

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290618 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.06.01

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.08.20

(54) ОПТИМИЗАЦИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЙ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

(31) 62/889,354

(72) Изобретатель:

(32) 2019.08.20

Чжоу Чэнь, Ванг Венхуа, Лю Динцзян  
(US)

(33) US

(86) PCT/US2020/047156

(74) Представитель:

(87) WO 2021/035028 2021.02.25

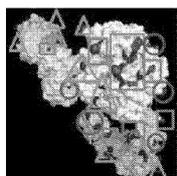
Медведев В.Н. (RU)

(88) 2021.04.08

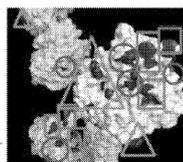
(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

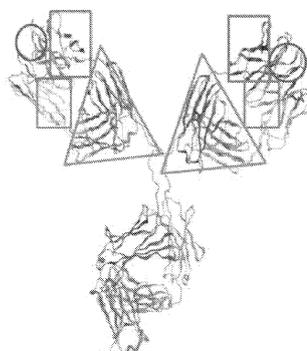
(57) В данном изобретении предложены способы и системы для оптимизации приготовлений биспецифических антител. В данной заявке также предложены способы и системы для отбора молекул-кандидатов для конструирования биспецифических антител и оптимизации их приготовлений. Охарактеризованы физико-химические параметры биспецифического антитела. Стратегии оптимизации приготовлений основаны на прогнозировании параметров взаимодействия. На основании этих физико-химических параметров предложены различные стратегии оптимизации приготовлений.



Fab-область МА-В



Fab-область МА-А



Модель поверхности BcAt 1

A1

202290618

202290618

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573304EA/042

### ОПТИМИЗАЦИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЙ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/889,354, поданной 20 августа 2019 г. (20. 08. 2019), содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в целом относится к способам и системам оптимизации приготовлений биспецифических антител. Данное изобретение также относится к способам и системам для отбора комбинации пептидов или белков для получения биспецифических антител и к способам оптимизации их приготовлений.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биспецифические антитела представляют собой чрезвычайно ценные биофармацевтические препараты с повышенной эффективностью и целевой специфичностью по сравнению с обычными моноклональными антителами, поскольку биспецифические антитела нацелены на два разных антигена. Конструкции биспецифических антител могут относиться к множественным тканеспецифическим антителам в сочетании с низкомолекулярными лекарственными средствами, например, сочетанию множественных тканеспецифических антител и цитотоксических лекарственных средств для высвобождения лекарственных средств в непосредственной близости от опухолей. Низкомолекулярные лекарственные средства могут быть конъюгированы с очищенными биспецифическими антителами для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC - antibody-drug conjugates). Однако разработка лекарственных средств и оптимизация приготовлений биспецифических антител могут быть затруднены из-за сложности их структуры и состава, поскольку две Fab-области биспецифических антител являются гетерогенными, полученными от двух разных исходных антител.

Две гетерогенные Fab-области биспецифических антител могут иметь разные физико-химические свойства, такие как различия в поверхностной гидрофобности или поверхностном заряде. Структурная сложность биспецифических антител приводит к изменениям физико-химических свойств, которые отрицательно или нежелательно влияют на растворимость в воде. Трудности включают снижение растворимости из-за высокой вязкости или опалесценции во время разработки приготовлений биспецифических антител. Растворимость в воде ограничивает биодоступность приготовлений лекарственных средств. Разработка стабильного приготовления на основе белка имеет решающее значение для вопросов безопасности, связанных с иммуногенным ответом, стабильностью лекарственного средства в течение разумного срока годности и оптимизацией доставки посредством инъекции. С практической точки зрения предпочтительно понимать стабильность и растворимость белка в различных условиях

приготовления, таких как рН, ионная сила, буферные соли или температура, для оптимизации приготовлений биспецифических антител.

Следует понимать, что существует потребность в способах и системах для отбора комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами для получения биспецифических антител. Кроме того, существует потребность в способах оптимизации композиций для разработки приготовлений биспецифических антител.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Структурная сложность биспецифических антител из-за гетерогенных Fab-областей может привести к отрицательному или нежелательному влиянию на растворимость в воде. Трудности включают высокую вязкость или опалесценцию во время разработки приготовлений биспецифических антител. В данной заявке предложены способы и системы для отбора молекул-кандидатов для конструирования биспецифических антител и оптимизации их приготовлений. Охарактеризован профиль физико-химических параметров биспецифического антитела и его исходных антител. На основе этих физико-химических параметров предложены различные стратегии оптимизации приготовлений.

В раскрытии предложен способ получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающий: получение множества аминокислотных последовательностей пептидов или белков; отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; определение профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; отбор целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; и получение комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе по данной заявке белок-белковые взаимодействия могут представлять собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия, при этом профиль белок-белковых взаимодействий можно определить путем измерения параметров взаимодействия пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данной заявке дополнительно включает определение профиля физико-химических свойств пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, может быть получена в соответствии с целевым профилем белок-белкового взаимодействия и профилем физико-химических свойств, при этом физико-химическое свойство может представлять собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные

заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды можно определить путем проведения структурного моделирования пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В некоторых предпочтительных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе по данной заявке концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, может составлять от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл или, по меньшей мере, около 70 мг/мл или, по меньшей мере, около 100 мг/мл.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе по данной заявке комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, может представлять собой биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело, при этом способ по данной заявке дополнительно включает определение индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела для получения биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В раскрытии, по меньшей мере, предложена система получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающая: множество аминокислотных последовательностей пептидов или белков; отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; профиль белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; целевой профиль белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; и комбинацию пептидов или белков, при этом пептиды или белки, имеющие желаемые аминокислотные последовательности, выбирают в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в системе по данной заявке белок-белковые взаимодействия могут представлять собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия, при этом профиль белок-белковых взаимодействий определяют путем измерения параметров взаимодействия пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения система по данной заявке дополнительно включает профиль физико-химических свойств пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности выбрана в соответствии с целевым профилем белок-белкового взаимодействия и профилем физико-химических свойств, при этом физико-химическое

свойство может представлять собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения поверхностная гидрофобность или поверхностные заряды можно определить путем проведения структурного моделирования пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В некоторых предпочтительных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в системе по данной заявке концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, может составлять от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл или, по меньшей мере, около 70 мг/мл или, по меньшей мере, около 100 мг/мл.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в системе по данной заявке комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, может представлять собой биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело, при этом система по данной заявке дополнительно включает профиль индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В данном изобретении, по меньшей мере частично, предложен способ оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, при этом приготовление содержит комбинацию пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности по данной заявке, при этом способ включает: регулирование ионной силы приготовления на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, и регулирование значения pH приготовления на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В некоторых предпочтительных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления по данной заявке дополнительно включает добавление соли к приготовлению на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности. В некоторых предпочтительных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления по данной заявке дополнительно включает добавление гидрофобного эксципиента к приготовлению на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом, по меньшей мере, один компонент представляет собой хлорид натрия, ацетат, гистидин или гидрохлорид

аргинина.

В данном изобретении, по меньшей мере частично, предложен способ оптимизации приготовления биспецифических или полиспецифических антител, включая способ оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, при этом приготовление содержит биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело, а способ включает: определение профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела; и оптимизацию или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела профиль белок-белковых взаимодействий можно определить путем измерения параметров взаимодействия биспецифического антитела или полиспецифического антитела. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает регулирование ионной силы приготовления на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела или регулирование значения pH приготовления на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает определение профиля физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела, при этом оптимизация или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении основан на профиле белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела и профиле физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает добавление соли к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела или добавление гидрофобного эксципиента к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела, по меньшей мере, один компонент представляет собой хлорид натрия, ацетат, гистидин или гидрохлорид аргинина.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в

способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность, при этом поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды можно определить путем проведения структурного моделирования биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифических или полиспецифических антител белок-белковые взаимодействия представляют собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифических или полиспецифических антител концентрация биспецифического антитела или полиспецифического антитела составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл или, по меньшей мере, около 70 мг/мл или, по меньшей мере, около 100 мг/мл. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает определение индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает определение профиля физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела, при этом оптимизация или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении основан на профиле белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела и профиле физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает добавление соли к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела или добавление гидрофобного эксципиента к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела, по меньшей мере, один компонент представляет собой хлорид натрия, ацетат, гистидин или гидрохлорид аргинина.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность, при этом поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды определяют путем проведения структурного моделирования биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела белок-белковые взаимодействия представляют собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела концентрация биспецифического антитела или полиспецифического антитела составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл или, по меньшей мере, около 70 мг/мл или, по меньшей мере, около 100 мг/мл. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ оптимизации приготовления биспецифического или полиспецифического антитела дополнительно включает определение индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении их вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации данного изобретения и его многочисленные конкретные детали, дано в качестве иллюстрации, а не ограничения данного изобретения. Многие замены, модификации, добавления или перестройки могут быть выполнены в рамках объема данного изобретения.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На Фиг. 1 изображены модели поверхности БсАт1, Fab-области мАт-А и Fab-области мАт-В на основании структурного моделирования согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Затененные области в прямоугольниках указывают на расположение гидрофобных участков. Затененные области в кружках указывают на расположение участков с отрицательным зарядом. Затененные области в треугольниках указывают на участки с положительным зарядом.

На Фиг. 2А-2С представлены измерения оптической плотности (OD) при 405 нм приготовлений БсАт1, мАт-А и мАт-В для характеристики опалесценции белковых приготовлений согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. А5

обозначает буферную композицию 10 мМ ацетата при pH 5. H6 обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина при pH 6. H6N обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ NaCl при pH 6.

На Фиг. 3А-3С представлены измерения вязкости приготовлений БсАт1, мАт-А и мАт-В согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Теоретическая вязкость иммуноглобулина с диаметром 10 нм при 150 мг/мл рассчитывалась по уравнению Муни для сравнения. А5 обозначает буферную композицию 10 мМ ацетата при pH 5. H6 обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина при pH 6. H6N обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ NaCl при pH 6. H6Arg обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ ArgHCl при pH 6.

На Фиг. 4 представлены измерения стабильности при перемешивании для исследования межфазной чувствительности БсАт1 в различных приготовлениях согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Измерения включают контрольные белковые приготовления и белковые приготовления при перемешивании. H6 обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина при pH 6. H6N обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ NaCl при pH 6. H6Arg обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ ArgHCl при pH 6.

На Фиг. 5А представлены измерения параметров взаимодействия ( $k_D$ ) для БсАт1, мАт-А и мАт-В в различных буферных композициях, включая совместные приготовления мАт-А и мАт-В, согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. А5 обозначает буферную композицию 10 мМ ацетата при pH 5. H6 обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина при pH 6. H6N обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ NaCl при pH 6. H6Arg обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ ArgHCl при pH 6. На Фиг. 5В представлены измерения второго осмотического вириального коэффициента  $B_{22}$  приготовления БсАт1 в 10 мМ гистидине при pH 6 при различных концентрациях белка с использованием композиционного градиентно-многоугольного светорассеяния (CG-MALS - composition gradient-multi-angle light scattering) согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 6А представлен корреляционный анализ для опалесценции и параметра взаимодействия  $k_D$  согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения (при концентрации 150 мг/мл). На Фиг. 6В представлен корреляционный анализ для вязкости и параметра взаимодействия  $k_D$  согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. На Фиг. 6С представлен корреляционный анализ для опалесценции и параметра взаимодействия  $k_D$  согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения (при концентрации 70 мг/мл).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Биспецифические антитела представляют собой антитела следующего поколения, направленные на превосходные терапевтические эффекты, с двумя разными сайтами связывания антигена, которые могут повысить эффективность и целевую специфичность

по сравнению с обычными моноклональными антителами. Применение биспецифических антител охватывает широкий спектр терапевтических областей, включая аутоиммунные, онкологические или хронические воспалительные заболевания. Например, при лечении онкологического заболевания биспецифические антитела могут одновременно стимулировать различные иммунные рецепторы, вызывая и усиливая цитотоксический иммунный ответ против развития опухоли.

Введение биспецифических антител осуществляется преимущественно парентерально, например, путем внутривенной или подкожной инъекции. Спрос на приготовления с высокой концентрацией белка растет из-за необходимости небольшого объема инъекции при подкожном дозировании для улучшения соблюдения пациентом режима лечения. Обычно потребность в концентрации белка может быть выше 100 мг/мл в приготовлении для подкожного введения. Однако разработка белкового приготовления с высокими концентрациями может быть сложной задачей, поскольку молекулы белка имеют тенденцию агрегироваться и/или осаждаться при высоких концентрациях, что может привести к высокой вязкости и опалесценции. Белки обычно имеют более высокую тенденцию к самоассоциации при высоких концентрациях.

Две Fab-области биспецифических антител являются гетерогенными, поскольку они происходят от двух разных исходных антител. Сложность структуры и композиции биспецифических антител может вызвать проблемы при разработке приготовления, такие как проблемы опалесценции, высокой вязкости или межфазной чувствительности, поскольку две гетерогенные Fab-области могут иметь существенно разные физико-химические свойства. В данной заявке предложены способ и система для отбора молекул-кандидатов для конструирования биспецифических антител, таких как отбор комбинации пептидов или белков для получения биспецифических антител на основании профиля белок-белкового взаимодействия и/или профиля физико-химических свойства пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

В данной заявке дополнительно предложен способ оптимизации приготовления биспецифического антитела, которое может быть получено с использованием способов по данной заявке. В данной заявке предложены способы и системы для исследования молекулярного механизма нежелательного поведения белков биспецифических антител при высокой концентрации путем структурного моделирования биспецифического антитела и его исходных антител. Профиль физико-химических параметров можно охарактеризовать и сравнить между биспецифическим антителом и его исходными антителами. На основании физико-химических параметров предложены различные стратегии оптимизации приготовлений.

В данной заявке предложены способы и системы для прогнозирования поведения белков с помощью использования параметра взаимодействия белков  $k_D$  для количественной оценки белок-белковых взаимодействий. В частности, в данной заявке предложены характеристики молекулярного механизма биспецифических антител в растворе, в частности, при высоких концентрациях белка. В данной заявке предложены

способы и системы для изучения влияния различных условий приготовления, таких как регулирование ионной силы, значения pH или буферных солей, для уменьшения опалесценции и высокой вязкости во время разработки приготовлений биспецифических антител.

Белок-белковые взаимодействия, такие как отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия, относятся к поведению белков при высоких концентрациях белка в растворе. Обычно предпочтительны отталкивающие белок-белковые взаимодействия, поскольку притягивающие белок-белковые взаимодействия могут быть связаны с нежелательным поведением белков. Способы характеристики белок-белковых взаимодействий включают динамическое светорассеяние (DLS), статическое светорассеяние (SLS), малоугловое рентгеновское рассеяние (SAXS), аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) и мембранную осмометрию. При измерении DLS характер и величину белок-белковых взаимодействий можно экстраполировать как параметр взаимодействия  $k_D$  из неидеальной зависимости коэффициента диффузии от концентрации белка в режиме относительного разведения. SLS измеряет неидеальное изменение интенсивности светорассеяния в зависимости от градиента концентрации белка. Второй осмотический вириальный коэффициент  $B_{22}$  можно измерить с помощью SLS.

Белок-белковые взаимодействия могут доминировать в характеристиках белков (поведении белков) при высокой концентрации белка в растворе. В данной заявке предложены способ и система для прогнозирования поведения биспецифических антител при высокой концентрации белка с использованием параметра взаимодействия  $k_D$ . Параметр взаимодействия  $k_D$  может обеспечить разумное прогнозирование поведения белка при высоких концентрациях для отбора молекул-кандидатов для конструирования биспецифических антител и оптимизации их приготовлений. Способ и система по данной заявке могут быть использованы для отбора молекул-кандидатов для получения биспецифических антител путем измерения  $k_D$  для прогнозирования поведения белков. Кроме того, в данной заявке предложен способ для оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, содержащем биспецифические антитела.

Способ по данной заявке обеспечивает прогнозирование для получения приемлемой корреляции между опалесценцией/вязкостью и параметром взаимодействия  $k_D$  для оптимизации приготовления биспецифических антител. Способ по данной заявке также обеспечивает прогнозирование для получения приемлемой корреляции между опалесценцией/вязкостью и белок-белковыми взаимодействиями для оптимизации приготовления биспецифических антител.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения физико-химические свойства белок-белковых взаимодействий в биспецифических антителах могут быть преимущественно электростатическими, и стратегии увеличения ионной силы и регулирования значения pH могут эффективно улучшить результат оптимизации приготовления биспецифических антител.

В данной заявке предложен способ оптимизации приготовлений, содержащих биспецифическое антитело, при этом указанный способ включает определение профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела, таких как притягивающих белок-белковых взаимодействий. Опалесценция и/или вязкость приготовлений биспецифического антитела могут быть значительно снижены путем регулирования ионной силы или значения рН приготовления на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела, например, путем увеличения ионной силы или снижения значения рН для уменьшения опалесценции и вязкости за счет частичного устранения притягивающих белок-белковых взаимодействий.

Превосходные терапевтические эффекты биспецифических антител привели к увеличению спроса на оптимизацию приготовлений биспецифических антител. Иллюстративные варианты реализации данного изобретения, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым потребностям, предлагая способы и системы для удовлетворения вышеупомянутых потребностей, предлагая способы и системы для отбора комбинации пептидов или белков для получения биспецифических антител на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, согласно измерению параметра взаимодействия  $k_D$ . В данном раскрытии также предложен способ оптимизации приготовлений, содержащих биспецифическое антитело. Стратегии оптимизации могут руководствоваться прогнозированием параметра взаимодействия  $k_D$ . Эти стратегии также направлены на решение давно назревших проблем, связанных с высокой вязкостью или опалесценцией во время разработки приготовлений биспецифических антител.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий «по меньшей мере, один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, понятные специалистам в данной области техники; и в случаях, когда указаны диапазоны, то конечные точки включены в него.

Используемые в контексте данного документа термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и их следует понимать как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий», соответственно.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, в раскрытии предложен способ получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающий: получение множества аминокислотных последовательностей пептидов или белков; отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; определение профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; отбор целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; и получение комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий.

Используемый в контексте данного документа термин «пептиды» или «белки» включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «пептид» или «полипептиды». Белок может содержать один или более полипептидов для формирования одной функционирующей биомолекулы. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, в раскрытии предложен способ оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, при этом приготовление содержит биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело, а способ включает: определение профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела, и оптимизацию или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

Используемый в контексте данного документе термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

#### **Иллюстративные варианты реализации данного изобретения**

В вариантах реализации данного изобретения, описанных в данном документе, предложены способы и системы для получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающие: получение множества аминокислотных последовательностей пептидов или белков; отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; определение профиля белок-

белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; отбор целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности; и получение комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данному раскрытию дополнительно включает определение профиля физико-химических свойств пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинацию пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, получают в соответствии с целевым профилем белок-белкового взаимодействия и профилем физико-химических свойств. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность.

В некоторых предпочтительных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в способе по данной заявке концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл или, по меньшей мере, около 70 мг/мл, или, по меньшей мере, около 100 мг/мл, от около 1 мг/мл до около 400 мг/мл, от около 50 мг/мл до около 300 мг/мл, от около 100 мг/мл до около 300 мг/мл, от около 80 мг/мл до около 250 мг/мл, от около 80 мг/мл до около 150 мг/мл, по меньшей мере, около 50 мг/мл, по меньшей мере, около 67 мг/мл, по меньшей мере, около 70 мг/мл, по меньшей мере, около 75 мг/мл, по меньшей мере, около 90 мг/мл, по меньшей мере, около 120 мг/мл или, по меньшей мере, около 150 мг/мл.

Следует понимать, что система не ограничивается какими-либо из вышеупомянутых фармацевтических продуктов, пептидов, белков, антител, антител против лекарственных препаратов, комплексов антиген-антитело, белковых фармацевтических продуктов, хроматографической колонкой или масс-спектрометром.

Последовательная маркировка этапов способа цифрами и/или буквами, как предложено в данном документе, не предназначена для ограничения способа или любых вариантов его реализации конкретным указанным порядком.

Различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются по всему описанию изобретения. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме и для любых целей посредством ссылки. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же

значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение.

Раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие Примеры, которые предложены для более подробного описания данного раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного раскрытия.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Подготовка материалов и реагентов**

#### **1.1 Получение биспецифических антител**

Биспецифические антитела получали с использованием технологии «выступ-впадина» («knob-in-hole») (Xu et al., Production of bispecific antibodies in "knobs-into-holes" using a cell-free expression system. *mAbs*, 2015, 7(1):231-242). БсАт1 представляет собой моноклональное антитело IgG 4, которое было сконструировано из исходных мАт-А и мАт-В с использованием способа «выступ-впадина». БсАт1 имеет общую легкую цепь и две разные Fab-области. Приготовления БсАт1 продемонстрировали высокую вязкость и опалесценцию при концентрациях белка от средней до высокой, например, приготовление, содержащее 10 мМ гистидина при pH около 6 и около 70-85 мг/мл БсАт1.

#### **2.1 Приготовление целевых буферных растворов для приготовления готовой лекарственной формы**

Различные целевые буферные растворы были приготовлены, как представлено в Таблице 1, и включают компонент ацетат, гистидин, гидрохлорид аргинина или хлорид натрия в диапазоне pH около 5-8. Все образцы белков в их исходных буферных растворах подвергали диализу в целевых буферных растворах, как представлено в Таблице 1. Концентрации белков измеряли с использованием спектрометра УФ и видимой областей спектра с переменной длиной оптического пути (Solo/VPE, C-Technologies Inc, Нью-Джерси). Все химические материалы имеют квалификацию чистых для анализа или выше.

Таблица 1. Композиции целевых буферных растворов

Целевой Буферный Раствор	Сокращения
10 мМ ацетат, pH 5	A5
10 мМ гистидин, pH 6	H6
10 мМ гистидин, 150 мМ NaCl, pH 6	H6N
10 мМ гистидин, 150 мМ ArgHCl, pH 6	H6Arg
10 мМ Трис, pH 8	T8

### **Способы характеристики физико-химических свойств антител**

#### **1.1 Измерение мутности**

Оптическую плотность при 405 нм измеряли с помощью автоматического детектора ультрафиолетового и видимого диапазонов (Spectramax 190, Molecular Devices, Калифорния) для количественной оценки мутности и опалесценции белковых приготовлений при комнатной температуре.

## **2.1 Гидрофобная хроматография - высокоэффективная жидкостная хроматография (ГХ-ВЭЖХ, ИС-НPLC) для определения безразмерной величины времени удерживания**

Белок, связанный с трет-бутил-гидрофобной хроматографической колонкой (ИС) (Tosoh Bioscience, Пенсильвания) в приборе Agilent 1200 HPLC (Agilent, Санта-Клара, Калифорния), элюировали уменьшающимся градиентом  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Время удерживания было получено для расчета безразмерной величины времени удерживания (DRT) с использованием приведенного ниже уравнения 1:

$$\text{DRT} = \frac{t_s - t_i}{t_e - t_i} \times 100\% \text{ (Уравнение 1)}$$

где  $t_s$  представляет собой время элюирования образца,  $t_i$  представляет собой время начала градиента элюирования, и  $t_e$  представляет собой время окончания градиента. DRT использовали для ранжирования порядка относительной поверхностной гидрофобности среди белковых молекул.

### **3.1 Измерение вязкости на основе микрочипов**

VROC<sup>®</sup> Initium (Rheosense, Калифорния) использовали для измерения кажущейся вязкости белковых растворов при различных условиях приготовления. Температура была выставлена на 20°C. Референтные стандарты вязкости 2 сП и 80 сП были измерены до и после пробоподготовки или воздействия для обеспечения работоспособности прибора. Промежуточную скорость сдвига использовали для измерения кажущейся вязкости белковых растворов при различных условиях приготовления.

### **4.1 Капиллярное изоэлектрофокусирование для определения изоэлектрической точки**

Капиллярное изоэлектрофокусирование (iCIEF), например iCE3<sup>TM</sup> (Protein Simple, Калифорния), использовали для измерения изоэлектрической точки (pI) белков. pI белка определяли как основной пик в профилях заряда, измеренных с помощью iCIEF.

### **5.1 Гомологическое моделирование белков, включая секвенирование и структурный анализ**

Гомологические модели белков были построены с помощью модуля 5DWU с использованием Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group, Квебек, Канада). Значение pI рассчитывали на основе структуры статической модели с использованием модуля анализа свойств белка. Свойства поверхности были проанализированы и рассчитаны с помощью модуля BioMOE на основе алгоритмов Sharma et al. (Sharma et al., *In silico* selection of therapeutic antibodies for development: Viscosity, clearance, and chemical stability. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(52):18601-18606).

### **6.1 Измерения белок-белкового взаимодействия**

Параметр взаимодействия  $K_D$  и второй осмотический вириальный коэффициент  $B_{22}$  определяли для измерения белок-белкового взаимодействия. Параметр взаимодействия  $K_D$  измеряли с помощью динамического светорассеяния (DLS), например, с использованием

сканирующий спектрофотометра для прочтения планшетов Wyatt DynaPro (Wyatt Technology, Калифорния), от 2 мг/мл до 10 мг/мл. Значение  $k_D$  было экстраполировано исходя из влияния концентрации макромолекул на коэффициент взаимной диффузии, как представлено в уравнении 2:

$$D_m = D_0 (1 + k_D c + \dots) \quad (\text{Уравнение 2})$$

где  $D_m$  представляет собой коэффициент взаимной диффузии,  $D_0$  представляет собой значение  $D_m$  при неограниченном разведении,  $k_D$  представляет собой параметр взаимодействия первого порядка,  $c$  представляет собой концентрацию белка. В диапазоне концентраций относительно разбавленного белка эффектом концентрации более высокого порядка можно пренебречь, и  $k_D$  равен наклону, деленному на точку пересечения с осью  $y$ , на линейном графике зависимости  $D_m$  от  $c$ .

Второй осмотический вириальный коэффициент  $B_{22}$  измеряли с использованием статического светорассеяния (SLS), например, с использованием системы композиционного градиентно-многоугольного светорассеяния (CG-MALS) Wyatt (Calypso III в сочетании с детектором DAWN HELEOS MALS и детектором показателя преломления Optilab rEX, Wyatt Technology, Калифорния). Белковый раствор с концентрацией около 14 мг/мл разбавляли в шесть этапов до концентрации около 3 мг/мл в Calypso III со скоростью потока 1 мл/мин. Интенсивность светорассеяния под разными углами при 658 нм использовали для определения избыточных коэффициентов Релея, а измерение показателя преломления использовали для определения концентрации белка. Следующие уравнения 3 и 4, ранее описанные в литературе (Alford et al., High concentration formulations of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist: I. Physical characterization. *J Pharm Sci*, 2008, 97(8):3035-3050; Kalonia et al., 2016. Effects of Protein Conformation, Apparent Solubility, and Protein-Protein Interactions on the Rates and Mechanisms of Aggregation for an IgG1 Monoclonal Antibody. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120(29):7062-7075), использовались для определения второго осмотического вириального коэффициента:

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} + 2 B_{22} c \quad (\text{Уравнение 3})$$

где  $M_w$  представляет собой среднемассовую молекулярную массу,  $c$  представляет собой концентрацию белка,  $R(\theta)$  представляет собой избыточный коэффициент Релея, а  $K$  как оптическая константа описывается в уравнении 4:

$$K = \frac{4 \pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{N_A \lambda^4} \quad (\text{Уравнение 4})$$

где  $n_0$  представляет собой показатель преломления растворителя,  $dn/dc$  представляет собой увеличение показателя преломления,  $N_A$  представляет собой число Авогадро,  $\lambda$  представляет собой длину волны падающего луча.

### 7.1 Измерение способом дифференциальной сканирующей калориметрии

Дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), например, MicroCal VP-DSC (Malvern Instruments, Вустершир, Великобритания), использовали для измерения

кажущейся температуры плавления ( $T_m$ ) белков во время линейного изменения температуры. В типичных условиях эксперимента плацебо и растворы белка с концентрацией 1 мг/мл в различных условиях приготовления нагревали со скоростью 1 °С/мин от 20°С до 105 °С. Полученные данные термограммы вычитали из значений для плацебо и анализировали на  $T_m$  с помощью программного обеспечения Origin 7.0 с использованием модели разворачивания не ограниченная двумя состояниями.

### 8.1 Измерения устойчивости при перемешивании

Белковый раствор без поверхностно-активных веществ в концентрации 1 мг/мл перемешивали на вортексе при 1000 об/мин при комнатной температуре. Впоследствии профили агрегации были охарактеризованы с помощью микропотоковой визуализации (MFI) и эксклюзионной хроматографии (SEC).

#### Пример 1. Определение физико-химических свойств биспецифического антитела и его исходных антител

Гомологичное моделирование белков было проведено для БсАт1, мАт-А и мАт-В, включая секвенирование и структурный анализ. Были проанализированы поверхностные свойства белков. Физико-химические свойства биспецифического антитела, например, БсАт1, и его исходных антител, например, мАт-А и мАт-В, определяли, как представлено в Таблице 2. На основании статических структур модели определяли теоретические изоэлектрические точки (pI) антител. Экспериментальные значения pI измеряли с помощью iCIEF. Экспериментальные значения pI были аналогичны теоретическим значениям pI с небольшими отличиями. Интересно, что значения pI у БсАт1 больше, чем у мАт-А, но меньше, чем у мАт-В. Относительная поверхностная гидрофобность, измеренная с помощью НИС-НPLC, продемонстрировала, что БсАт1 и мАт-В обладают относительно более высокой гидрофобностью. Принимая во внимание сходство константных областей мАт-А, мАт-В и БсАт-1, моделировали переменные области (Fv) этих антител, чтобы точно определить различия pI между ними путем определения заряда Fv, индекса гидрофобности Fv и гетерогенности заряда Fv.

Таблица 2. Физико-химические свойства БсАт1, мАт-А и мАт-В.

Физико-химические Свойства	БсАт1	мАт-А	мАт-В
pI (теоретическая)	6,84	6,3	7,77
pI (экспериментальная, iCIEF)	Около 6,9	Около 6,3	Около 7,3
НФ% (ГХ-ВЭЖХ)	30	20	32
Поверхностный заряд Fv	3	-1	8
Индекс гидрофобности Fv	1,15	1,08	1,23
Гетерогенность заряда Fv	-13	-53	9

Согласно анализу свойств поверхности результаты моделирования показывают, что мАт-В имеет самый высокий поверхностный заряд Fv (общий заряд) и гидрофобность Fv. Значения поверхностного заряда Fv и гидрофобности Fv находятся в порядке от высокого к низкому - мАт-В, БсАт1 и мАт-А. Однако значение гетерогенности заряда Fv находится

в обратном порядке, как представлено в Таблице 2. Структурное моделирование БсАт1, Fab-области мАт-А и Fab-области мАт-В в виде моделей поверхности представлено на Фиг. 1. Затененные области в прямоугольниках указывают на расположение гидрофобных участков. Затененные области в кружках указывают на расположение участков с отрицательным зарядом. Затененные области в треугольниках указывают на участки с положительным зарядом. Как представлено на модели поверхности, представленной на Фиг. 1, две Fab-области БсАт1 обладают различными свойствами поверхности, такими как разный поверхностный заряд и гидрофобность. Эти результаты показывают, что высокая гетерогенность заряда и низкий поверхностный заряд в области Fv мАт-А могут быть связаны с нежелательным поведением мАт-А и БсАт1 при более высоких концентрациях.

Определяли температуры плавления, например  $T_m$ , данных антител. Результаты демонстрируют, что не было значимых различий между температурами плавления. Это позволяет предположить, что биспецифическое антитело, например, БсАт1, и его исходные антитела, например, мАт-А и мАт-В, обладают аналогичной конформационной стабильностью.

### **Пример 2. Измерения опалесценции белковых приготовлений**

Опалесценцию белковых приготовлений характеризовали путем измерения оптической плотности при длине волны 405 нм. Измерения оптической плотности при 405 нм были проведены для белковых приготовлений БсАт1, мАт-А и мАт-В, как представлено на Фиг. 2А-2С. Как представлено в целевых буферных растворах в Таблице 1, А5 обозначает композицию с 10 мМ ацетатом при рН 5. Н6 обозначает композицию с 10 мМ гистидином при рН 6. Н6N обозначает композицию с 10 мМ гистидином, 150 мМ NaCl при рН 6. Т8 обозначает композицию с 10 мМ Трис при рН 8. Когда БсАт1 готовили в буферном растворе, содержащем 10 мМ гистидина при рН 6 (обозначенном как Н6 на Фиг. 2А), концентрации белка БсАт1 и измерения ОП при длине волны 405 нм имеют линейные зависимости в диапазоне от 20 мг/мл до 150 мг/мл, как представлено на Фиг. 2А. Однако когда концентрация белка БсАт1 превышала 50 мг/мл, визуально наблюдалась значительная мутность. Когда 150 мМ NaCl включали в буферный раствор БсАт1, опалесценция значительно снижалась при концентрациях белка выше 50 мг/мл, а измерения ОП при 450 нм по-прежнему линейно зависела от концентрации белка БсАт1. Влияние диапазона рН также исследовали путем приготовления БсАт1 в буферном растворе, содержащем 10 мМ ацетата при рН 5 (обозначенном А5 на Фиг. 2А). Опалесценция значительно уменьшалась, когда значение рН буферного раствора для БсАт1 уменьшалось, например, с рН 6 до рН 5. И наоборот, наблюдалось значительное линейное увеличение опалесценции при повышении значения рН до 8. Хотя это не представлено на Фиг. 2А, измеряли опалесценцию БсАт1 в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис при рН 8 (обозначенном как Т8), как представлено в Таблице 3:

Таблица 3. Опалесценция БсАт1 в Трис, рН 8

Концентрация БсАт1 (приготовлено в Т8)	OD при 405 нм
20,4 мг/мл	0,078

49,0 мг/мл	0,125
67,2 мг/мл	0,152

Напротив, исходные мАт-А и мАт-В имеют различные профили опалесценции по сравнению с БсАт1, как представлено на Фиг. 2В и 2С. мАт-А было нестабильным в буферном растворе 10 мМ гистидина при рН 6, что приводило к сильному осаждению и, в конечном счете, к фазовому разделению с верхней фазой при концентрации белка 6,3 мг/мл. Когда 150 мМ NaCl включали в буферный раствор мАт-А для увеличения ионной силы, опалесценция значительно уменьшалась, а растворимость увеличивалась (Н6N на Фиг. 2В). Влияние диапазона значений рН также исследовали путем приготовления мАт-А в буферном растворе, содержащем 10 мМ ацетата при рН 5 (А5 на Фиг. 2В). Опалесценция значительно уменьшалась, когда значение рН буферного раствора мАт-А уменьшалось, например, с рН 6 до рН 5. мАт-В готовили в трех буферных растворах (Фиг. 2С), а значения измерений ОП при 405 нм для мАт-В были низкими при всех трех условиях. Стратегия снижения значения рН (А5 на Фиг. 2С) оказала лишь минимальное влияние, например, с рН 6 до рН 5. Когда 150 мМ NaCl включали в буферный раствор мАт-В для увеличения ионной силы, опалесценция слегка увеличивалась (Н6N на Фиг. 2С).

### **Пример 3. Измерения вязкости белковых приготовлений**

Вязкость растворов белковых приготовлений при различных условиях измеряли с помощью вискозиметра на основе использования микрочипа. Этот подход позволяет избежать искажений от границы раздела фазы воздух-вода, а также использовать преимущества использования небольших объемов образцов. БсАт1, мАт-А или мАт-В готовили в различных буферных растворах, как представлено на Фиг. 3А-3С, включая композицию 10 мМ ацетата при рН 5 (А5), композицию 10 мМ гистидина при рН 6 (Н6), композицию 10 мМ гистидина, композицию 150 мМ NaCl при рН 6 (Н6N), композицию 10 мМ гистидина, композицию 150 мМ ArgHCl при рН 6 (Н6Arg) и композицию 10 мМ Трис при рН 8 (Т8). Вязкость БсАт1 в 10 мМ гистидине, рН 6, демонстрировала экспоненциальную зависимость от концентрации белка и достигала 120 сП при 150 мг/мл, что значительно превышает допустимый диапазон для производства и введения лекарственных средств (Н6 на Фиг. 3А). Для сравнения теоретическую вязкость иммуноглобулина диаметром 10 нм при 150 мг/мл рассчитывали по уравнению Муни. Полученные результаты составляют всего около 4 сП, что позволяет предположить, что только исключение твердых сфер способствует межмолекулярному взаимодействию (Фиг. 3А). Вязкость приготовлений БсАт1 резко снижалась либо за счет увеличения ионной силы при добавлении 150 мМ NaCl, либо за счет снижения значения рН, например, с рН 8 до рН 5. Когда 150 мМ ArgHCl включали в приготовление БсАт1 (Н6Arg на Фиг. 3А), вязкость приготовления БсАт1 снижалась в наибольшей степени среди всех буферных растворов. Вязкость приготовления БсАт1, содержащего 150 мМ ArgHCl, при различных концентрациях белка была аналогична теоретической вязкости, рассчитанной и предсказанной по уравнению Муни. Изменения ионной силы и значений рН

продемонстрировали аналогичное влияние для приготовлений мАТ-А (Фиг. 3В). Хотя это не представлено на Фиг. 3А, вязкость БсАт1 в приготовлении с Т8 также измеряли, как представлено в Таблице 4.

Таблица 4. Вязкость БсАт1 в Трисе, рН 8

Концентрация БсАт1 (приготовлено в Т8)	Вязкость (сП)
20,4 мг/мл	1,27
49,0 мг/мл	1,85
67,2 мг/мл	2,37

Как обсуждалось в предыдущем примере (Фиг. 2В), мАТ-А можно было повторно солюбилизовать при концентрации выше 150 мг/мл путем добавления 150 мМ NaCl или снижения рН, например, с рН 6 до рН 5. Однако при концентрации белка 150 мг/мл вязкость мАТ-А в 10 мМ ацетате при рН 5 (А5) была значительно выше, чем в 10 мМ гистидина, 150 мМ NaCl, при рН 6 (Н6N), как представлено на Фиг. 3В. Использование 150 мМ ArgHCl также способствовало солюбизированию мАТ-А до 150 мг/мл (Н6Arg на Фиг. 3В). Кроме того, использование 150 мМ ArgHCl в приготовлении мАТ-А еще больше снизило вязкость до значений, близких к теоретически предсказанным значениям. Напротив, вязкость приготовлений мАТ-В при различных значениях рН или ионной силы были одинаковы и сопоставимы. Использование 150 мМ ArgHCl в приготовлении мАТ-В не приводит к значимым различиям, и лишь немного улучшает вязкость до теоретических значений (Фиг. 3С).

Поскольку добавление ArgHCl может значительно снизить вязкость приготовлений БсАт1, мАТ-А и мАТ-В, это указывает на то, что на поведение этих белков при высокой концентрации влияла поверхностная гидрофобность этих белков. Вполне вероятно, что между двумя гетерогенными Fab-областями БсАт1 существуют минимальные перекрестные взаимодействия. Высокая вязкость и опалесценция БсАт1, вероятно, связаны с Fab-областью от мАТ-А.

#### **Пример 4. Влияние ионной силы, рН и эксципиента на стабильность при перемешивании**

Стабильность при перемешивании измеряли для исследования межфазной чувствительности БсАт1 в различных приготовлениях. Белковый раствор при концентрации 1 мг/мл перемешивали на вортексе при 1000 об/мин при комнатной температуре. Впоследствии профили агрегации были охарактеризованы с помощью микропоточковой визуализации (MFI) и эксклюзионной хроматографии (SEC). Как представлено на Фиг. 4, стратегии увеличения ионной силы могут значительно снизить образование частиц, невидимых невооруженным глазом, при перемешивании. Присутствие ArgHCl может обеспечить улучшение межфазной стабильности воздух-вода. Результаты демонстрируют, что межфазная чувствительность БсАт1 в значительной степени модулируется белок-белковым взаимодействием. Как представлено на Фиг. 4, Н6 обозначает композицию с 10 мМ гистидином при рН 6. Н6N обозначает композицию с 10

мМ гистидином, 150 мМ NaCl при pH 6. H6Arg обозначает буферную композицию 10 мМ гистидина, 150 мМ ArgHCl при pH 6.

### **Пример 5. Измерения параметра взаимодействия и второго осмотического коэффициента**

Параметр взаимодействия  $k_D$  измеряли с помощью динамического светорассеяния (ДСР), например, с использованием сканирующий спектрофотометра для прочтения планшетов Wyatt DynaPro (Wyatt Technology, Калифорния), от 2 мг/мл до 10 мг/мл. Значение  $k_D$  оценивали, как описано в разделе, посвященном способам. Второй осмотический вириальный коэффициент  $B_{22}$  измеряли с помощью системы композиционного градиентно-многоуглового светорассеяния (CG-MALS) Wyatt, как описано в разделе, посвященном способам.

Параметры взаимодействия белков ( $k_D$ ) измеряли с помощью способа ДСР. Результаты демонстрируют, что параметр взаимодействия  $k_D$  БсАт1 имеет значимое отрицательное значение в присутствии 10 мМ гистидина при pH 6 (H6 на Фиг. 5А) и pH 8 (Таблица 5), что указывает на наличие сильных притягивающих белок-белковых взаимодействий при pH 6. Стратегии увеличения ионной силы (добавление 150 мМ NaCl или 150 мМ ArgHCl) и изменение значения pH (от pH 6 до pH 5) могут увеличить значения  $k_D$  приготовления БсАт1, как представлено на Фиг. 5А. Хотя это не представлено на Фиг. 5А, вязкость БсАт1 в дополнительных приготовлениях также измеряли, как представлено в Таблице 5.

Таблица 5. Вязкость БсАт1 в Трисе, pH 8

Компонент приготовления БсАт1	$k_D$ (мл/г)
Ацетат, pH5,0+Пролин	-2,86
Ацетат, pH5,0+Цитрат	-12,5
Ацетат, pH5,0+MgCl <sub>2</sub>	-15,6
Ацетат, pH5,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-20,4
Гистидин, pH 6,0+Пролин	-23,4
Гистидин, pH 6,0+Цитрат	-11,7
Гистидин, pH 6,0+MgCl <sub>2</sub>	-11,9
Гистидин, pH 6,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-15
Трис, pH8,0	-7,03
Трис, pH8,0+Пролин	-9,19
Трис, pH8,0+Цитрат	-7,79
Трис, pH8,0+MgCl <sub>2</sub>	-10,8
Трис, pH8,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-8,3

Как представлено на Фиг. 5А и в Таблице 5, добавление 150 мМ ArgHCl или снижение значения pH с pH 8 до pH 5 в приготовлениях БсАт1 может увеличить значения

$k_D$  приготовлений БсАт1 до тета-условия, при котором  $k_D$  составляет около -5,37 мл/г. Когда значение  $k_D$  достигает тета-условия, чистого белок-белкового взаимодействия не существует, за исключением отталкивания твердых сфер при высоких концентрациях.

По сравнению с БсАт1 параметр взаимодействия  $k_D$  мАт-А имеет гораздо большее отрицательное значение в присутствии 10 мМ гистидина при рН 6 (Фиг. 5А), что указывает на наличие гораздо более сильных притягивающих белок-белковых взаимодействий. Стратегии увеличения ионной силы (добавление 150 мМ NaCl или 150 мМ ArgHCl) и изменение значения рН (от рН 8 до рН 5) могут увеличить значения  $k_D$  приготовления мАт-А, как представлено на Фиг. 5А и в Таблице 5. Однако скорректированные значения  $k_D$  приготовлений мАт-А все еще остаются более отрицательными по сравнению со значениями приготовлений БсАт1 в соответствующих приготовлениях. Как представлено на Фиг. 5А и в Таблице 5, добавление 150 мМ ArgHCl в приготовления мАт-А может увеличить значения  $k_D$  приготовлений мАт-А до тета-условия. И напротив, значения  $k_D$  приготовлений мАт-В были близки к тета-условию или превышали его, как представлено на Фиг. 5А (ошибка=стандартное отклонение из трех повторов). Совместные приготовления мАт-А и мАт-В имеют аналогичный уровень белок-белковых взаимодействий по сравнению с БсАт1. Основываясь на результатах, увеличение ионной силы, снижение значения рН и использование гидрофобного эксципиента могут эффективно уменьшить притягивающее белок-белковое взаимодействие.

Анализ параметра межмолекулярного взаимодействия  $k_D$  продемонстрировал, что между молекулами БсАт1 в 10 мМ гистидине при рН 6 присутствуют значительные притягивающие белок-белковые взаимодействия. Значение рН приготовления при рН 6 близко к значению  $pI$  БсАт1, равному около 6,9. Таким образом, было продемонстрировано, что стратегия добавления 150 мМ NaCl в приготовление может значительно снизить белок-белковое взаимодействие до минимального уровня. Принимая во внимание общий низкий белковый заряд БсАт 1 при рН 6, поскольку корректировка ионной силы может оказывать существенное влияние на снижение вязкости приготовления, можно предположить, что короткодействующие электростатические взаимодействия, такие как диполь-дипольное взаимодействие, ответственны за притягивающие белок-белковые взаимодействия, которые могут способствовать нежелательному поведению БсАт1 при высоких концентрациях.

Высокая вязкость и опалесценция БсАт1 при высокой концентрации белка были приписаны короткодействующему электростатическому взаимодействию и гидрофобному взаимодействию, при этом одна Fab-область преобладала в притягивающем взаимодействии между компонентами. Следовательно, нежелательное поведение при высокой концентрации БсАт1 в приготовлении можно эффективно уменьшить путем увеличения ионной силы и/или добавления гидрофобных эксципиентов. Эти результаты демонстрируют, что параметр межмолекулярного взаимодействия  $k_D$  БсАт1 может обеспечить корректное предсказание поведения белка при высокой концентрации.

Следовательно, измерения  $k_D$  можно использовать для отбора молекул-кандидатов для конструирования биспецифических антител и оптимизации их приготовлений.

Второй осмотический вириальный коэффициент  $B_{22}$  приготовления БсАт1 в 10 мМ гистидине при pH 6 и различных концентрациях белка измеряли с помощью композиционного градиентно-многоугольного светорассеяния Wyatt (CG-MALS), как представлено на Фиг. 5В. Результаты демонстрируют большие отрицательные значения  $B_{22}$ , которые указывают на наличие сильного притягивающего белок-белкового взаимодействия в приготовлении БсАт1 в присутствии 10 мМ гистидина при pH 6. Эти результаты подтвердили, что прогнозирование белок-белкового взаимодействия было надежным на основе измерения параметра взаимодействия  $k_D$ .

#### **Пример 6. Корреляционный анализ, связанный с параметрами взаимодействия**

Взаимосвязь между опалесценцией и параметром взаимодействия  $k_D$  анализировали с использованием корреляции Пирсона, как представлено на Фиг. 6А (при концентрации 150 мг/мл) и на Фиг. 6А (при концентрации 70 мг/мл). Хотя это не представлено на Фиг. 6А, взаимосвязь между опалесценцией и параметром взаимодействия  $k_D$  для БсАт1 в дополнительных приготовлениях также измеряли, как представлено в Таблице 6.

Таблица 5. Вязкость БсАт1 в Трисе, pH 8

Компонент приготовления БсАт1	OD при 405 нм (при 70 мг/мл)
Ацетат, pH5,0+Пролин	0,1179
Ацетат, pH5,0+Цитрат	0,2194
Ацетат, pH5,0+MgCl <sub>2</sub>	0,1815
Ацетат, pH5,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2657
Гистидин, pH 6,0+Пролин	0,2187
Гистидин, pH 6,0+Цитрат	0,1848
Гистидин, pH 6,0+MgCl <sub>2</sub>	0,1799
Гистидин, pH 6,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2202
Трис, pH8,0	0,152 (при 67 мг/мл)
Трис, pH8,0+Пролин	0,15
Трис, pH8,0+Цитрат	0,152
Трис, pH8,0+MgCl <sub>2</sub>	0,1711
Трис, pH8,0+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1595

Взаимосвязь между вязкостью и параметром взаимодействия  $k_D$  анализировали с

использованием корреляции Пирсона, как представлено на Фиг. 6В. Коэффициент корреляции Пирсона, например, корреляция Пирсона, представляет собой измерение линейной корреляции между двумя переменными. Существует соответствующая корреляция между опалесценцией/вязкостью и параметром взаимодействия  $k_D$ . Результаты указывают на наличие соответствующей корреляции между опалесценцией/вязкостью и белок-белковыми взаимодействиями. Белок-белковые взаимодействия доминируют в характеристиках белков (поведении белков) при высокой концентрации белка в растворе.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ для получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающий:

получение множества аминокислотных последовательностей пептидов или белков, отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности,

определение профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности,

отбор целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, и

получение комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что профиль белок-белковых взаимодействий определяют путем измерения параметров взаимодействия пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

3. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение профиля физико-химических свойств пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинацию пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, получают в соответствии с целевым профилем белок-белкового взаимодействия и профилем физико-химических свойств.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды определяют путем проведения структурного моделирования пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок-белковые взаимодействия представляют собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия.

7. Способ по п. 2, отличающийся тем, что комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, представляет собой биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело.

8. Способ по п. 7, дополнительно включающий определение индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела для получения биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация комбинации пептидов или

белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, составляет, по меньшей мере, около 70 мг/мл.

11. Система для получения комбинации пептидов или белков с целевыми физико-химическими свойствами, включающая:

первый накопитель данных, содержащий множество аминокислотных последовательностей пептидов или белков,

первое устройство обработки данных, соединенное с первым накопителем данных, способное осуществлять отбор пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, и

второе устройство обработки данных, способное генерировать профиль белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, совершать отбор целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, и идентифицировать комбинацию пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, отбирается в соответствии с целевым профилем белок-белковых взаимодействий.

12. Система по п. 11, отличающаяся тем, что профиль белок-белковых взаимодействий определяют путем измерения параметров взаимодействия пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

13. Система по п. 11, дополнительно содержащая профиль физико-химических свойств пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, при этом комбинация пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, выбрана в соответствии с целевым профилем белок-белкового взаимодействия и профилем физико-химических свойств.

14. Система по п. 13, отличающаяся тем, что физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность.

15. Система по п. 14, отличающаяся тем, что поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды определяют путем проведения структурного моделирования пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

16. Система по п. 11, отличающаяся тем, что белок-белковые взаимодействия представляют собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия.

17. Система по п. 11, отличающаяся тем, что комбинация пептидов или белков,

имеющих желаемые аминокислотные последовательности, представляет собой биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело.

18. Система по п. 17, дополнительно содержащая профиль индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

19. Система по п. 11, отличающаяся тем, что концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл.

20. Система по п. 11, отличающаяся тем, что концентрация комбинации пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, составляет, по меньшей мере, около 70 мг/мл.

21. Способ для оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, при этом приготовление содержит комбинацию пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, по п. 1, и способ включает:

регулирование ионной силы приготовления на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности, и

регулирование значения pH приготовления на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий добавление соли к приготовлению на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

23. Способ по п. 21, дополнительно включающий добавление гидрофобного эксципиента к приготовлению на основании целевого профиля белок-белковых взаимодействий пептидов или белков, имеющих желаемые аминокислотные последовательности.

24. Способ по п. 21, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один компонент представляет собой хлорид натрия, ацетат, гистидин или гидрохлорид аргинина.

25. Способ для оптимизации или отбора, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении, при этом приготовление содержит биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело, и способ включает:

определение профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела, и

оптимизацию или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что профиль белок-белковых взаимодействий определяют путем измерения параметров взаимодействия биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

27. Способ по п. 25, дополнительно включающий регулирование ионной силы приготовления на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

28. Способ по п. 25, дополнительно включающий регулирование значения рН приготовления на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

29. Способ по п. 25, дополнительно включающий определение профиля физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела, при этом оптимизация или отбор, по меньшей мере, одного компонента в приготовлении основаны на профиле белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела и профиле физико-химических свойств биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

30. Способ по п. 25, дополнительно включающий добавление соли к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

31. Способ по п. 25, дополнительно включающий добавление гидрофобного эксципиента к приготовлению на основании профиля белок-белковых взаимодействий биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

32. Способ по п. 25, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один компонент представляет собой хлорид натрия, ацетат, гистидин или гидрохлорид аргинина.

33. Способ по п. 29, отличающийся тем, что физико-химическое свойство представляет собой теоретическую изоэлектрическую точку, экспериментальную изоэлектрическую точку, поверхностную гидрофобность, относительную поверхностную гидрофобность, индекс гидрофобности, поверхностные заряды, гетерогенность заряда, второй осмотический вириальный коэффициент, стабильность при перемешивании, опалесценцию, вязкость или межфазную чувствительность.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что поверхностную гидрофобность или поверхностные заряды определяют путем проведения структурного моделирования биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

35. Способ по п. 25, отличающийся тем, что белок-белковые взаимодействия представляют собой отталкивающие или притягивающие белок-белковые взаимодействия.

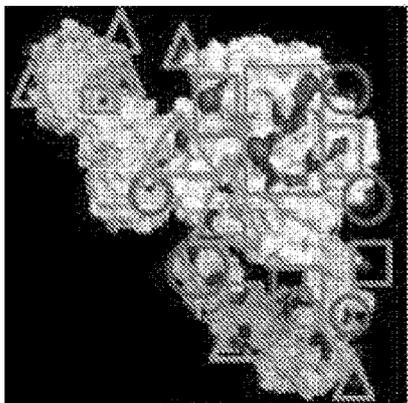
36. Способ по п. 29, дополнительно включающий определение индекса гидрофобности, поверхностных зарядов или гетерогенности заряда вариабельной области биспецифического антитела или полиспецифического антитела.

37. Способ по п. 25, отличающийся тем, что концентрация биспецифического антитела или полиспецифического антитела составляет от около 20 мг/мл до около 200 мг/мл.

38. Способ по п. 25, отличающийся тем, что концентрация биспецифического антитела или полиспецифического антитела составляет, по меньшей мере, около 70 мг/мл.

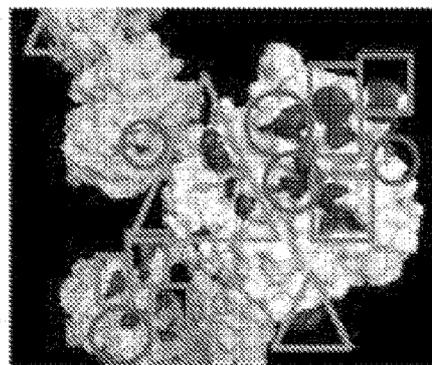
По доверенности

1A



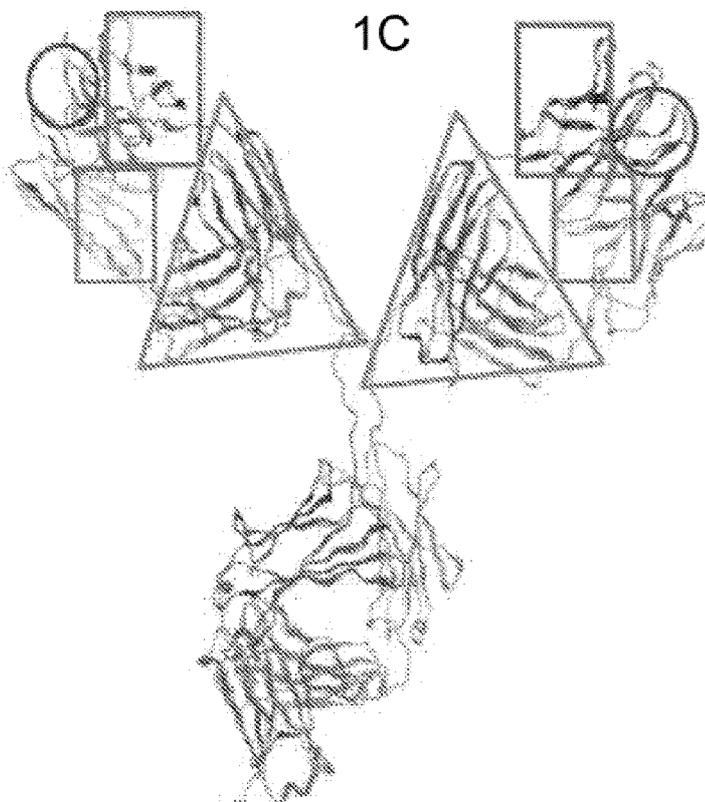
Fab-область МАТ-B

1B



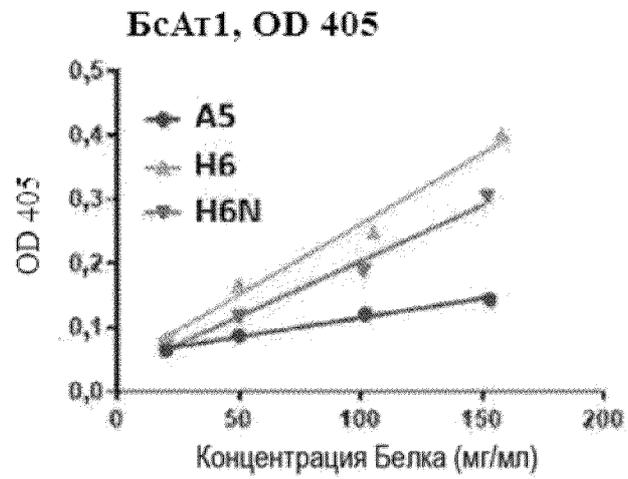
Fab-область МАТ-A

1C

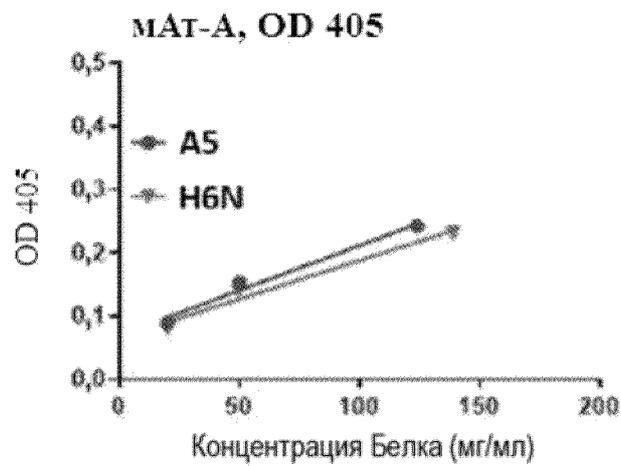


Модель поверхности БсАт 1

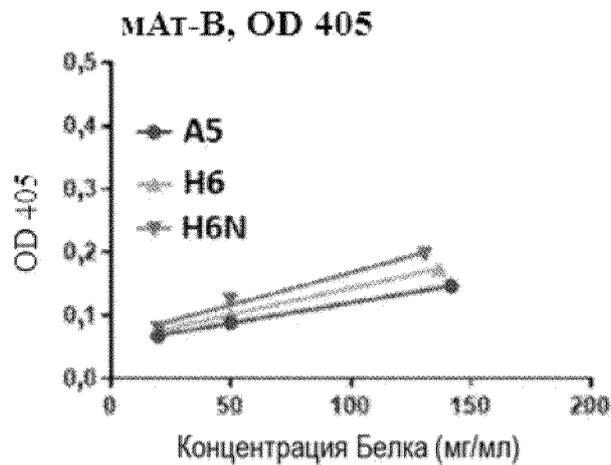
Фиг. 2А



Фиг. 2В

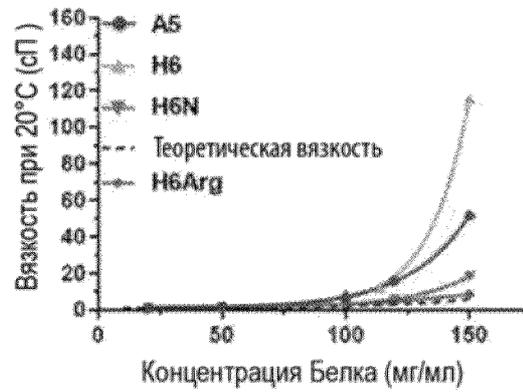


Фиг. 2С



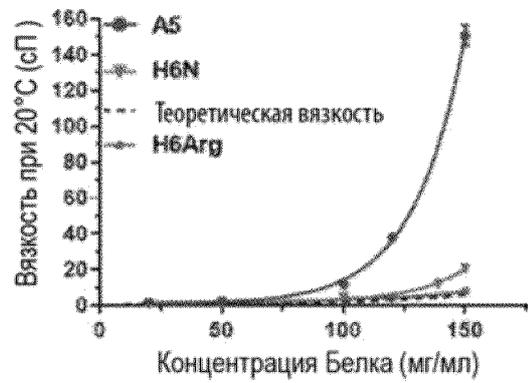
Фиг. 3А

БсАт1



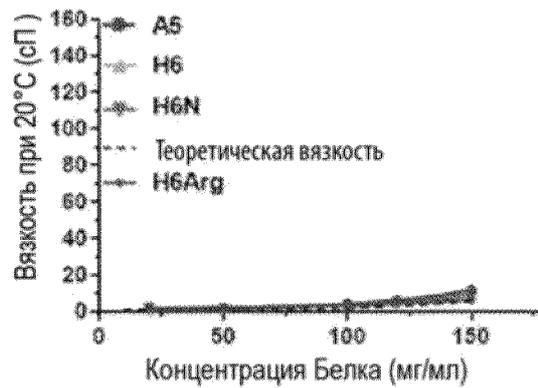
Фиг. 3В

МАТ-А



Фиг. 3С

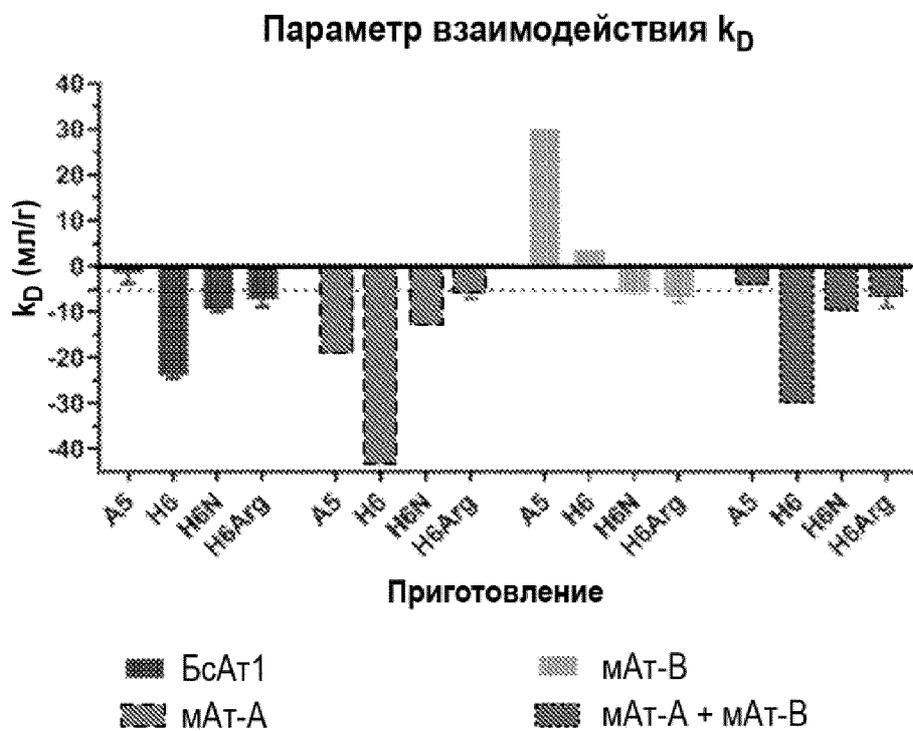
МАТ-В



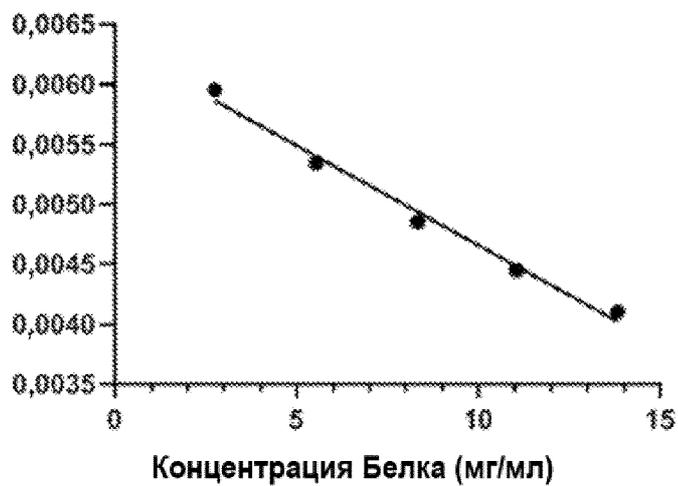
Фиг. 4



Фиг. 5А

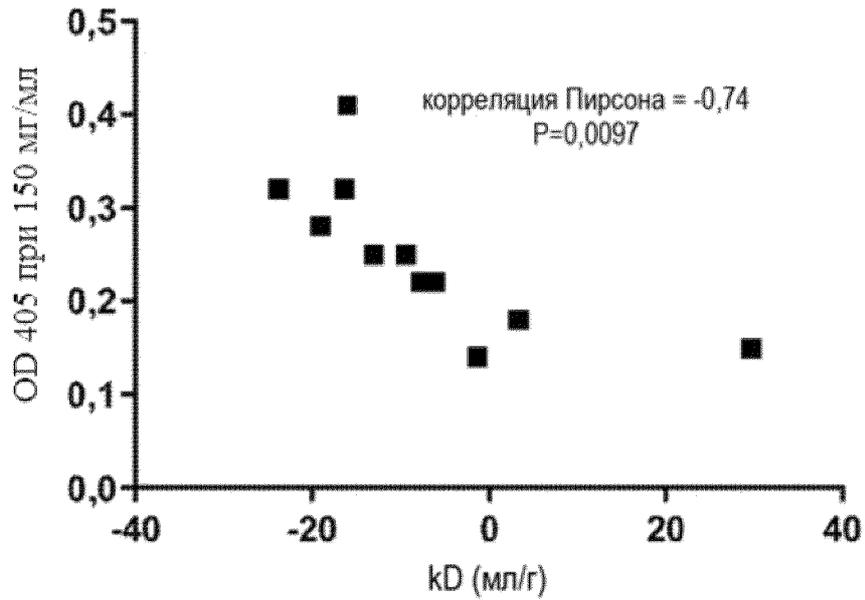


Фиг. 5В

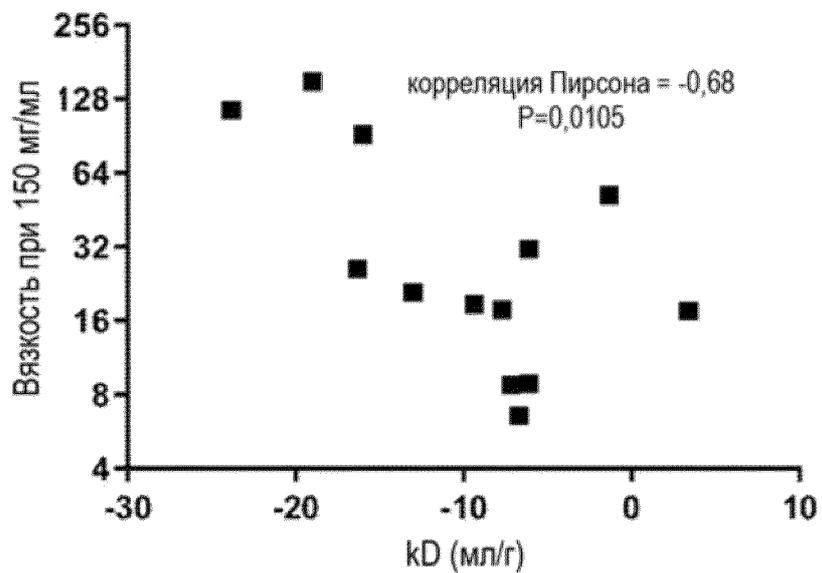


$B_{22}$	$-8,09E-05$	мол · мг/г <sup>2</sup>
$B_{22}/B_{HS}$	-1,85	
$Mw$	149,2	кДа

Фиг. 6А

Опалесценция в сравнении с  $kD$ 

Фиг. 6В

Вязкость в сравнении с  $kD$ 

Фиг. 6С

Опалесценция в сравнении с  $k_D$ 