Это демонстрирует непосредственное воздействие агентов краудинга на взаимодействия белок-лиганд, а также потенциальные последствия конкуренции со стороны других макромолекул. Однако воздействие, наблюдаемое в присутствии Фиколла, основывается на времени, требуемом для достижения равновесного состояния, а не на отклике в равновесном состоянии как таковом, демонстрируя, что полимерные (Фиколл) и белковые (HSA) агенты краудинга не обязательно дают одинаковый результат. Такие потенциальные отличия, вероятно, зависят от присущих физико-химических свойств, связанных с изучаемыми молекулами. Дополнительное исследование является необходимым для получения лучшего понимания такого комплексного феномена; более того, исследования гидратации белка или предпочтительного исключения/взаимодействия могут объяснить механизм, который стоит за таким расхождением. Полимерные агенты краудинга не оказывают систематического воздействия на связывание лиганда. Замена в этой системе белкового агента краудинга на полимеры может иметь абсолютно другое воздействие на термодинамику, поскольку это будет создавать дополнительную сложность, связанную с электростатическими взаимодействиями и другим неидеальным поведением.

[00139] Сложность и занятость объема биологических растворов вызывают значительные отклонения от идеального поведения входящих в состав молекул. Понимание неидеального поведения и неспецифических взаимодействий белков в таких условиях является ключевым для получения более полной и точной картины функционирования белков. В данном документе авторы изобретения продемонстрировали высокопроизводительный подход к характеристике функционального влияния неспецифических взаимодействий белок-белок с помощью биослойной интерферометрии, который позволяет проводить скрининг большого количества опытных образцов за относительно короткое время, используя минимальный материал. В частности, авторы изобретения изучили влияние, оказываемое физиологическими концентрациями альбумина на связывание антитела с антигеном. Присутствие альбумина оказало разное воздействие на два разных антитела, которые связываются с одним и тем же антигеном, что позволяет предположить, что биотерапевтические средства в определенных системах могут демонстрировать целый диапазон неспецифических взаимодействий с альбумином. Оценка связывания mAb с другими биологически значимыми молекулами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn), в присутствии HSA является чрезвычайно важной. FcRn способствует рециркуляции IgG и HSA в кровотоке из кислотных эндосом зависимым от pH образом (Vaughn, D. E. & Bjorkman, P. J. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. Structure 6, 63-73 (1998)), and while this process is well-understood, the potential interplay between IgG and HSA that was observed suggests a more

complex process (Wang, W. et al. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug Metab Dispos* 39, 1469-1477, doi: 10.1124/dmd.111.039453 (2011)). Наконец, являясь в значительной степени неизученной областью разработки биотерапевтических средств, характеристика неспецифических взаимодействий применительно к показанию и пути введения может выступать важным отличительным признаком в пуле основных потенциально пригодных молекул. Технология биослойной интерферометрии все чаще применяется при различных биологических проблемах, а также проблемах поиска новых лекарственных средств (Verzija, D., Riedl, T., Parren, P. & Gerritsen, A. F. A novel label-free cell-based assay technology using biolayer interferometry *Biosens Bioelectron* 87, 388-395, doi: 10.1016/j.bios.2016.08.095 (2017), Kaminski, T., Gunnarsson, A. & Geschwindner, S. Harnessing the Versatility of Optical Biosensors for Target-Based Small-Molecule Drug Discovery. *ACS Sens* 2, 10-15, doi: 10.1021/acssensors.6b00735 (2017), Yang, D., Singh, A., Wu, H. & Kroe-Barrett, R. Determination of High-affinity Antibody-antigen Binding Kinetics Using Four Biosensor Platforms *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi: 10.3791/55659 (2017)). В качестве инструмента скрининга на ранних стадиях исследования BLI можно использовать для более быстрого исключения кандидатов из процесса разработки, а также BLI может быть полезной при увеличении типов анализов, используемых в исследовании. Описанный в данном документе подход является важным инструментом, который можно использовать в комбинации с другими биофизическими методами, такими как ЯМР и АУС, чтобы лучше изучить феномен густых растворов.

Пример 2. Выбор антител из пути FcRn-опосредованной рециркуляции

[00140] FcRn увеличивает период полужизни IgG и сывороточного альбумина путем снижения лизосомальной деградации в эндотелиальных клетках. IgG, сывороточный альбумин и другие сывороточные белки непрерывно поглощаются в процессе пиноцитоза. Как правило, сывороточные белки переносятся из эндосом в лизосомы, где они расщепляются. IgG и сывороточный альбумин связываются FcRn при слабокислом pH (< 6,5) и возвращаются обратно к клеточной поверхности, где они высвобождаются при нейтральном pH (> 7,0) крови. Таким образом IgG и сывороточный альбумин избегают лизосомальной деградации. Данный механизм дает объяснение более длительному периоду полужизни в сыворотке крови IgG и сывороточного альбумина. Таким образом, следует ожидать, что те антитела, которые демонстрировали более сильное связывание FcRn в моделируемых условиях *in vivo*, будут иметь более длительный период полужизни и, следовательно, представлять собой лучшие терапевтические агенты. Тест-система для определения воздействия HSA на связывание антитела с FcRn показана на Фиг. 13. На Фиг. 14 показано, что этапы ассоциации HSA и mAb/HSA вызвали специфичный отклик связывания FcRn при pH 6,0, который является полностью обратимым при pH 7,4. На Фиг. 15A и 15B показано, что на связывание mAb1 и mAb2 с FcRn аналогичным образом влияет HSA. Воздействие является одинаковым при низкой и физиологической ионной силе. HSA ослабляет связывание mAb с FcRn при

низкой и физиологической концентрациях HSA. Описанные ниже исследования, как правило, проводятся в соответствии с тем, как описано в примере 1.

[00141] Воздействие HSA, загруженного ЖК, на связывание антитела с FcRn. Ранее сообщалось о том, что C18:1 прекращает, а C16:0 сильно снижает связывание hFcRn, тогда как C12:0 оказывает меньшее воздействие, демонстрируя, что эффективность рециркуляции связанного с ЖК HSA, вероятно, будет меньше, чем эффективность рециркуляции свободного от лиганда HSA. В данном документе эксперименты показывают (см. Фиг. 16), что связывание двух разных mAb (mAb1 и mAb2) с FcRn в присутствии ЖК:HSA будет сильнее по сравнению со связыванием с чистым HSA. Такой результат позволяет предположить, что чистый HSA связывается с FcRn с более высокой аффинностью, чем «нечистый HSA», препятствуя взаимодействию mAb с FcRn. HSA, загруженному ЖК, возможно, понадобится продолжить циркуляцию, тогда как свободному от лиганда HSA необходима рециркуляция в цитоплазму. Изменение зарядового состояния HSA, связанного с ЖК, может привести к снижению аффинности FcRn.

[00142] Различающееся воздействие HSA на связывание антител к C5 с FcRn. mAb3 представляет собой mAb к C5. Вариант этого mAb с увеличенным периодом полужизни (mAb4) содержит мутацию YTE (M252Y, S254T, T256E) (см. Фиг. 17). mAb5 и mAb6 содержат HLE-мутации KFF (H433K, N434F, Y436F) и LS (M428L, N434S), соответственно. В отличие от наблюдений для mAb1 и mAb2, HSA по-разному воздействовал на связывание различных молекул против C5 с FcRn (см. Фиг. 18). Несмотря на то что все молекулы демонстрируют ослабленное связывание с FcRn в присутствии HSA, воздействие на мутанты HLE (mAb4, mAb5 и mAb6) было оказано в меньшей степени. Было показано, что наименьшее влияние HSA оказал на связывание mAb5 с FcRn по сравнению с другими мутантами HLE.

[00143] Различающееся воздействие HSA на связывание mAb к вирусу Зика с FcRn. mAb7 представляет собой mAb к вирусу Зика без активности связывания рецептора Fev. mAb8=mAb7+мутация YTE. mAb9 представляет собой антитело к вирусу Зика со сниженной активностью связывания рецептора Fev. Только мутация YTE влияет на взаимодействия с FcRn. Как показано на Фиг. 19, связывание mAb9 с FcRn ослабляется при физиологических уровнях HSA; однако mAb9 сохраняло более высокую степень взаимодействия с FcRn по сравнению с mAb7 и mAb8 в присутствии HSA. В присутствии концентраций HSA 20 мг/мл и выше связыванию mAb7 и mAb9 с FcRn в незначительной степени мешал сигнал HSA (отрицательные значения).

[00144] Мутанты с увеличенным периодом полужизни демонстрируют более высокий уровень отклика связывания с FcRn, чем исходные mAb, в присутствии HSA. Мутанты HLE сконструированы таким образом, чтобы они имели более высокую аффинность связывания с FcRn, и как показано на Фиг. 20, в присутствии HSA такой ранговый порядок сохраняется. Мутанты KFF демонстрируют самый высокий отклик связывания в присутствии почти физиологических концентраций HSA.

[00145] Эксперименты по связыванию с FcRn демонстрируют потенциал для использования этой платформы в качестве инструмента для оценки функции mAb в физиологических условиях. Канонические эксперименты по связыванию с использованием BLI показали, что mAb1 и mAb2 имеют аналогичные аффинности связывания с FcRn в присутствии обеих концентраций соли. HSA оказывает аналогичное влияние на связывание mAb1 и mAb2 с FcRn в присутствии 10 и 137 мМ NaCl. Присутствие HSA ослабляло связывание mAb с FcRn. Мутанты YTE антител к C5 и вирусу Зика продемонстрировали повышенную аффинность связывания с FcRn, а также более слабое воздействие HSA по сравнению с диким типом. Данная методология может обеспечить платформу для понимания функции mAb в условиях, близких к физиологическим, заполнив пробел между оценками биофизического развития и ФК исследованиями.

[00146] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания и сопроводительных фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения воздействия неспецифических взаимодействий в моделируемых условиях *in vivo*, включающий в себя:

приведение в контакт раствора, содержащего биологически значимый агент молекулярного краудинга и молекулу-мишень, с биосенсором, причем поверхность биосенсора содержит захватывающую молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью;

предоставление возможности молекуле-мишени связываться с захватывающей молекулой и

определение количества молекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя:

сравнение количества биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с контрольным пороговым значением, которое позволяет различать биомолекулу-мишень, имеющую притягивающие неспецифические взаимодействия с агентом молекулярного краудинга, и биомолекулу-мишень, имеющую отталкивающие неспецифические взаимодействия с агентом молекулярного краудинга.

3. Способ по п. 2, в котором пороговое значение представляет собой нормализованный отклик по идеальному, разбавленному или наполовину разбавленному раствору.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором биологически значимый агент молекулярного краудинга представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA), IgG, трансферрин, фибриноген, IgA, α 2-макроглобулин, IgM, α 1-антитрипсин, гаптоглобин, α 1-кислый гликопротеин, аполипопротеин А-1, аполипопротеин А-11 или любые другие белковые компоненты, присутствующие в образцах крови или сыворотки.

5. Способ по п. 4, в котором агент молекулярного краудинга присутствует в физиологически значимой концентрации.

6. Способ по п. 4, в котором агент молекулярного краудинга присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л.

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций биологически значимого агента молекулярного краудинга.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий в себя определение величины связывания при двух или более уровнях pH с целью определить зависимость связывания от pH.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций соли с целью определить зависимость связывания от соли.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антиген, который специфически связывается с антителом.

12. Способ по любому из пп. 1-10, в котором молекула-мишень содержит антиген, а захватывающая молекула содержит антитело, которое специфически связывается с антигеном.

13. Способ по любому из пп. 1-10, в котором молекула-мишень содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, а захватывающая молекула содержит лиганд, который специфически связывается с рецептором или его лиганд-связывающим фрагментом.

14. Способ по любому из пп. 1-10, в котором молекула-мишень содержит лиганд, а захватывающая молекула содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, который специфически связывается с лигандом.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором захватывающая молекула связана с поверхностью сенсора посредством линкера.

16. Способ по п. 15, в котором линкер содержит биотин и стрептавидин или авидин.

17. Способ по любому из пп. 1-10, в котором молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антитело к Fc IgG.

18. Способ по п. 17, в котором антитело к Fc IgG представляет собой антитело к Fc IgG человека.

19. Способ выбора биомолекулы в моделируемых условиях *in vivo*, включающий в себя:

приведение в контакт раствора, моделирующего условия *in vivo*, с биосенсором, причем поверхность биосенсора содержит захватывающую молекулу, которая специфически связывается с биомолекулами-мишенями из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул-мишеней, и причем раствор дополнительно содержит биологически значимый агент молекулярного краудинга и первую биомолекулу-мишень, выбранную из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул-мишеней;

предоставление возможности первой биомолекуле-мишени связываться с захватывающей молекулой и

определение количества первой биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии.

20. Способ по п. 19, дополнительно включающий в себя приведение в контакт второго раствора, моделирующего условия *in vivo*, с биосенсором, причем второй раствор дополнительно содержит биологически значимый агент молекулярного краудинга и вторую биомолекулу-мишень, выбранную из набора, состоящего из двух или более интересующих биомолекул;

предоставление возможности второй биомолекуле-мишени связываться с

захватывающей молекулой;

определение количества второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с помощью биослойной интерферометрии и

сравнение количества первой биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, с количеством второй биомолекулы, связанной с захватывающей молекулой, чтобы определить, какая из первой биомолекулы и второй биомолекулы обладает большей величиной связывания.

21. Способ по п. 19 или 20, дополнительно включающий в себя:

сравнение количества первой и/или второй биомолекулы-мишени, связанной с захватывающей молекулой, с контрольным пороговым значением, которое позволяет отличить биомолекулу-мишень, имеющую притягивающие неспецифические взаимодействия с агентом молекулярного краудинга, от биомолекулы-мишени, имеющей отталкивающие неспецифические взаимодействия с агентом молекулярного краудинга.

22. Способ по п. 21, в котором пороговое значение представляет собой нормализованный отклик по идеальному, разбавленному или наполовину разбавленному раствору.

23. Способ по любому из пп. 19-22, в котором биологически значимый агент молекулярного краудинга представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA), IgG, трансферрин, фибриноген, IgA, α 2-макроглобулин, IgM, α 1-антитрипсин, гаптоглобин, α 1-кислый гликопротеин, аполипопротеин А-1, аполипопротеин А-11 или любые другие белковые компоненты, присутствующие в образцах крови или сыворотки.

24. Способ по п. 23, в котором агент молекулярного краудинга присутствует в физиологически значимой концентрации.

25. Способ по п. 23, в котором агент молекулярного краудинга присутствует в концентрации от около 1 г/л до около 100 г/л.

26. Способ по любому из пп. 19-25, дополнительно включающий в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций биологически значимого агента молекулярного краудинга.

27. Способ по любому из пп. 19-26, в котором биологически значимый агент молекулярного краудинга содержит сыворотку и/или плазму.

28. Способ по любому из пп. 19-27, дополнительно включающий в себя определение величины связывания при двух или более уровнях рН с целью определить зависимость связывания от рН.

29. Способ по любому из пп. 19-28, дополнительно включающий в себя определение величины связывания в присутствии двух или более концентраций соли с целью определить зависимость связывания от соли.

30. Способ по любому из пп. 19-29, в котором молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антиген, который специфически связывается с антителом.

31. Способ по любому из пп. 19-29, в котором молекула-мишень содержит антиген,

а захватывающая молекула содержит антитело, которое специфически связывается с антигеном.

32. Способ по любому из пп. 19-29, в котором молекула-мишень содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, а захватывающая молекула содержит лиганд, который специфически связывается с рецептором или его лиганд-связывающим фрагментом.

33. Способ по любому из пп. 19-29, в котором молекула-мишень содержит лиганд, а захватывающая молекула содержит рецептор или его лиганд-связывающий фрагмент, который специфически связывается с лигандом.

34. Способ по любому из пп. 19-33, в котором захватывающая молекула связана с поверхностью сенсора посредством линкера.

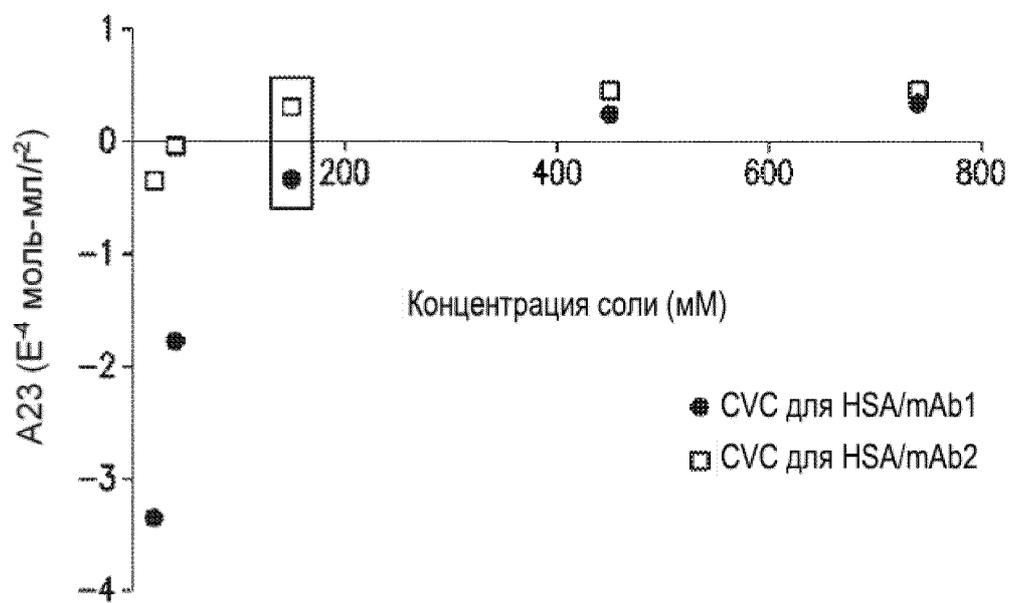
35. Способ по п. 34, в котором линкер содержит биотин и стрептавидин или авидин.

36. Способ по любому из пп. 19-29, в котором молекула-мишень содержит антитело, а захватывающая молекула содержит антитело к Fc IgG.

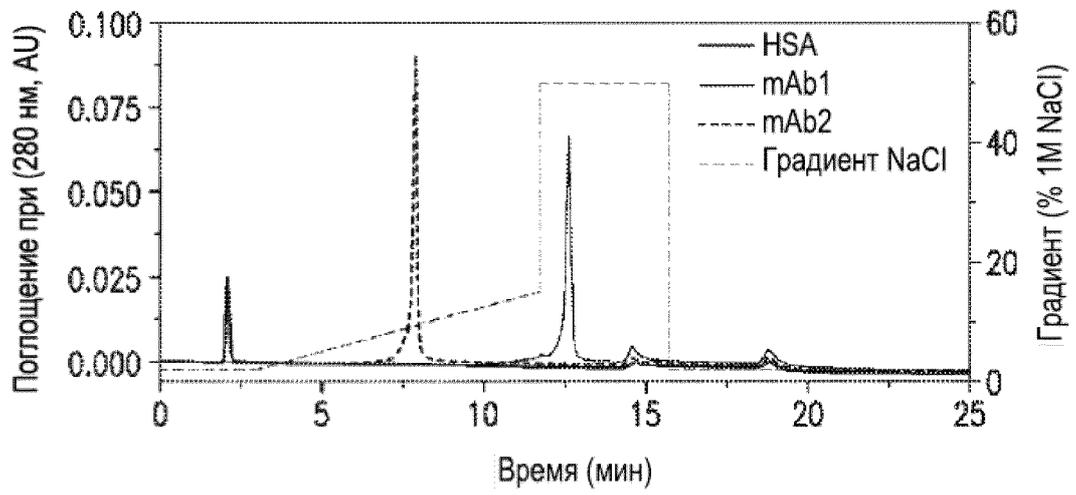
37. Способ по п. 36, в котором антитело к Fc IgG представляет собой антитело к Fc IgG человека.

По доверенности

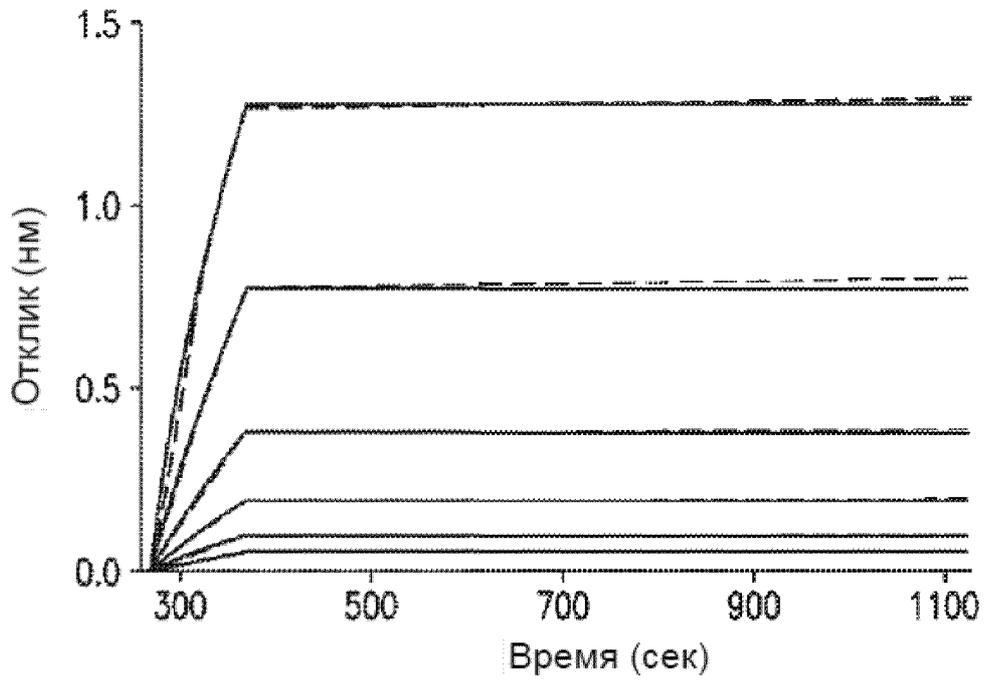
1/20



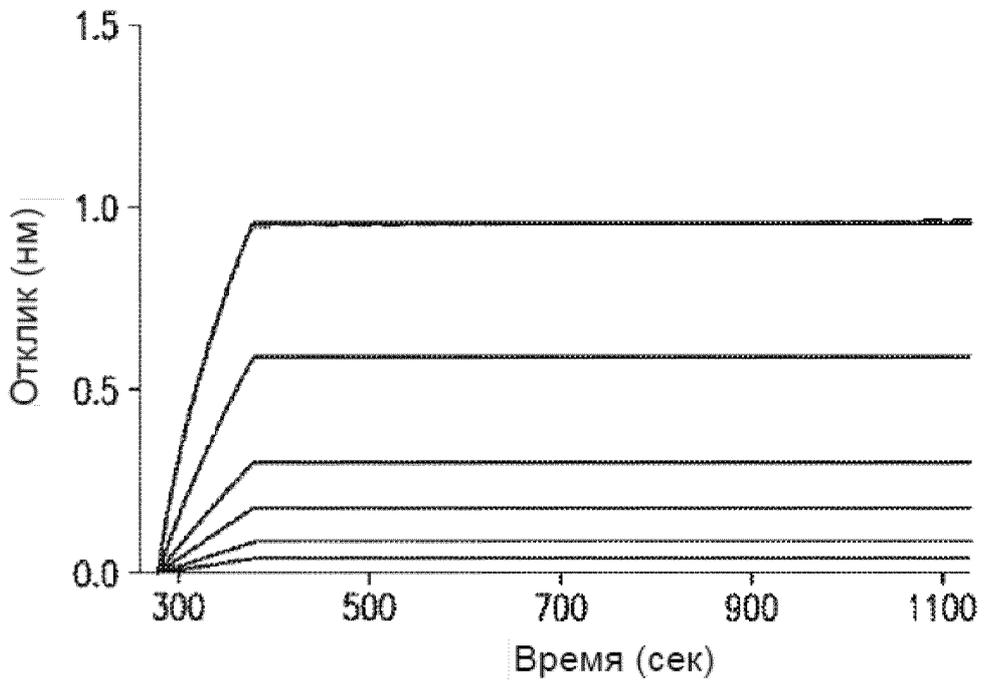
ФИГ. 1



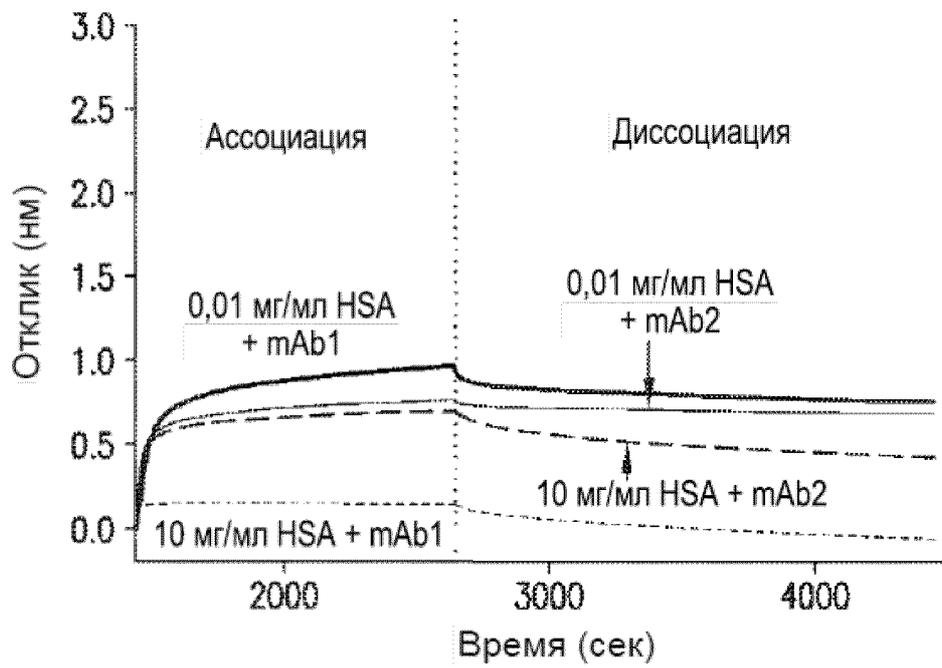
ФИГ. 2



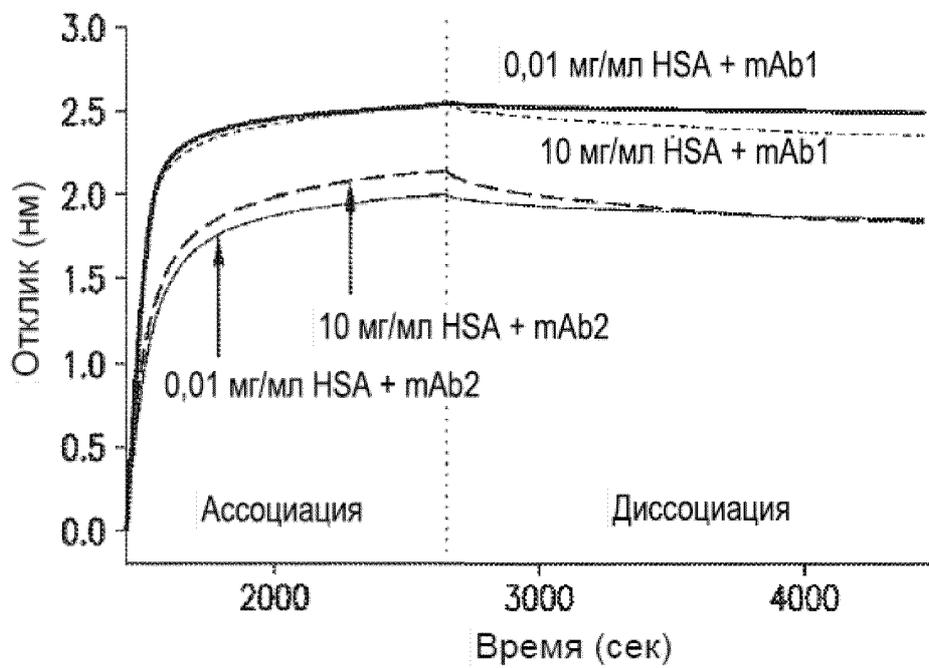
ФИГ. 3А



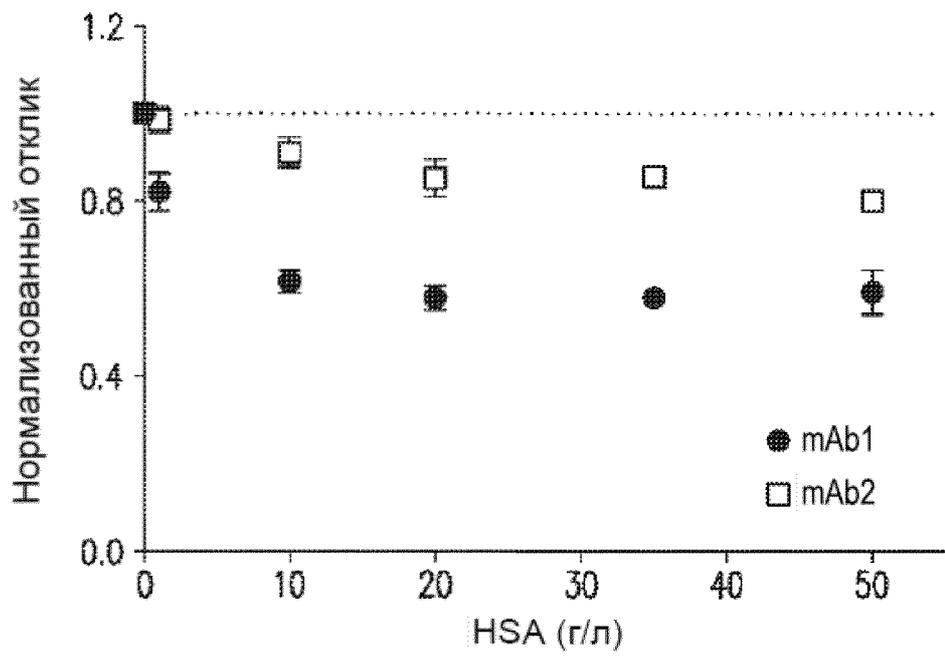
ФИГ. 3В



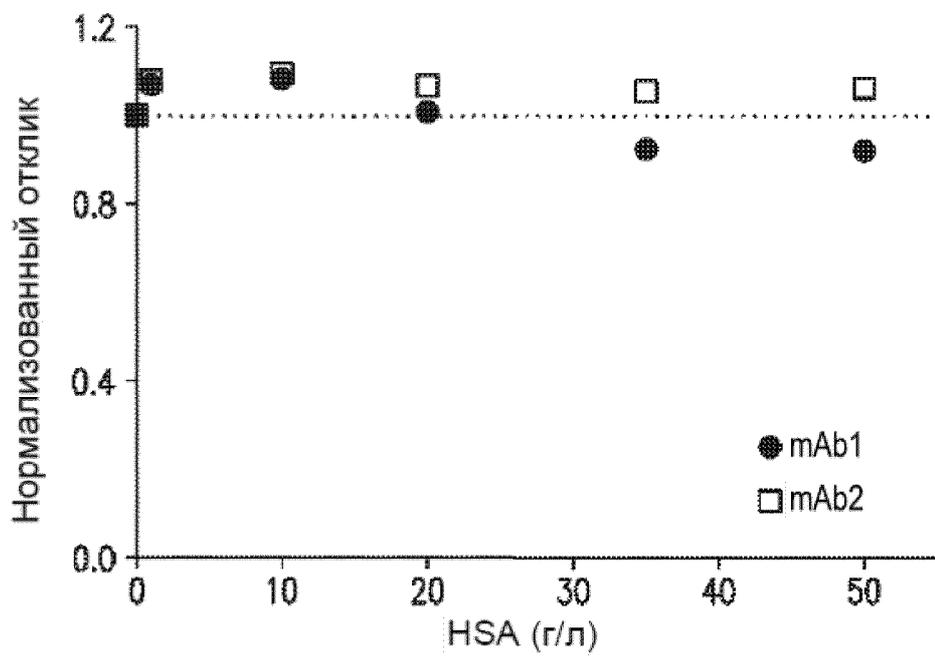
ФИГ. 4А



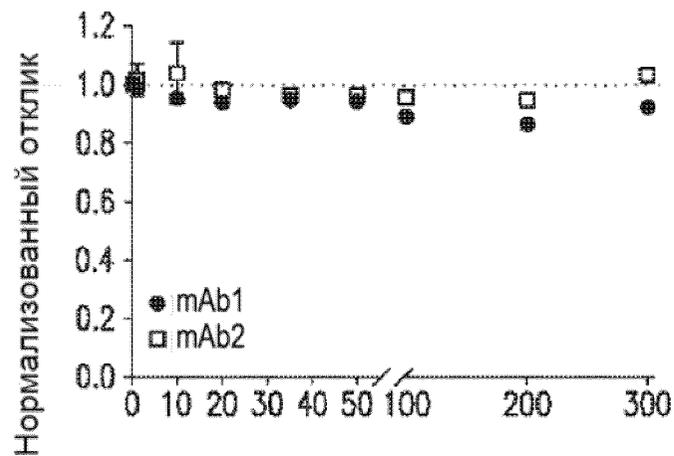
ФИГ. 4В



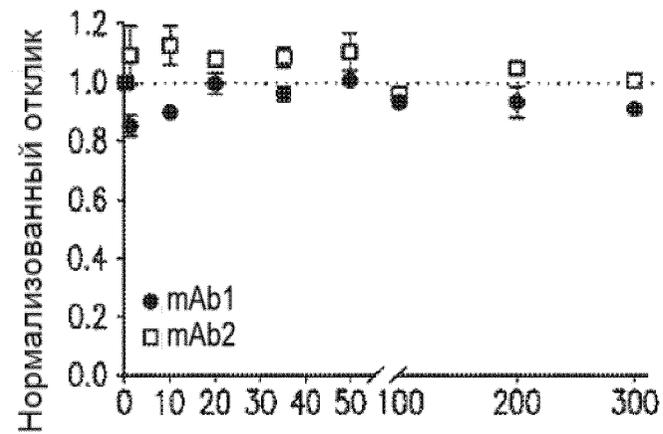
ФИГ. 5А



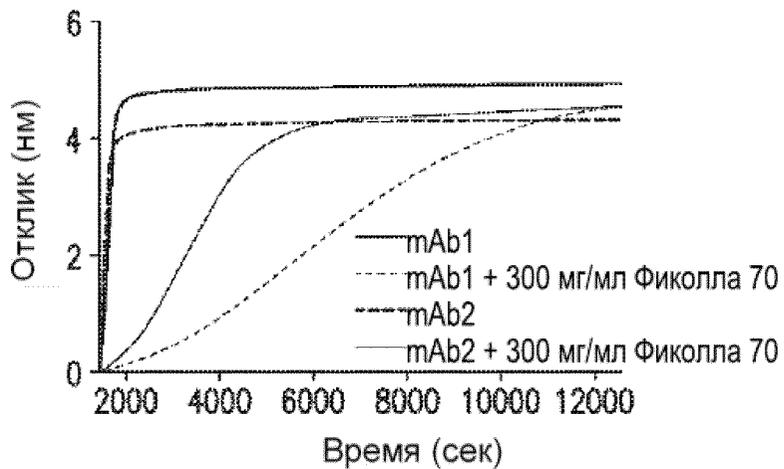
ФИГ. 5В



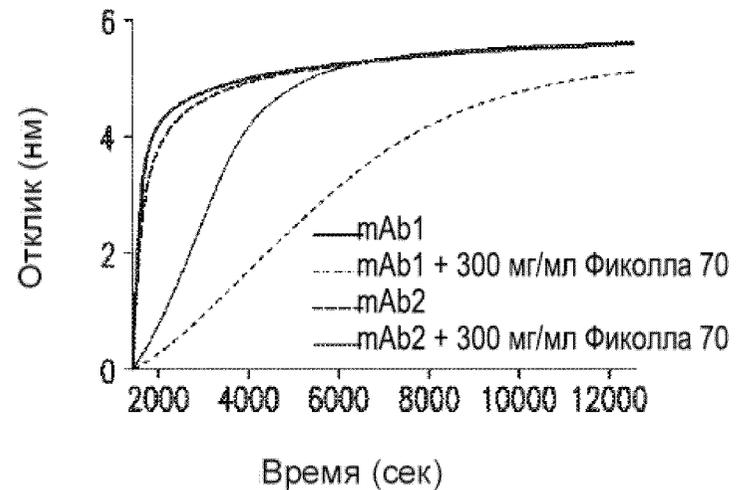
Фиколл 70 (г/л)
ФИГ. 6А



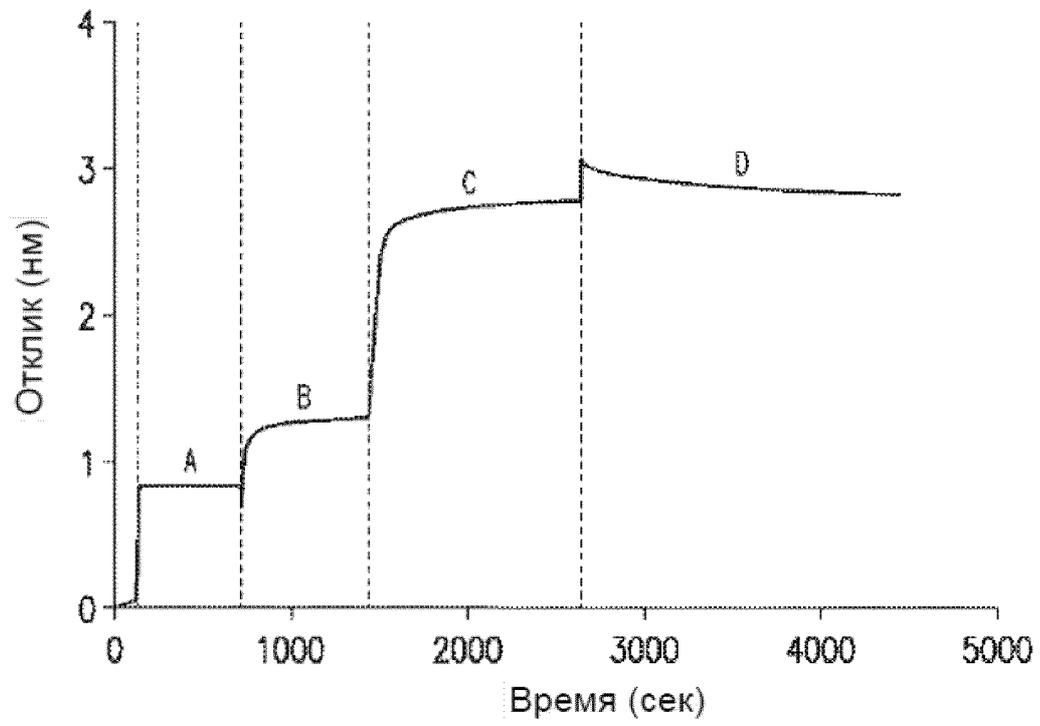
Фиколл 70 (г/л)
ФИГ. 6В



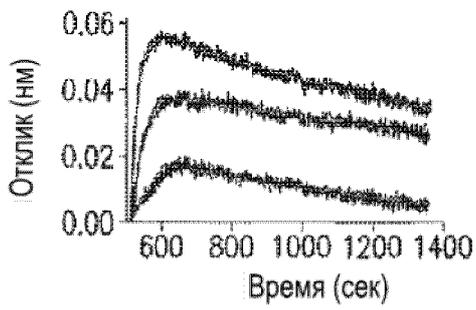
ФИГ. 6С



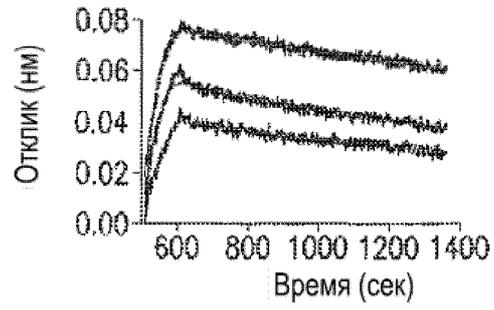
Время (сек)
ФИГ. 6D



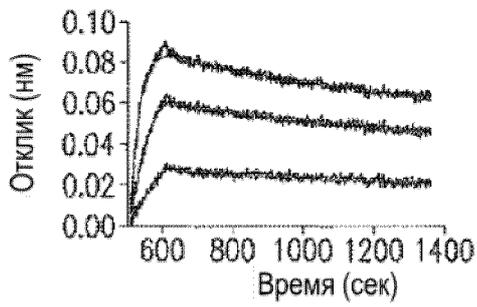
ФИГ. 7



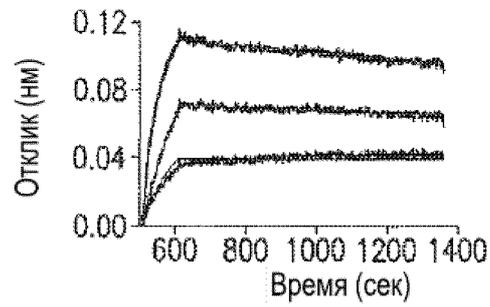
ФИГ. 8А



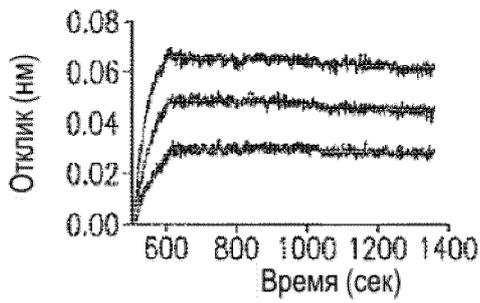
ФИГ. 8В



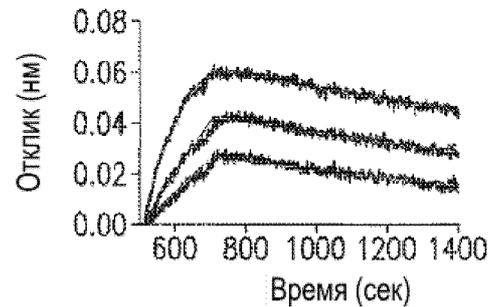
ФИГ. 8С



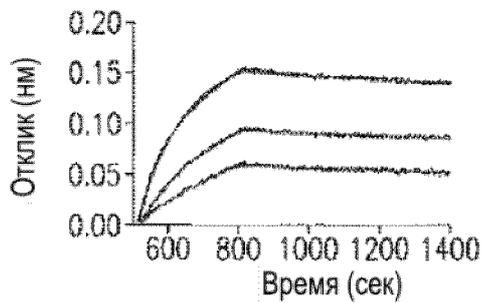
ФИГ. 8D



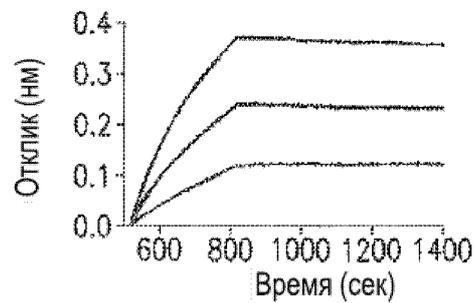
ФИГ. 8Е



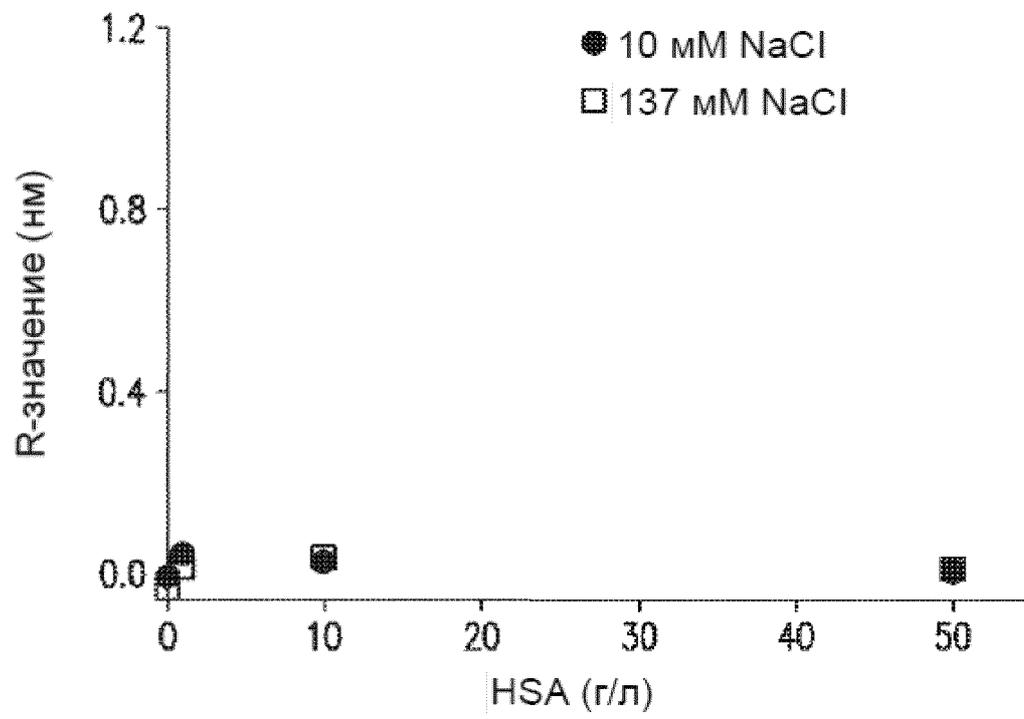
ФИГ. 8F



ФИГ. 8G

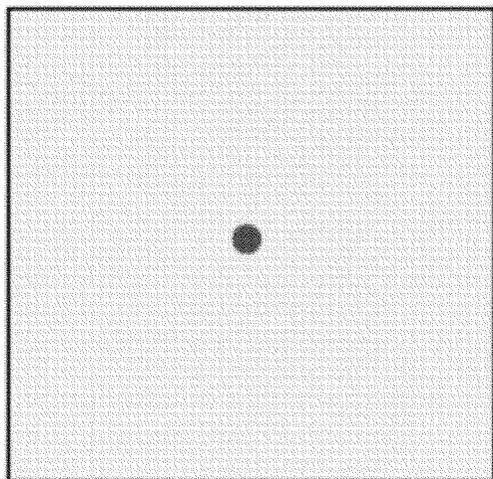


ФИГ. 8H



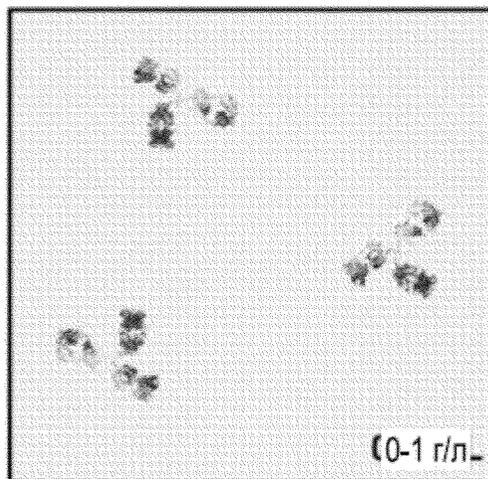
ФИГ. 9

Идеальный; $PV=nRT$



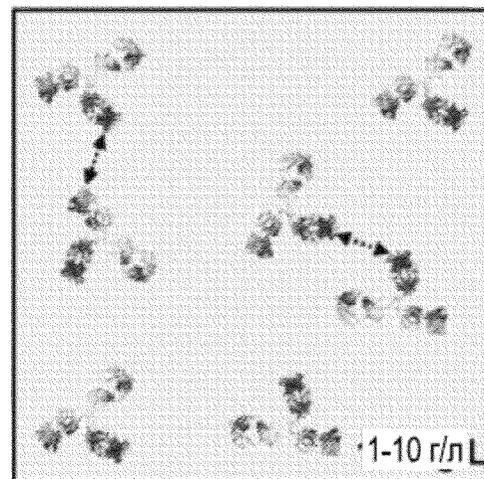
Точечная молекула с
одинаковыми поверхностными
свойствами

Разбавленный



Расстояние между белками
намного больше, чем радиус

Наполовину разбавленный

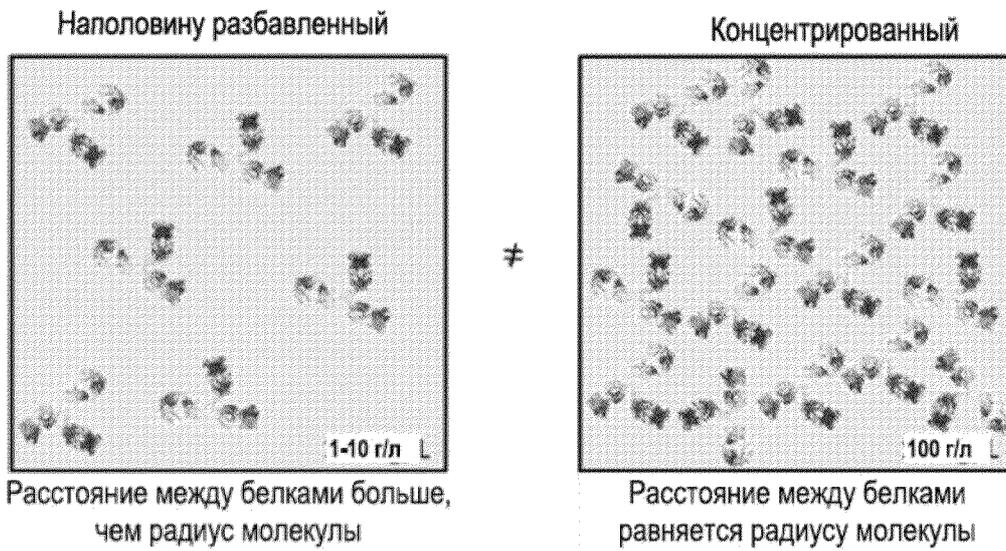


Расстояние между белками больше,
чем радиус молекулы

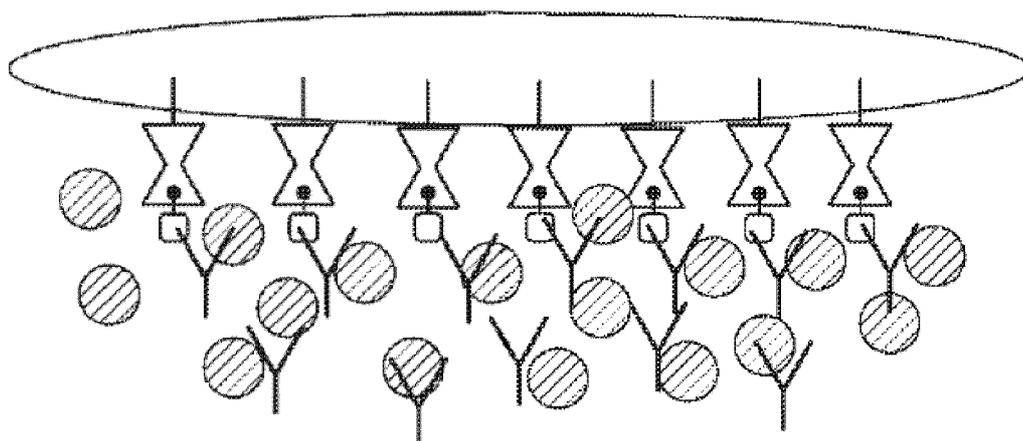
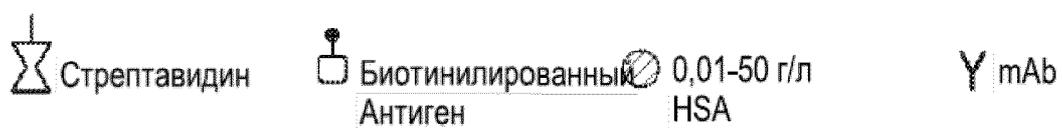
\approx

1°
сог.

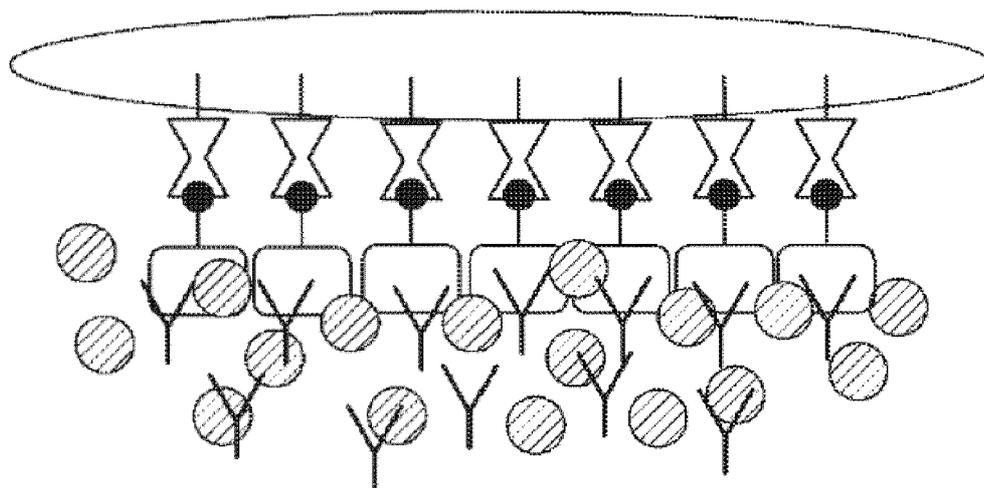
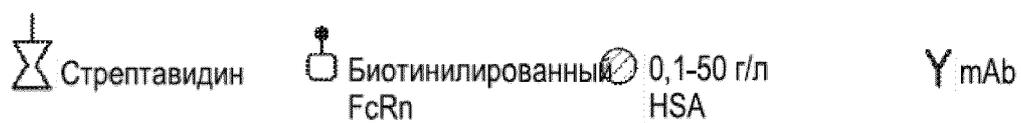
ФИГ. 10



ФИГ. 11

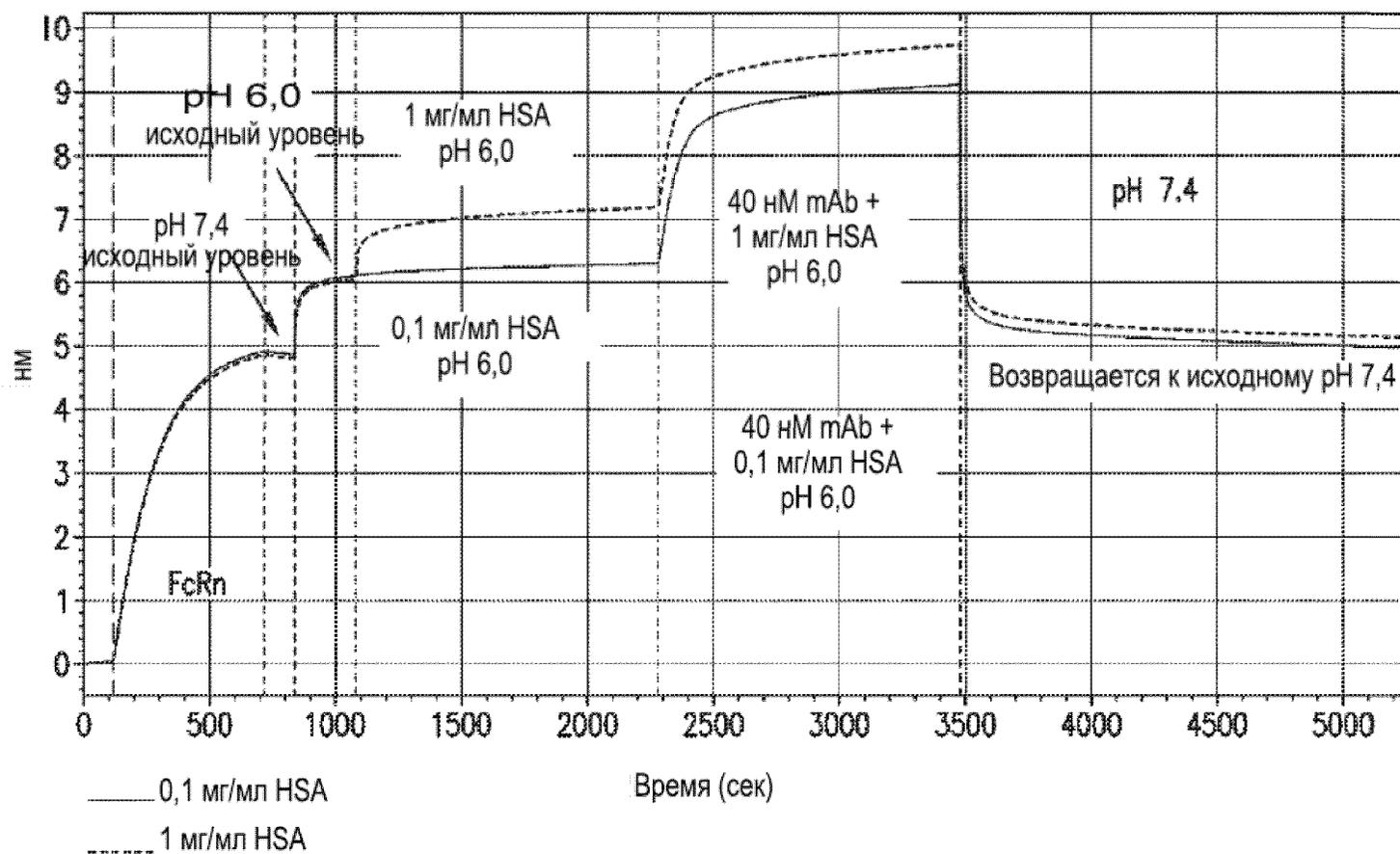


ФИГ. 12

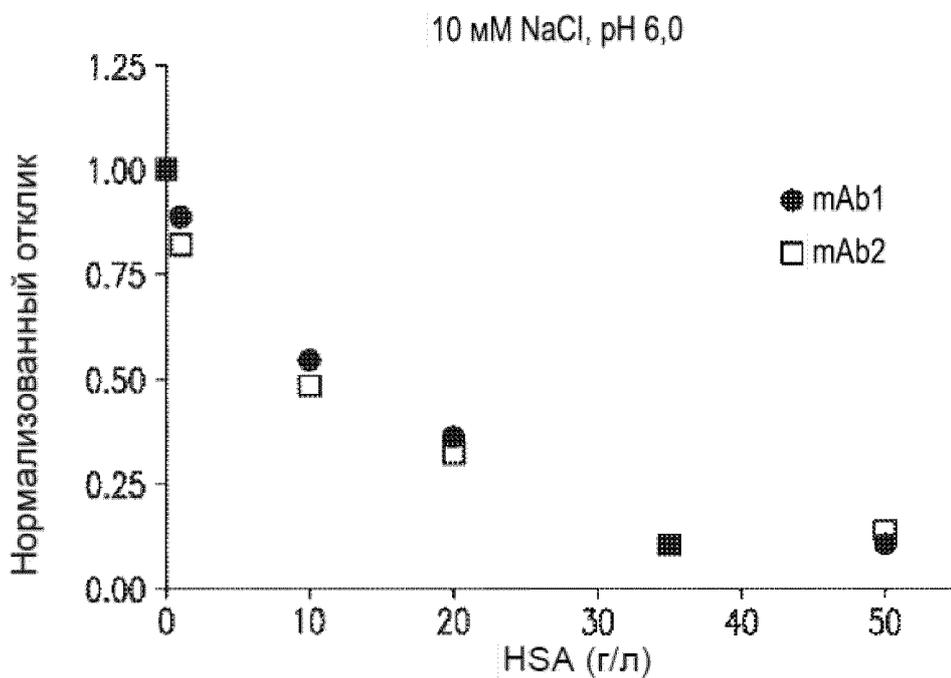


ФИГ. 13

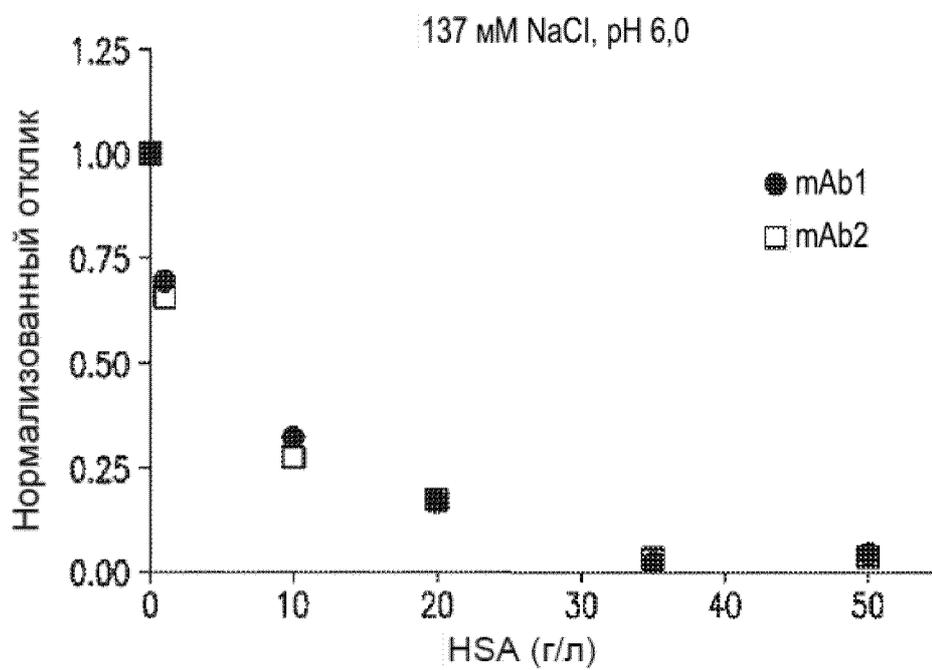
Все этапы выровнены относительно исходного этапа (местоположение сенсора)



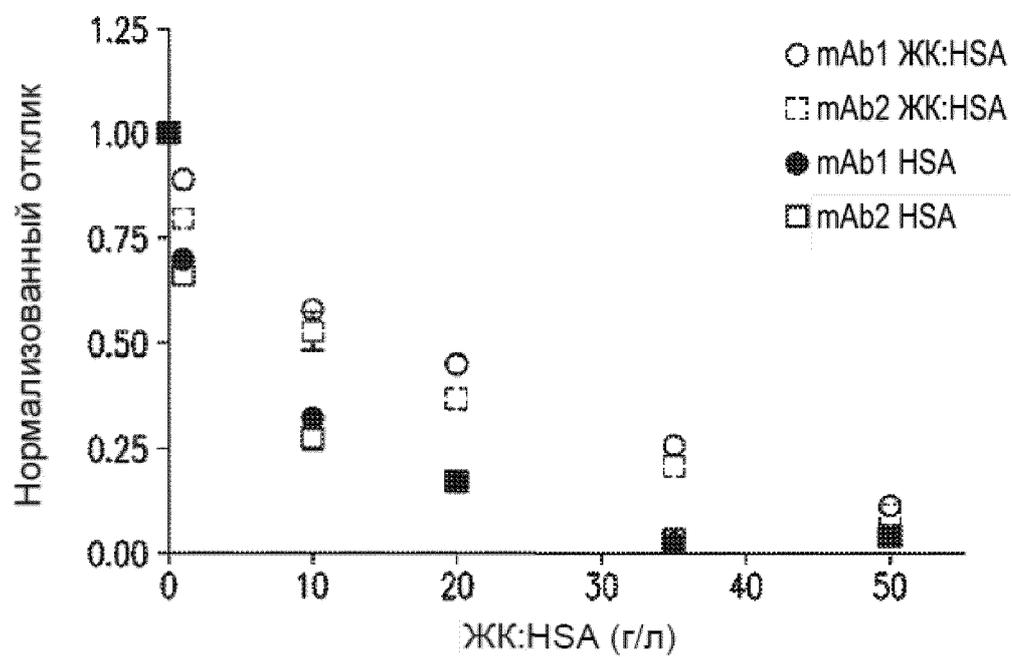
ФИГ. 14



ФИГ. 15А



ФИГ. 15В



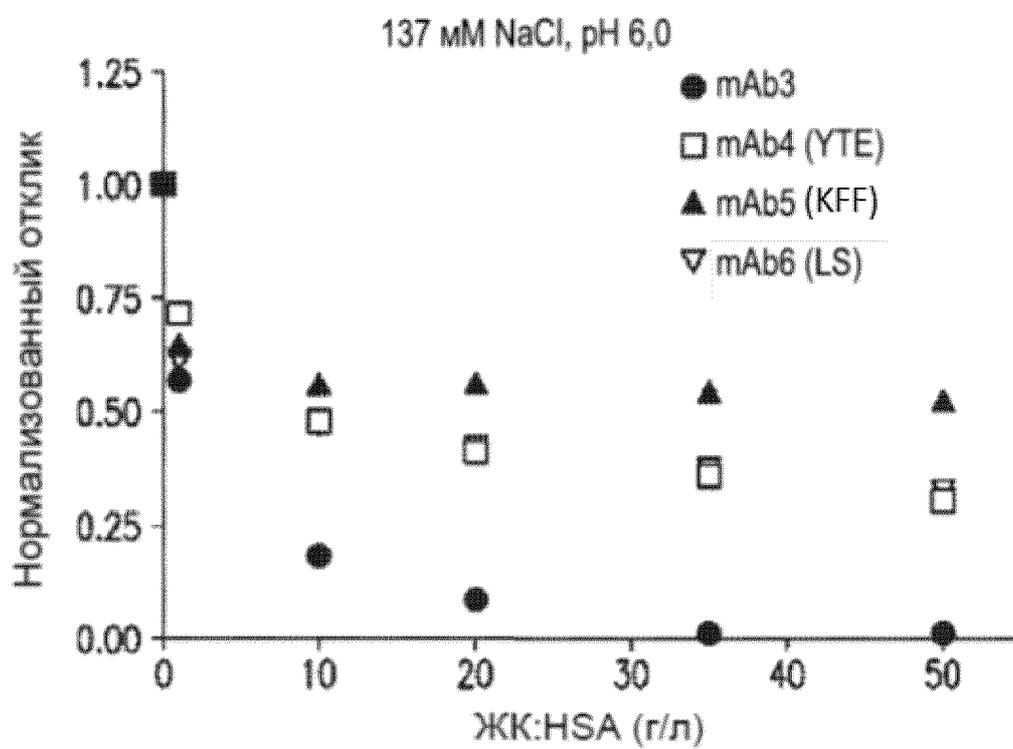
ФИГ. 16

Мутация YTE:

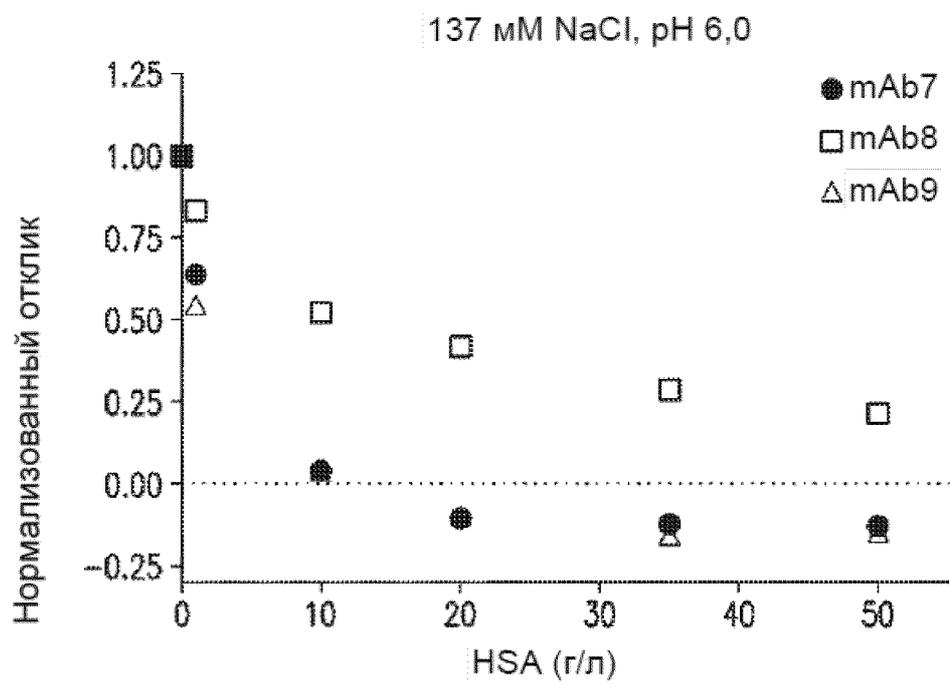
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK (SEQ ID NO. 1)

FLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK (SEQ ID NO. 2)

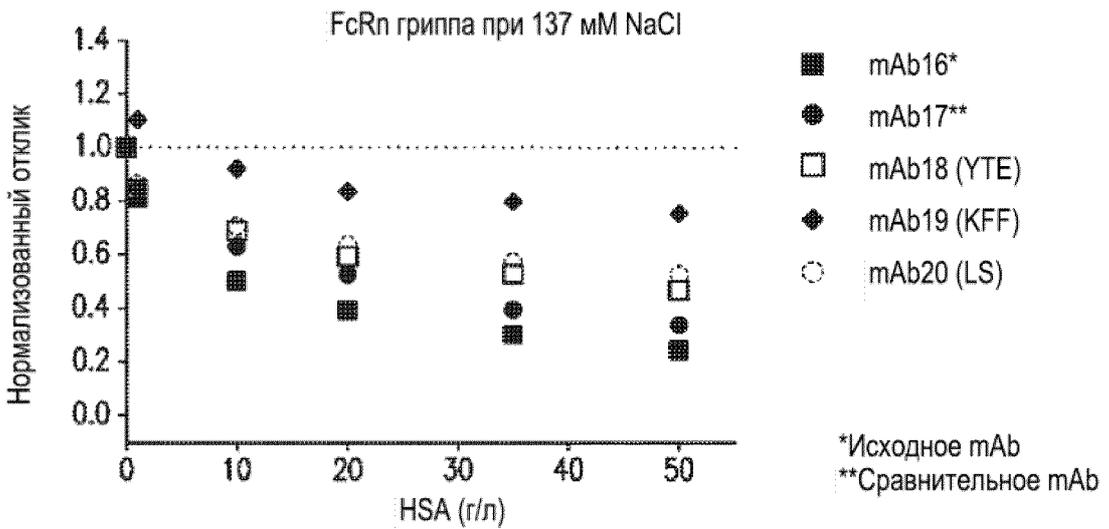
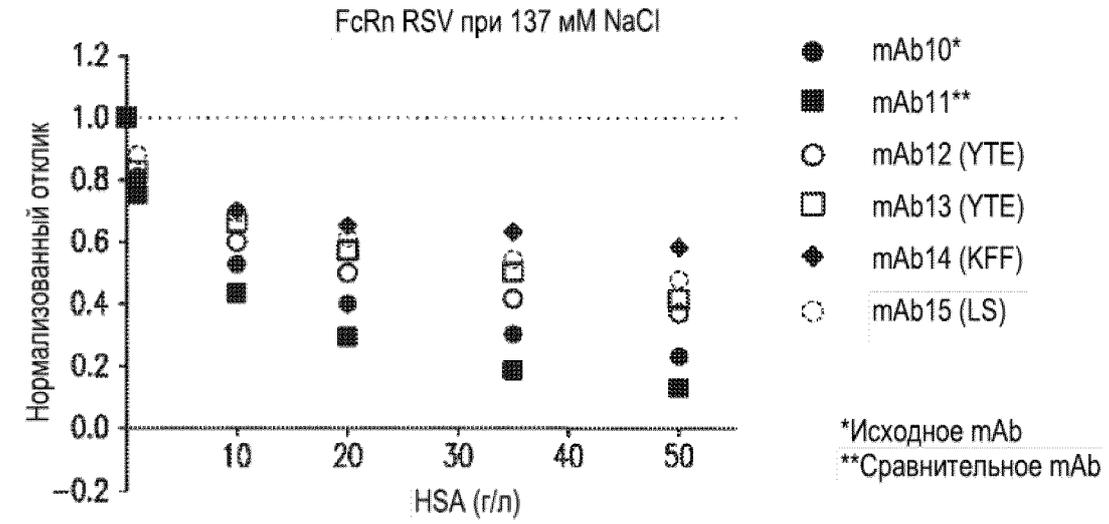
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20