

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392190** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.11.20

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

(22) Дата подачи заявки
2022.03.02

(54) **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ
ВЯЗКОСТИ БЕЛКОВ**

(31) **63/156,217**

(32) **2021.03.03**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/018465**

(87) **WO 2022/187323 2022.09.09**

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Сюй Сяобинь, Чжан Амин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены системы и способы определения областей белков, которые способствуют самоассоциации белка. Также предложены способы изменения самоассоциации концентрированных белковых составов.

202392190
A1

202392190

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579021EA/085

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ ВЯЗКОСТИ БЕЛКОВ

Данная заявка заявляет приоритет согласно заявке на патент США № 63/156,217, поданной 3 марта 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в целом относится к способам прогнозирования вязкости высококонцентрированных терапевтических антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Моноклональные антитела представляют собой быстрорастущий класс биологических терапевтических средств. Моноклональные антитела имеют широкий спектр показаний, включая воспалительные заболевания, онкологические заболевания и инфекционные заболевания. Количество коммерчески доступных моноклональных антител растет быстрыми темпами, и ожидается, что к 2020 году на рынке появится около ~70 продуктов моноклональных антител (Ecker, D.M, et al., *mAbs*, 7:9-14 (2015)).

В данное время наиболее часто используемым путем введения терапевтических антител является внутривенная (в/в) инфузия. Однако подкожные инъекции все чаще используются для пациентов с хроническими заболеваниями, которым требуется частое введение доз. Готовые к использованию предварительно заполненные шприцы или автоинжекторы позволяют пациентам самостоятельно вводить терапевтические антитела. Составы антител для подкожной инъекции обычно более концентрированы, чем для внутривенной инфузии, поскольку подкожная инъекция представляет собой одно болюсное введение (обычно 1-1,5 мл), в отличие от медленной инфузии антител в течении времени в случае внутривенной инфузии.

Общей проблемой, с которой сталкиваются при производстве высококонцентрированных терапевтических моноклональных антител, является высокая вязкость (Tomar, D.S., et al., *mAbs*, 8:216-228 (2016)). Высокая вязкость может вызвать увеличение времени инъекции и усиление боли в месте инъекции. Помимо проблем с введением, антитела с высокой вязкостью также создают проблемы при биопроцессинге раствора антител. Высокая вязкость может увеличить время обработки, дестабилизировать лекарственный препарат и увеличить производственные затраты. Электростатические и/или гидрофобные белок-белковые взаимодействия ближнего действия и электрорезистивные эффекты могут влиять на зависимость вязкости антител от концентрации.

Характеризация конформации и структурной динамики антитела может быть серьезной аналитической задачей. Многие доступные структурные технологии либо очень сложны, требуют высокоспециализированных навыков и большого количества образца (количества > мкМ), либо имеют низкое разрешение, что затрудняет детальный структурный анализ. В результате желательно иметь доступные способы, которые могут

позволить исследовать структуру белка с небольшими требованиями к образцу, хорошим разрешением и относительно коротким временем обработки.

Таким образом, целью данного изобретения является предоставление способов идентификации областей белков, которые способствуют вязкости составов этих белков.

Другой целью данного изобретения является предоставление способов изменения вязкости концентрированных белковых растворов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены системы и способы определения областей белков, которые способствуют вязкости составов этих белков. Также предложены способы изменения вязкости концентрированных белковых составов.

В вариантах реализации данного изобретения предложены способы идентификации областей в белке, которые способствуют вязкости белка, путем микродиализа образцов белка в картридже для микродиализа с буфером, содержащим дейтерий, в течение по меньшей мере двух различных периодов времени. После этого микродиализ гасят. Затем образцы с гашеным микродиализом анализируют с использованием системы масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом для определения областей белка в образце, которые имеют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка. Области белка с пониженным уровнем дейтерия способствуют повышению вязкости белка.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения образцы белка имеют концентрацию от 10 мг/мл до 200 мг/мл белка.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения образцы белка подвергают микродиализу в буфере, имеющем уровень pH от 5,0 до 7,5. Предпочтительным буфером для образцов белка является 10 мМ гистидин при уровне pH 6,0. Иллюстративный буфер, содержащий дейтерий, включает дейтерий в 10 мМ гистидине при уровне pH 6,0. Обычно микродиализ проводят при температуре от 2 до 6 °С, предпочтительно при 4 °С. В некоторых вариантах реализации данного изобретения микродиализ проводят при температуре от 20 до 25 °С. Различные образцы могут подвергаться диализу в течение разного времени, например, один образец может подвергаться диализу в течение 4 часов, а другой образец может подвергаться микродиализу в течение 24 часов. В некоторых вариантах реализации данного изобретения образцы подвергают диализу в течение 30 минут, 4 часов, 24 часов или в течение ночи, т.е. 26 часов.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения этап гашения микродиализа обычно проводят при температуре от -2 до 2°С в течение от 1 до 5 минут.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ включает этап расщепления белка до пептидов перед масс-спектрометрическим анализом.

В других вариантах реализации данного изобретения предложены способы изменения вязкости белкового лекарственного средства путем определения областей белкового лекарственного средства, которые способствуют вязкости белкового лекарственного средства в соответствии с описанными способами, и способы модификации

областей белкового лекарственного средства, которые идентифицированы как влияющие на вязкость белкового лекарственного средства для изменения вязкости белкового лекарственного средства. Области, идентифицированные как способствующие вязкости лекарственного средства, могут быть модифицированы путем замены одной или более аминокислот в по меньшей мере одном участке для уменьшения или увеличения вязкости произвольно.

В других вариантах реализации данного изобретения предложены способы идентификации областей в белках, которые способствуют самоассоциации белков, включающие: микродиализ образцов представляющего интерес белка в картридже для микродиализа с буфером, содержащим дейтерий, в течение по меньшей мере двух различных периодов времени; последующее гашение микродиализа образцов; и анализ образцов с подавленным микродиализом в системе масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом для определения распределения поверхностного заряда и гидрофобности в областях белка в образце, которые демонстрируют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка, при этом области белка, которые демонстрируют пониженные уровни дейтерия способствуют самоассоциации белков. Белки могут представлять собой моноклональные антитела, включая, но не ограничиваясь, описанные в данном документе антитела. Белки также могут представлять собой Fc-слитые белки, включая, но не ограничиваясь, Fc-слитые белки, описанные в данном документе.

Белок или белковое лекарственное средство может представлять собой антитело, слитый белок, рекомбинантный белок или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации данного изобретения белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

Условия, концентрации, время и этапы могут быть выбраны специалистом в данной области техники на основе описания, содержащегося в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А представлен линейный график, демонстрирующий вязкость (сП) мАт1 в зависимости от концентрации (мг/мл). На Фиг. 1В представлен линейный график, демонстрирующий вязкость (сП) мАт2 в зависимости от концентрации (мг/мл).

На Фиг. 2А-2F представлена схема иллюстративного протокола ВДО-МС на основе микродиализа. Получают картриджи для микродиализа (Фиг. 2А), добавляют буфер D₂O в планшет с глубокими лунками (Фиг. 2В), образцы загружают в картриджи для микродиализа (Фиг. 2С), картриджи для микродиализа загружают в планшет с глубокими лунками (Фиг. 2D), образцы инкубируют в буфере D₂O в течение различных периодов времени (Фиг. 2Е), и образцы удаляются для МС-анализа (Фиг. 2F).

На Фиг. 3А-3F представлены иллюстративные спектрограммы поглощения дейтерия с течением времени в образцах мАт1 без CDR при концентрациях 15 мг/мл (Фиг. 3А-3С) и концентрациях 120 мг/мл (Фиг. 3D-3F) через 0 часов (Фиг. 3А и 3D), 4 часа (Фиг. 3В и 3Е) или 24 часа (Фиг. 3С и 3F) после инкубации с дейтерием. На Фиг. 3G-3L представлены спектрограммы поглощения дейтерия в течении времени в образцах мАт1 без CDR при

концентрациях 15 мг/мл (Фиг. 3G-3I) и 120 мг/мл (Фиг. 3J-3L) через 0 часов (Фиг. 3G и 3J), 4 часа (Фиг. 3H и 3K) или 24 часа (Фиг. 3I и 3L) после инкубации с дейтерием. На Фиг. 3M и 3N представлены графики поглощения дейтерия, демонстрирующие % поглощения дейтерия в зависимости от времени (часы) при 15 мг/мл (σ) и 120 мг/мл (ρ) для HC36-47 мАт1 и LC48-53 мАт1.

На Фиг. 4A-4B и 4E-4F представлены графики «бабочки», демонстрирующие относительное поглощение дейтерия в областях CDR тяжелой цепи для мАт1 (Фиг. 4A и 4E) и мАт2 (Фиг. 4B и 4F) после 4 часов или 24 часов инкубации с дейтерием. Верхние графики представляют концентрацию образца 120 мг/мл, а нижние графики представляют концентрацию образца 15 мг/мл. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение дейтерия (%). На Фиг. 4C-4D и 4G-4H представлены графики остатков, демонстрирующие относительное поглощение дейтерия в областях CDR тяжелой цепи для мАт1 (Фиг. 4C и 4G) и мАт2 (Фиг. 4D и 4H) после 4 часов или 24 часов инкубации с дейтерием. Верхние графики представляют концентрацию образца 120 мг/мл, а нижние графики представляют концентрацию образца 15 мг/мл. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение дейтерия (%). На Фиг. 4G-4H представлены графики остатков, демонстрирующие поглощение дейтерия для легкой цепи мАт1 (Фиг. 4G) и легкой цепи мАт2 (Фиг. 4H) после 4 часов или 24 часов инкубации. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение дейтерия (%).

На Фиг. 5A представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR1 пептида 30-33 мАт1. На Фиг. 5B представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR1 пептида 31-34 мАт2. На Фиг. 5C представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR2 пептида 50-54 мАт1. На Фиг. 5D представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR2 пептида 50-53 мАт2. На Фиг. 5E представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR2 пептида 101-104 мАт1. На Фиг. 5F представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC CDR3 пептида 99-103 мАт2. На Фиг. 5G представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для LC CDR2 пептида 48-53 мАт1. На Фиг. 5H представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для LC CDR2 пептида 47-52 мАт2. На Фиг. 5I представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC без CDR пептида 36-47 мАт1. На Фиг. 5J представлен линейный график зависимости поглощения дейтерия (%) от времени (часы) для HC без CDR пептида 36-47 мАт2.

На Фиг. 6A представлено поглощение дейтерия, измеренное с помощью ВДО-МС, нанесенное на гомологичную модель мАт1. На Фиг. 6B представлено увеличенное изображение Fab-домена мАт1. Области CDR изображены в виде шариков. Области с дифференциальным поглощением дейтерия $\geq 10\%$ (абсолютное значение) указаны

стрелками без значимого дифференциального поглощения дейтерия (<10%, абсолютное значение). На Фиг. 6C представлено увеличенное изображение участков поверхности Fab-домена mAt1, а на Фиг. 6D представлено увеличенное изображение участков поверхности Fab-домена mAt2. Области CDR изображены в виде шариков. Гидрофобные участки указаны стрелкой. Положительно заряженные участки указаны стрелкой. Отрицательно заряженные участки указаны стрелкой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

Использование терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания заявленного изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее термины и в единственном, и множественном числе, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного способа индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в описание данного изобретения, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

Использование термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 10%; в других вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 5%; в других вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 2%; в других вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 1%. Предыдущие диапазоны предназначены для разъяснения контекста, и никаких дополнительных ограничений не подразумевают. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или иллюстративного языка (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не налагает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании данного изобретения не должны толковаться как указывающие на какие-либо не заявленные элементы как существенные для практического применения изобретения.

Используемый в контексте данного документа термин «белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может включать такие модификации, как гликозилирование, присоединение липидов, сульфирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес,

включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку путем трансфекции генно-инженерными нуклеотидными векторами (например, такими как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интрона и т. д.), при этом векторы могут находиться в виде эписомы или быть интегрированы в геном клетки.

«Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей 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), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими разными эпитопами. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527.

«CDR» или область, определяющая комплементарность, представляет собой область гипервариабельности, чередующуюся с более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» (FR). FR могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем.

Используемый в контексте данного документа термин «вязкость» относится к скорости передачи количества движения жидкости. Это величина, выражающая величину внутреннего трения, измеряемую силой на единицу площади, противодействующей потоку, в котором параллельные слои, расположенные на единичном расстоянии друг от друга, имеют единичную скорость относительно друг друга. В жидкостях вязкость относится к «густоте» жидкости.

Термин «ВДО-МС» относится к масс-спектрометрии с использованием водородно-

дейтериевого обмена.

Используемый в контексте данного документа термин «диализ» представляет собой способ разделения, который облегчает удаление небольших нежелательных соединений из макромолекул в растворе путем селективной и пассивной диффузии через полупроницаемую мембрану. Образец и буферный раствор (называемый диализатом, обычно в 200-500 раз превышающий объем образца) помещают на противоположные стороны мембраны. Молекулы пробы, размер которых превышает размеры пор мембраны, остаются на стороне пробы мембраны, но небольшие молекулы и буферные соли свободно проходят через мембрану, снижая концентрацию этих молекул в пробе. Как только возникает граница раздела жидкость-жидкость (образец с одной стороны мембраны и диализат с другой), все молекулы будут пытаться диффундировать через мембрану в любом направлении для достижения равновесия. Диализ (диффузия) прекратится, когда будет достигнуто равновесие. Системы диализа также используются для замены буфера.

Термин «микродиализ» относится к диализу образцов объемом менее одного миллилитра.

«D₂O» представляет собой аббревиатуру дейтерированной воды. Она также известна как тяжелая вода или оксид дейтерия. D₂O содержит большое количество изотопа водорода дейтерия вместо обычного изотопа водорода, который составляет большую часть водорода в обычной воде. Дейтерий представляет собой изотоп водорода, который в два раза тяжелее из-за добавленного нейтрона.

II. Способы Идентификации Областей Белков, Влияющих на Вязкость

Разработка высококонцентрированных терапевтических моноклональных антител имеет первостепенное значение для подкожной доставки терапевтических моноклональных антител. Однако высокая вязкость является проблемой при производстве концентрированных терапевтических моноклональных антител. Существует необходимость в разработке вычислительных и экспериментальных инструментов для быстрого и эффективного определения характера вязкости в зависимости от концентрации лекарственных средств-кандидатов на ранних этапах процесса разработки.

A. Микродиализ-Масс-Спектрометрия с Водородно-Дейтериевым Обменом

В процессе разработки терапевтическое моноклональное антитело может проявлять необычно высокую вязкость, например, при концентрациях >100 мг/мл, по сравнению с другими подобными моноклональными антителами. Это может быть связано с характерными электростатическими и/или гидрофобными белок-белковыми взаимодействиями моноклонального антитела при высоких концентрациях. Масс-спектрометрия с водородно-дейтериевым обменом (ВДО-МС) является полезным инструментом для исследования конформации, динамики и взаимодействий белков. Однако традиционный анализ ВДО-МС с мечением разбавлением имеет ограничения при анализе необычного характера поведения вещества, которое происходит только при высоких концентрациях белка. Для исследования белок-белковых взаимодействий, влияющих на высокую вязкость моноклональных антител при высокой концентрации

белка, с помощью ВДО-МС был разработан пассивный способ ВДО-МС на основе микродиализа для мечения ВДО без разбавления буфером D_2O , который позволяет профилировать характерные молекулярные взаимодействия при различных концентрациях белка. Использование планшета для микродиализа значительно снизило расход образцов и D_2O по сравнению с традиционными устройствами для диализа. Этот способ применялся для исследования белок-белковых взаимодействий при высокой концентрации моноклональных антител, обладающих очень высокой вязкостью.

Белки с высокой вязкостью можно оптимизировать, чтобы уменьшить или устранить характер поведения высокой вязкости. Способы оптимизации белковых препаратов или антител включают, но не ограничиваются, оптимизацию аминокислотной последовательности для снижения вязкости, изменение уровня рН или содержания соли в составе или добавление эксципиента.

В одном варианте реализации данного изобретения несколько составов терапевтического белка или антитела могут быть исследованы, чтобы определить наиболее перспективного кандидата для продолжения производства. Получают образцы с высокой и низкой концентрацией каждого белка или антитела. В одном варианте реализации данного изобретения высокая концентрация белка или антитела представляет собой >50 мг/мл. Высокая концентрация может составлять 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл или >200 мг/мл. В одном варианте реализации данного изобретения низкая концентрация антитела представляет собой <15 мг/мл. Низкая концентрация может составлять 15 мг/мл, 10 мг/мл, 9 мг/мл, 8 мг/мл, 7 мг/мл, 6 мг/мл, 5 мг/мл, 4 мг/мл, 3 мг/мл, 2 мг/мл, 1 мг/мл, 0,5 мг/мл или $<0,5$ мг/мл.

Более подробная информация об этапах описанных способов представлена ниже.

1. Водородно-Дейтериевый Обмен

Водородно-дейтериевый обмен представляет собой явление, при котором атомы водорода в лабильных положениях в белках спонтанно меняются местами с атомами водорода из окружающего растворителя, содержащего ионы дейтерия (Houde, D. and Engel, J.R., *Methods Mol Biol*, 988:269-289 (2013)). При ВДО задействуются три типа атомов водорода в белках: в углерод-водородных связях, в боковых цепях и в амидных функциональных группах (также называемых атомами водорода основной цепи). Скорости обмена атомов водорода в углерод-водородных связях слишком медленны, чтобы их можно было наблюдать, а скорости обмена атомов водорода в боковых цепях (например, OH, COOH) настолько высоки, что они быстро обмениваются обратно, когда реакция гасится в растворе на основе H_2O , и обмен не регистрируется. Только атомы водорода основной цепи полезны для описания структуры и динамики белка, поскольку скорость их обмена поддается измерению и отражает водородные связи и доступность растворителя. Амидные атомы водорода играют ключевую роль в формировании элементов вторичной и третичной структуры. Измерения скорости их обмена можно интерпретировать с точки зрения конформационной динамики отдельных структурных элементов более высокого порядка, а

также общей динамики и стабильности белка.

Скорость обмена отражает конформационную подвижность, прочность водородных связей и доступность растворителя в структуре белка. Информацию о конформации белка и, что наиболее важно, о различиях в конформации белка между двумя или более формами одного и того же белка можно извлечь, наблюдая за реакцией обмена. Скорость обмена зависит от температуры и уменьшается приблизительно в десять раз при понижении температуры с 25°C до 0 °C. Следовательно, при уровне pH 2-3 и при 0 °C (обычно называемых «условиями гашения») период полураспада для амидного изотопного обмена водорода в неструктурированном полипептиде составляет 30-90 мин, в зависимости от эффекта экранирования растворителя, вызванного боковыми цепями. Водород имеет массу 1,008 Да, а дейтерий (второй изотоп водорода) имеет массу 2,014 Да, за водородным обменом можно следить, измеряя массу белка с помощью масс-спектрометра.

В одном варианте реализации данного изобретения скорость водородно-дейтериевого обмена используется для определения характера вязкости терапевтических препаратов на основе белков или антител.

2. Микродиализ

Классическое непрерывное мечение ВДО посредством разбавления неприменимо при анализе высококонцентрированных белковых растворов. В одном варианте реализации данного изобретения предложен альтернативный способ мечения ВДО для использования с белковыми растворами высокой концентрации. Мечение ВДО в планшете для микродиализа облегчает анализ высококонцентрированных белковых растворов. Кроме того, использование планшета для микродиализа снижает расход образцов и D₂O по сравнению с традиционными устройствами для диализа (Houde, D., et al., *J Am Soc Mass Spectrom*, 27(4):669-76 (2016)). Планшет для микродиализа может представлять собой имеющийся в продаже планшет для микродиализа, например, 96-луночный планшет для микродиализа Pierce™.

В одном варианте реализации данного изобретения микродиализ на основе обмена ВДО используется для анализа высококонцентрированных белковых растворов. Образцы загружаются в микродиализный картридж планшета для микродиализа. В планшет с глубокими лунками или другой подходящий сосуд добавляют буфер D₂O. Картриджи для микродиализа, содержащие образцы белков, добавляют к буферу и оставляют инкубироваться в течение по меньшей мере 4 часов. Образцы могут инкубироваться в течение 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более 24 часов. Система диализа обеспечивает пассивную диффузию буфера в картридж, содержащий образец, чтобы не разбавлять образец, как это обычно бывает при традиционном непрерывном мечении ВДО, при котором требуется большое количество буфера. На этапе инкубации дейтерий из буфера D₂O попадает в картридж, содержащий образец, и заменяет атомы водорода в амидах основной цепи образцов белка. После этапа инкубации образцы собирают из картриджа для микродиализа.

3. Подготовка Образцов

Как только диализированные образцы удаляются из картриджа для микродиализа, реакция ВДО может быть остановлена путем гашения образцов. В одном варианте реализации данного изобретения гашение достигается добавлением к образцам буфера для гашения реакции. Буфер для гашения реакции может содержать 6 М GlnHCl и 0,6 М ТСЕР в H_2O , уровень рН 2,5. В одном варианте реализации данного изобретения буфер для гашения реакции содержит 8 М мочевины, 0,6 М ТСЕР в H_2O , уровень рН 2,5. В другом варианте реализации данного изобретения уровень рН конечного раствора с остановленной реакцией составляет 2,5.

В одном варианте реализации данного изобретения снижение температуры реакции также может гасить реакцию ВДО. Реакцию можно проводить при 0 °С. Скорость обмена уменьшается в десять раз при снижении температуры с 25°С до 0 °С. В одном варианте реализации данного изобретения реакцию гашения проводят при температуре 0 °С или ниже.

После гашения образцы можно разбавлять для последующего масс-спектрометрического анализа. Образцы можно разбавлять 0,1% муравьиной кислотой (FA) в H_2O или любым другим подходящим разбавителем для использования в масс-спектрометрии. Затем образцы обрабатываются масс-спектрометром.

4. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия используется для определения сдвигов масс, вызванных обменом водорода на дейтерий (или наоборот) с течением времени. Водород имеет массу 1,008 Да, а дейтерий имеет массу 2,014 Да, поэтому за водородным обменом можно следить, измеряя массу белка с помощью масс-спектрометра. Белки или антитела, содержащие дейтерий, будут иметь повышенную массу по сравнению с нативным белком или антителом, которые не были инкубированы в D_2O . Как правило, уровень обменного водорода отражает гибкость, доступность растворителя и взаимодействие водородных связей в белковых структурах.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения расщепление в реальном времени используется для расщепления более крупных белков или антител на более мелкие фрагменты или пептиды. Обычно используемые ферменты для расщепления в режиме реального времени включают, но не ограничиваются, пепсин, трипсин, трипсин/Lys-C, rLys-C, Lys-C и Asp-N.

В одном варианте реализации данного изобретения расщепленные белки или антитела подвергаются масс-спектрометрическому анализу. Способы проведения масс-спектрометрии известны в данной области техники. См., например, (Aebersold, M., and Mann, M., *Nature*, 422:198-207 (2003)). Обычно используемые типы масс-спектрометрии включают, но не ограничиваются, тандемную масс-спектрометрию (МС/МС), масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) и матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (МАЛДИ).

III. Способы Изменения Вязкости Белков

В одном варианте реализации данного изобретения предложены способы изменения вязкости белкового лекарственного средства путем определения областей белкового лекарственного средства, которые способствуют вязкости белкового лекарственного средства в соответствии с описанными способами, и способы модификации областей белкового лекарственного средства, которые идентифицированы как влияющие на вязкость белкового лекарственного средства для изменения вязкости белкового лекарственного средства. Области, идентифицированные как способствующие вязкости лекарственного средства, могут быть модифицированы путем замены одной или более аминокислот по меньшей мере в одном участке для уменьшения или увеличения вязкости произвольно.

Например, легкая цепь, тяжелая цепь или области, определяющие комплементарность, антитела могут быть модифицированы для снижения вязкости концентрированных составов антитела. Иллюстративный концентрированный состав имеет концентрацию антитела, превышающую 50 мг/мл, предпочтительно 100 мг/мл или более.

Другие модификации белкового лекарственного средства или антитела включают химические модификации аминокислот в области белка или антитела, которые, как определено, способствуют вязкости белкового лекарственного средства или антитела.

В одном варианте реализации данного изобретения белок, антитело или лекарственный продукт представляет собой или содержит один или более представляющих интерес белков, подходящих для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, представляющий интерес белок включает, но не ограничивается, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности, или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут быть простыми полипептидами, состоящими из одной субъединицы, или сложными мультисубъединичными белками, состоящими из двух или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант или любой белковый продукт, подлежащий очистке и стандартам качества.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения представляющий интерес белок представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, четырехвалентную иммуноглобулин G-подобную молекулу с двойной специфичностью, называемую иммуноглобулином с двойным переменным доменом (DVD-IG), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой

антитело IgG4. В другом варианте реализации данного изобретения антитело содержит химерную шарнирную область. В других вариантах реализации данного изобретения антитело содержит химерный Fc. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела против PD1, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда белка запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела против PD-L1, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела против Dll4, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитела против ANG2, описанного в патенте США № 9,402,898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела против AngPt13, описанного в патенте США № 9,018,356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, описанного в патенте США № 9,265,827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, описанного в патенте США № 9,302,015), антитела против компонента комплемента 5 (например, антитела против C5, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела против TNF, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитела против EGFR, описанного в патенте США № 9,132,192, или антитела против EGFRvIII, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексин 9 (например, антитела против PCSK9, описанного в патенте США № 8,062,640 или патенте США No. 9,540,449), антитела против фактора роста и дифференцировки 8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, описанного в патентах США № 8,871,209 или № 9,260,515), антитела против глюкогонового рецептора (например, антитела против GCGR, описанного в публикациях заявок на патент США № US2015/0337045A1 или № US2016/0075778A1)), антитела против VEGF, антитела против IL1R, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, антитела против IL4R, описанного в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или патентах США № 8,735,095 или № 8,945,559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитела против IL6R, описанного в патентах США № 7,582,298, № 8,043,617 или № 9,173,880), антитела против IL1, антитела против IL2, антитела против IL3, антитела против IL4, антитела против IL5, антитела против IL6, антитела против IL7, антитела против интерлейкина 33 (например, антитела против IL33, описанного в патентах США № 9,453,072 или № 9,637,535), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитела против RSV, описанного в публикации заявки на патент США № 9,447,173), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитела против CD3,

описанного в патентах США № 9,447,173 № 9,447,173 и в заявке на патент США № 62/222,605), антитела против кластера дифференцировки 20 (например, антитела против CD20, описанного в патентах США № 9,657,102 и № US20150266966A1, и в патенте США № 7,879,984), антитела против CD19, антитела против CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитела против CD48, описанного в патенте США № 9,228,014), антитела против Fel d1 (например, описанного в патенте США № 9,079,948), антитела против респираторно-синцитиального вируса Среднего Востока (например, антитела против MERS, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (например, описанного в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, антитела против LAG3 или антитела против CD223), антитела против фактора роста нервов (например антитела против NGF, описанного в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США № 8,309,088 и № 9,353,176) и антитела против белка Y. В некоторых вариантах реализации данного изобретения биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 × CD20 (описанного в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295A1 и № US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 × муцина 16 (например, биспецифического антитела против CD3 × Muc16) и биспецифического антитела против CD3 × простат-специфического мембранного антигена (например, биспецифического антитела против CD3 × PSMA). В некоторых вариантах реализации данного изобретения представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В одном варианте реализации данного изобретения представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах реализации данного изобретения Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за

которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах реализации данного изобретения рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или множественными лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганд-связывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6,927,044) или ловушку VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc из hIgG1; см. патенты США № 7,087,411 и № 7,279,159). В других вариантах реализации данного изобретения Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

В одном варианте реализации данного изобретения белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Масс-спектрометрия с использованием микродиализа на основе ВДО

Материалы и Способы

Реагенты и Химические Реактивы

мАт1 и мАт2 (мАт IgG4 человека) были произведены Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Тэрритаун, Нью-Йорк). Оксид дейтерия (99,9 атомных % D), гистидин, моногидрат гидрохлорида гистидина и гидрохлорид гуанидина были приобретены у Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Гидрохлорид трис-(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР-НСl), муравьиную кислоту (FA, степень чистоты реактива для секвенирования) и 96-луночный планшет для микродиализа (отсечение по молекулярной массе 10 кДа, MWCO) были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). Вода высокой чистоты была получена с использованием системы Milli-Q от Millipore Sigma (Бедфорд, Массачусетс).

Измерение концентрации и вязкости образцов мАт1 и мАт2

Образцы мАт1 и мАт2 с высокой концентрацией (120 мг/мл) разбавляли 10 мМ гистидином до ряда более низких концентраций: 100 мг/мл, 80 мг/мл, 60 мг/мл, 30 мг/мл и 15 мг/мл (Таблица 4). Концентрация каждого разбавленного образца измерялась микрообъемным спектрофотометром NanoDrop от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс) и представлена в Таблице 4. Вязкость каждого образца мАт1 и мАт2 измеряли с помощью вискозиметра Rheosense m-VROC (Сан-Рамон, Калифорния).

Таблица 4: Измерение концентрации образцов мАт1 и мАт2, полученных путем серийного разбавления

Точка Серийного	Ожидаемая номинальная	Измеренная концентрация мАт1	Измеренная концентрация мАт2
--------------------	--------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Разбавления	концентрация (мг/мл)	(мг/мл)	(мг/мл)
1	Исходный образец (~120)	Нет измерения	Нет измерения
2	100	104,2	102,4
3	80	87,0	83,4
4	60	55,7	56,8
5	30	29,5	32,8
6	15	15,7	15,3

Микродиализ без разбавления

мАт1 и мАт2 разбавляли в 10 мМ гистидине (рН 6,0) для создания образцов с высокой концентрацией (120 мг/мл) и образцов с низкой концентрацией (15 мг/мл). 160 мкл каждого образца загружали в картридж для микродиализа. Картридж вставляли в луночный планшет с глубокими лунками, содержащий буфер D₂O, и инкубировали в течение 4 или 24 часов при 4 °С. После инкубации 5 мкл каждого диализированного образца гасили добавлением к образцу буфера для гашения реакции в соответствии с Таблицей 1. Буфер для гашения реакции содержал 6М GlnHCl/0,6М ТСЕР в 100% D₂O. Реакцию гашения проводили при 0 °С в течение 3 минут. 10 мкл каждого гашеного образца разбавляли 0,1% FA в D₂O в соответствии с Таблицей 1. 70 мкл каждого образца загружали в систему ВДО.

Таблица 1. Буферы для образцов и объемы разбавления.

Сразу после этого 10 мкл каждого гашеного образца быстро смешивали с необходимым объемом 0,1% FA в H₂O при 0 °С, чтобы довести концентрацию белка в каждом образце до 0,1 мкг/мкл. Сразу после этого каждый образец анализировали с использованием специальной системы ВДО-МС, которая состояла из автодозатора ВДО с жидкостным охлаждением (NovaBioAssays, Воберн, Массачусетс) для расщепления и загрузки, системы СВЭЖХ (Jasco, Истон, Массачусетс) для разделения пептидов, и масс-спектрометра Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisherScientific, Уолтем, Массачусетс) для измерения массы пептида. Вкратце, 7 мкг каждого образца вводили в колонку с иммобилизованным пепсином/протеазой XIII (NovaBioassays, Воберн, Массачусетс) для расщепления в режиме реального времени и разделения ВЭЖХ. Расщепленные пептиды улавливали на колонке C8 1,0 × 50 мм (NovaBioAssays, Воберн, Массачусетс) при -9 °С. После обессоливания колонки в течение 3 минут захваченные пептиды элюировали 25-минутным градиентом с помощью системы СВЭЖХ (Jasco, Истон, Массачусетс) при -9 °С. Подвижная фаза А представляла собой 0,5% FA/95% воды/4,5% ацетонитрила, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% FA в ацетонитриле. Первоначально колонка была уравновешена 100% подвижной фазой А. После внесения образца и улавливания градиент начинался с 0,5-минутной выдержки при 0% подвижной фазы В с последующим увеличением до 8% подвижной фазы В течение 2,5 мин и увеличением до 28% подвижной фазы В в течение следующих 14 мин для разделения пептидов. Затем колонку промывали путем увеличения содержания подвижной фазы В до

95% в течение 3 мин с последующим снижением содержания подвижной фазы В до 2% в течение 0,5 мин. Градиент заканчивался выдержкой 4,5 мин при 2% подвижной фазы В. Выделенные пептиды анализировали путем масс-спектрометрии в режимах МС и МС/МС. Параметры МС были установлены следующим образом: разрешающая способность 70000 (m/z 200) при сканировании МС и 35000 при сканировании МС/МС; напряжение распыления 3,8 кВ; капиллярная температура 325 °С; мишень AGC, 3e6 при сканировании МС и 1e5 при сканировании МС/МС; максимальное время внесения, 100 мсек. для сканирования МС и 50 мсек. для сканирования МС/МС; количество циклов МС/МС, 6; диапазон m/z , 300-1500; и ступенчатая NCE, 15–26–36. Данные ЖХ-МС/МС недеитерированных образцов мАт1 и мАт2 искали по базе данных, включая мАт1 и мАт2 и их рандомизированную последовательность, с использованием поисковой системы Yuonic™ (Protein Metrics, Купертино, Калифорния). Список идентифицированных пептидов затем был импортирован вместе с данными ЖХ-МС всех дейтерированных образцов в программное обеспечение HDExaminer™ (Sierra Analytics, Модесто, Калифорния) для расчета поглощения дейтерия отдельными пептидами в каждом образце. Моделирование гомологии мАт1 и мАт2 и анализ участков поверхности белка выполняли с использованием МОЕ (версия 2019.0102, Chemical Computing Group, Монреаль, Квебек, Канада).

Таблица 1

Образец	Объем буфера для гашения реакции	Объем буфера для разбавления	Количество внесенной пробы
120 мг/мл	5 мкл → 295 мкл (2 мг/мл)	10 мкл → 130 мкл (0,1 мг/мл)	70 мкл (7 мкг)
15 мг/мл	5 мкл → 70 мкл (1 мг/мл)	20 мкл → 120 мкл (0,1 мг/мл)	70 мкл (7 мкг)

Результаты

Моноклональное антитело 1 (мАт1) проявляло необычно высокую вязкость при концентрациях >100 мг/мл по сравнению с другими моноклональными антителами на этапе разработки (Фиг. 1А-1В). Для исследования белок-белковых взаимодействий, определяющих высокую вязкость мАт1 при высокой концентрации белка, был разработан пассивный способ ВДО-МС, основанный на микродиализе, для мечения ВДО без разбавления буфера D₂O, что позволяет профилировать молекулярные взаимодействия при различных концентрациях белка (Фиг. 2А-2F).

Значимое снижение содержания дейтерия наблюдалось в образцах с высокой концентрацией (120 мг/мл) по сравнению с контрольными образцами (15 мг/мл) для трех областей, определяющих комплементарность, тяжелой цепи и CDR2 легкой цепи в случае мАт1 (Фиг. 3А-3N, Таблица 2 и Таблица 3). Этот результат указывает на то, что эти CDR могут быть вовлечены в специфические межмолекулярные взаимодействия, которые могут вызывать необычно высокую вязкость, наблюдаемую в случае мАт1. Чтобы подтвердить,

что эти CDR являются причиной высокой вязкости, описанный способ был применен для исследования белок-белковых взаимодействий при высокой концентрации мАт2, которое имеет ту же аминокислотную последовательность, что и мАт1, за исключением CDR, и имеет низкую вязкость (Фиг. 4В, 4D, 4F и 4H). В отличие от мАт1, между образцами мАт2 с высокой концентрацией и образцами мАт2 с низкой концентрацией не наблюдалось различий в поглощении дейтерия, что еще раз подтверждает, что CDR мАт1 вызывают высокую вязкость при высоких концентрациях.

Таблица 2. Относительное поглощение дейтерия пептидом мАт1 без CDR с течением времени.

Момент времени	Относительное поглощение дейтерия мАт1 без CDR (%)	
	15 мг/мл	120 мг/мл
0 ч	0,0%	0,0%
4 ч	36,7%	33,2%
24 ч	41,7%	38,6%

Таблица 3. Относительное поглощение дейтерия пептидом мАт1 LC-CDR с течением времени.

Момент времени	Относительное поглощение дейтерия мАт1 LC-CDR (%)	
	15 мг/мл	120 мг/мл
0 ч	0,0%	0,0%
4 ч	49,8%	39,1%
24 ч	65,6%	52,2%

Пример II: Дифференциальная зависящая от концентрации вязкость наблюдалась у мАт1 и мАт2.

Два моноклональных антитела-кандидата, моноклональное антитело 1 (мАт1) и моноклональное антитело 2 (мАт2), каждое из которых специфично в отношении одной и той же терапевтической мишени и имеет одинаковую аминокислотную последовательность, за исключением CDR, были оценены на предмет потенциальных рисков при разработке на этапе отбора кандидатов. Значимая разница в вязкости, зависящей от концентрации, наблюдалась для мАт1 и мАт2 (Фиг. 1А и 1В). Вязкость мАт1 резко увеличивалась с увеличением концентрации белка, в то время как вязкость мАт2 увеличивалась лишь незначительно с увеличением концентрации белка. Кроме того, мАт1 проявляло необычно высокую вязкость при концентрациях выше 100 мг/мл. Как в случае мАт1, так и в случае мАт2 не наблюдалось аномальных уровней соединений с более высокой молекулярной массой, что указывает на то, что высокая вязкость не была вызвана агрегацией белка (данные не представлены). Для выяснения молекулярного механизма, вызывающего высокую вязкость состава мАт1, был разработан способ ВДО-МС без разбавления на основе использования планшетов для микродиализа с целью определения аминокислотных остатков, вовлеченных в поверхность границ белок-белковых

взаимодействий, которые, вероятно, ответственны за наблюдаемую высокую вязкость (Фиг. 2A-2D). При таком подходе реакции ВДО проводились с использованием картриджей для микродиализа для получения ВДО без разбавления. По сравнению с предыдущим способом, связанным с диализом, этот подход значительно снижает требуемое количество образцов и обеспечивает более высокую производительность благодаря формату 96-луночных микропланшетов. В результате этот способ подходит для скрининга кандидатов на раннем этапе разработки, когда белковые материалы ограничены.

Хотя в приведенном выше описании данное изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов реализации, и многие детали были представлены с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данное изобретение допускает дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отклонения от основных принципов данного изобретения.

Пример III: Области CDR мАт1 представляли собой области белок-белкового взаимодействия.

Для анализа поглощения дейтерия в составе с высокой концентрацией (120 мг/мл) по сравнению с составом с низкой концентрацией (15 мг/мл) для мАт1 и мАт2 использовали ВДО-МС на основе планшета для микродиализа. 458 пептидов были воспроизводимо идентифицированы в результате анализа ВДО-МС, в результате чего охват последовательностей тяжелой цепи (НС) мАт1 составил 89,2%, а легкой цепи (LC) мАт1-100% (данные не представлены). Чтобы сравнить дифференциальное поглощение дейтерия между образцами с высокой концентрацией при 120 мг/мл и образцами с низкой концентрацией при 15 мг/мл для мАт1 и мАт2, были созданы графики остатков идентифицированных пептидов мАт1 и мАт2, на которых поглощение дейтерия образцами с низкой концентрацией (15 мг/мл) вычитали из соответствующих образцов с высокой концентрацией (120 мг/мл) (Фиг. 4C, 4D, 4G и 4H). Графики остатков демонстрируют, что большинство пептидов имеют несколько более низкое поглощение дейтерия при 120 мг/мл по сравнению с поглощением дейтерия при 15 мг/мл как для мАт1, так и для мАт2, вероятно, из-за скопления молекул, которое делает белки менее доступными для D₂O при высокой концентрации, а также снижает скорость диффузии, что снижает скорость ВД-обмена при высокой концентрации. В среднем мы наблюдали на ~5% систематически более низкое дифференциальное поглощение дейтерия между образцами с концентрацией 120 мг/мл по сравнению с образцами с концентрацией 15 мг/мл. Из-за этих системных различий в поглощении дейтерия мы рассматривали дифференциальное поглощение дейтерия на уровне 10% (абсолютное значение) или более как значимую разницу в поглощении дейтерия между образцами с высокой и низкой концентрацией. Для мАт1 мы наблюдали, что дифференциальное поглощение дейтерия НС CDR1 30-33, НС CDR2 50-54, НС CDR3 101-104 и LC CDR2 48-53 между образцами 120 мг/мл и образцами 15 мг/мл было значимо выше ($\geq 10\%$, абсолютное значение) по сравнению с другими областями пептида, что указывает на то, что эти области CDR были более экранированы при высокой концентрации

по сравнению с низкой концентрацией. Таким образом, эти области CDR, вероятно, находились на поверхности границ самоассоциации мАт1. Никаких существенных различий в дифференциальном поглощении дейтерия не наблюдалось в каких-либо областях последовательности в мАт2, подтверждая, что эти области CDR мАт1 находились на поверхности границы самоассоциации мАт1.

Пример IV: Результаты поглощения дейтерия в зависимости от времени мечения ВДО

На Фиг. 5А-5J представлены результаты поглощения дейтерия в зависимости от времени мечения ВДО для пяти иллюстративных пептидов, включая эти четыре пептида CDR мАт1 (НС CDR1 30-33, НС CDR2 50-54, НС CDR3 101-104 и LC CDR2 48-53) и один пептид мАт1 без CDR (НС без CDR 36-47) в качестве сравнения. Также представлено поглощение дейтерия пятью соответствующими пептидами в тех же областях мАт2 (НС CDR1 31-34, НС CDR2 50-53, НС CDR3 99-103, LC CDR2 47-52 и НС не-CDR 36-47) в качестве сравнения. Поглощение дейтерия этими пептидами увеличивалось по мере увеличения времени реакции ВДО, пока не достигалось равновесие в 24-часовой момент времени. На Фиг. 5I представлен иллюстративный пептид мАт1, который не демонстрирует существенной разницы в кинетике ВДО между образцами с высокой и низкой концентрацией, что указывает на то, что эта область не вовлечена в поверхность границы самоассоциации белка. В противоположность этому, на Фиг. 5А, 5С, 5Е и 5G представлено, что четыре пептида CDR мАт1 (НС CDR1 30-33, НС CDR2 50-54, НС CDR3 101-104 и LC CDR2 48-53) имели значимое дифференциальное поглощение дейтерия ($\geq 10\%$, абсолютное значение) между образцами с высокой и низкой концентрацией, что указывает на то, что эти области были более экранированы в образцах с высокой концентрацией по сравнению с образцами с низкой концентрацией и, следовательно, находились на поверхности границы самоассоциации. С другой стороны, соответствующие области в мАт2 продемонстрировали очень низкое дифференциальное поглощение дейтерия ($<5\%$, абсолютное значение) (Фиг. 5В, 5D, 5F, 5H, 5J), что указывает на отсутствие самоассоциации в образцах с высокой концентрацией мАт2.

Пример VI: Гомологичная модель мАт1 и мАт2

Результаты ВДО-МС были сопоставлены с гомологичной моделью мАт1 и мАт2 (Фиг. 6А-6D). На Фиг. 6А мАт1 представлено полностью, а на Фиг. 6В представлено увеличенное изображение области Fab. Области пептида в мАт1, связанные с самоассоциацией при высокой концентрации, вызывающей значимое снижение поглощения дейтерия ($\geq 10\%$, абсолютное значение), выделены красным цветом, в то время как области без значимого дифференцированного поглощения дейтерия ($<10\%$, абсолютное значение) окрашены в серый цвет. Пептиды, которые демонстрировали пониженное поглощение дейтерия при высокой концентрации по сравнению с низкой концентрацией, представляли собой области CDR, экспонированные растворителем, и представляли собой поверхность границы белок-белкового взаимодействия при зависящей от концентрации обратимой самоассоциации мАт1. Анализ белковых участков поверхности Fab-доменов

мАт1 и мАт2 представлен на Фиг. 6С и 6D. Анализ белковых участков демонстрирует, что распределение поверхностного заряда и гидрофобности HC CDR1, CDR2 и CDR3 различаются между мАт1 и мАт2. HC CDR1 мАт1 конструирует гидрофобный участок 50 \AA^2 , HC CDR2 конструирует гидрофобный участок 70 \AA^2 , а HC CDR3 и LC CDR2 конструируют положительно заряженный участок 140 \AA^2 , в то время как HC CDR1 и CDR3 мАт2 конструируют гидрофобный участок 170 \AA^2 , а HC CDR2 конструирует отрицательно заряженный участок 80 \AA^2 . Следовательно, различия в распределениях поверхностного заряда и гидрофобности областей CDR мАт1 и мАт2 обуславливают обратимую самоассоциацию мАт1.

При анализе профилей поглощения дейтерия мАт1 и мАт2 было обнаружено, что большинство пептидов имеют несколько более низкое поглощение дейтерия (~5%) в образцах с концентрацией 120 мг/мл по сравнению с поглощением дейтерия в образцах с концентрацией 15 мг/мл как для мАт1, так и для мАт2 (Фиг. 4А-4Н и Фиг. 5А-5J). Сообщалось, что скорость обмена Н/D может варьироваться в зависимости от уровня pH раствора, температуры, доступности растворителя и структуры белка. В этом исследовании уровень pH и температура раствора точно контролировались и поддерживались одинаковыми для тестируемых образцов, чтобы обеспечить высокую воспроизводимость результатов анализа. Таким образом, маловероятно, что уровень pH и температура раствора обуславливали наблюдаемую разницу скорости обмена Н/D между образцами с концентрацией 15 мг/мл и 120 мг/мл. Однако вполне вероятно, что скученность молекул в образцах с высокой концентрацией снижала доступность растворителя и гибкость белковой цепи, что приводило к более медленной кинетике обмена Н/D и немного более низкому поглощению дейтерия. В образцах с высокой концентрацией отношение D_2O к белку было ниже, чем в образцах с низкой концентрацией. Кроме того, белковые молекулы были более скученными в образцах с высокой концентрацией, что уменьшало их доступность для окружающего D_2O . Эти два фактора снижали доступность растворителя и, вероятно, были причиной несколько более низкого поглощения дейтерия, наблюдаемого в образцах мАт2 (Фиг. 4С и 4D), при этом не наблюдалось обратной самоассоциации, зависящей от концентрации. Структура белка также может влиять на скорость обмена Н/D, и лежащий в основе этого механизм был описан моделью⁴⁵ Линдерстрема-Ланга. Согласно модели Линдерстрема-Ланга, скорость обмена Н/D зависит от внутреннего химического обмена (k_{int}) и гибкости белка (k_{cl}/k_{op}). Хотя мы наблюдали необычно высокую вязкость мАт1 при 120 мг/мл, сообщается, что разница в вязкости мало влияет на внутренний химический обмен. Гибкость остова в основном зависит от первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры белка. Обратимая самоассоциация, возникающая в результате электростатических взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса или гидрофобных взаимодействий, может влиять на гибкость остова целых белковых молекул. Действительно, анализ белковых участков продемонстрировал, что области CDR мАт1 и мАт2 демонстрируют различия в распределениях поверхностного заряда и гидрофобности (Фиг. 6С). Таким образом, вполне вероятно, что самоассоциация уменьшила гибкость

остова мАт1 при высокой концентрации и привела к более медленной кинетике обмена H/D и немного более низкому поглощению дейтерия (Фиг. 4С и 4G).

Анализ ВДО-МС продемонстрировал, что некоторые пептиды в мАт1 обладают повышенной защитой от поглощения дейтерия в образцах с высокой концентрацией (Фиг. 4А-4Н). Таким образом, эти пептиды были идентифицированы как поверхность границы взаимодействия для обратимой самоассоциации мАт1. В частности, четыре области CDR, HC 30-33 (HC CDR1), HC 50-54 (HC CDR2), HC 101-104 (HC CDR3) и LC 48-53 (LC CDR2) в мАт1 показали значимое снижение поглощения дейтерия, демонстрируя, что эти четыре области CDR были вовлечены в самоассоциацию, что приводит к высокой вязкости при высокой концентрации. В аналогичных участках CDR защита от поглощения дейтерия не наблюдалась в образцах мАт2, что еще раз подтверждает участие остатков CDR мАт1 в самоассоциации мАт1. Об участии областей CDR в обратимой самоассоциации антител сообщалось и в предыдущих исследованиях. Например, Bethea et al. использовали точечные мутации, чтобы продемонстрировать, что F⁹⁹ и W¹⁰⁰ в CDR3 тяжелой цепи антитела IgG1 человека участвуют в самоассоциации белка. В другом исследовании Yadav et al. заменяли заряженные остатки в областях CDR самоассоциирующихся антител IgG1, что приводило к резкому снижению вязкости²³ раствора. Точно так же Perchiacca et al. вставили два или более отрицательно заряженных остатка на краю CDR3 однодоменного (V_H) антитела, что значительно уменьшало агрегацию белка, вызванную кластерами гидрофобных остатков в CDR3. Аналогично Bethea et al. использовали подход мутагенеза, чтобы идентифицировать, что три остатка ⁹⁹FHW¹⁰⁰ в HC CDR3 мАт IL13 способствуют самоассоциации и агрегации²¹. Недавно Aroga et al. восстановили лиофилизированное мАт IgG1 в растворах с концентрацией 5 мг/мл и 60 мг/мл с использованием буфера для мечения D₂O с последующим анализом ВДО-МС и определили, что HC CDR2 и LC CDR2 находились на поверхности границы белок-белкового взаимодействия, связанного с зависимой от концентрации обратимой самоассоциацией. Эти исследования продемонстрировали, что как заряженные остатки, так и гидрофобные остатки в областях CDR могут приводить к обратимой самоассоциации. Хотя анализы мутагенеза могут точно определить аминокислотные остатки, участвующие в самоассоциации, внесение точечных мутаций может занять много времени. Анализ ВДО-МС может помочь найти аминокислотные остатки, участвующие в самоассоциации, без проведения трудоемких анализов мутагенеза.

В связи с растущей популярностью подкожного введения и потребностью в препаратах с высокой концентрацией важно лучше понять зависимую от концентрации обратимую самоассоциацию потенциальных терапевтических мАт. В этом исследовании был разработан способ микродиализа с ВДО-МС без разведения для определения аминокислотных остатков на поверхности границ самоассоциации мАт1. Этот способ может помочь идентифицировать аминокислотные остатки на поверхности границ белок-белковых взаимодействий перед проведением трудоемких анализов мутагенеза. По сравнению с ранее описанными подходами ВДО-МС, наш подход на основе планшетов для микродиализа не только снизил требования к количеству пробы, но и увеличил

производительность анализа. В результате, способ ВДО-МС на основе планшетов для микродиализа в сочетании с другими ортогональными биофизическими измерениями может стать подходящим и мощным инструментом для использования на ранних этапах отбора терапевтических мАт-кандидатов и оценки возможности разработки, чтобы помочь понять обратимую самоассоциацию белка и причины высокой вязкости.

Описанный в данном документе способ ВДО-МС на основе планшетов для микродиализа может обеспечить мечение ВДО без разбавления буфером D_2O , что позволяет нам профилировать характерные молекулярные взаимодействия при различных концентрациях белка. Использование планшета для микродиализа значительно снижает расход образцов и D_2O по сравнению с традиционными устройствами для диализа. Данный способ был применен для оценки на раннем этапе возможности разработки двух кандидатов в лекарственные средства, мАт1 и мАт2. Хотя мАт1 и мАт2 имеют одинаковую аминокислотную последовательность, за исключением CDR, мАт1 имело необычно высокую вязкость при высоких концентрациях по сравнению с мАт2. В случае мАт1 наблюдалось значимое снижение поглощения дейтерия между образцами с высокой концентрацией (120 мг/мл) и образцами с низкой концентрацией (15 мг/мл) в трех CDR тяжелой цепи и CDR2 легкой цепи, в то время как в случае мАт2 дифференциальное поглощение дейтерия не наблюдалось между образцами с высокой концентрацией и образцами с низкой концентрацией. Этот результат указывает на то, что эти CDR в мАт1 участвуют в межмолекулярных взаимодействиях, что приводит к необычно высокой вязкости в образцах мАт1 с высокой концентрацией.

Данное изобретение может быть реализовано в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, ссылка должна быть сделана на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, указывающую на объем данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации областей в белке, которые способствуют самоассоциации белка, включающий:

микродиализ образцов белка в картридже для микродиализа с буфером, содержащим дейтерий, в течение по меньшей мере двух различных периодов времени;

последующее гашение микродиализа образцов; и

анализ гашеных образцов в системе масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом для определения распределения поверхностного заряда и гидрофобности в областях белка в образце, которые демонстрируют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка, при этом области белка, которые демонстрируют пониженные уровни дейтерия, способствуют самоассоциации белка.

2. Способ по п. 1, где белок представляет собой моноклональное антитело.

3. Способ по п. 2, где области белка, которые демонстрируют пониженные уровни дейтерия, представляют собой области, определяющие комплементарность.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где микродиализ проводят в концентрации, используемой при подкожной доставке.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где распределения поверхностного заряда, имеющие положительно заряженные участки, способствуют самоассоциации белка.

6. Способ по п. 1, где образцы белка содержат от 10 мг/мл до 200 мг/мл белка.

7. Способ по п. 1, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в буфере, имеющем уровень pH от 5,0 до 7,5.

8. Способ по п. 1, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в 10 мМ гистидине при уровне pH 6,0.

9. Способ по п. 1, где буфер, содержащий дейтерий, содержит 10 мМ гистидина при уровне pH 6,0.

10. Способ по п. 1, где микродиализ проводят при температуре от 2 до 6 °C.

11. Способ по п. 1, где по меньшей мере один образец подвергают микродиализу в течение 4 часов и по меньшей мере один другой образец подвергают микродиализу в течение 24 часов.

12. Способ по п. 1, где этап гашения реакции проводят при температуре от -2 до 2 °C в течение от 1 до 5 минут.

13. Способ по п. 1, дополнительно включающий расщепление белка до пептидов перед масс-спектрометрическим анализом.

14. Способ по п. 1, где белок выбран из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

15. Способ по п. 14, где белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

16. Способ по п. 2, где моноклональное антитело выбрано группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба,

бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-duyb, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

17. Способ по п. 1, где белок представляет собой Fc-слитый белок.

18. Белковое лекарственное средство, полученное способом по п. 1.

19. Способ идентификации областей в белке, которые способствуют вязкости белка, включающий:

микродиализ образцов белка в картридже для микродиализа с буфером, содержащим дейтерий, в течение по меньшей мере двух различных периодов времени;

последующее гашение микродиализа образцов;

анализ гашеных образцов в системе масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом для определения областей белка в образце, которые имеют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка, при этом области белка, которые имеют пониженные уровни дейтерия, способствуют вязкости белка.

20. Способ по п. 19, где образцы белка содержат от 10 мг/мл до 200 мг/мл белка.

21. Способ по п. 19, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в буфере, имеющем уровень pH от 5,0 до 7,5.

22. Способ по п. 19, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в 10 мМ гистидине при уровне pH 6,0.

23. Способ по п. 19, где буфер, содержащий дейтерий, содержит 10 мМ гистидина при уровне pH 6,0.

24. Способ по п. 19, где микродиализ проводят при температуре от 2 до 6 °C.

25. Способ по п. 19, где по меньшей мере один образец подвергают микродиализу в течение 4 часов и по меньшей мере один другой образец подвергают микродиализу в течение 24 часов.

26. Способ по п. 19, где этап гашения реакции проводят при температуре от -2 до 2 °C в течение от 1 до 5 минут.

27. Способ по п. 19, дополнительно включающий расщепление белка до пептидов перед масс-спектрометрическим анализом.

28. Способ изменения вязкости белкового лекарственного средства, включающий:

идентификацию областей белкового лекарственного средства, которые способствуют вязкости белкового лекарственного средства, в соответствии со способом по

любому из п. 19,

модификацию одной или более областей, идентифицированных как способствующие вязкости белкового лекарственного средства, для изменения вязкости белкового лекарственного средства.

29. Способ по п. 28, где по меньшей мере одну из областей, идентифицированных как способствующие вязкости лекарственного средства, модифицируют путем замены одной или более аминокислот по меньшей мере в одном участке.

30. Способ по п. 28, где одну или более областей, идентифицированных как способствующие вязкости белкового лекарственного средства, модифицируют для снижения вязкости белкового лекарственного средства.

31. Способ по п. 19, где белок выбран из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

32. Способ по п. 28, где белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

33. Белковое лекарственное средство, полученное способом по п. 28.

По доверенности

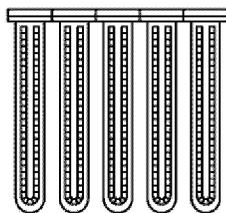
1/18



Фиг. 1А

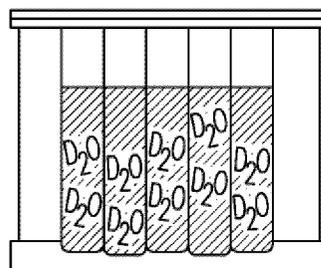


Фиг. 1В



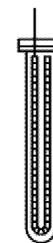
Картриджи для микродиализа

Фиг. 2А



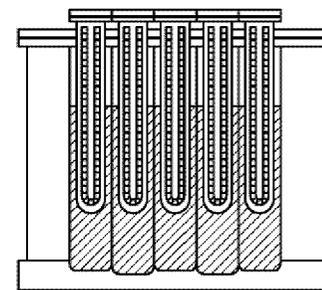
Добавление буфера D_2O в планшет с глубокими лунками

Фиг. 2В



Загрузка образцов

Фиг. 2С



Размещение картриджей для микродиализа в планшет с глубокими лунками

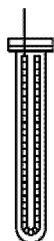
Фиг. 2D



Время – 4 ч
Время – 24 ч

Инкубирование в течении различных временных точек

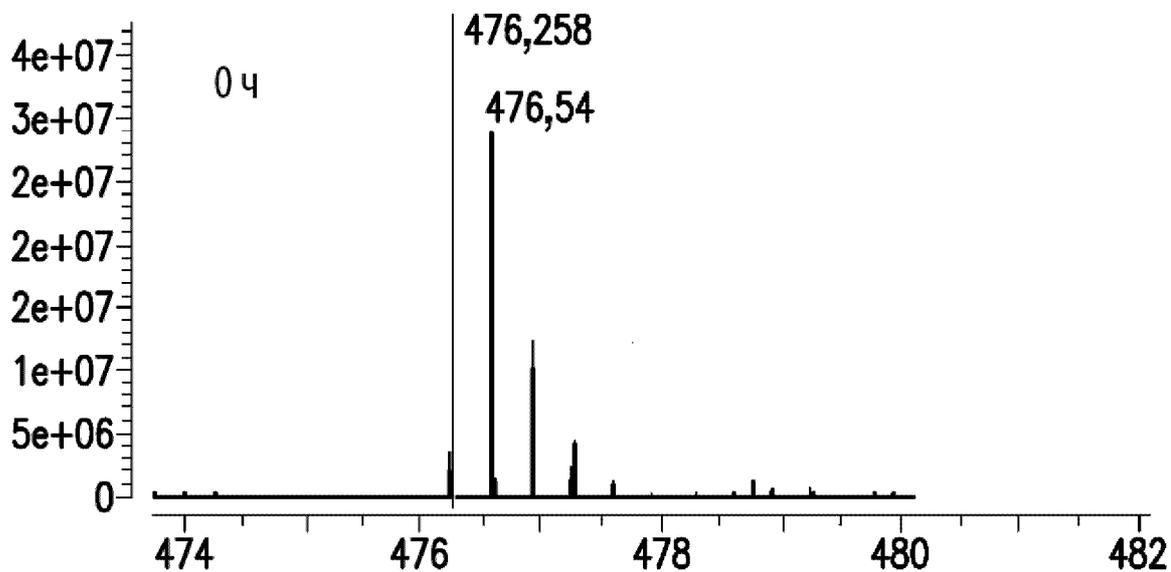
Фиг. 2Е



Удаление образцов для МС-анализа

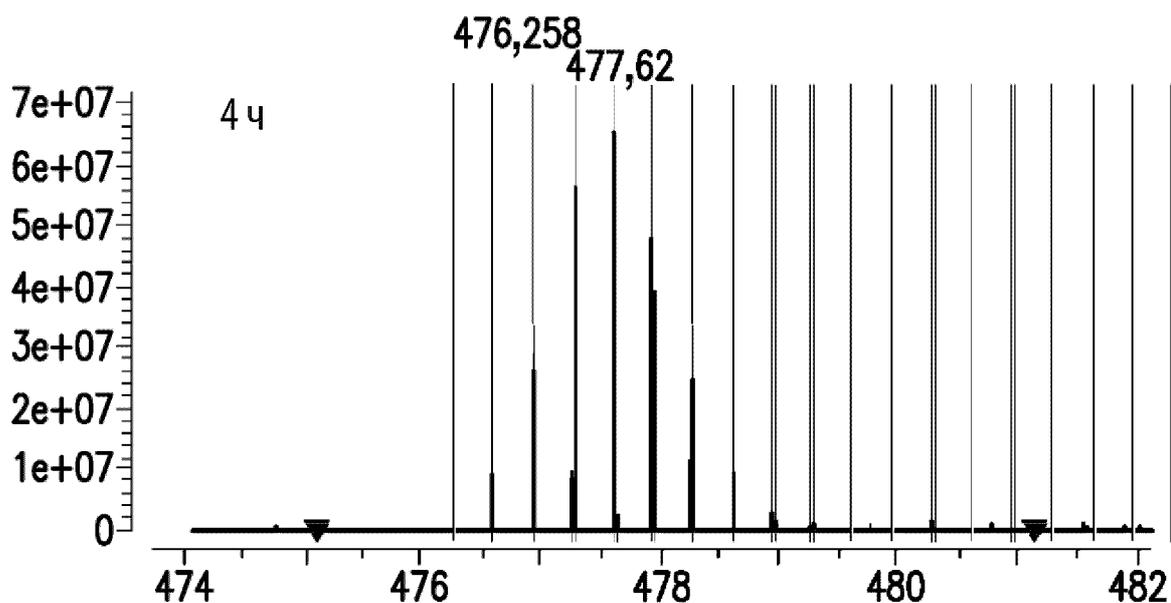
Фиг. 2F

МАТ1 без CDR, 15 мг/мл
Без D — Высокая Дост. — Оценка: 0,9716 — Центроид: 476,54



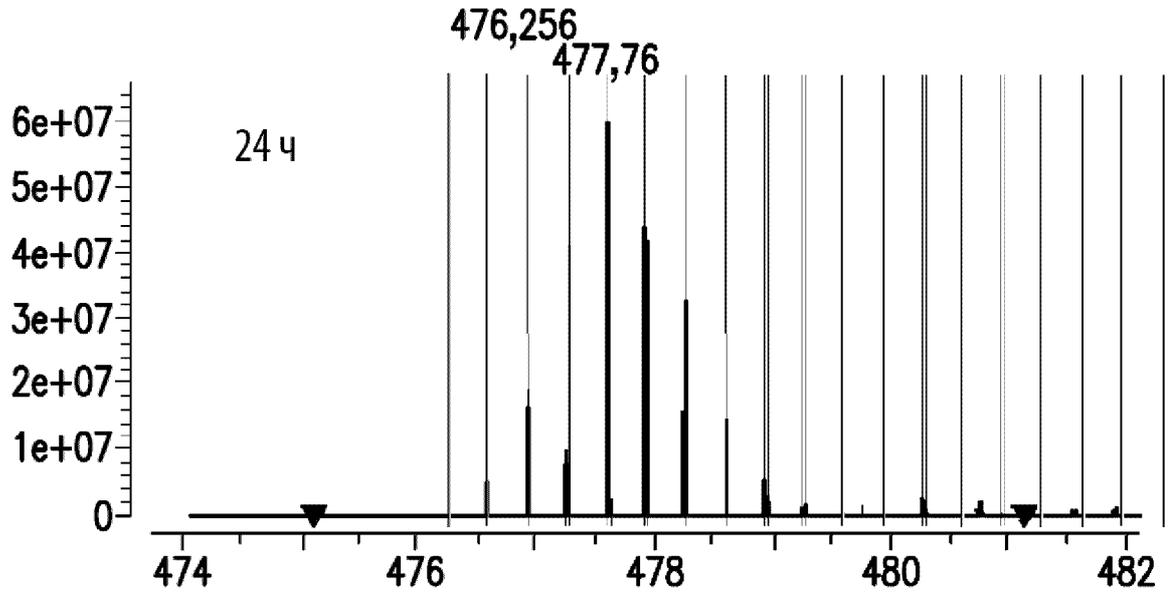
Фиг. 3А

МАТ1 без CDR, 15 мг/мл
4 ч — Высокая Дост. — Оценка: 0,8900 — Центроид: 477,62 -
#D: 3,22 - %D: 35,82



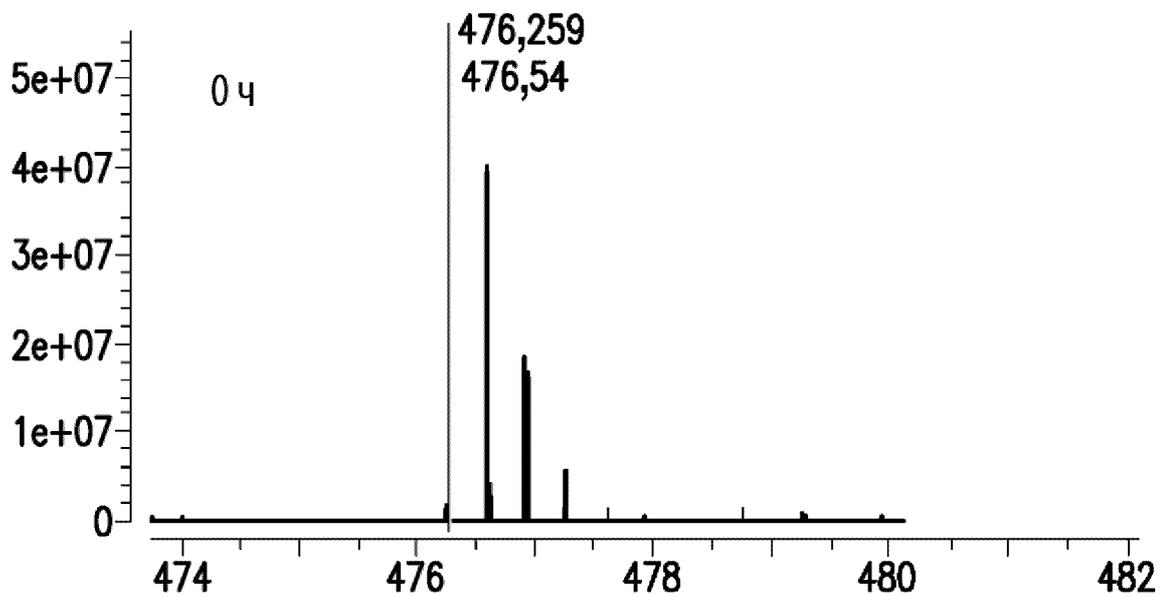
Фиг. 3В

МАТ1 без CDR, 15 мг/мл
24 ч – Высокая Дост. – Оценка: 0,8914 – Центроид: 477,76 -
#D: 3,66 - %D: 40,71



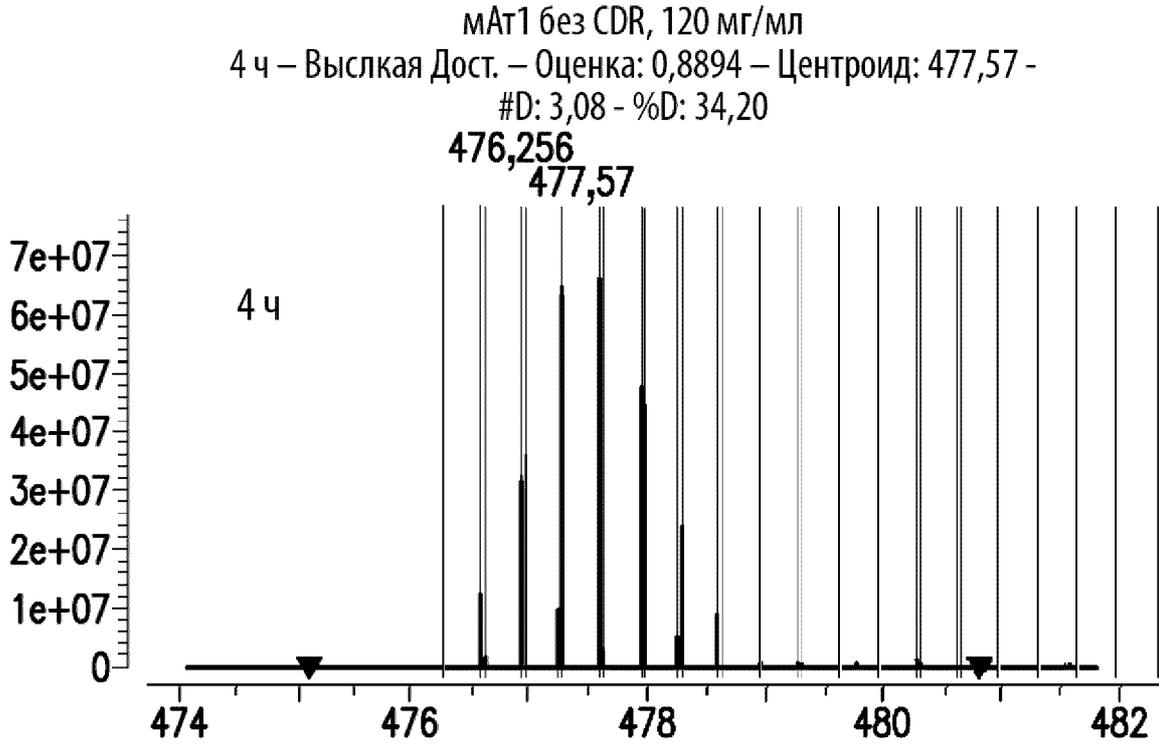
Фиг. 3С

МАТ1 без CDR, 120 мг/мл
Без D – Высокая Дост. – Оценка: 0,9588 – Центроид: 476,54

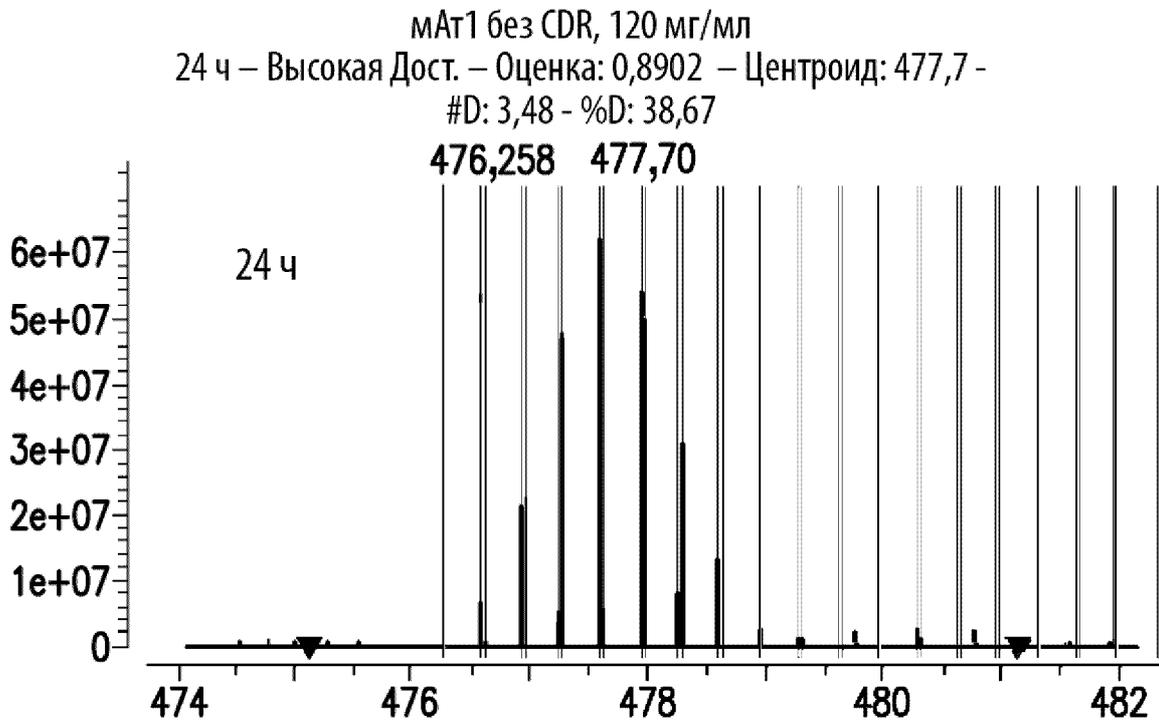


Фиг. 3D

5/18

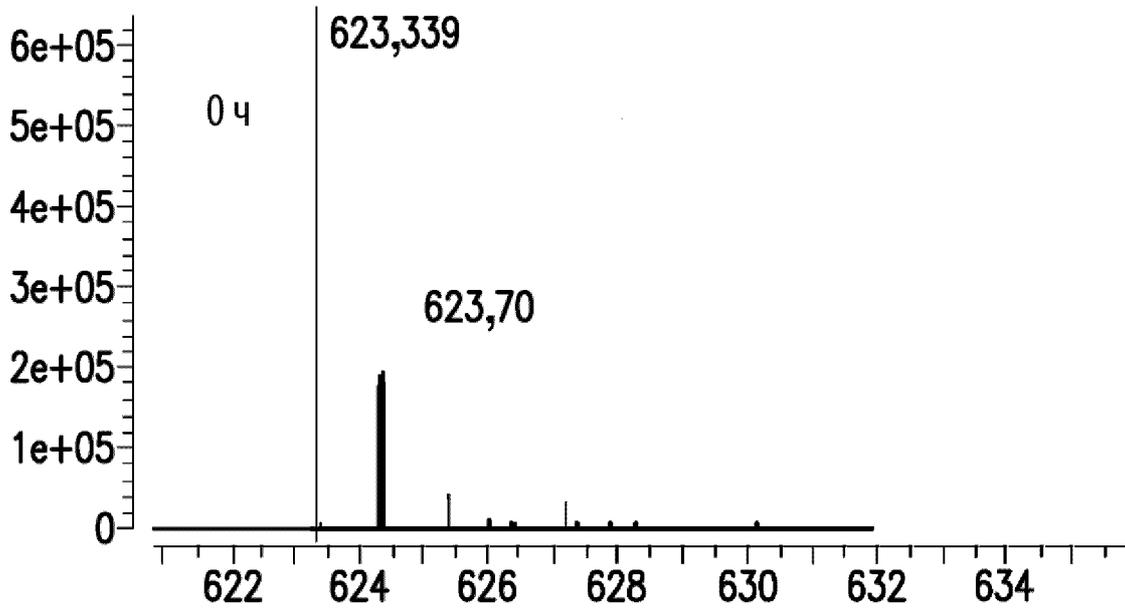


Фиг. 3Е



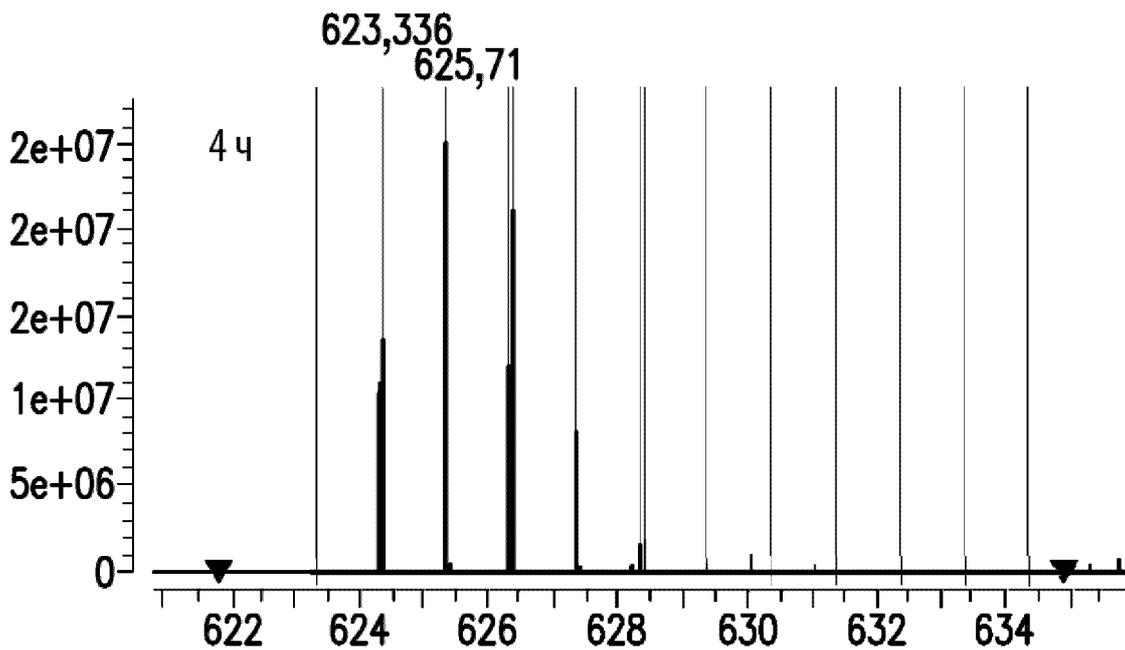
Фиг. 3F

МАТ1 LC-CDR, 15 мг/мл
Без D – Высокая Дост. – Оценка: 0,9417 – Центроид: 623,70



Фиг. 3G

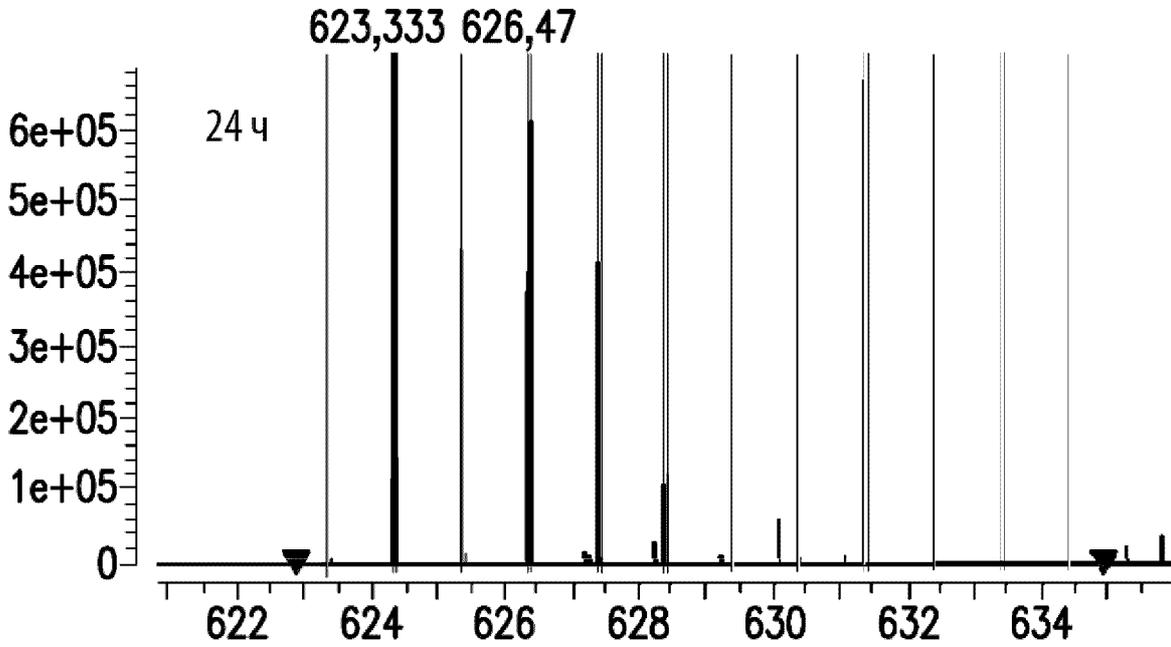
МАТ1 LC-CDR, 15 мг/мл
4 ч – Средн. Дост. – Оценка: 0,8336 – Центроид: 625,71 -
#D: 2,01 - %D: 50,37



Фиг. 3H

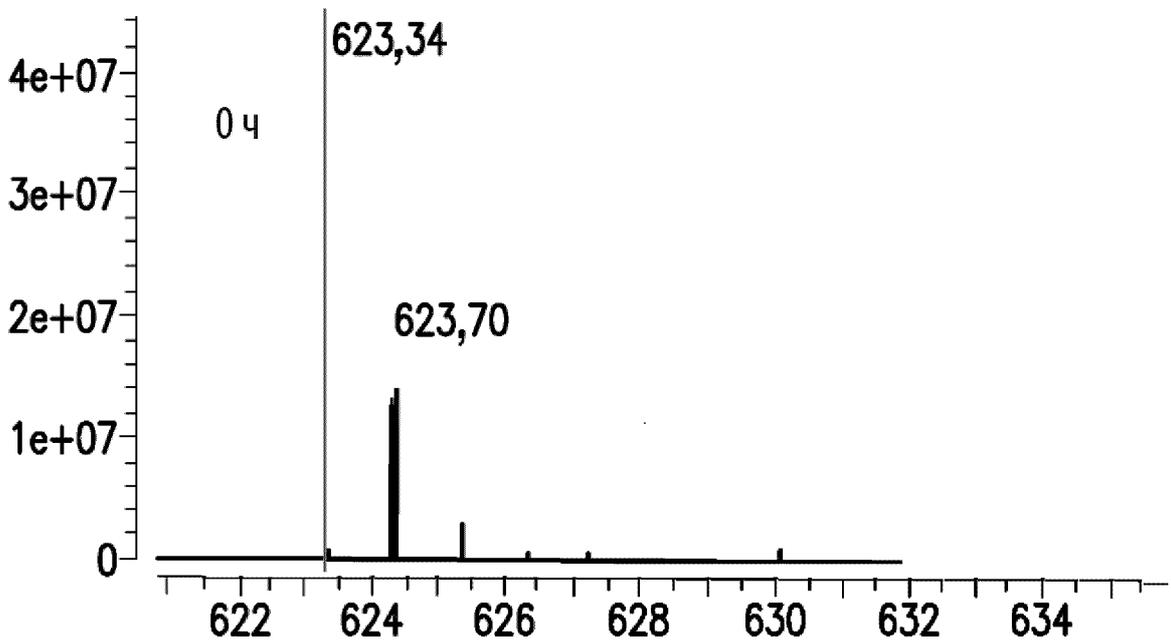
7/18

МАТ1 LC-CDR, 15 мг/мл
24 ч – Средн. Дост. – Оценка: 0,8243 – Центроид: 626,47 -
#D: 2,78 - %D: 69,45



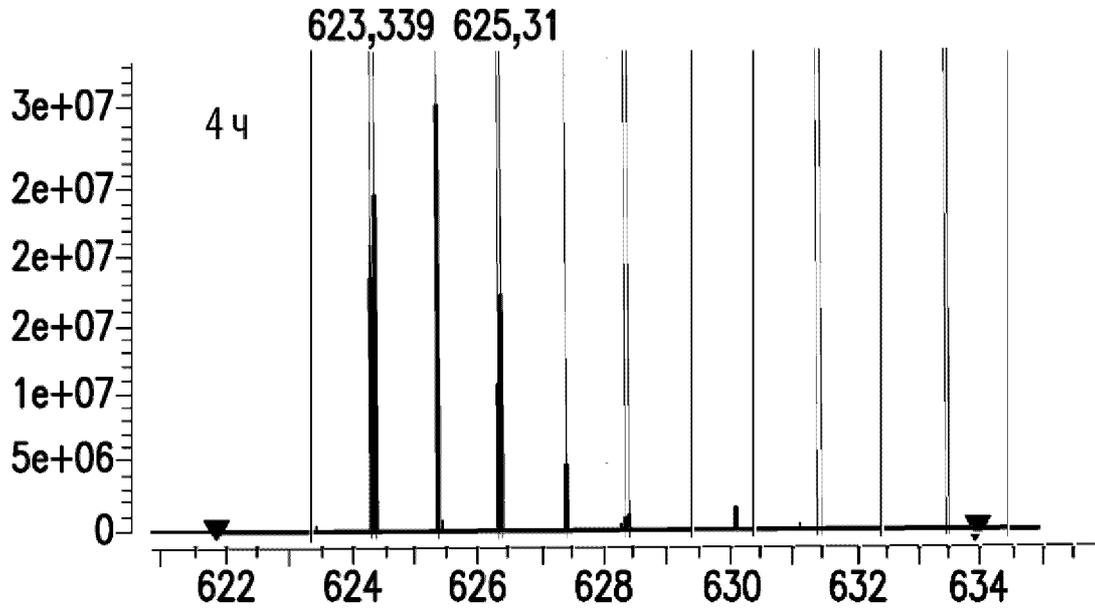
Фиг. 3I

МАТ1 LC-CDR, 120 мг/мл
Без D – Средн. Дост. – Оценка: 0,9646 – Центроид: 623,70



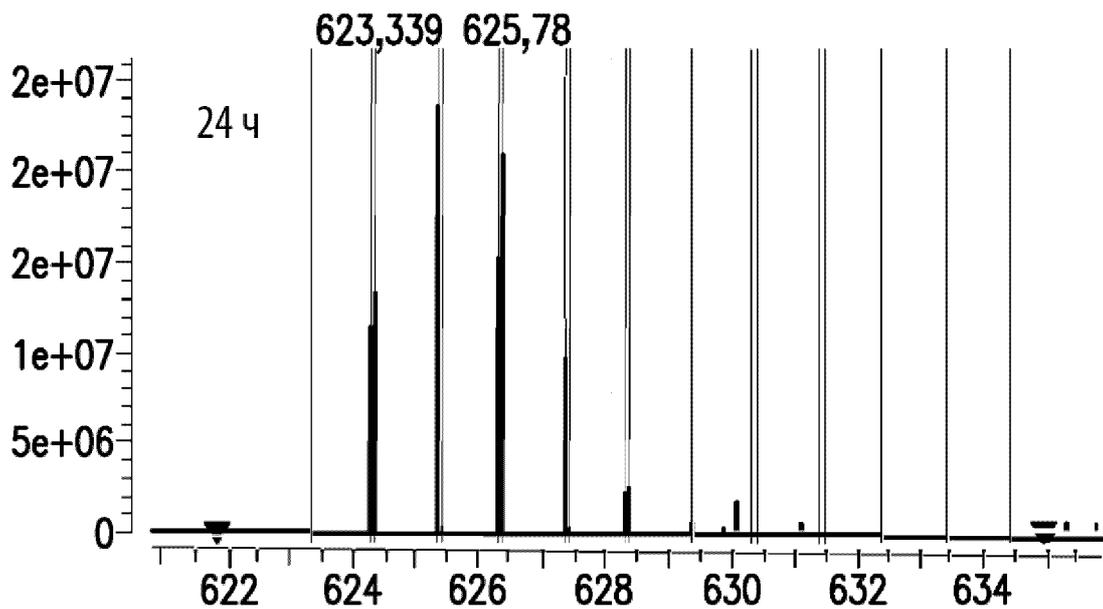
Фиг. 3J

МАТ1 LC-CDR, 120 мг/мл
4 ч – Средн. Дост. – Оценка: 0,8507 – Центроид: 625,31 -
#D: 1,62 - %D: 40,45

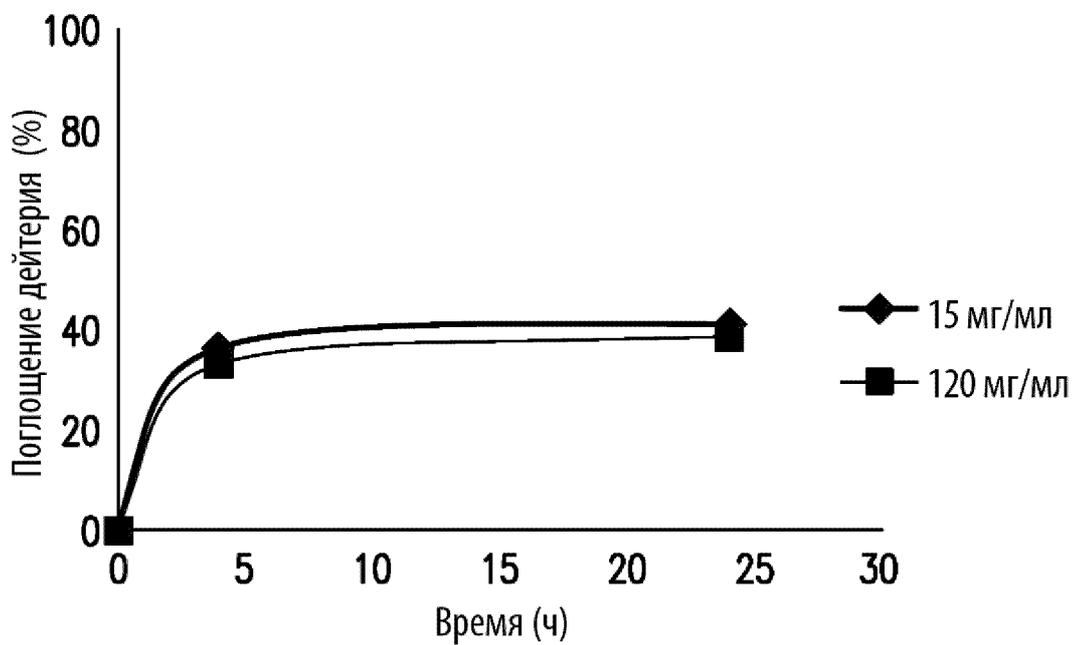


Фиг. 3К

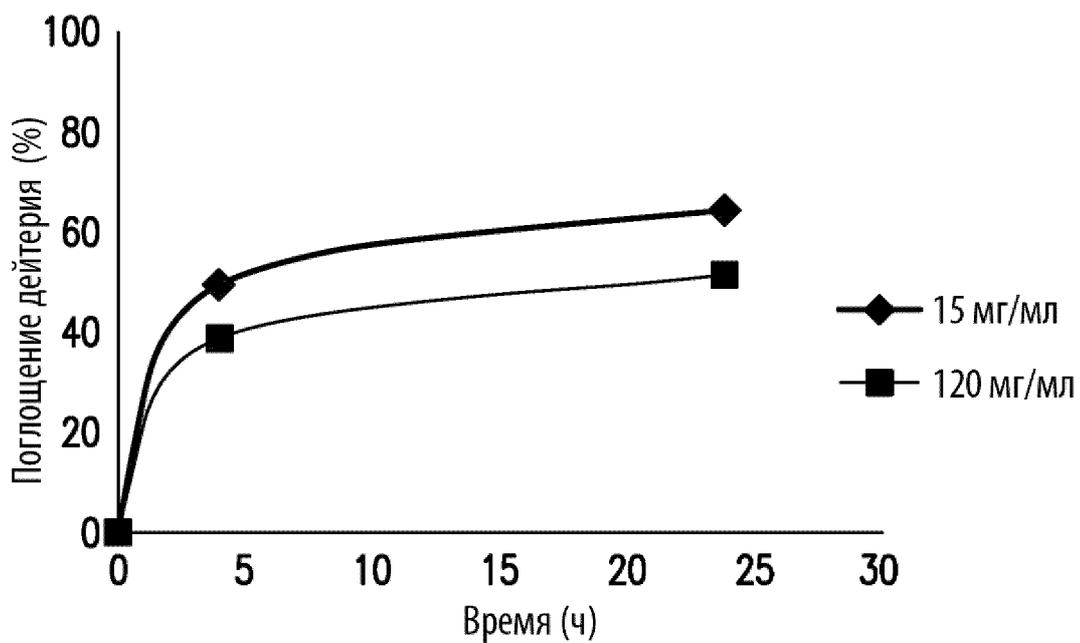
МАТ1 LC-CDR, 120 мг/мл
24 ч – Средн. Дост. – Оценка: 0,8194 – Центроид: 625,78 -
#D: 2,09 - %D: 52,20



Фиг. 3Л

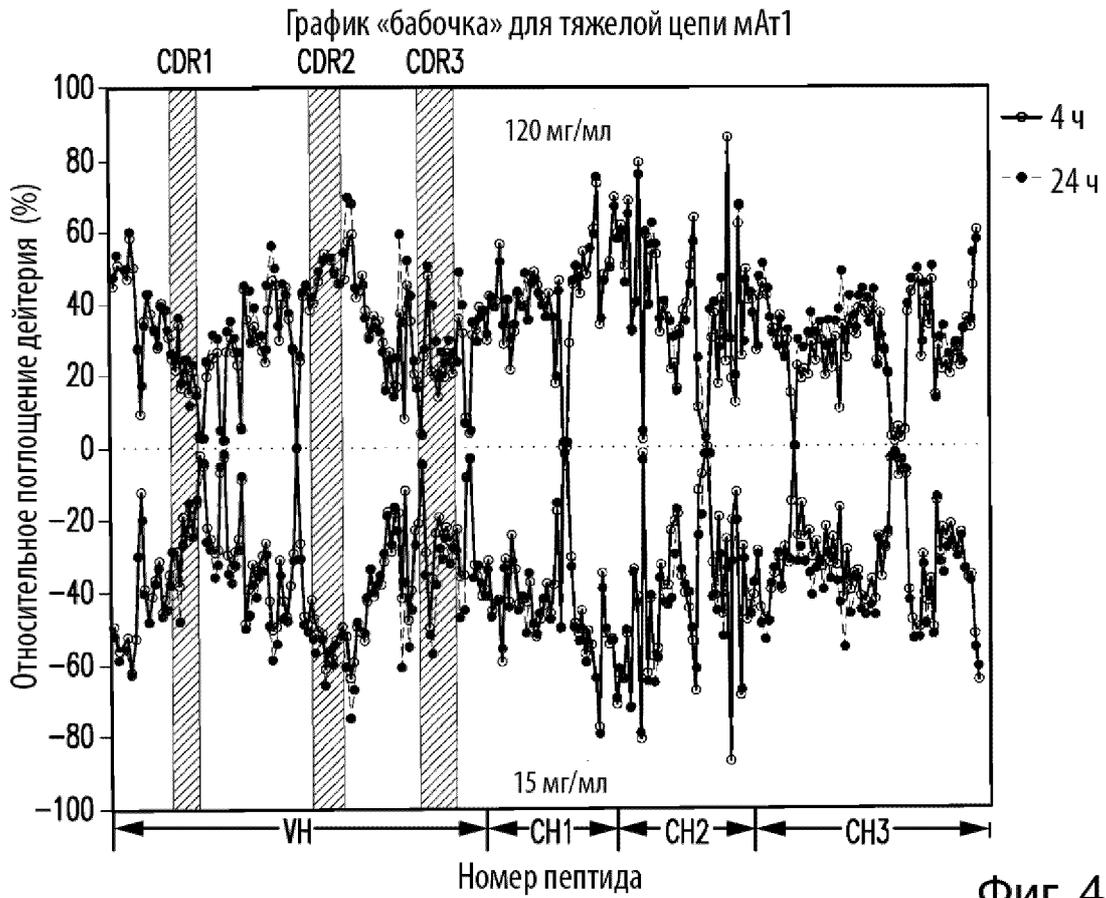


Фиг. 3М

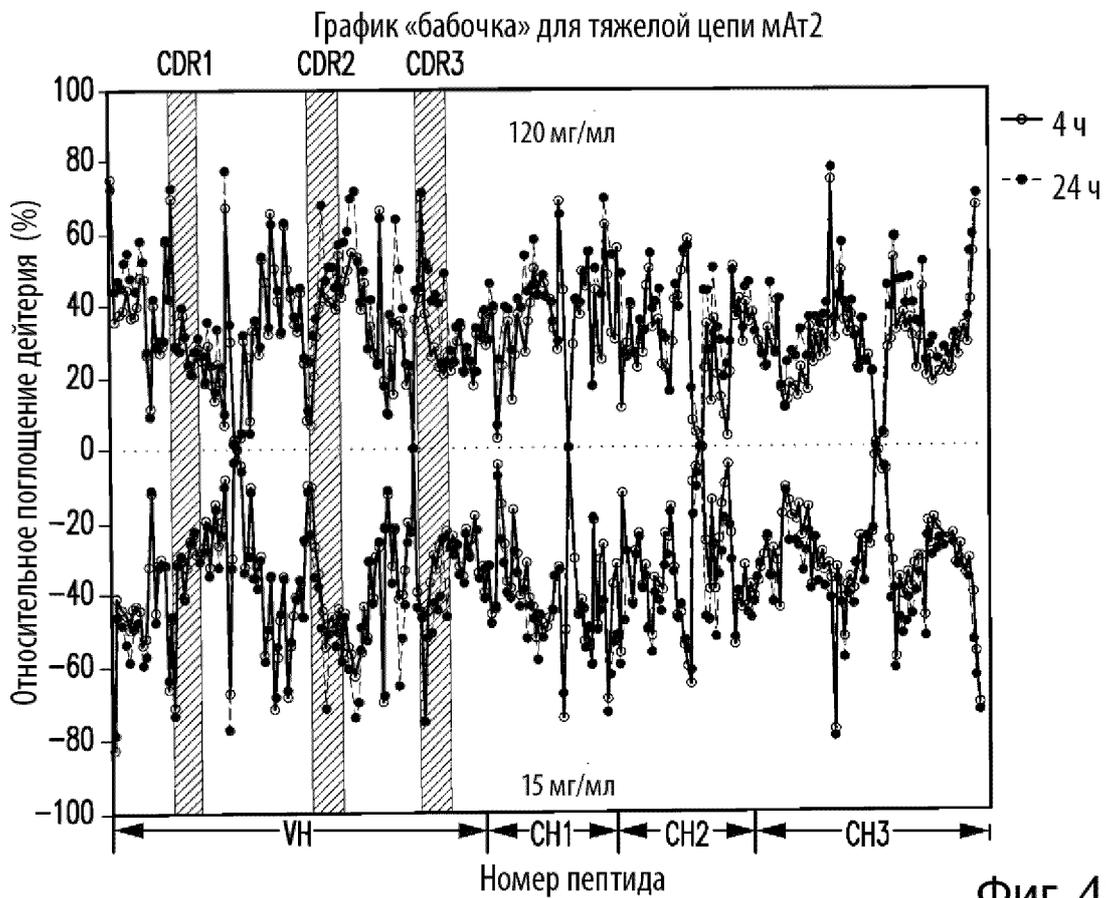


Фиг. 3N

10/18

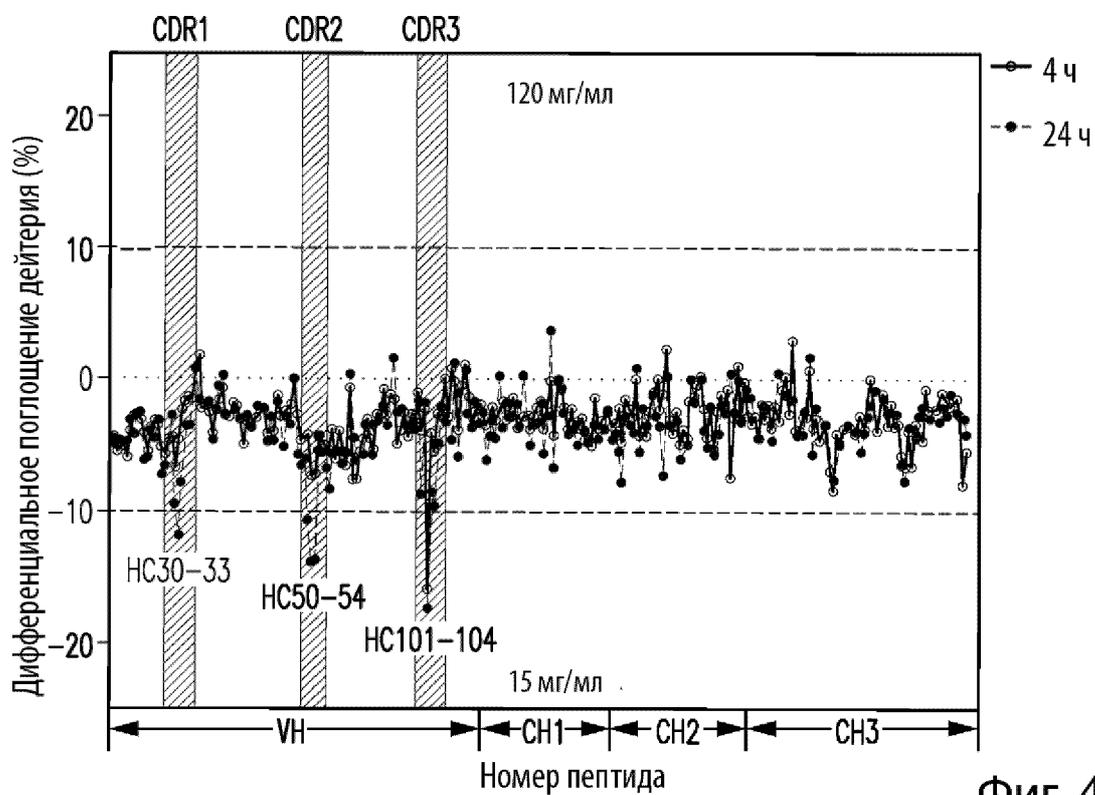


Фиг. 4А



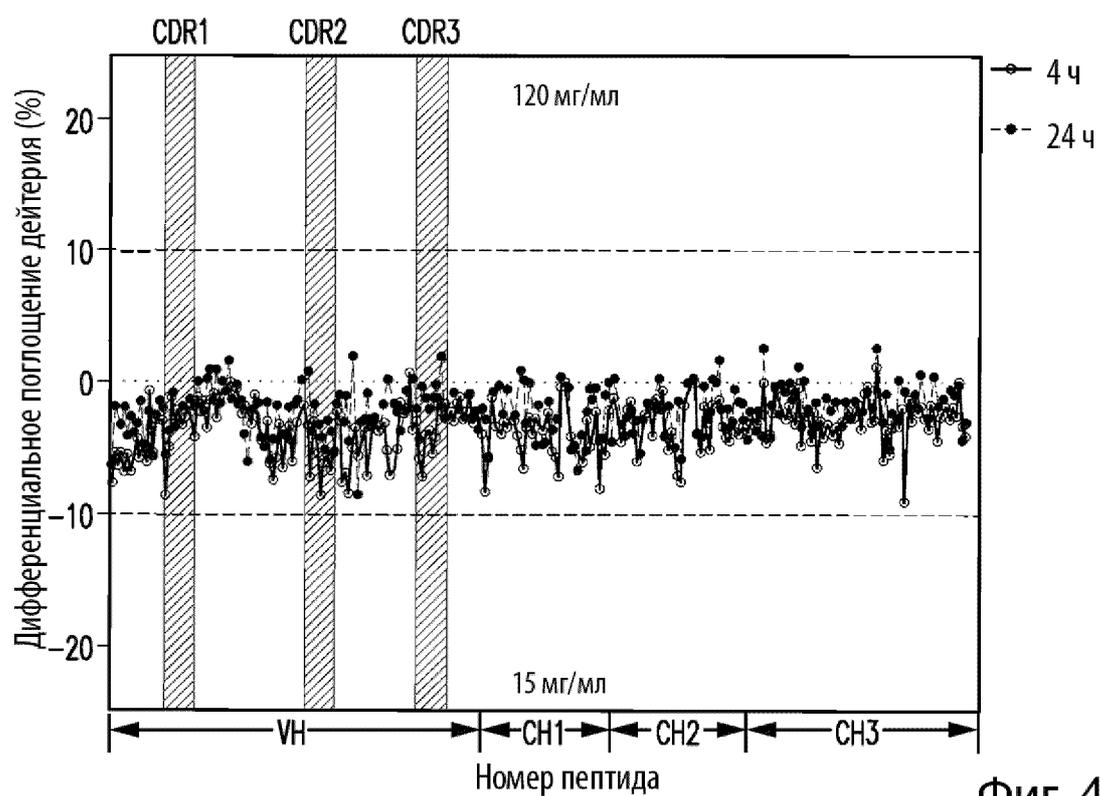
Фиг. 4В

График остатков для тяжелой цепи mAt1

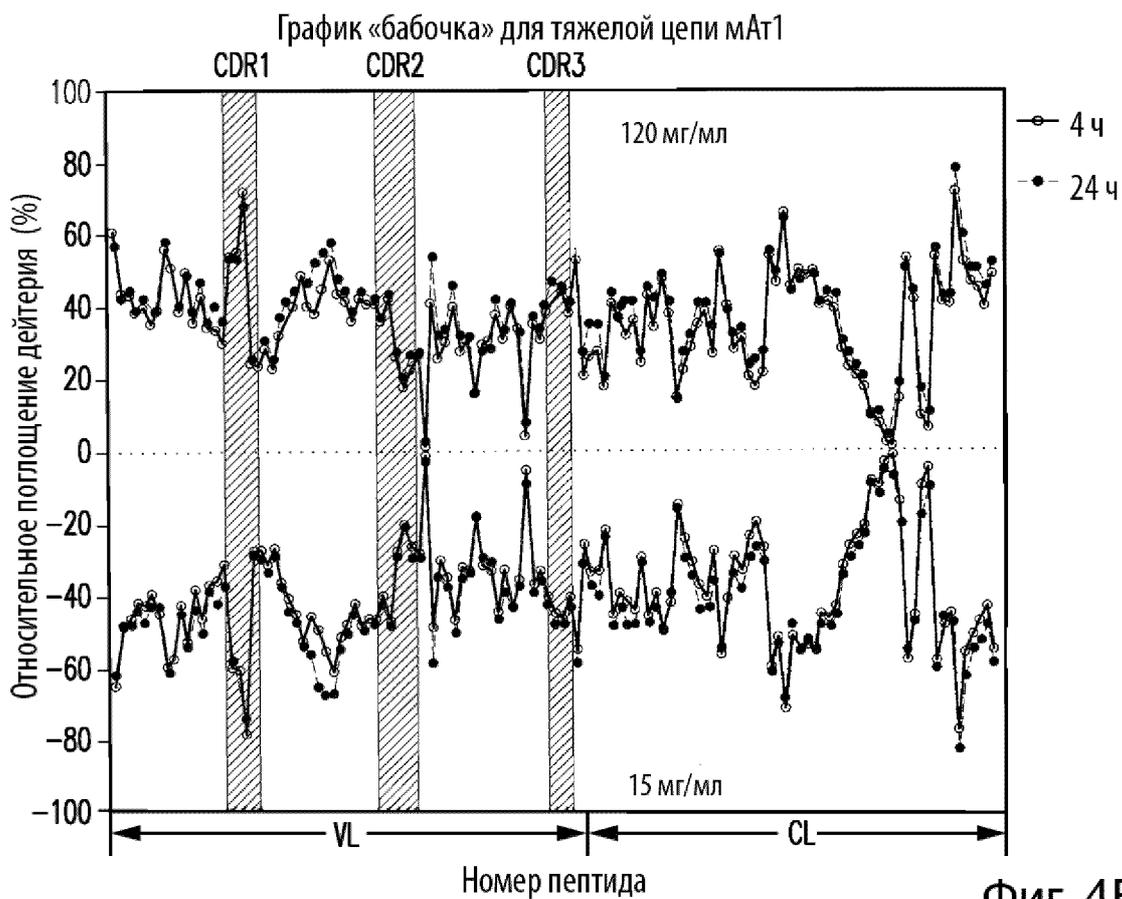


Фиг. 4С

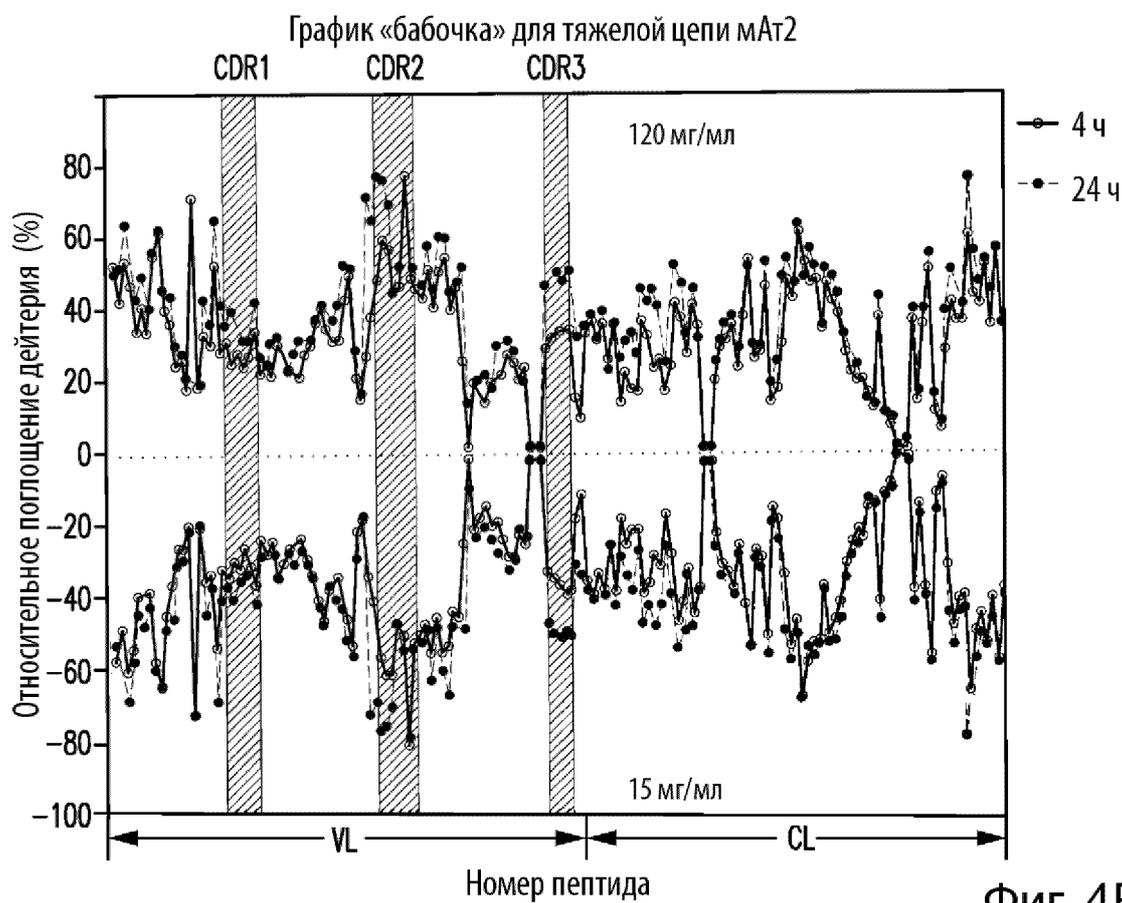
График остатков для тяжелой цепи mAt2



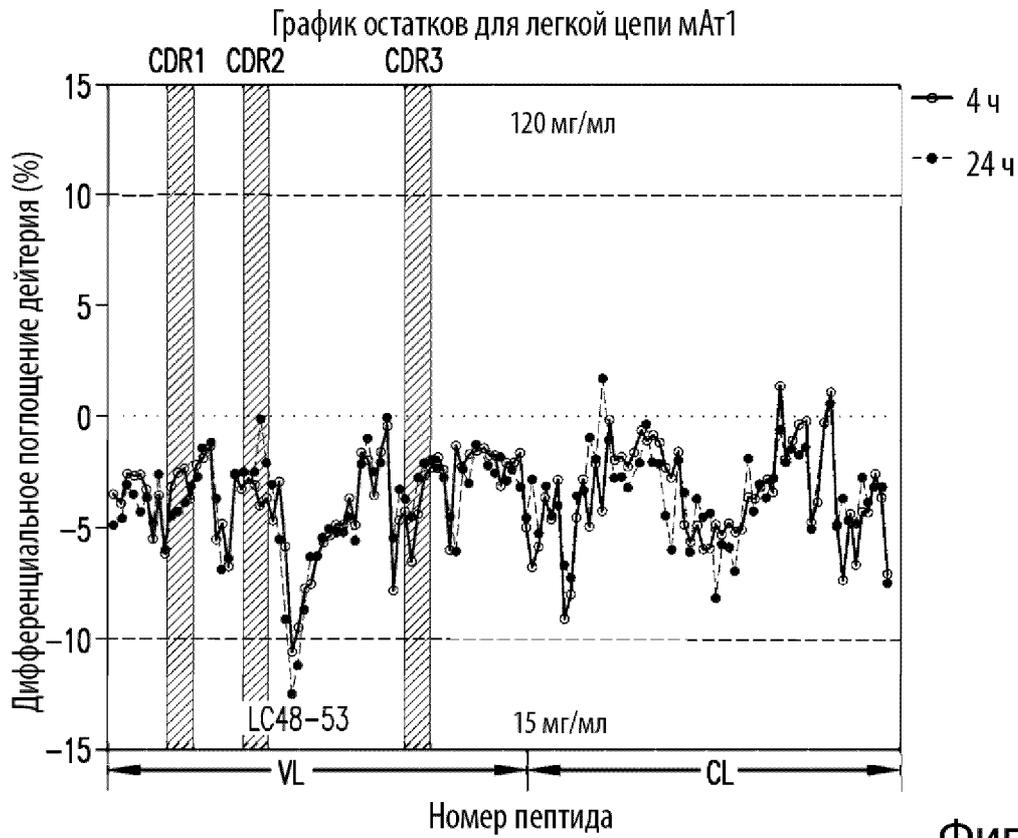
Фиг. 4D



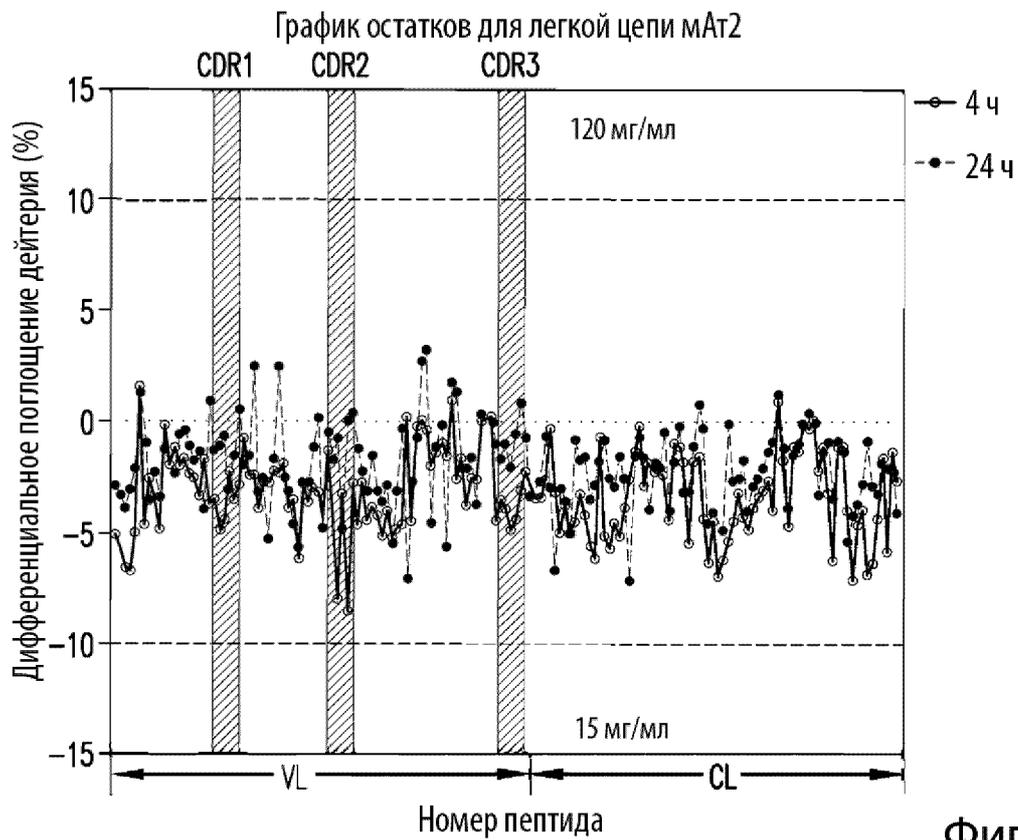
Фиг. 4Е



Фиг. 4F

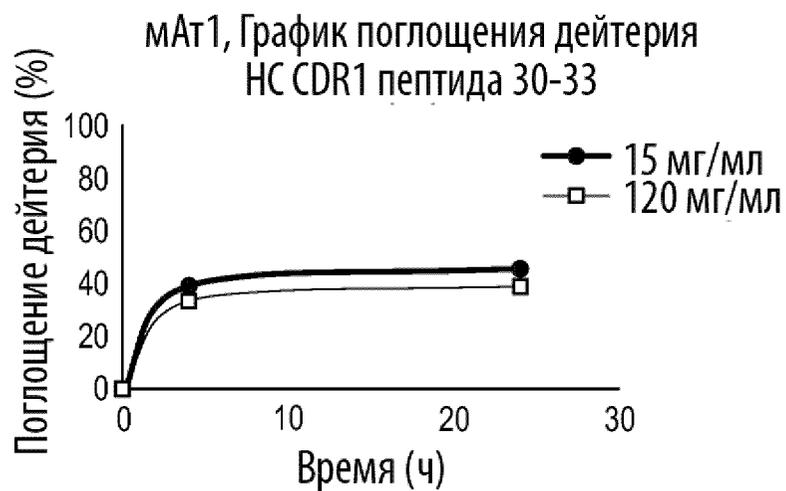


Фиг. 4G

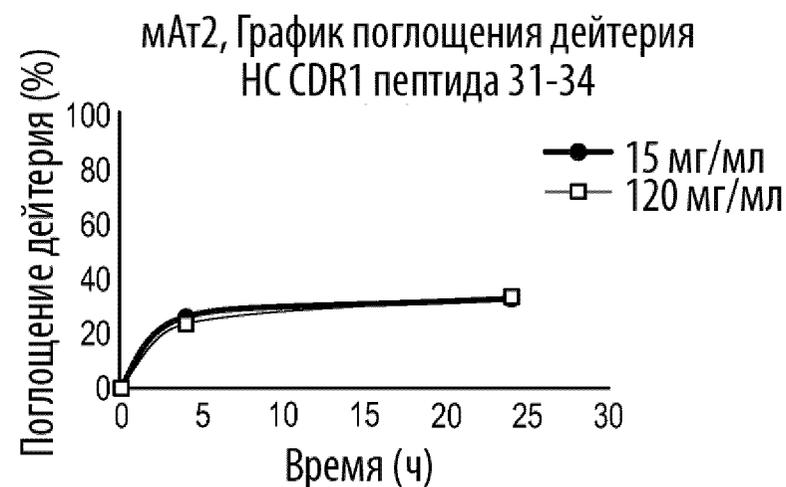


Фиг. 4H

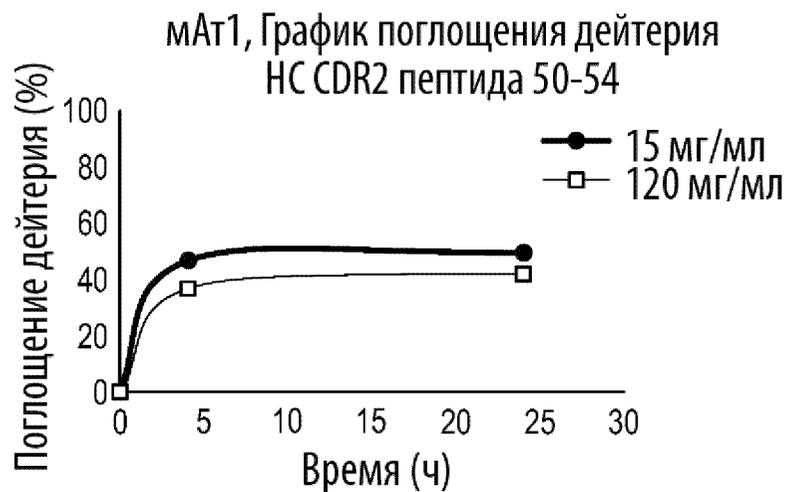
Фиг. 5А



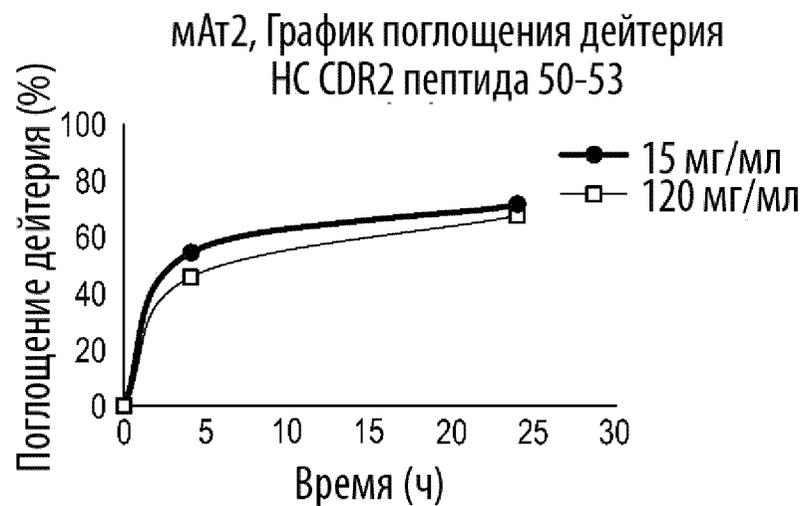
Фиг. 5В



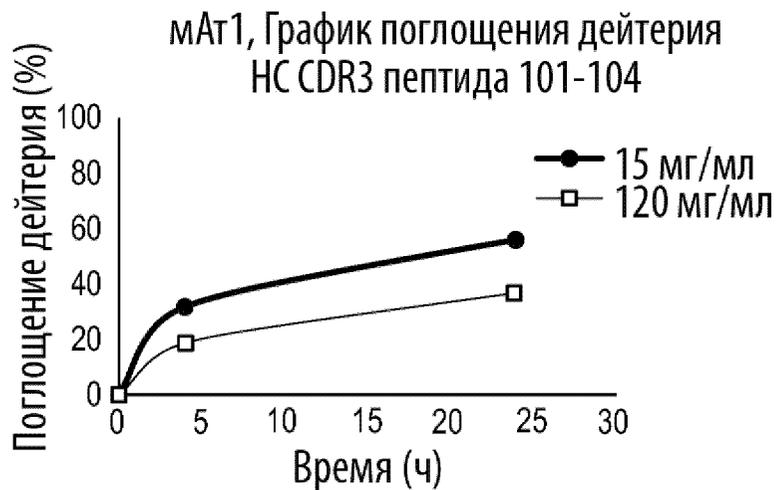
Фиг. 5С



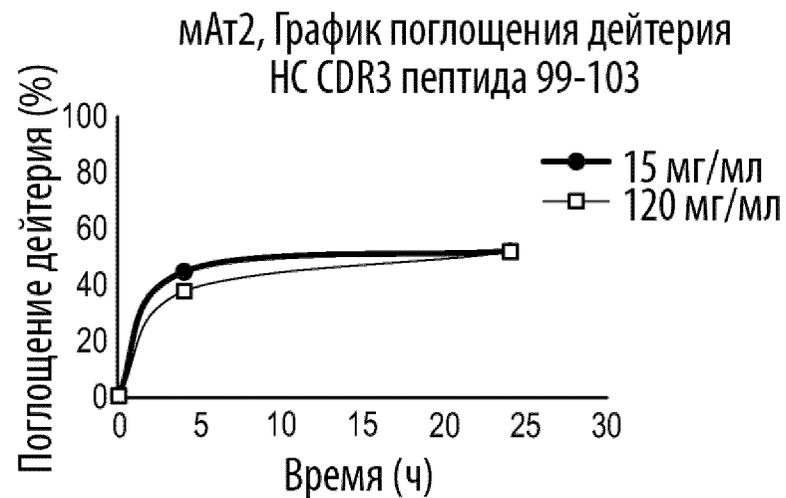
Фиг. 5D



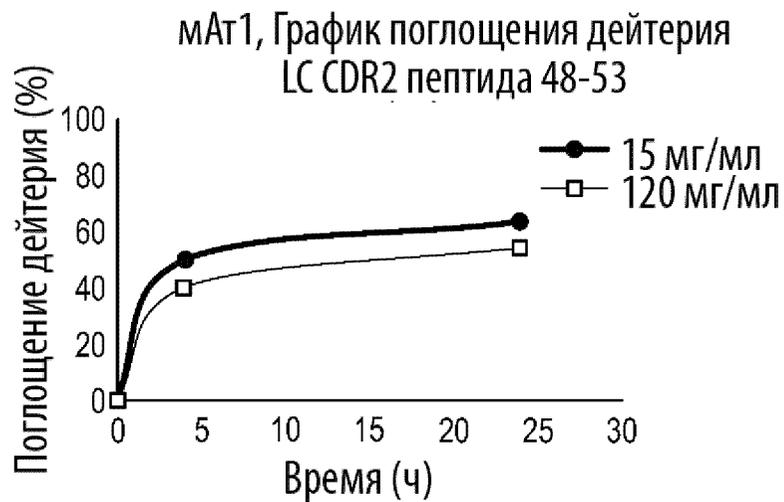
Фиг. 5Е



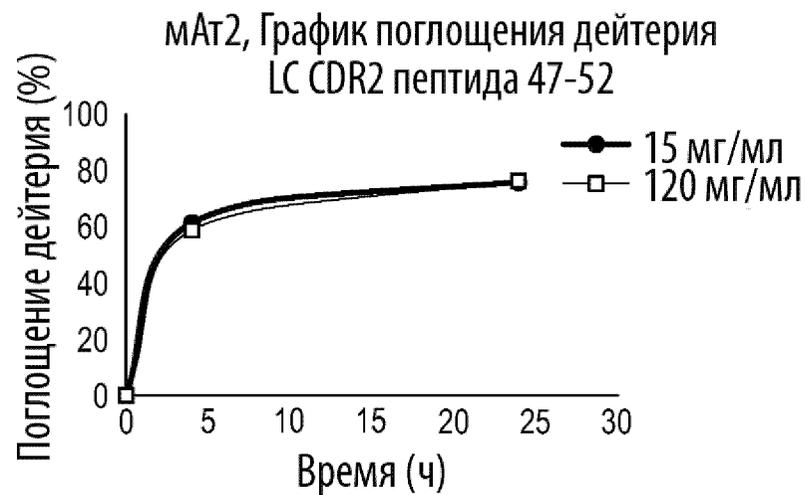
Фиг. 5F



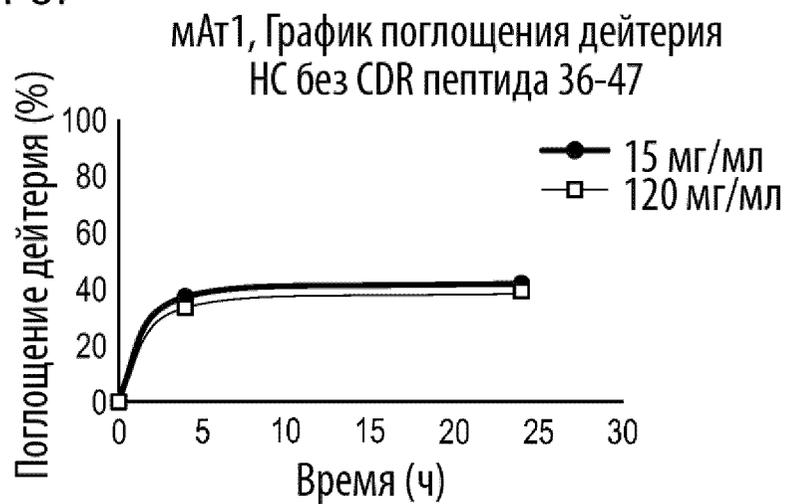
Фиг. 5G



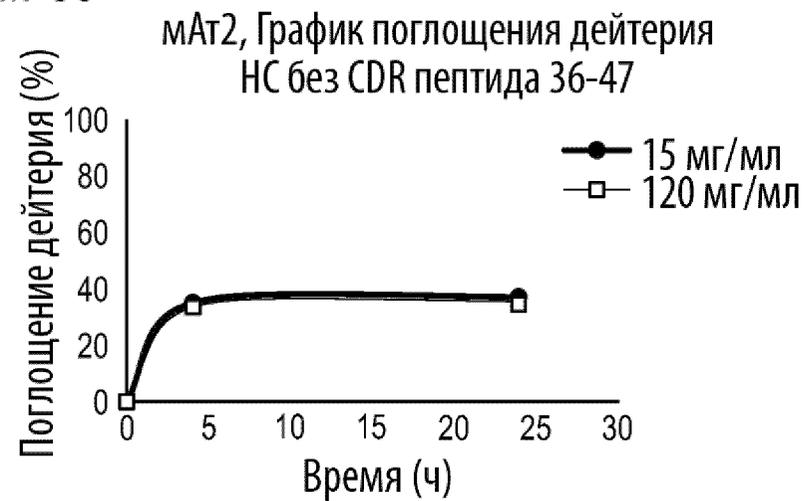
Фиг. 5H



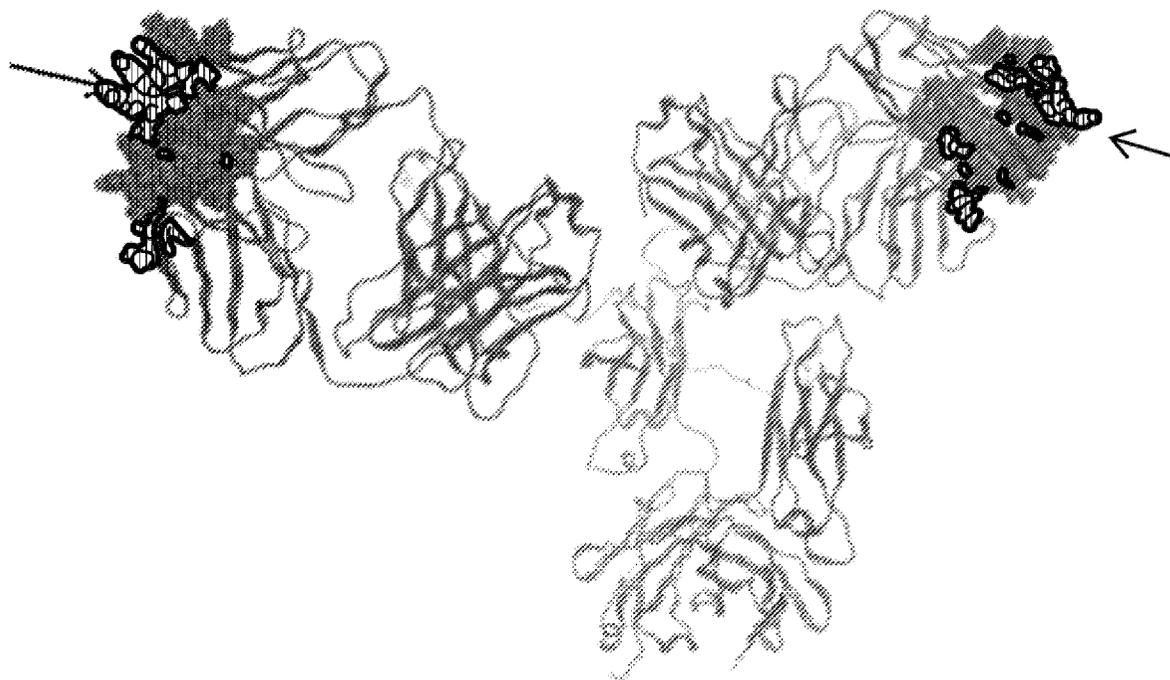
Фиг. 5I



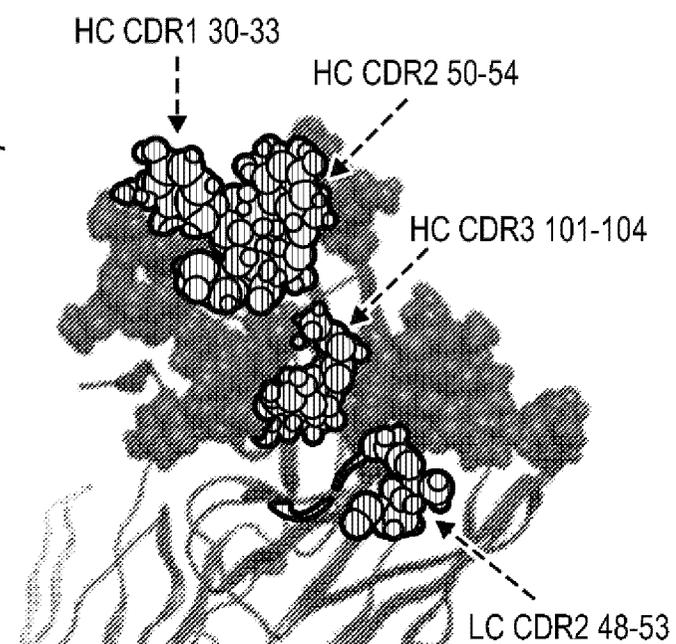
Фиг. 5J



Фиг. 6А

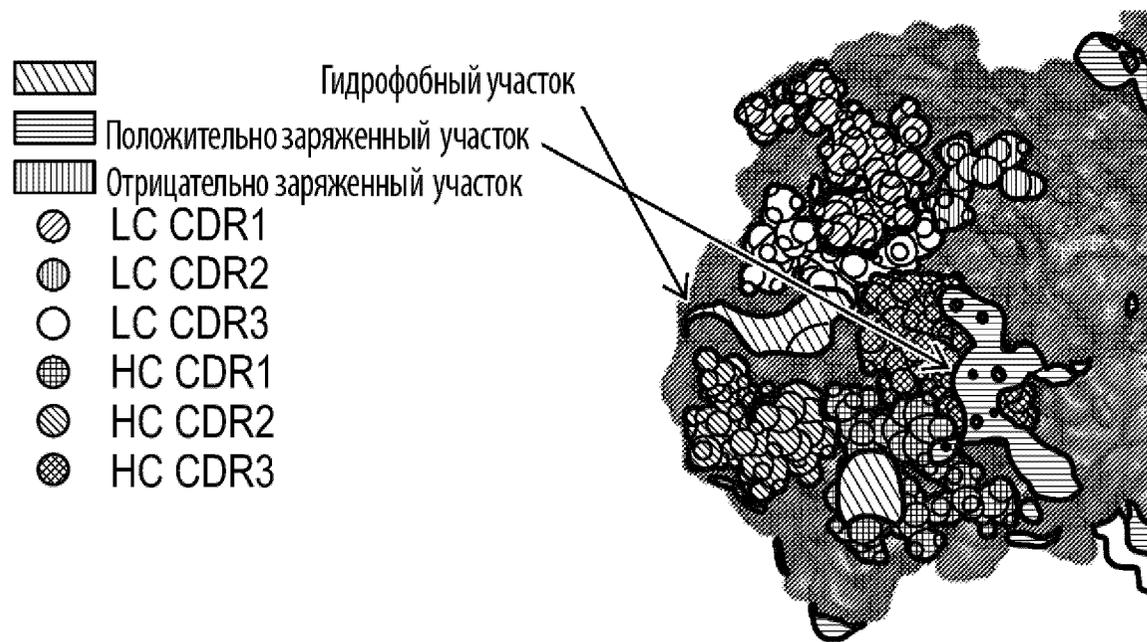


Фиг. 6В



-  Дифференциальное поглощение дейтерия $\geq 10\%$
-  Дифференциальное поглощение дейтерия $< 10\%$
-  Нет данных
-   Области CDR

Фиг. 6С



Фиг. 6D

