

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391050** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.29**

(51) Int. Cl. **G01N 33/538** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.08.18**

---

(54) **АНАЛИЗ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА САМОАССОЦИИ БЕЛКА С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИОННО-ЗАВИСИМОЙ СПЕКТРОСКОПИИ  
САМОВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ**

---

(31) **62/376,788**

(32) **2016.08.18**

(33) **US**

(62) **201990316; 2017.08.18**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Марлоу Майкл, Сеннетт Майкл,**

**Шнейдер Майкл (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предлагаются способы получения высококонцентрированных белковых композиций, имеющих высокую стабильность. Анализы для выбора белков и условий приготовления, которые имеют высокие самоотталкивающие характеристики, используемых в качестве начального этапа производственного процесса. В частности, в качестве анализа коллоидного взаимодействия белка используется способ концентрационно-зависимой спектроскопии самовзаимодействия на основе наночастиц.

---

**A1**

**202391050**

**202391050**

**A1**

**АНАЛИЗ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА САМОАССОЦИИ БЕЛКА С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИОННО-ЗАВИСИМОЙ СПЕКТРОСКОПИИ  
САМОВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ**

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0001] Данное изобретение в целом относится к выбору терапевтических белков для разработки и коммерческой реализации; и более конкретно, к отбору белков, которые имеют большую вероятность легкого достижения высокой концентрации белка с сопутствующей более низкой вероятностью образования агрегатов. Данное изобретение, в частности, относится к оценке белковых коллоидных взаимодействий и выбору белков для приготовления в высокой концентрации.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Крупные биологические молекулы - «биотерапевтические средства» представляют собой важный класс лекарств. Например, моноклональные антитела обладают исключительной терапевтической специфичностью, длительным биологическим периодом полураспада и высокими профилями безопасности.

[0003] Биотерапевтические средства, учитывая их размер и комплексность, сложны в изготовлении и разработке. Большинство биотерапевтических средств составляют в виде лиофилизированных твердых веществ или жидких композиций, и стабильность этих молекул является важной задачей. Стабильность влияет не только на срок годности конечного продукта, но и на процесс производства.

[0004] Большая молекула по определению имеет большую молекулярную массу. Следовательно, несколько молей лекарственного средства заключают в себе относительно большую массу. Например, антитело имеет молекулярную массу около 150000 грамм на моль, тогда как низкомолекулярное лекарственное средство, такое как аторвастатин, имеет молекулярную массу около 560 грамм на моль. Следовательно, для достижения эффективной дозы требуется значительная масса белкового препарата. По мере того, как все больше лекарств составляются для подкожной инъекции, данная большая масса должна помещаться в небольшой

объем. Чтобы обеспечить терапевтически эффективные дозы, подкожные составы биотерапевтических лекарственных средств должны достигать высоких (около 50 мг/мл или более) или очень высоких (около 100–250 мг/мл) концентраций, все это при сохранении вязкости на приемлемом уровне.

**[0005]** По мере того, как большие молекулы заполняют небольшое пространство и расстояние между белковыми молекулами уменьшается, частота коллоидных взаимодействий, то есть эффекта поля одной молекулы на другую, увеличивается. Белковые самовзаимодействия (коллоидные взаимодействия), как правило, энергетически слабы, обычно обратимы и неспецифичны. Эти взаимодействия белок-зависимы и на них влияют pH, соли и другие добавки. В некоторых случаях, взаимодействия могут быть в общем притягивающими, отталкивающими или нейтральными. Характер и величина взаимодействия может зависеть от концентрации белка.

**[0006]** Коллоидные взаимодействия охватывают широкий спектр взаимодействий (потенциальных энергий), которые количественно определяют с помощью вириальных коэффициентов.  $V_{22}$  представляет парные взаимодействия,  $V_{222}$  представляет взаимодействия трех тел,  $V_{2222}$  представляет взаимодействия четырех тел и так далее. Положительное значение вириального коэффициента представляет отталкивающие взаимодействия, отрицательный вириальный коэффициент представляет притягивающие взаимодействия, а нулевой вириальный коэффициент представляет идеальное состояние.

**[0007]** Коллоидные взаимодействия обычно присутствуют в белковых растворах, которые превышают ~ 2 мг/мл, и становятся значительными в растворах, которые превышают ~ 40 мг/мл. При более низких концентрациях преобладают стерические и электростатические силы. Ситуация становится более сложной с увеличением концентрации белка. Когда концентрация белка увеличивается в процессе производства и приготовления, коллоидные взаимодействия становятся неоптимальными.

**[0008]** Коллоидные взаимодействия влияют на различные последующие процессы во время синтеза белка. Эти силы могут быть полезными или вредными в зависимости от характера и масштаба взаимодействий. Коллоидные взаимодействия влияют на

хроматографические характеристики, ультрафильтрацию и диафильтрацию (УФ/ДФ), диализ, вязкость и обработку раствора, а также стабильность белка в растворе. Коллоидные взаимодействия также влияют на долговременную стабильность при хранении, в результате которого могут образовываться олигомеры и мультимеры, а также белковые агрегаты. Поэтому оценка вириального коэффициента белка дает важную информацию, перед выделением ресурсов на разработку конкретного белкового терапевтического средства.

**[0009]** Анализ вириального коэффициента является хорошо развитой и очень активной областью исследований. Современные способы оценки вириального коэффициента ( $B_{22}$  или тесно связанного  $A_2$ ) для конкретных белков включают мембранную осмометрию, седиментационное равновесное аналитическое ультрацентрифугирование, хроматографию на основе самовзаимодействия, статическое рассеяние света (SLS), параметры диффузионного или седиментационного взаимодействия и спектроскопию самовзаимодействия на основе наночастиц (SINS).

**[0010]** Например, Cohen и Benedek (US 4080264A, публикация от 3 марта 1978 г.) описывают квазиупругий спектроскопический метод рассеяния света для измерения агрегации антигена или антитела. Publicover и Vincze (US7514938B2, публикация от 7 апреля 2009 г.) описывают использование диэлектрической релаксационной спектроскопии (DRS) для исследования взаимодействия и агрегации частиц микронного и субмикронного масштаба, покрытых белком, включая антитела. Holman et al (US20070291265A1, публикация от 20 декабря 2007 г.) описывает раздвоенную волоконно-оптическую систему для измерения сигналов рассеяния света и концентрации для измерения агрегации макромолекул. Obrezanova et al. (mAbs, 7 (2): 352-363, 2015) описывает использование эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) и анализа обнаружения олигомеров, который представляет собой анализ захвата антител на микротитровальной пластине оптической плотности, для систематического измерения склонности к агрегации более 500 антител. Geoghegan et al. (mAbs, 8 (5): 941-950, 2016) описывает

использование времени удерживания хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), аффинного захвата SINS и динамического рассеяния света для измерения самовзаимодействия, вязкости и стабильности моноклональных антител. Обзор современных способов, используемых для оценки коллоидных белковых взаимодействий, представлен Geng et al (J Pharm Sci., 103(11): 3356-3363, 2014).

**[0011]** Спектроскопия самовзаимодействия на основе наночастиц (SINS) для оценки самоассоциации моноклональных антител описана Sule et al (Biophys. J, 101: 1749-1757, 2011). Вкратце, антитела адсорбируют на наночастицах золота, которые затем объединяют с буфером в 96-луночных планшетах для микротитрования. По мере того как наночастицы агрегируют из-за самоассоциации слипшихся антител, спектр абсорбции наночастиц изменяется. Это изменение поверхностного плазмонного резонанса коррелирует с ассоциацией частиц. Анализ обеспечивает двоичное считывание «самоассоциации» или «отсутствия самоассоциации» в зависимости от того, смещается ли пик абсорбции или изменяется по амплитуде. Sule et al (Mol. Pharmaceutics, 10: 1322-1331, 2013) описывают улучшенный метод SINS, называемый спектроскопией самовзаимодействия на основе наночастиц с аффинным захватом (AC-SINS). В данном случае, человеческие поликлональные антитела сначала прикрепляются к наночастицам, затем частицы с покрытием контактируют с образцами антител низкой концентрации/низкой чистоты, которые затем захватываются анти-человеческим покрытием (антителами). AC-SINS обеспечивает быстрый скрининг клеточных супернатантов без необходимости интенсивной очистки антител. AC-SINS, как и SINS, обеспечивает бинарную оценку положительной самоассоциации или отсутствия самоассоциации антител субъекта.

**[0012]** Белки представляют собой сложные молекулы и часто демонстрируют непредсказуемое поведение в различных условиях. Уровень техники предлагает некоторые средства для наблюдения за самоассоциацией белка, но не предлагает быстрых и точных средств для определения склонности белка к самоассоциации при множестве различных условий. Некоторые белки стабильны в некоторых условиях, но нестабильны в других условиях. В данной области остается потребность в анализе определения динамического

диапазона способности белка притягиваться и отталкиваться в изменяющихся условиях.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0013] Авторы изобретения разработали способ определения потенциала белка к самосборке (то есть присущего белку отталкивающего или притягивающего взаимодействия) в динамическом диапазоне условий. Следовательно, этот способ можно понимать как способ определения стабильности самоассоциирующихся белков или способ определения стабильности агрегированных белков. Как дополнительно описано в данном документе, белок может представлять собой белок одного типа или комбинацию любых белков различного происхождения. Способ, называемый концентрационно-зависимой спектроскопией самовзаимодействия на основе наночастиц (CD-SINS), измеряет склонность белка к самосборке при изменении концентрации и различных условиях ионной силы и pH. Способ позволяет оценивать белок в условиях высокой или очень высокой концентрации и информирует о выборе белков для коммерческой разработки. Способ также обеспечивает информацию о том, как приготовить фармацевтическую композицию, содержащую высокие концентрации одного или нескольких биофармацевтических лекарственных средств, при этом сохраняя длительный срок хранения без ассоциации биофармацевтического лекарственного средства или лекарств. Способ также позволяет получить информацию о том, как составить композицию, удовлетворяющую требуемым спецификациям физических свойств, таких как, например, подходящую реологию/вязкость для обеспечения конкретного желаемого пути введения. Изобретение также позволяет проводить более быстрый скрининг биофармацевтических препаратов с использованием меньшего количества материала для получения подходящей композиции или выбора подходящих кандидатов для дальнейшей разработки лекарственного средства.

[0014] В первом аспекте, изобретение предлагает биоаналитическую смесь, содержащую множество наночастиц, белок и забуференную соль. В смеси белок существует как минимум в двух фазах: в адгезивной (прилипающей) фазе и растворимой фазе. Адгезивная фаза включает белки, которые прилипают (то есть

покрывают) к наночастицам. Растворимая фаза включает белки, которые растворяются в забуференном солевом растворе. В некоторых вариантах реализации, белок существует в третьей фазе, где белки являются самоассоциированными в виде димера, тримеров, тетрамеров или мультимеров более высокого порядка, включая агрегированные наночастицы с покрытием.

[0015] В одном варианте реализации, наночастица представляет собой наночастицу золота. В некоторых вариантах реализации, наночастица имеет диаметр от около 20 нм до около 100 нм. В конкретном варианте реализации, наночастица представляет собой наночастицу золота, имеющую диаметр около 20 нм.

[0016] В одном варианте реализации, каждая наночастица покрыта белком. В некоторых вариантах реализации, большая часть или все поверхности наночастиц насыщены белком, что означает, что поверхность полностью занята белком, и для прикрепления белка не остается свободной поверхности. В некоторых вариантах реализации, большая часть или все поверхности наночастиц насыщаются белком перед добавлением в смесь других компонентов, таких как подходящая соль или забуференная соль.

[0017] В одном варианте реализации, смесь содержит от около  $6 \times 10^{11}$  до около  $7 \times 10^{11}$  наночастиц на миллилитр смеси. В конкретном варианте реализации, смесь содержит около  $6,3 \times 10^{11}$  наночастиц на мл. Если не связывать себя теорией и предполагая, что средний белок может быть смоделирован как сфера размером 10 нм, теоретический верхний предел для количества сфер размером 10 нм, необходимых для покрытия сферы размером 20 нм, составляет около 30. Можно оценить, что приблизительно от 15 до 20 молекул антител связаны одной наночастицей размером 20 нм. Следовательно, оценивается, что  $\sim 2,5$  мкг/мл антител является минимальной концентрацией, необходимой для полного покрытия  $6,3 \times 10^{11}$  наночастиц (20 нм)/мл. В некоторых вариантах реализации, смесь содержит от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл белка.

[0018] В некоторых вариантах реализации, белок, включенный в смесь, представляет собой терапевтическое антитело. В

некоторых вариантах реализации, белок содержит Fc-домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации, белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки включают антитела, фрагменты антител, производные антител, Fc-слитые белки и рецептор -Fc-слитые белки. В одном варианте реализации, белок представляет собой моноклональное антитело. В более конкретном варианте реализации, моноклональное антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может представлять собой моноспецифическое антитело или биспецифическое антитело.

[0019] В некоторых вариантах реализации, забуференная соль включает буфер и соль. В некоторых вариантах реализации, буфер обеспечивает ионную силу. В некоторых вариантах реализации, соль забуферивает смесь. В принципе, соль может быть любой подходящей солью, известной в данной области техники, и может быть, например, любой хлоридной, бромидной, фосфатной, сульфатной или аммониевой солью или любой их комбинацией. Неограничивающими примерами являются, например, хлорид натрия, хлорид калия, фосфат калия, хлорид аммония и т.д. В одном варианте реализации, соль включает хлорид натрия. Соль (например, хлорид натрия) может присутствовать в концентрации от около 2 мМ до около 300 мМ. В конкретных вариантах реализации, соль присутствует в смеси в концентрации около 2 мМ, около 20 мМ или около 200 мМ.

[0020] В одном варианте реализации, буфер содержит 2- (N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES). В конкретном варианте реализации, MES присутствует в смеси в концентрации около 10 мМ и pH около 6.

[0021] Во втором аспекте, изобретение предоставляет способ определение способности белка к самоассоциации. В одном варианте реализации, способ включает стадии объединения белка, множества наночастиц и забуференной соли для образования образца; возбуждение образца светом; измерение света, прошедшего через образец; и вычисление первого коэффициента интенсивности абсорбции образца. Процесс повторяется по меньшей мере еще один раз, каждый раз меняя один или несколько параметров и получая



второй, третий и т.д. коэффициент абсорбции. Множество коэффициентов интенсивности абсорбции, полученное для данного белка, может быть нанесено на график для анализа. Эти параметры включают тип соли (то есть нейтральный, хаотропный, космотропный), концентрацию соли, pH, концентрацию белка, включение или исключение дополнительных компонентов. Когда коэффициент интенсивности абсорбции превышает пороговое значение, белок считается подходящим для дозирования при высокой концентрации. Ожидается, что белок, который считается подходящим для дозирования при высокой концентрации, останется стабильным при высокой концентрации и будет менее склонным к агрегации.

[0022] В некоторых вариантах реализации, белок представляет собой терапевтическое антитело. В некоторых вариантах реализации, белок содержит Fc-домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации, белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки включают антитела, фрагменты антител, производное антитела, Fc-слитые белки и рецептор-Fc-слитые белки. В одном варианте реализации, белок представляет собой моноклональное антитело. В более конкретном варианте реализации, моноклональное антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело может представлять собой моноспецифическое антитело или биспецифическое антитело.

[0023] В некоторых вариантах реализации, белок добавляют к образцу до конечной концентрации от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл.

[0024] В некоторых вариантах реализации, наночастица представляет собой наночастицу золота. В некоторых вариантах реализации, наночастица золота имеет диаметр от около 20 нм до около 100 нм. В одном варианте реализации, диаметр наночастицы золота составляет около 20 нм.

[0025] В некоторых вариантах реализации, наночастицы добавляют к образцу до конечной концентрации от около  $5 \times 10^{11}$  до около  $8 \times 10^{11}$  наночастиц на мл, от около  $6 \times 10^{11}$  до около  $6,5 \times 10^{11}$

наночастиц на мл или около  $6,3 \times 10^{11}$  наночастиц на мл.

[0026] Забуференная соль может содержать буфер, буфер, который придает ионную силу, соль, соль, которая имеет буферную способность, или соль и буфер. В одном варианте реализации, соль включает хлорид натрия. Соль (например, хлорид натрия) может присутствовать в концентрации от около 2 мМ до около 300 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации, соль присутствует в смеси в концентрации около 2 мМ, около 5 мМ, около 10 мМ, около 20 мМ, около 50 мМ, около 75 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 120 мМ, около 150 мМ, около 175 мМ, около 200 мМ или около 300 мМ.

[0027] В одном варианте реализации, буфер содержит 2- (N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES). В конкретном варианте реализации, MES присутствует в смеси в концентрации около 10 мМ и рН около 6.

[0028] В некоторых вариантах реализации, свет возбуждения представляет собой белый свет, имеющий длины волн, охватывающие видимый спектр. В некоторых вариантах реализации, проходящий свет измеряют на нескольких длинах волн в диапазоне от около 450 нм до около 750 нм.

[0029] Коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой меру относительной интенсивности абсорбции света относительно стандарта или контроля. Контроль может быть внешним или внутренним. В одном варианте реализации, коэффициент интенсивности абсорбции рассчитывается путем деления максимальной интенсивности (оптической плотности или абсорбции) длины волны пиковой абсорбции образца на наблюдаемую исходную интенсивность абсорбции. В одном варианте реализации, исходная наблюдаемая интенсивность абсорбции представляет собой интенсивность абсорбции, наблюдаемую при 450 нм. В данном варианте реализации, коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой пиковую абсорбцию ( $A_{\text{пик}}$ )/абсорбцию при 450 нм ( $A_{450}$  или  $A_{\text{исход}}$ ). В этом варианте реализации, пороговое значение коэффициента интенсивности абсорбции составляет от около 1,5 до около 2. В конкретном варианте реализации, пороговое значение

коэффициент интенсивности абсорбции составляет около 1,7.

[0030] В одном варианте реализации, белок, который считается подходящим для дозирования при высокой концентрации, объединяют с наполнителем для образования состава лекарственного вещества (СЛВ) или лекарственного препарата (ЛП). В одном варианте реализации, белок составляют до конечной концентрации от около 50 мг/мл до около 250 мг/мл.

[0031] В одном варианте реализации, наполнитель включает модификатор тоничности, буфер, поверхностно-активное вещество, стабилизатор или любую комбинацию двух или более из них. В одном варианте реализации, модификатор тоничности представляет собой соль. В конкретном варианте реализации, соль представляет собой хлорид натрия. В одном варианте реализации, буфер поддерживает рН от около 6 до около 7. В конкретном варианте реализации, буфер представляет собой гистидин. В другом конкретном варианте реализации, буфер представляет собой фосфат. В одном варианте реализации, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном варианте реализации, стабилизатор представляет собой сахар, такой как сахароза или трегалоза. В другом варианте реализации, стабилизатор представляет собой аминокислоту, такую как пролин или аргинин.

[0032] В третьем аспекте, изобретение относится к способу производства терапевтического белка. В одном варианте реализации, способ включает этап выбора белка, имеющего высокую коллоидную стабильность, из множества различных белков с различной неизвестной коллоидной стабильностью; продуцирование выбранного белка в клетке-хозяине; очистку белка; и объединение белка в высокой концентрации с наполнителем с образованием лекарственного вещества или лекарственного препарата, где белок является стабильным. В одном варианте реализации, менее 10% белка агрегирует в составленном лекарственном веществе или лекарственном препарате.

[0033] В одном варианте реализации, стадия выбора белка, обладающего высокой коллоидной стабильностью, включает этапы объединения белка с наночастицей и забуференной солью для

образования образца; возбуждение образец светом; измерение света, проходящего через образец; и вычисление коэффициента интенсивности абсорбции образца. Эта стадия выбора повторяется один или несколько раз с изменением одного или нескольких параметров. Изменяемые параметры включают тип соли, концентрацию соли, рН, концентрацию белка и включение или исключение дополнительных компонентов. Когда коэффициент интенсивности абсорбции превышает пороговое значение, белок выбирают как имеющий высокую коллоидную стабильность.

[0034] В некоторых вариантах реализации, свет возбуждения представляет собой белый свет, содержащий длины волн, охватывающие видимый спектр. В некоторых вариантах реализации, проходящий свет измеряют на нескольких длинах волн в диапазоне от около 450 нм до около 750 нм.

[0035] Коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой меру относительной интенсивности абсорбции света относительно стандарта или контроля. Контроль может быть внешним или внутренним. В некоторых вариантах реализации, коэффициент интенсивности абсорбции рассчитывают путем деления максимальной интенсивности (оптической плотности или абсорбции) длины волны пика абсорбции образца на (1) исходную интенсивность абсорбции, наблюдаемую в этом образце (внутренняя), или на (2) исходную интенсивность абсорбции, наблюдаемую в образце наночастиц в отсутствии белка (внешняя). В одном варианте реализации, исходная наблюдаемая интенсивность абсорбции представляет собой интенсивность абсорбции, наблюдаемую при 450 нм. В данном варианте реализации, коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой пиковую абсорбцию ( $A_{\text{пик}}$ )/абсорбцию при 450 нм ( $A_{450}$  или  $A_{\text{исход}}$ ). В данном варианте реализации, пороговое значение коэффициента интенсивности абсорбции составляет от около 1,5 до около 2. В конкретном варианте реализации, пороговое значение коэффициента интенсивности абсорбции составляет около 1,7.

[0036] В дополнительном варианте реализации, изобретение относится к композиции, содержащей биотерапевтическое лекарственное средство (такое как, например, белок или антитело) в высокой концентрации. Конкретно, композиция может быть такой,

что не более чем около 10% всех видов белков присутствует в виде необратимого агрегата при концентрации биотерапевтического лекарственного средства. В альтернативном варианте, композиция является такой, что пороговое значение, как обсуждалось в данном документе, в диапазоне, например, от около 1,5 до около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ). Еще один альтернативный вариант представляет собой такой, где пороговое значение составляет, например, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9 или около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ). В некоторых вариантах реализации, пороговое значение находится в диапазоне от около 0,7 до около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). Дополнительный альтернативный вариант представляет собой такой, где пороговое значение составляет, например, около 0,7, около 0,8, около 0,9 или около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). В еще одном дополнительном варианте реализации, композиция является такой, что не более чем около 10% всех видов белка присутствует в виде необратимого агрегата при концентрации биотерапевтического лекарственного средства, и таким образом, что композиция имеет пороговое значение, как обсуждалось в данном документе, например, в диапазоне, например, от около 1,5 до около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ) или где пороговое значение составляет, например, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9 или около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ) и/или где пороговое значение находится в диапазоне от около 0,7 до около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ), или где пороговое значение составляет, например около 0,7, около 0,8, около 0,9 или около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). Концентрация биофармацевтического препарата может составлять около 50 мг/мл или более. В альтернативном варианте, концентрация биофармацевтического препарата может быть в диапазоне, например, от около 50 мг/мл до около 500 мг/мл, такой как, например, от около 50 до около 250 мг/мл, такой как, например, от около 100 до около 250 мг/мл.

[0037] В одном варианте реализации, изобретение относится к композиции, которую можно получить способом определения потенциала белка к самосборке, как описано в данном документе.

[0038] Еще в одном аспекте, изобретение относится к композиции, содержащей биотерапевтическое лекарственное средство (такое как, например, белок или антитело) в высокой

концентрации, для применения в медицине. В зависимости от лекарственного средства, специалист в данной области техники будет знать, которые или какие клинические состояния можно лечить путем введения композиции субъекту, нуждающемуся в этом. Композиция может быть такой что, не более чем около 10% всех видов белка присутствует в виде необратимого агрегата при этой концентрации биотерапевтического лекарственного средства. В альтернативном варианте, композиция является такой, что пороговое значение, как обсуждалось в данном документе, находится в диапазоне, например, от около 1,5 до около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ). Еще один альтернативный вариант представляет собой такой, где пороговое значение составляет, например, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9 или около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ). В некоторых вариантах реализации, пороговое значение находится в диапазоне от около 0,7 до около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). Дополнительный альтернативный вариант представляет собой такой, где пороговое значение составляет, например, около 0,7, около 0,8, около 0,9 или около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). В еще одном дополнительном варианте реализации, композиция представляет собой такую, в которой не более чем около 10% всех видов белка присутствует в виде необратимого агрегата при этой концентрации биотерапевтического лекарственного средства, и таким образом, композиция имеет пороговое значение, как обсуждалось в данном документе, например, в диапазоне, например, от около 1,5 до около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ) или где пороговое значение составляет, например, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9 или около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ) и/или где пороговое значение находится в диапазоне от около 0,7 до около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ), или где пороговое значение, представляет собой, например около 0,7, около 0,8, около 0,9 или около 1,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ). Концентрация биофармацевтического препарата может составлять около 50 мг/мл или более. В альтернативном варианте, концентрация биофармацевтического препарата может быть в диапазоне, например, от около 50 мг/мл до около 500 мг/мл, такой как, например, от около 50 до около 250 мг/мл, такой как например, от около 100 до около 250 мг/мл. Композицию можно вводить в виде одной дозы или

нескольких доз, которые считаются необходимыми для получения желаемого результата при лечении. В альтернативном варианте, изобретение относится к композиции, содержащей биотерапевтическое лекарственное средство (такое как, например, белок или антитело) при высокой концентрации, для производства лекарственного средства при лечении заболевания или заболеваний, которые поддаются лечению или излечиваются указанным биотерапевтическим лекарственным средством.

[0039] В одном варианте реализации, изобретение относится к способу приготовления биофармацевтической композиции (такой как, например, белок или антитело) таким образом, чтобы полученная композиция обладала подходящей реологией. В частности, способ определения способности белка к самосборке, как описано в данном документе, позволяет определять порядок обеспечения стабильной композиции, содержащей высокую концентрацию биофармацевтического лекарственного средства. Одним из важных атрибутов такого состава является вязкость. Следовательно, способ по изобретению позволит получить композицию с желаемыми физическими свойствами, так что композицию можно вводить желаемым путем или способом введения. Одним, в качестве примера, путем введения может быть введение путем инъекции. В таком случае, таким образом, важно иметь вязкость приготовленной композиции, позволяющую делать инъекцию, например, посредством шприца и катетера. Такой катетер может быть катетером такого размера, как, например, 6G, 8G, 9G, 10G, 11G, 12G, 13G, 14G, 16G, 19G, 20G, 21G, 22G, 23G, 24G или 26G. Термин «вязкость» относится к динамической или абсолютной вязкости (при 20°C и нормальном давлении), которая является мерой сопротивления жидкости, которая деформируется либо от напряжения сдвига, либо от напряжения растяжения. Таким образом, «вязкость» описывает внутреннее сопротивление жидкости к подвижности и может рассматриваться как мера трения жидкости. Следовательно, чем меньше вязкость чего-либо, тем больше его легкость движения (текучесть). В данном контексте, соответствующие диапазоны вязкости составляют от около 10-10 000 мПа·с, такие как, например, около 20-9000 мПа·с, такие как, например, около 30-

8000 мПа•с, такие как, например, около 40–7000 мПа•с, такие как, например, около 50–6000 мПа•с, такие как, например, около 70–5000 мПа•с, такие как, например, около 90–4000 мПа•с, такие как, например, около 100–3000 мПа•с или около 10 мПа•с, или около 20 мПа•с, или около 30 мПа•с, или около 40 мПа•с, или около 50 мПа•с, или, в альтернативном варианте, от около 1 мПа•с до около 20 мПа•с, такие как, например, около 2 мПа•с, такие как, например около 3 мПа•с, такие как, например около 4 мПа•с, такие как, например около 5 мПа•с, такие как, например около 6 мПа•с, такие как, например около 7 мПа•с, такие как, например, около 10 мПа•с, около 13 мПа•с, около 15 мПа•с, такие как, например, около 20 мПа•с.

[0040] Другие единицы измерения вязкости хорошо известны, например, 1 сантипуаз эквивалентен 1 мПа•с. Без связи с какой-либо конкретной теорией, типичный белок с низкой концентрацией (то есть менее или равный 10 мг/мл) имеет вязкость около 10 сП. Как таковая, высококонцентрированная белковая композиция, например, композиция антител, проявляющая вязкость ниже примерно 10 сантипуаз (ниже примерно 10 мПа•с), существенно подходит для использования в качестве биофармацевтической композиции. Белковая композиция (при высокой концентрации), имеющая вязкость от около 10 до около 15 сантипуаз (от около 10 мПа•с до около 15 мПа•с), безопасна для использования в процессе производства и разработки лекарств. Белковая композиция (при высокой концентрации), имеющая вязкость от около 15 до около 20 сантипуаз (от около 15 мПа•с до около 20 мПа•с), предупреждает о необходимости соблюдать осторожность в процессе производства и разработки лекарств. Белковая композиция (при высокой концентрации), имеющая вязкость более примерно 20 сантипуаз (более примерно 20 мПа•с), сообщает о проблемном производстве и разработке лекарственных препаратов. Вязкость может регулироваться различными компонентами и ингредиентами, как описано в данном документе. «Растворимый» и «высокорастворимый» также относятся к белку, имеющему подходящую вязкость для любого из описанных в данном документе применений, например, для приготовления и использования биофармацевтической композиции.



[0041] В одном варианте реализации, белок представляет собой антигенсвязывающий белок, например антитело, фрагмент антитела или белок рецептор-Fc-слитый белок.

[0042] В одном варианте реализации, клетка-хозяин, в которой производится белок, представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или производную клетки CHO, такую как клетка CHO-K1 или клетка EESYR® (см. Chen et al., US771997B2, опубликовано 10 августа 2010 г.).

[0043] В одном варианте реализации, стадия очистки белка включает подвергание белка (1) одному или нескольким этапам аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, хроматографии со смешанным режимом и хроматографии на гидроксипатите; и (2) одному или обоим этапам ультрафильтрации и диализации.

[0044] В одном варианте реализации, белок составляет конечную концентрацию, которая составляет, по меньшей мере, 50 мг/мл. В одном варианте реализации, концентрация белка составляет от около 50 мг/мл до около 250 мг/мл.

[0045] В одном варианте реализации, наполнитель, с которым белок объединяют для образования лекарственного вещества или лекарственного препарата, содержит один или несколько модификаторов тоничности, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизатор. В одном варианте реализации, модификатор тоничности представляет собой соль. В конкретном варианте реализации, соль представляет собой хлорид натрия. В одном варианте реализации, буфер поддерживает pH от около 6 до около 7. В конкретном варианте реализации, буфер представляет собой гистидин. В другом конкретном варианте реализации, буфер представляет собой фосфат. В одном варианте реализации, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном варианте реализации, стабилизатор представляет собой сахар, такой как сахароза или трегалоза. В другом варианте реализации, стабилизатор представляет собой аминокислоту, такую как пролин или аргинин.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0046] На Фиг. 1 изображен профиль абсорбции дисперсных наночастиц золота 20 нм (линия А) и агломерированных наночастиц золота 20 нм (линия В). Ось Y отображает оптическую плотность в произвольных единицах абсорбции. Ось X отображает длину волны проходящего света в нанометрах (нм).

[0047] На Фиг. 2 изображена диаграмму разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 2 (мкАт2) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт2 в микрограммах на миллилитр.

[0048] На Фиг. 3 изображен график разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела (мкАт) 1 (открытые символы) и мкАт5 (закрытые символы) в присутствии наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (квадраты) 20 мМ соли (треугольники) и 200 мМ соли (кружки). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт в микрограммах на миллилитр. Заключенная в рамку область слева (А) представляет условия с более высокими коллоидными отталкивающими условиями, имеющими высокое значение отбора, заключенная в рамку область в средней части (В) представляет условия со смешанными отталкивающими и притягивающими условиями, имеющими умеренное или смешанное значение отбора, и заключенная в рамку область с права (С) представляет условия притягивания, имеющие неоптимальное или низкое значение отбора.

[0049] На Фиг. 4 изображено наложение нескольких профилей абсорбции дисперсных наночастиц золота размером 20 нм в сочетании с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) различной концентрации (3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл по порядку сверху вниз в самой правой [750 нм] части кривой). Ось Y отображает

произвольную абсорбцию в произвольных единицах. Ось X отображает длину волны проходящего света в нанометрах (нм).

[0050] На Фиг. 5 изображена диаграмма разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций ЧСА, полученных из необработанных спектров абсорбции, изображенных на фигуре 4, и наночастиц золота размером 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию ЧСА в микрограммах на миллилитр.

[0051] На Фиг. 6 изображена диаграмма разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 1 (мкАт1) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт1 в микрограммах на миллилитр.

[0052] На Фиг. 7 изображена диаграмма рассеяния интенсивности рассеянного света растворов мкАт1 при различных концентрациях и концентрациях ионных солей: 2 мМ NaCl (кружки), 20 мМ NaCl (квадраты) и 200 мМ NaCl (треугольники). Ось Y отображает интенсивность рассеяния света в произвольных единицах абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт1 в граммах на литр. Сплошная линия представляет идеальную твердую сферу сопоставимого диаметра.

[0053] На Фиг. 8 изображена диаграмма разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 6 (мкАт6) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт6 в микрограммах на миллилитр.

[0054] На Фиг. 9 изображена диаграмма рассеяния

интенсивности рассеянного света растворов мкАт6 при различных концентрациях и концентрациях ионных солей: 2 мМ NaCl (кружки), 20 мМ NaCl (квадраты) и 200 мМ NaCl (треугольники). Ось Y отображает интенсивность рассеяния света в произвольных единицах абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт6 в граммах на литр. Сплошная линия представляет идеальную твердую сферу сопоставимого диаметра.

[0055] На Фиг. 10 изображен график разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 3 (мкАт3) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт3 в микрограммах на миллилитр.

[0056] На Фиг. 11 изображен график разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 4 (мкАт4) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт4 в микрограммах на миллилитр.

[0057] На Фиг. 12 изображен график разброса данных коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 5 (мкАт5) и наночастиц золота 20 нм при 2 мМ соли (кружки), 20 мМ соли (квадраты) и 200 мМ соли (треугольники). Ось Y отображает отношение интенсивности пиковой абсорбции каждого условия образца к исходной интенсивности абсорбции. Ось X отображает концентрацию мкАт5 в микрограммах на миллилитр.

[0058] На Фиг. 13 изображен график разброса данных CD-SINS коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 7 (мкАт7), составленного в различных буферах, pH и ионных силах. Каждый символ представляет различные составы буфера, pH и ионной силы с различными концентрациями

мкАт7 (ось X).

[0059] На Фиг. 14 изображен график разброса данных CD-SINS коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 7 (мкАт7), составленного в присутствии различных сахаров, концентраций сахаров и/или аминокислот. Каждый символ представляет различную композицию сахара/аминокислоты с различными концентрациями мкАт7 (ось X).

[0060] На Фиг. 15 изображен график разброса данных CD-SINS коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 7 (мкАт7) (8 мкг/мл, 32 мкг/мл, 128 мкг/мл и 512 мкг/мл мкАт7), комбинированных с различными соединениями бензоата. Когда мкАт7 комбинировали с п-аминобензойной кислотой [ПАБК (-o-), не закрашенный кружок], проявлялся благоприятный динамический коллоидный профиль взаимодействия, в котором отношение интенсивности абсорбции (ось Y) превышает 1,6.

[0061] На Фиг. 16 изображен график разброса данных CD-SINS коэффициентов интенсивности абсорбции различных концентраций моноклонального антитела 7 (мкАт7) в присутствии различных концентраций п-аминобензойной кислоты (ПАБК). Ось X отображает  $\log_2$  концентрации мкАт7 в микрограммах на миллилитр. Ось Y отображает коэффициент интенсивности абсорбции. Не закрашенные кружки (-o-) отображают отсутствие ПАБК, не закрашенные квадраты (-□-) отображают 12 мМ ПАБК, не закрашенные треугольники (-Δ-) отображают 18 мМ ПАБК, закрашенные кружки (-●-) отображают 24 мМ ПАБК, закрашенные квадраты (-■-) отображают 30 мМ ПАБК, а закрашенные треугольники (-▲-) отображают 36 мМ ПАБК.

УТОЧНЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 91) МПО/ЕП

[0062] На Фиг. 17 изображен точечный график постоянной вязкости при сдвиге (в мПа·с) раствора мкАт7, не содержащего ПАБК (закрашенные кружки [-●-]) или 20 мМ ПАБК (закрашенные треугольники [-▲-]), как функция концентрации мкАт7 в г/л. Не закрашенные символы отображают экстраполированную вязкость растворов, которые, как ожидается, содержат 100 г/л мкАт7.

**ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0063] Прежде чем описывать данное изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут меняться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0064] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. Используемый в данном документе термин «около» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 15%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает в себя 85 и 115 и все целые и дробные значения в промежутке (например, 86, 86,001, 87, 88, 88,3, 89 и т.д.).

[0065] Абсолютные количества и относительные количества наполнителей, компонентов и других материалов могут быть описаны по массе или молям. Единицы массы могут быть выражены в граммах, миллиграммах, микрограммах и т.п.). Термин «масса», такой как «масса/объем» или «м/о», означает «масса». Относительные количества могут быть выражены в процентах по массе (то есть в процентном отношении), где один (1) процент массы к объему (м/о) означает 1 грамм материала на 100 миллилитров объема. Также, например, одна (1) часть компонента «А» на одну (1) часть компонента «В» по массе означает, например, что на каждый один (1) грамм компонента «А» приходится один (1) грамм компонента «В». Например, один процент (1%) от массы компонента «А» означает, например, что на каждые 100 грамм общей массы частицы приходится один (1) грамм компонента «А». Относительные количества компонента также могут быть выражены в виде молей или количества молекул на данный объем, например, миллимолей на литр (миллимоль (мМ)), или на другой компонент, например, X частей

компонента «А» на Y частей компонента «В» в молях означает, что для каждых X молей «А» есть Y молей «В»

[0066] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться при практическом применении или испытании данного изобретения, в данный момент описаны примерные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в него в посредством ссылки во всей их полноте.

**Анализ для определения динамической коллоидной стабильности: Концентрационно-зависимая спектроскопия самовзаимодействия на основе наночастиц (CD-SINS)**

[0067] Предлагается разработанный анализ на основе SINS для определения динамического диапазона вириалов для белков. Белок проявляет сложное функциональное состояние, которое очень чувствительно к химико-физическим условиям среды белка. Следовательно, оценка вириального коэффициента белка в определенном наборе условий окружающей среды недостаточна для определения вириального коэффициента этого белка в других средах. Получение нескольких вириалов для данного белка в многочисленных условиях является кропотливым и трудоемким. Авторы данного изобретения описывают высокопроизводительный анализ для определения динамической коллоидной стабильности белка, который информирует о выборе белка, который может быть включен в состав композиции или иным образом сохранен в высокой концентрации, без проблем, связанных с агрегацией, или, по меньшей мере, с минимизацией проблем потенциальной агрегации.

[0068] В этом анализе SINS используется новым способом, путем оценки агрегации наночастиц в условиях различной концентрации белка, различной ионной силы, переменного pH и других условий. Как описано выше и в работе Sules (2011), наночастицы золота покрыты белком и помещены в забуференный раствор. По мере того как наночастицы агрегируют из-за самоассоциации белка, поверхностный плазмонный резонанс частиц изменяется: максимальная абсорбция смещается в сторону большей длины волны (красное смещение); и абсорбция имеет более низкую интенсивность, то есть профиль абсорбции расширяется и

перемещается влево (фигура 1). В данном варианте, наночастицы золота без покрытия размером 20 нм имеют пиковую оптическую плотность при около 520–530 нм.

[0069] Сравнение традиционных SINS с хорошо известным способом статического рассеяния света (SLS) для определения  $B_{22}$  или  $A_2$  показывает общее совпадение для большинства тестируемых антител. В таблице 1 приведено сравнение пиковой абсорбции гранул, покрытых специфическими различными моноклональными антителами и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) в анализе SINS, с вириалами  $A_2$  для тех же белков, определенных SLS. Как показано в таблице 1, анализ SINS легко отличает притягивающиеся (отрицательные  $A_2$ ) от отталкивающихся (положительных  $A_2$ ) систем. Однако, традиционные анализы SINS и SLS не показывают динамического диапазона для условий отталкивания. Кроме того, несколько расхождений между обычными SINS и SLS указывают на сложное поведение некоторых белков.

**Таблица 1**

Белок	Особенность системы	2 мМ NaCl		20 мМ NaCl		200 мМ NaCl	
		SINS	$A_2$	SINS	$A_2$	SINS	$A_2$
ЧСА	Отталкивание	526	$1,17E-4$	526	$9,68E-5$	528	$7,85E-5^*$
мкАт1	Отталкивание	530	$1,72E-4$	531	$6,70E-5$	532	$1,34E-5$
мкАт2	Смешанные	583	$-2,36E-5$	536	$-1,44E-5$	534	$1,47E-5$
мкАт3	Притягивание	556	$-3,39E-5$	555	$-4,68E-5$	565	НД
мкАт4	Отталкивание	531	$-5,90E-5$	533	$-1,06E-5$	535	$1,38E-5$
мкАт5	Смешанные	562	$-1,09E-5$	535	$-2,14E-5$	530	$-7,67E-6$

[0070] Авторы изобретения наблюдали, что некоторые белки способны быть стабильными при высоких концентрациях, но демонстрируют отрицательные  $A_2$  или смещенные в красный цвет максимальные спектры абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ), например, мкАт5 может легко достигать концентрации около  $\sim 200$  г/л и быть стабильным, однако его  $A_2$  отрицателен, и его  $\lambda_{\text{макс}}$  смещается в красный при более низкой ионной силе. Аналогичным образом, мкАт2 может легко достигать концентрации около  $\sim 175$  г/л и оставаться стабильным, однако его  $A_2$  отрицателен при более низкой концентрации соли, а его  $\lambda_{\text{макс}}$  смещается в красный цвет при более низкой ионной силе.

[0071] В данном документе описан улучшенный способ SINS.



Способ обеспечивает данные о динамической коллоидной стабильности белков для оценки специфического для белка состояния на ранних сроках разработки, обходя при этом потребность в больших количествах белка. В данном способе используется поверхностный плазмонный резонанс наночастиц с покрытием в присутствии различных количеств белка в растворе, превышающих количество, необходимое для покрытия наночастиц. Наблюдают профили абсорбции, рассчитывают коэффициент интенсивности абсорбции для каждого варианта образца и наносят на график для определения динамической коллоидной стабильности.

[0072] В одном варианте реализации, для каждого образца во множестве образцов, используемых для определения множества отдельных значений коэффициента интенсивности абсорбции для данного рассматриваемого белка, наночастицы объединяют с различными количествами белка, превышающими минимальное количество белка, необходимое для полного покрытия частиц. Количество используемого минимального белка зависит от молекулярной массы белка (то есть от его гидродинамического радиуса), размера (площади поверхности) наночастиц и концентрации наночастиц. Например, когда наночастицы золота размером 20 нм используются в количестве от около 6 до  $6,5 \times 10^{11}$  частиц на мл, для полного покрытия наночастиц достаточно около 2,5 мкг/мл белка от около 50 до 150 кДа. Поэтому белок в количестве более 2,5 мкг/мл используется для каждого образца из множества образцов в этих условиях. В данном случае, например, белок включен в образец от около 2,6 мкг/мл до около 512 мкг/мл или более, около  $3 \pm 1$  мкг/мл, около  $4 \pm 1$  мкг/мл, около  $5 \pm 1$  мкг/мл, около  $6 \pm 1$  мкг/мл, около  $7 \pm 1$  мкг/мл, около  $8 \pm 1$  мкг/мл, около  $9 \pm 1$  мкг/мл, около  $10 \pm 1$  мкг/мл, около  $15 \pm 5$  мкг/мл, около  $20 \pm 5$  мкг/мл, около  $25 \pm 5$  мкг/мл, около  $30 \pm 5$  мкг/мл, около  $40 \pm 5$  мкг/мл, около  $50 \pm 10$  мкг/мл, около  $60 \pm 10$  мкг/мл, около  $70 \pm 10$  мкг/мл, около  $80 \pm 10$  мкг/мл, около  $90 \pm 10$  мкг/мл, около  $100 \pm 10$  мкг/мл, около  $125 \pm 15$  мкг/мл, около  $150 \pm 25$  мкг/мл,  $175 \pm 25$  мкг/мл,  $200 \pm 25$  мкг/мл,  $225 \pm 25$  мкг/мл, 250

$\pm 25$  мкг/мл,  $300 \pm 50$  мкг/мл,  $350 \pm 50$  мкг/мл,  $400 \pm 50$  мкг/мл,  $450 \pm 50$  мкг/мл,  $500 \pm 50$  мкг/мл или  $512 \pm 50$  мкг/мл. В некоторых вариантах реализации, множество образцов включает два образца, три образца, четыре образца, пять образцов, шесть образцов, семь образцов, восемь образцов, девять образцов, 10 образцов или более, содержащих другую концентрацию белка.

[0073] Например, множество образцов в одном варианте реализации включает  $6,3 \times 10^{11}$  частиц/мл 20 нм наночастиц золота и антитело в первой концентрации около 3,125 мкг/мл, во второй концентрации 6,25 мкг/мл, третьей концентрации около 12,5 мкг/мл, четвертой концентрации около 25 мкг/мл, пятой концентрации около 50 мкг/мл, шестой концентрации около 100 мкг/мл, седьмой концентрации около 200 мкг/мл и восьмой концентрации около 400 мкг/мл.

[0074] В одном варианте реализации, для каждого образца из множества образцов, используемых для определения множества отдельных значений коэффициента интенсивности абсорбции для данного рассматриваемого белка, каждая комбинация наночастиц/белка комбинируется с переменной концентрацией соли. Например, образец может содержать нейтральную соль для белка, такую как хлорид натрия, в концентрации около 1 мкМ, около 10 мкМ, около 100 мкМ, около 1 мМ, около 2 мМ, около 4 мМ, около 6 мМ, около 8 мМ, около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 150 мМ, около 175 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ или около 300 мМ или более. В другом варианте реализации, соль может быть хаотропной солью, такой как хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния или тому подобное. Образец также может содержать в дополнение или вместо хаотропной соли другой хаотропный агент, такой как бутанол, этанол, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину или мочевину. В другом варианте реализации, образец может содержать космотропную соль, такую как соль карбоната, сульфата или фосфата, например сульфат аммония.

[0075] Множество образцов может содержать два, три, четыре,

пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 или более подмножеств образцов, имеющих различную концентрацию соли. Таким образом, например, множество образцов может содержать 10 различных концентраций белка при трех различных концентрациях соли в общей сложности для 30 образцов. В конкретном варианте реализации, одна подгруппа из множества образцов содержит около 2 мМ хлорида натрия, другая группа из множества образцов содержит около 20 мМ хлорида натрия, и еще одна группа из множества образцов содержит около 200 мМ хлорида натрия. Соль 2 мМ считается низкой ионной силой, а 200 мМ считается высокой ионной силой. Высокая тоничность соли до и 300 мМ включительно, хотя она не относится к большинству терапевтических составов для белка, используется в случае изготовления белка, в процессе очистки посредством хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC). Следовательно, изобретение полезно для определения того, будет ли белок при высокой концентрации в условиях высокой концентрации соли подходить для очистки HIC или тому подобного.

[0076] Белый свет подается на каждый образец, и получается его спектр абсорбции. Коэффициент интенсивности абсорбции рассчитывают для каждого образца из множества и наносят на график. В тех образцах, в которых наночастицы не агрегируют или где агрегация является низкой, то есть когда белок проявляет отталкивание или низкий потенциал агрегации, длина волны пика абсорбции и интенсивность абсорбции аналогичны контрольным наночастицам без покрытия. В тех образцах, в которых наночастицы агрегируют, то есть когда белок проявляет притягивания или высокий потенциал агрегации, длина волны пика абсорбции смещается в сторону красного, и профиль абсорбции выравнивается по мере уменьшения интенсивности пика по сравнению с контрольными наночастицами без покрытия. Каждый образец из множества образцов для данного белка может демонстрировать различные профили абсорбции (то есть различные коэффициенты интенсивности абсорбции), в некоторых случаях показывая способность притягиваться, а в других случаях демонстрируя способность отталкиваться. Эти белки имеют динамический диапазон коллоидной стабильности и могут быть коллоидно стабильными в

определенных условиях. Для некоторых белков, белок может проявлять отталкивание по всем параметрам (образцам). Такой белок считается устойчивым или обладает устойчивой динамической коллоидной стабильностью. Для других белков, белок может проявлять способность притягиваться при всех условиях тестируемых параметров. Такой белок считается коллоидно нестабильным.

[0077] Те белки, которые проявляют отталкивание, по меньшей мере, в одном тестируемом состоянии (по меньшей мере, в одном образце), могут быть выбраны для крупномасштабного производства и приготовления в качестве стабильного лекарственного вещества. Эти белки с меньшей вероятностью образуют агрегаты во время производства и хранения. Кроме того, те условия, при которых белок проявляет отталкивающую способность, могут дать информацию касательно этапов производства и наполнителей в составах для белка в качестве лекарственного вещества. Например, использование концентрационно-зависимой SINS (CD-SINS), как описано в данном документе, может определять выполнимость производства белков, например, на последующих этапах ультрафильтрации и диализа. Выбор белкового раствора с низкой вязкостью для крупномасштабного производства может повысить эффективность и снизить затраты при биопроцессе получения белка (Shire SJ, 2009, "Formulation and manufacturability of biologics." *Curr Opin Biotechnol.* 20(6):708-14). CD-SINS также в общем доступен для широкого спектра наполнителей (как обычных, так и специфических). CD-SINS может быть использована для получения взаимосвязей структура-активность между различными химическими рядами, используемыми для составления белкового лекарственного вещества, и может быть использована для выбора вспомогательных веществ, которые изменяют самоассоциацию (см. пример 11 и фигуры 13 и 14).

[0078] Общие критерии для выбора молекул и условий, имеющих приемлемую динамику коллоидной стабильности, изображены на фигуре 3, на которой представлены кривые коэффициентов интенсивности абсорбции двух белков, мкАт1 и мкАт5, в трех условиях ионной силы. Три области обеспечивают: (А) безопасный

процесс, который включает устойчивые молекулы, которые, как ожидается, будут стабильными при высокой концентрации; (В) процесс с возможными неблагоприятными последствиями, который включает молекулы, демонстрирующие коэффициенты интенсивности абсорбции выше порогового уровня (например,  $A_{\text{дик}}/A_{450} > 1,7$ ) при некоторых условиях; и (С) потенциально неоптимальный, который включает молекулы, не достигающие порогового значения коэффициентов интенсивности абсорбции при любых условиях. Например, мкАт1 (открытые символы) является устойчивым с точки зрения коллоидной стабильности, попадая в область «безопасного процесса» при более низких солевых условиях (2 мМ NaCl, открытые квадраты; 20 мМ NaCl, открытые треугольники), и категорию «процесса с возможными неблагоприятными последствиями» при более высоких солевых условиях (200 мМ NaCl, незакрашенные кружки). И наоборот, мкАт5 (закрашенные символы) является менее устойчивым, попадая в категорию «потенциально неоптимальных» при более низких солевых условиях, и в область «процесса с возможными неблагоприятными последствиями» при более высоких солевых условиях.

**[0079]** Концентрационно-зависимая SINS (CD-SINS) демонстрирует, как системы белок/растворитель «развиваются» с увеличением концентрации белка. Она фиксирует множество коллоидных взаимодействий, которые проявляются различными белками при высокой концентрации белка: от отталкивающих до идеальных (нейтральных); притягивающих до идеальных; идеальных до притягивающих; и нечувствительных. Она фиксирует многие из различных аспектов коллоидных взаимодействий, таких как отталкивание или притягивание, обусловленное зарядом, подвергает электростатическому экранированию и качественно обеспечивает довольно широкий динамический диапазон. CD-SINS выявляет возможные гидрофобно-опосредованные проблемы и дает сведения об обычно неоптимальных молекулах. Способ обеспечивает аналитический инструмент для оценки возможности разработки белка при высокой концентрации с заметно минимальными потребностями для белка, который пригодный для автоматизации.

**Снижение вязкости притягивающего или смешанного коллоидного**

**белка**

[0080] Те белки, которые имеют неблагоприятные профили динамического коллоидного взаимодействия, то есть склонны к самоассоциации, обычно могут иметь высокую вязкость при более высоких концентрациях. Такая высокая вязкость при высокой концентрации может сделать белок нежелательным для парентерального введения. Описанный в данном документе анализ CD-SINS полезен для скрининга снижающих вязкость наполнителей. В одном аспекте предлагается способ получения белковой композиции с пониженной вязкостью. В одном варианте реализации, наполнитель, потенциально уменьшающий вязкость.

[0081] В некоторых вариантах реализации, наполнитель, уменьшающий вязкость, снижает вязкость раствора белка по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2,5 раза, в 3 раза, в 3,5 раза, в 4 раза, в 4,5 раза, в 5 раз или более чем в 5 раз по отношению к вязкости раствора белка без наполнителя, уменьшающего вязкость.

[0082] В некоторых вариантах реализации, наполнитель, уменьшающий вязкость представляет собой аминокислоту или соль аминокислоты. В некоторых вариантах реализации, наполнитель, уменьшающий вязкость, представляет собой углеводород, алкан, алкен и алкин, жирную кислоту, жирную кислотную группу, бензолсодержащую структуру, бензойную кислоту, замещенный углеводород, замещенный алкан, замещенный алкен, замещенный алкин, замещенную жирную кислоту, хвост замещенной жирной кислоты, замещенную бензолсодержащую структуру, замещенную бензойную кислоту, сульфоновую кислоту, аминокислоту, аминобензойную кислоту, алкилированную бензойную кислоту, гидроксibenзойную кислоту или аммонийную соль бензойной кислоты. В одном варианте реализации, наполнитель, уменьшающий вязкость представляет собой парааминобензойную кислоту (ПАБК). В одном варианте реализации, ПАБК включена в белковый состав в концентрации 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ или 25 мМ. В одном варианте реализации, наполнитель, уменьшающий вязкость,

представляет собой ПАБК, комбинированную в концентрации > 12 мМ или в концентрации 20 мМ в растворе белка.

### **Определения**

[0083] Используемый в данном документе термин «коллоидная стабильность», который можно использовать взаимозаменяемо со «склонностью к самоассоциации» или «склонностью к агрегации», означает суммарный (общий) эффект молекулярных сил в пространстве, например, электростатических, ван-дер-ваальсовых и т.п., что может привести к притягивающему, нейтральному или отталкивающему потенциалу взаимодействия белка.

[0084] Используемый в данном документе термин «коэффициент интенсивности абсорбции» означает отношение максимальной интенсивности абсорбции образца к исходной интенсивности абсорбции. Исходная интенсивность может быть получена из абсорбции образца на произвольной длине волны, которая значительно короче или длиннее ожидаемой длины волны абсорбции. В некоторых вариантах реализации, ожидаемая длина волны абсорбции для наночастиц золота размером 20 нм находится в диапазоне от около 500 до 600 нм и достигает пиков около 530 нм. Следовательно, исходная интенсивность абсорбции может быть интенсивностью абсорбции образца на длине волны менее 500 или более 600. Например, исходная интенсивность абсорбции может быть интенсивностью абсорбции образца при 450 нм. В таком случае, коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой интенсивность абсорбции на пиковой длине волны абсорбции ( $A_{\text{пик}}$ ) образца, деленную на интенсивность абсорбции при 450 нм ( $A_{450}$  или  $A_{\text{исход}}$ ).

[0085] В других вариантах реализации, исходная интенсивность абсорбции может быть интенсивностью пика абсорбции непокрытых наночастиц (контрольных наночастиц). В таком случае, наночастицы без белка, но в той же забуференной соли, в которой взяты образцы наночастиц с экспериментальным покрытием, подвергают анализу абсорбции. Пиковая интенсивность абсорбции непокрытого контроля наночастиц ( $A_{\text{контроль}}$ ) служит исходной интенсивностью абсорбции. В таком случае, коэффициент интенсивности абсорбции рассчитывается как  $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ .

[0086] Абсорбция обычно выражается в произвольных единицах, которые сокращаются при расчете коэффициента. Абсорбция измеряется путем пропускания источника белого света через образец. Образец абсорбирует свет определенной длины волны с определенной силой, в соответствии с оптическими свойствами образца. Интенсивность света, который проходит через образец, то есть «проходящий свет», измеряется на нескольких длинах волн, и рассчитывается интенсивность «абсорбированного света».

[0087] Спектр абсорбции наночастиц золота определяется поверхностным плазмонным резонансом частиц. Электрическое поле от падающего света взаимодействует со свободными электронами на поверхности частиц золота и приводит к сильной абсорбции в видимой области. Это оптическое свойство зависит от размера, формы и состояния агломерации наночастиц. Например, более мелкие частицы (диаметром 20 нм) абсорбируют на более низкой длине волны (~ 522 нм) и с более узким и более интенсивным пиком ( $A \sim 0,6$ ), чем более крупные частицы (например, частицы размером 250 нм абсорбируют наиболее сильно при 570–660 нм с интенсивностью около 40% интенсивности частицы 20 нм). Частица неправильной формы показывает более широкий пик более низкой интенсивности, который смещен в красный цвет относительно сферической частицы. Аналогично, агломерированные частицы показывают более широкий пик с более низкой интенсивностью, который смещен в красный цвет относительно дискретных дисперсных сферических частиц (фигура 1).

[0088] Используемый в данном документе термин «пороговое значение» обозначает коэффициент интенсивности абсорбции, выше которого белок считается пригодным для достижения стабильной высокой концентрации в растворе. Образец белка, имеющий коэффициент абсорбции ниже порогового значения, указывает на то, что белок, по крайней мере, в экспериментальных условиях pH, ионной силы и плотности белка, может оказаться не пригодным для достижения стабильной высокой концентрации в растворе. Эта возможная пригодность белка для достижения высокой концентрации в растворе обратно связана с «способностью притягиваться» или потенциалом самоассоциации белка и положительно связана с



«способностью отталкиваться» белка. В некоторых вариантах реализации, пороговое значение составляет около 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ). В некоторых вариантах реализации, пороговое значение составляет около 0,7, 0,8, 0,9 или 1 ( $A_{\text{пик}}/A_{\text{контроль}}$ ).

[0089] Используемый в данном документе термин «динамический диапазон» относится к способности белка к самоассоциации в ряде условий. В предварительном уровне техники исследований самоассоциации, в которых используется спектроскопия самовзаимодействия на основе наночастиц (SINS), измеряют только потенциал самоассоциации белков при одном наборе условий. Белок, который считается «притягивающимся» при анализе по единичным пунктам, может быть исключен, тогда как белок, который считается «отталкивающим» в этом анализе, может быть принят как пригодный для составления при высокой концентрации и производства. В таком случае, ряд коэффициентов интенсивности абсорбции получают в различных экспериментальных условиях и наносят на график, получая профиль «динамического диапазона» для конкретного белка. В некоторых условиях, белок может иметь коэффициент интенсивности абсорбции ниже порогового значения, тогда как в других условиях белок может иметь коэффициент интенсивности абсорбции ниже порогового значения. Такой белок будет иметь приемлемую степень отталкивания в этих условиях, что может повлиять на выбор процессов производства белка и наполнителей и концентраций препарата. Например, моноклональное антитело 2 (мкАт2) демонстрирует приемлемую степень отталкивания в условиях высокой концентрации/высокой ионной силы (например, 200 мМ NaCl), но неприемлемую способность притягиваться в условиях низкой ионной силы (фигура 2).

[0090] Экспериментальные условия, используемые для определения динамического диапазона белка, включают концентрацию белка; размер, количество форм наночастицы; материал, из которого изготовлена наночастица; способ покрытия наночастиц белком; характер и количество компонентов в буфере или растворителе; pH; и ионную силу раствора. Например, pH буфера может влиять на общий заряд белка в зависимости от

изоэлектрической точки белка ( $pI$ ), а заряд в свою очередь может влиять на вириальный коэффициент белка второго порядка (отрицательный  $B_{22}$  является притягивающимся, а положительный  $B_{22}$  является отталкивающимся). Как известно, ионная сила (то есть содержание соли) влияет на самопритягивание белка, причем увеличение ионной силы защищает белки от отталкивания на основе заряда и способствует притягиванию.

[0091] В некоторых вариантах реализации, точки данных (то есть коэффициенты интенсивности абсорбции) взяты при различных концентрациях соли или вообще без соли. Например, соль, например хлорид натрия, может быть включена в любой концентрации в диапазоне от следовых количеств до перенасыщения. В некоторых вариантах реализации, хлорид натрия включен в «забуференную соль» в концентрации от около 0,1 до около 1 мМ, от 1 до 500 мМ или от 2 до 300 мМ. В некоторых вариантах реализации, данные берутся в двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, 10 или более различных условиях концентрации соли. В одном варианте реализации, используются по меньшей мере три условия концентрации соли, например, 2 мМ, 20 мМ и 200 мМ хлорида натрия. В другом варианте реализации, используются по меньшей мере пять условий концентрации соли. Неограничивающие примеры пяти условий концентрации соли могут включать: 1 мМ, 2 мМ, 20 мМ, 200 нМ и 300 мМ хлорида натрия или 1 мМ, 5 мМ, 20 мМ, 100 нМ и 300 мМ хлорида натрия. Специалист в данной области может легко адаптировать анализ с использованием различных солей и/или солевых условий в зависимости от характера экспериментального или терапевтического использования представляющего интерес белка.

[0092] Используемый в данном документе термин «забуференная соль» обозначает водный раствор, содержащий буфер и соль. Соль может быть в любой концентрации, и буфер может иметь буферную емкость при любом диапазоне pH. В некоторых вариантах реализации, соль и буфер могут быть одинаковыми, такими как карбонат кальция. Известно, что соли влияют на взаимодействие белков и часто используются для осаждения белков, чтобы влиять на сворачивание белка для стабилизации фармацевтических

составов, чтобы обеспечить тоничность и регулировать поведение белка во время хроматографии. Соли могут быть космотропными (положительная свободная энергия водородной связи) или хаотропными (отрицательная свободная энергия водородной связи) агентами. Космотропы облегчают взаимодействие вода-вода и обычно используются для высаливания белков. Примеры космотропных ионов включают карбонат, сульфат, фосфат, магний, литий, цинк и алюминий. Хаотропы разрушают водородные связи и ослабляют гидрофобные эффекты, способствуя тем самым денатурации белка. Примеры хаотропных солей включают хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития и хлорид магния. Соли, такие как хлорид натрия, находятся ближе к середине ряда Гофмайстера, что означает, что они не эффективны ни при всаливании, ни при высаливании. В зависимости от цели анализа самоассоциации белка, соли забуференной соли могут быть выбраны по их способности всаливать, высаливать или оставаться эффективно нейтральными при физиологических концентрациях.

[0093] «Буферы» включены для контроля pH, который, в свою очередь, влияет на свойства заряда белков, а также на последующую структуру и функцию. В зависимости от цели анализа самоассоциации белка, буферы могут быть выбраны, например, по их способности усиливать очистку белка, обеспечивать долгосрочную стабильность белка или обеспечивать комфорт для пациента во время введения терапевтического белка. Пригодные буферы хорошо известны в данной области техники и включают MES, TRIS, PIPES, MOPS, фосфат, цитрат-фосфат, цитрат, ацетат, карбонат-бикарбонат, гистидин, имидазол и тому подобное. В одном конкретном варианте реализации, буфер, используемый в анализе самоассоциации белка, представляет собой MES (2- (N-морфолино) этансульфоновую кислоту), который имеет удобный буферный диапазон около pH 5,5-6,7. В конкретном варианте реализации, MES включен в забуференную соль при около 10 mM, pH 6.

[0094] Буфер используется в забуференном солевом компоненте аналитической системы и реагентах. Буфер также используется для контроля pH растворов, которые содержат белок после анализа. Буферы используются в средах для производства клеточных культур,

используемых для получения белка. Буферы также используются в растворах, используемых во время очистки белка, и во время различных типовых операций. Буферы используются в составленных лекарственных веществах и в конечном составе лекарственного препарата.

[0095] Буферы широко используются в белковых составах, хорошо известны в данной области техники и включают гистидин, сукцинат, цитрат, ацетат, фосфат и тому подобное. Буфер может быть включен в состав лекарственного вещества (СЛВ) или лекарственного препарата (ЛП) в концентрации от 1 мМ до 100 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации, буфер включен в количестве около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации, буфер присутствует в концентрации от 5 мМ  $\pm$  0,75 мМ до 15 мМ  $\pm$  2,25 мМ; от 6 мМ  $\pm$  0,9 мМ до 14 мМ  $\pm$  2,1 мМ; от 7 мМ  $\pm$  1,05 мМ до 13 мМ  $\pm$  1,95 мМ; от 8 мМ  $\pm$  1,2 до 12 мМ  $\pm$  1,8 мМ; от 9 мМ  $\pm$  1,35 мМ до 11 мМ  $\pm$  1,65 мМ; 10 мМ  $\pm$  1,5 мМ; или около 10 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации, буферная система СЛВ или ЛП содержит гистидин, фосфат и/или ацетат при 10 мМ  $\pm$  1,5 мМ.

[0096] В некоторых вариантах реализации, буфер выбирают из химического вещества, способного буферизироваться где-то в диапазоне рН от около 3 до около 9 или в диапазоне рН от около 3,7 до около 8,0. Например, предварительно лиофилизированный раствор может иметь рН около 3,4, около 3,6, около 3,8, около 4,0, около 4,2, около 4,4, около 4,6, около 4,8, около 5,0, около 5,2, около 5,4, около 5,6, около 5,8, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,6, около 6,8, около 7,0, около 7,2, около 7,4, около 7,6, около 7,8 или около 8,0.

[0097] Буфер может быть комбинацией отдельных буферов, таких как, например, комбинация гистидина и ацетата (гист-ацетатный буфер). В одном варианте реализации, буфер имеет диапазон буферизации от около 3,5 до около 6 или от около 3,7 до около 5,6, такой как диапазон, забуференный ацетатом. В одном варианте реализации, буфер имеет диапазон буферизации от около 5,5 до около 8,5 или от около 5,8 до около 8,0, такой как диапазон, забуференный фосфатом. В одном варианте реализации,

буфер имеет диапазон буферизации от около 5,0 до около 8,0 или от около 5,5 до около 7,4, такой как диапазон, забуференный гистидином.

**[0098]** Используемый в данном документе термин «наночастица» относится к сферической, почти сферической или сфероидальной частице, имеющей диаметр в диапазоне от  $10^{-9}$  М (0,001 микрона) до  $10^{-6}$  М (1 микрона). Наночастицы могут содержать любой материал, включая органические полимеры, металлы, полупроводниковые материалы, магнитные материалы и комбинации материалов. Металлические наночастицы особенно пригодны для анализов на основе поверхностного плазмонного резонанса, поскольку на их поверхности имеются свободные электроны, которые могут взаимодействовать с электрическим полем от падающего света, что приводит к сильному спектру абсорбции. Наночастицы золота и наночастицы серебра являются примерами наночастиц из металла, полезных для измерения изменений в плазмонном резонансе. Размер, форма и материал наночастиц влияют на интенсивность и длину волны максимальной абсорбции. Полезны наночастицы золота диаметром от 20 до 400 нм. В некоторых вариантах реализации, наночастица, используемая в анализе динамического диапазона самоассоциации, представляет собой наночастицу золота (AuNP) диаметром около 20 нм, 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 80 нм или 100 нм.

**[0099]** Используемый в данном документе термин «свет» означает электромагнитное излучение (ЭМИ). Свет может иметь одну длину волны, узкий диапазон длин волн, широкий диапазон длин волн, такой как «белый свет», совокупности длин волн. Свет может быть в форме лазерного луча или в виде рассеянного света. Анализ самоагрегации представляет собой спектрофотометрический анализ, в котором измеряется влияние, которое образец оказывает на свет. Таким образом, свет подается на образец (то есть «падающий свет»), образец взаимодействует со светом, таким как генерация плазмонов и абсорбция определенных длин волн света (то есть абсорбированный свет), и спектр света пропускается через образец и на детектор (то есть, «проходящий свет»). В некоторых вариантах реализации, падающий свет представляет собой белый

свет, содержащий ЭМИ, имеющий длины волн от 400 до 800 нм. В некоторых вариантах реализации, проходящий свет детектируется и измеряется на длинах волн от 400 нм до 800 нм, из которых определяется интенсивность абсорбции.

[0100] Используемый в данном документе термин «самоассоциация» относится к неспецифическому связыванию конкретного белка с другим белком того же вида. Под неспецифическим подразумевается ассоциация со слабыми силами, которые считаются небиологическими. Чтобы отличить неспецифическое от специфического взаимодействия, ассоциация двух идентичных половин антитела с образованием интактного антитела считается специфическим взаимодействием. И наоборот, ассоциации двух или более идентичных интактных антител посредством ван-дер-ваальсовых или гидрофобных взаимодействий с образованием димеров, тримеров или мультимеров высшего порядка, которые являются обратимыми или необратимыми, являются «неспецифичными».

[0101] Используемый в данном документе термин «стабильный» или «стабильность» относится к сохранению приемлемой степени физической структуры (термодинамическая стабильность), химической структуры (кинетическая стабильность) или биологической функции (функциональная стабильность) белка или другой биологической макромолекулы с течением времени. Белок может быть стабильным, даже если он не сохраняет 100% своей физической структуры, химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах, поддержание около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% структуры или функции белка после хранения в течение определенного периода времени может рассматриваться как «стабильное».

[0102] Стабильность может быть измерена путем определения процентного содержания нативного белка, остающегося в образце. Процент белка, который сохраняет свою нативную форму, можно определить с помощью эксклюзионной хроматографии, которая разделяет высокомолекулярные агрегаты белка с нативным белком с более низкой молекулярной массой. Стабильный белок со временем

сохранит 90% или более своей нативной структуры. Стабильный белок содержит не более 10% всех видов белка в виде необратимого агрегата.

[0103] Стабильный белок имеет низкую скорость образования агрегатов. Стабильный белок подвергается увеличению образования высокомолекулярных видов, то есть агрегации, которая составляет менее чем 15%, менее чем 14%, менее чем 13%, менее чем 12%, менее чем 11%, менее чем 10%, менее чем 9%, менее чем 8%, менее чем 7%, менее чем 6%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, менее чем 1% или менее чем 0,5% при хранении при температуре от около 5 С до около 25°C в течение до 7 месяцев, до 8 месяцев, до 9 месяцев, до 10 месяцев, до 11 месяцев, до 12 месяцев, до 13 месяцев, до 14 месяцев, до 15 месяцев, до 16 месяцев, до 17 месяцев, до 18 месяцев, до 19 месяцев, до 20 месяцев, до 21 месяца, до 22 месяцев, до 23 месяцев, или до 24 месяцев.

[0104] Другие методы могут быть использованы для оценки стабильности белка, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термостабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и абсорбция при 350 нм или около 405 нм для определения мутности раствора. В одном варианте реализации, белок можно считать стабильным, если после хранения в течение 6 месяцев или более при температуре от около 5°C до около 25°C изменение ОП405 состава представляет собой менее чем около 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) от ОП405 белка в нулевой момент времени.

[0105] Используемый в данном документе термин «белок» означает любой аминокислотный полимер, имеющий более чем около 50 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или несколько аминокислотных полимерных цепей, известных в данной области техники как «полипептиды». Белок может содержать один или несколько полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. «Полипептиды» обычно содержат более 50 аминокислот, тогда как «пептиды» обычно

содержат 50 аминокислот или менее. Белки могут содержать одну или несколько ковалентных и нековалентных модификаций. Дисульфидные мостики (то есть между остатками цистеина с образованием цистина) могут присутствовать в некоторых белках. Эти ковалентные связи могут находиться в пределах одной полипептидной цепи или между двумя отдельными полипептидными цепями. Например, дисульфидные связи необходимы для правильной структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и тому подобного. Информацию касательно образования дисульфидной связи см. недавний обзор, . Oka and Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013).

[0106] В дополнение к образованию дисульфидной связи, белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Эти модификации включают липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фамезоилирование, геранилгеранилирование и образование якорного гликозилфосфатидилинозитола (GPI)), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, добавление гликозильных групп к аргинину, апспарагину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, и/или триптофану) и фосфорилирование (то есть добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Касательно посттрансляционной модификации белков, продуцируемых у эукариот см. недавний обзор Mowen and David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling," 15(6) *Nat Immunol* 512-20 (2014); и Blixt and Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)," 18 *Curr Opin Chem Biol*. 62-9 (2014).

[0107] Примеры белков включают терапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие рецептор-Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, антитела человека, биспецифичные антитела, фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител цитокины, хемокины, пептидные гормоны и тому подобное. Белки могут быть получены с использованием систем



продуцирования рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор касательно обсуждения терапевтических белков и их производства см. у Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012).

**[0108]** Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий белок» обозначает любой белок, который связывает другую молекулярную единицу. Молекулярный объект может представлять собой пептид, полипептид, белок, эпитоп, гаптен, антиген или биологическую молекулу. Например, антигенсвязывающий белок включает молекулу рецептора, которая связывает лиганд, где лиганд является антигеном. Антигенсвязывающие белки включают антитела, фрагменты антител (например, Fabs), одноцепочечные антитела, молекулы ScFv, рекомбинантные белки, содержащие рецепторы и части рецепторов, молекулы лигандов, рекомбинантные белки, содержащие лиганды или части лигандов, рекомбинантные молекулы, содержащие несколько рецепторов или фрагменты рецептора (например, рецептор-Fc-слитые белки) и тому подобное.

**[0109]** «Антитело» или «молекула иммуноглобулина» представляет собой разновидность или подтип антигенсвязывающего белка. Канонический белок иммуноглобулина (например, IgG) содержит четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть далее подразделены на гиперпеременные области, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые

являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый 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 (CDR тяжелой цепи могут быть сокращены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут быть сокращены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» означает просто антитело с одной молекулярной общностью, обычно вырабатываемое клонами родительской клетки, которая продуцирует одно антитело. Моноклональные антитела отличаются от поликлональных антител тем, что поликлональные антитела представляют собой совокупность антител, созданных различными клетками. Моноклональное антитело может иметь моновалентную аффинность, что означает, что обе половины антитела являются идентичными и связываются с одним и тем же эпитопом или двухвалентной аффинностью, как в «биспецифическом антителе», что означает, что одна половина антитела связывается с другим эпитопом, по сравнению с другой половиной антитела.

[0110] «Биспецифическое антитело» включает любое антитело, способное селективно связывать два или более эпитопов. Биспецифичные антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывает разные эпитопы, либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один-два, три или четыре порядка величины ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут быть на одной или другой мишени (например, на одном и том же или другом белке). Биспецифичные антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные

эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют (от N-конца к С-концу) домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, и легкую цепь иммуноглобулина, которая в определенной степени может не осуществлять антигенсвязывающей специфичности, но которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью или, которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и позволяют связывать или одну или обе тяжелые цепи с одним или обоими эпитопами.

[0111] Выражение «тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма, и, если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают три CDR тяжелой цепи и четыре области FR, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают CDR, CDR и FR и их комбинации. Типичная тяжелая цепь имеет после переменного домена (от N-конца к С-концу) домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает фрагмент, который способен специфически распознавать антиген (например, распознавать антиген с KD в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазоне), который способен экспрессировать и секретировать из клетки, и который содержит по меньшей мере один CDR.

[0112] Выражение «легкая цепь» включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма, и, если не указано иное, включает у человека легкие цепи каппа и лямбда. Переменные (VL) домены легкой цепи обычно включают три CDR легкой цепи и четыре каркасных (FR) области, если не указано иное. Как правило, полная длина легкой цепи

включает от аминоконца до карбоксильного конца домен VL, который включает FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые могут быть использованы по данному изобретению, включают те, например, которые избирательно не связывают ни первый, ни второй антиген избирательно связываются с антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают те, которые можно идентифицировать путем скрининга наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител (влажные библиотеки или *in silico*), где легкие цепи по существу не влияют на аффинность и/или избирательность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают те, которые могут связывать один или оба эпитопа, которые связаны антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

[0113] Выражение «вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (модифицированной по желанию), которая включает следующие аминокислотные области в последовательности от N-конца к C-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность, способную сворачиваться в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойной бета-складчатости, причем бета-складчатость связана дисульфидной связью между остатком первой бета-складчатости и второй бета-складчатости.

[0114] Выражение «область, определяющая комплементарность» или термин «CDR» включает аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая обычно (т.е. у животного дикого типа) появляется между двумя каркасными области в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или рецептора Т-клеток). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перестроенной или неупорядоченной последовательностью, и, например, наивной или зрелой В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых обстоятельствах (например, для CDR3), CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например,

последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в неупорядоченной последовательности нуклеиновой кислоты), но являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты В-клетки например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинация VDJ с образованием CDR3 тяжелой цепи).

[0115] Fc-содержащие белки включают антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины, «рецептор-Fc слитые белки» и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть области CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к области CH2 и CH3, которая может связывать Fc-рецептор (например, FcγR или FcRn, то есть неонатальный Fc-рецептор) и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если область CH2 и CH3 содержит делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые делают его неспособным связывать какой-либо Fc-рецептор и также неспособным активировать комплемент, область CH2 и CH3 не функционирует.

[0116] Белки, содержащие Fc, могут содержать модификации в доменах иммуноглобулина, в том числе в тех случаях, когда модификации влияют на одну или несколько эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и, таким образом, на период полужизни и/или активность CDC (клеточнозависимой цитотоксичности)). Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, следующие модификации и их комбинации со ссылкой на нумерацию в ЕС константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, и 439.

[0117] Например, но не в качестве ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и проявляет повышенное время полужизни в сыворотке (по сравнению с тем же

Fc-содержащим белком без указанной модификации (модификаций)) и имеет модификация в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификация в 250 и/или 428; или модификация в 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере, модификация может содержать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификация 428L, 2591 (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификация 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификация 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификация 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификация 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0118] Некоторые рекомбинантные Fc-содержащие белки содержат рецепторы или фрагменты рецепторов, лиганды или фрагменты лигандов, которые имеют родственных партнеров по связыванию в биологических системах. «Рецептор-Fc-слитые белки» относятся к рекомбинантным молекулам, которые содержат растворимый рецептор, слитый с Fc-доменом иммуноглобулина. Некоторые рецептор Fc-слитые белки могут содержать лиганд-связывающие домены множества различных рецепторов. Эти рецептор-Fc-слитые белки известны как «ловушки» или «молекулы-ловушки». Рилонацепт и афлиберцепт являются примерами рыночных ловушек, которые антагонизируют IL1R (см. Пат. США №7927583) и VEGF (см. Пат. США № 7087411), соответственно. Другие рекомбинантные Fc-содержащие белки включают те рекомбинантные белки, которые содержат пептид, слитый с Fc-доменом, например, технология Centocor's MIMETIBODY™. Рекомбинантные Fc-содержащие белки описаны у С. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps and MIMETIBODY technology", 20 (6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[0119] Используемый в данном документе термин «модификатор тоничности» или «регулятор тоничности» представляет собой вещество или комбинацию веществ, которые обеспечивают тоничность или осмоляльность состава или раствора. Состав может требовать

физиологической осмолярности, которая составляет приблизительно 0,29 осмоля растворенного вещества на килограмм растворителя (290 мОсм). Состав, имеющий физиологическую осмоляльность, обычно называют физиологически изотоническим. Состав может иметь осмоляльность ниже 290 мОсм (физиологически гипотонический) или выше 290 мОсм (физиологически гипертонический). Модификатор тоничности добавляется к составу для доведения состава до соответствующей тоничности. Термин «тоничность» может использоваться взаимозаменяемо с осмоляльностью или осмолярностью.

**[0120]** Модификаторы тоничности включают соли, которые добавляют для регулирования ионной силы или проводимости, и несолевые модификаторы тоничности. Обычно используемые соли включают хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния и хлорид кальция. Несолевые модификаторы тоничности включают сахара, сахарные спирты, моносахариды и дисахариды, примеры которых включают сорбит, маннит, сахарозу, трегалозу, глицерин, мальтозу и лактозу.

**[0121]** Используемый в данном документе термин «поверхностно-активное вещество» обозначает добавку или наполнитель, которые снижают поверхностное натяжение на границе раздела. Некоторые поверхностно-активные вещества имеют липофильную часть и гидрофильную часть. Считается, что поверхностно-активные вещества обеспечивают дополнительную стабильность путем уменьшения гидрофобного взаимодействия белок-белок и, как результат, образования высокомолекулярных частиц (то есть агрегатов). Одно или несколько поверхностно-активных веществ могут быть включены в белоксодержащие растворы, включая СЛВ, ЛП, растворы для обработки и производства белка и растворы для анализа самоассоциации белка. Поверхностно-активные вещества могут быть ионными или неионными. Неионные поверхностно-активные вещества включают, например, алкилполи (этиленоксид), алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децил мальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид МЭА, кокамид ДЭА и кокамид ТЭА. Конкретные неионные поверхностно-активные вещества включают, например, сложные эфиры

полиоксиэтиленсорбитана (например, полисорбаты), такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, такие как полуксамер 188, полуксамер 407; полиэтилен-полипропиленгликоль; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат. Полисорбат 80 также известен как TWEEN 80, сорбитанмоноолеат и полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

[0122] Количество поверхностно-активного вещества, содержащегося в белок-содержащем растворе, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств и целей, требуемых для раствора. В некоторых вариантах реализации, раствор может содержать от около 0,001% (м/о) до около 0,5% (м/о) поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20 или полисорбата 80). Например, раствор может содержать около 0,001%; около 0,0015%; около 0,002%; около 0,0025%; около 0,003%; около 0,0035%; около 0,004%; около 0,0045%; около 0,005%; около 0,0055%; около 0,006%; около 0,0065%; около 0,007%; около 0,0075%; около 0,008%; около 0,0085%; около 0,009%; около 0,0095%; около 0,01%; около 0,015%; около 0,016%; около 0,017%; около 0,018%; около 0,019%; около 0,02%; около 0,021%; около 0,022%; около 0,023%; около 0,024%; около 0,025%; около 0,026%; около 0,027%; около 0,028%; около 0,029%; около 0,03%; около 0,031%; около 0,032%; около 0,033%; около 0,034%; около 0,035%; около 0,036%; около 0,037%; около 0,038%; около 0,039%; около 0,04%; около 0,041%; около 0,042%; около 0,043%; около 0,044%; около 0,045%; около 0,046%; около 0,047%; около 0,048%; около 0,049%; около 0,05%; около 0,051%; около 0,052%; около 0,053%; около 0,054%; около 0,055%; около 0,056%; около 0,057%; около 0,058%; около 0,059%; около 0,06%; около 0,061%; около 0,062%; около 0,063%; около 0,064%; около 0,065%; около 0,066%; около 0,067%; около 0,068%; около 0,069%; около 0,07%; около 0,071%; около 0,072%; около 0,073%; около 0,074%; около 0,075%; около 0,076%; около 0,077%; около 0,078%; около 0,079%; около 0,08%; около 0,081%; около 0,082%; около 0,083%; около 0,084%; около



0,085%; около 0,086%; около 0,087%; около 0,088%; около 0,089%; около 0,09%; около 0,091%; около 0,092%; около 0,093%; около 0,094%; около 0,095%; около 0,096%; около 0,097%; около 0,098%; около 0,099%; около 0,10%; около 0,15%; около 0,20%; около 0,25%; около 0,30%; около 0,35%; около 0,40%; около 0,45%; или около 0,50% поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20 или полисорбата 80).

**[0123]** Используемый в данном документе термин «стабилизатор» обозначает молекулу или соединение или комбинацию химических элементов (то есть более одного химического элемента), которые служат для стабилизации нативной конформации белка. Стабилизаторы стабилизируют белки в растворе с помощью одного или нескольких из следующих механизмов: (1) увеличением поверхностного натяжения воды, (2) исключением белка-наполнителя, который образует слой воды вокруг белка, (3) взаимодействием отрицательной пептидной связи и (4) отталкивающим взаимодействием с поверхностью белка. Независимо от конкретного механизма, стабилизаторы преимущественно исключаются из поверхности белка, тем самым обогащая воду на поверхности белка. Кроме того, неблагоприятное взаимодействие белка-наполнителя делает раскручивание белка термодинамически неблагоприятным, поскольку площадь поверхности белка увеличивается во время денатурации. Стабилизаторы включают, например, полиолы, сахара, аминокислоты, высаливающие соли или любую их комбинацию. Примеры полезных стабилизаторов включают полиэтиленгликоль, сорбит, глицерин, маннит, трегалозу, сахарозу, аргинин, аланин, пролин, глицин, хлорид натрия или любую их комбинацию. Сахароза и трегалоза являются наиболее часто используемыми сахарами.

**[0124]** Данное изобретение дополнительно описывается следующими неограничивающими пунктами.

**[0125]** Пункт 1. Способ определения способности белка к самоассоциации, включающий:

а. комбинирование белка, наночастиц и забуференной соли с образованием образца;

б. возбуждение образца светом;

с. измерение света, прошедшего через образец;  
d. вычисление коэффициента интенсивности абсорбции образца, отличающийся тем, что белок стабилен при высокой концентрации, когда коэффициент интенсивности абсорбции превышает пороговое значение.

[0126] Пункт 2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

[0127] Пункт 3. Способ по пункту 2, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, фрагмент антитела или рецептор-Fc-слитый белок.

[0128] Пункт 4. Способ по пункту 3, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой человеческое моноклональное антитело.

[0129] Пункт 5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что белок находится в образце в концентрации от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл.

[0130] Пункт 6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что наночастица представляет собой наночастицу золота.

[0131] Пункт 7. Способ по пункту 6, отличающийся тем, что наночастица золота имеет диаметр от около 20 нм до около 100 нм.

[0132] Пункт 8. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что диаметр наночастицы золота составляет около 20 нм.

[0133] Пункт 9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец содержит от около  $5 \times 10^{11}$  до около  $8 \times 10^{11}$  наночастиц на мл.

[0134] Пункт 10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец содержит около  $6-6,5 \times 10^{11}$  наночастиц на мл.

[0135] Пункт 11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что соль присутствует в образце в концентрации от около 2 до около 250 мМ.

[0136] Пункт 12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что соль представляет собой хлорид натрия.

[0137] Пункт 13. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что концентрация соли составляет около 2 мМ, около 20 мМ или около 200 мМ.

[0138] Пункт 14. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что проходящий свет измеряют на нескольких длинах волн в диапазоне от около 450 до около 750 нм.

[0139] Пункт 15. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой отношение максимума абсорбции к исходной абсорбции.

[0140] Пункт 16. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что пороговое значение коэффициента интенсивности абсорбции составляет около 1,7.

[0141] Пункт 17. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий повторение этапов (a) - (d) с использованием другой концентрации белка в образце.

[0142] Пункт 18. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий повторение этапов (a) - (d) с использованием другой концентрации соли в образце.

[0143] Пункт 19. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий повторение этапов (a) - (d) с использованием другого значения pH образца.

[0144] Пункт 20. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий: e. комбинирование высокорастворимого белка при высокой концентрации с наполнителем для образования лекарственного вещества.

[0145] Пункт 21. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что концентрация белка составляет от около 50 мг/мл до около 500 мг/мл.

[0146] Пункт 22. Способ по любому из пунктов 20 или 21, отличающийся тем, что наполнитель выбран из группы, состоящей из модификатора тоничности, буфера, поверхностно-активного вещества, стабилизатора и их комбинации.

[0147] Пункт 23. Способ по пункту 22, отличающийся тем, что модификатор тоничности представляет собой соль.

[0148] Пункт 24. Способ по любому из предшествующих

пунктов, отличающийся тем, что соль представляет собой NaCl.

[0149] Пункт 25. Композиция, содержащая биотерапевтическое лекарственное средство, полученное способом по любому из предыдущих пунктов.

[0150] Пункт 26. Композиция по пункту 25, отличающаяся тем, что не более чем около 10% от общего количества видов биотерапевтических препаратов присутствует в виде необратимого агрегата в концентрации биотерапевтического препарата.

[0151] Пункт 27. Композиция по любому из пунктов 25-26, отличающаяся тем, что композиция является такой, что пороговое значение находится в диапазоне, например, от около 1,5 до около 2,0 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ).

[0152] Пункт 28. Композиция по любому из пунктов 25-27, отличающаяся тем, что пороговое значение находится в диапазоне от около 0,7 до около 1,0 ( $A_{\text{дик}}/A_{\text{контроль}}$ ).

[0153] Пункт 29. Композиция по любому из пунктов 25-28, отличающаяся тем, что концентрация биофармацевтического лекарственного средства находится в диапазоне, например, от около 50 мг/мл до около 500 мг/мл, от около 50 мг/мл до около 250 мг/мл или от около 100 мг/мл до около 250 мг/мл.

[0154] Пункт 30. Композиция, которую можно получить по любому из пунктов 25-29 для применения в медицине.

[0155] Пункт 31. Способ по любому из пунктов 1-24 для приготовления композиции, включающей биофармацевтическое лекарственное средство, отличающийся тем, что композиция имеет вязкость около 10-10 000 мПа, около 20-9000 мПа, около 30-8000 мПа, около 40-7000 мПа, около 50-6000 мПа, около 70-5000 мПа, около 90-4000 мПа, около 100-3000 мПа, или около 10 мПа, или около 20 мПа, или около 30 мПа, или около 40 мПа, или около 50 мПа, или, в альтернативном варианте, от около 1 мПас до около 20 мПа, около 2 мПа, около 3 мПа, около 4 мПа, около 5 мПа, около 6 мПа, около 7 мПа, около 10 мПа, 13 мПа, 15 мПа или около 20 мПа.

[0156] Пункт 32. Способ по пункту 31, отличающийся тем, что биофармацевтическое лекарственное средство представляет собой один или несколько белков или одно или несколько антител или любые их смеси.

[0157] Пункт 33. Способ по любому из пунктов 31-32, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело или их комбинацию.

[0158] Пункт 34. Биоаналитическая смесь, содержащая:

- a. по меньшей мере две наночастицы;
- b. белок по меньшей мере в двух фазах; и
- c. соль или буфер.

[0159] Пункт 35. Биоаналитическая смесь по пункту 34, отличающаяся тем, что первая по меньшей мере из двух фаз белка представляет собой растворимую фазу.

[0160] Пункт 36. Биоаналитическая смесь по пункту 34 или 35, отличающаяся тем, что вторая, по меньшей мере, из двух фаз белка представляет собой адгезивную фазу, где белок прилипает к поверхности каждой, по меньшей мере, из двух наночастиц.

[0161] Пункт 37. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-36, отличающаяся тем, что третья по меньшей мере из двух фаз белка представляет собой агрегированную фазу, где белок самоассоциируется с образованием агрегата.

[0162] Пункт 38. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-37, отличающаяся тем, что один или несколько агрегированных белков также прикреплены к поверхности наночастицы.

[0163] Пункт 39. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-38, отличающаяся тем, что каждая по меньшей мере из двух наночастиц содержит золото.

[0164] Пункт 40. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-39, отличающаяся тем, что каждая по меньшей мере из двух наночастиц имеет диаметр от около 20 нм до около 100 нм.

[0165] Пункт 41. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-40, отличающаяся тем, что диаметр составляет около 20 нм.

[0166] Пункт 42. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-41, отличающаяся тем, что каждая из по меньшей мере двух наночастиц насыщена белком.

[0167] Пункт 43. Биоаналитическая смесь по любому из

предыдущих пунктов 34-42, отличающаяся тем, что наночастицы присутствуют с плотностью от около  $6 \times 10^{11}$  до около  $7 \times 10^{11}$  наночастиц на миллилитр смеси.

[0168] Пункт 44. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-43, отличающаяся тем, что белок присутствует в концентрации от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл.

[0169] Пункт 45. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-44, отличающаяся тем, что белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

[0170] Пункт 46. Биоаналитическая смесь по любому из предшествующих пунктов 34-45, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела, аптамера и рецептор-Fc-слитого белка.

[0171] Пункт 47. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-46, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

[0172] Пункт 48. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-47, отличающаяся тем, что антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.

[0173] Пункт 49. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-48, отличающаяся тем, что соль присутствует в концентрации от около 2 мМ до около 300 мМ.

[0174] Пункт 50. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-49, отличающаяся тем, что соль присутствует в концентрации около 2 мМ, около 20 мМ или около 200 мМ.

[0175] Пункт 51. Биоаналитическая смесь по любому из предыдущих пунктов 34-50, отличающаяся тем, что соль включает NaCl.

#### **ПРИМЕРЫ**

[0176] Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации способов по данному изобретению. Эти примеры являются только иллюстративными и не предназначены для

ограничения объема изобретения каким-либо образом.

**Пример 1: Материалы**

[0177] Моноклональные антитела (мкАт) продуцировались клетками EESYR® и очищались с помощью хроматографии на белке А с заключительной очисткой на анионообменной или хроматографии гидрофобного взаимодействия. Компоненты буфера получали от Sigma-Aldrich, VWR или JT-Baker и были наивысшей степени чистоты из доступных. Колонки Illustra NAP (кат. № 17-0853-02) и колонка XK26/100 Superdex 200 pg (кат. № 90-1002-73) были приобретены у GE Healthcare Life Sciences. Центробежные фильтры Amicon (Кат. № UFC905024) были приобретены у EMD Millipore. Кассеты для диализа Slide-A-Lyzer™ G2 (Кат. № 87732) были приобретены у ThermoFisher Scientific. Наночастицы золота 20 нм (кат. № ND.GC20) были приобретены у VBI solutions. 96-луночные микропланшеты Thermo Scientific™ Nunc™ Microwell™ (Кат. № 12-565-66) использовали в качестве реакционного контейнера для получения спектров абсорбции.

**Пример 2: Высококонтрированное статическое рассеяние света (HS-SLS).**

[0178] Концентрированные (100 г/л) моноклональные антитела (мкАт1, мкАт2, мкАт3, мкАт4, мкАт5 и мкАт6) каждое очищали на Akta avant (GE Healthcare Life Sciences) через колонку XK26/100 Superdex 200 pg в 10 мМ. MES pH 6,0, 50 мМ хлорида натрия. Фракцию мономерных мкАт собирали и концентрировали с использованием насоса Easy-Load MAsTerFlex L/S (Cole Parmer) в тандеме с мембраной VivaFlow 200 30000 MWCO NY. 150 мл каждого концентрированного антитела разделяли на 3 фракции и загружали в диализную кассету 10000 MWCO и замещали на 2 л 10 мМ MES pH 6,0, 250 мМ хлорида натрия; 10 мМ MES pH 6,0, 50 мМ хлорида натрия; и 10 мМ MES pH 6,0, 10 мМ хлорида натрия. Растворы концентрировали с использованием центробежного фильтрующего блока с 50000 MWCO до конечного объема приблизительно 15 мл в их соответствующих буферах. Концентрации измеряли с использованием SoloVPE (C Technologies, Inc.). Антитела не могли быть концентрированы сверх номинально 60 г/л в 10 мМ MES pH 6,0, 10 мМ хлорида

натрия. Две другие концентрации соли (250 мМ и 50 мМ хлорида натрия) доводили номинально до 80 г/л. Аликвоту из трех условий брали и разбавляли до 10 г/л. Образец 80 г/л, 10 г/л и буфер были прикреплены к устройству CG-MALS (Wyatt Technology), и сигнал рассеяния света был измерен как функция концентрации мкАт.

**Пример 3: Стандартная спектроскопия самовзаимодействия на основе наночастиц (SINS).**

[0179] Субаликвоту каждого антитела (мкАт1, мкАт2, мкАт3, мкАт4, мкАт5 и мкАт6) в разных солевых условиях добавляли в отдельную пробирку фирмы falcon объемом 15 мл. К этому раствору добавляли 5 мл раствора с оптической плотностью (1 о.п.) с наночастицами золота 20 нм, чтобы конечная концентрация белка составляла 50 мкг/мл. Спектры абсорбции и  $\lambda_{\text{макс}}$  записывались на SPECTRAmax 340PC (Molecular Devices) после выжидания 30 минут.

[0180] Концентрационно-зависимая спектроскопия самовзаимодействия на основе наночастиц (CD-SINS). 100 мМ буферные растворы готовили при соответствующем рН. Колонки Illustra NAP кондиционировали 2,4 мл 100 мМ буферного раствора (например, MES или фосфата натрия в зависимости от целевого рН). Концентрированные (50-75 г/л) исходные растворы мкАт подвергали буферному обмену с использованием кондиционированной деминерализированной колонки. Результирующая концентрация была измерена с использованием SoloVPE. Каждое антитело впоследствии разбавляли до 5,12 мг/мл в 100 мМ буфере. Затем мкАт добавляли в колонку 1 микропланшета и серийно разводили в буфере до 100 мМ до 0,04 мг/мл. 80 наночастиц золота добавляли в колонки 2, 3 и 4 96-луночного микропланшета. 40 серийно разведенных мкАт добавляли в каждую колонку с использованием многоканальной пипетки, содержащей наночастицы золота, поддерживающие серийное разбавление из колонки 1. Используя многоканальную пипетку, к колонкам 2, 3 и 4 соответственно, затем добавляли 280 мЛ исходного раствора хлорида натрия 357 мМ, 71 мМ и 14 мМ. Полученный раствор оставляли для уравнивания в течение 30 минут, прежде чем регистрировали спектры абсорбции на SPECTRAmax



340РС. Максимальная интенсивность абсорбции нормализовалась относительно абсорбции при 450 нм. Это отношение (коэффициент) графически выражали как зависимость от конечной концентрации антитела.

**Пример 4: Динамическая коллоидная стабильность человеческого сывороточного альбумина (ЧСА)**

[0181] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически (фигура 4, изображает спектры для образцов 200 мМ NaCl), и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 5).

[0182] ЧСА демонстрирует коэффициент интенсивности абсорбции, превышающий 1,7 ( $A_{\text{пик}}/A_{450}$ ) для всех ионных сил и при более высоких концентрациях белка, что указывает на благоприятный динамический профиль коллоидного взаимодействия. Эксперименты статического рассеяния света показывают положительные вириалы ( $A_2$ ) в полном соответствии с профилем CD-SINS (таблица 2).

**Таблица 2**

NaCl мМ	SLS ( $A_2$ )
2	1,17E-4
20	9,68E-5
120	7,85E-5

**Пример 5: Моноклональное антитело № 1 (мкАт1)**

[0183] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт1 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы,

содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 6).

**[0184]** мкАт1 демонстрирует коэффициент интенсивности абсорбции более 1,7 ( $A_{\text{лик}}/A_{450}$ ) для всех ионных сил и при более высоких концентрациях белка, что указывает на благоприятный динамический профиль коллоидного взаимодействия. Эксперименты по высококонцентрированному статическому рассеянию света показывают положительные вириалы ( $A_2$ ) в полном соответствии с профилем CD-SINS (таблица 3, фигура 7).

**Таблица 3**

NaCl мМ	SLS ( $A_2$ )
2	1,72E-4
20	6,70E-5
200	1,34E-5

**Пример 6: Моноклональное антитело № 6 (мкАт6)**

**[0185]** Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт6 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 8).

**[0186]** мкАт6 демонстрирует коэффициент интенсивности абсорбции более 1,7 ( $A_{\text{лик}}/A_{450}$ ) при более низких ионных силах и при более высоких концентрациях белка, что указывает на благоприятный динамический профиль коллоидного взаимодействия в этих условиях. мкАт6 демонстрирует увеличение взаимодействий притягивания с увеличением ионной силы. Эксперименты по

высококонтрированному статическому рассеиванию света показывают различные вириалы ( $A_2$ ) в полном соответствии с профилем CD-SINS (фигура 9).

**Пример 7: Моноклональное антитело № 2 (мкАт2)**

[0187] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт2 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 2).

[0188] мкАт2 демонстрирует абсолютные изменения в общих белковых взаимодействиях в различных условиях. При низкой ионной силе, мкАт2 демонстрирует увеличение взаимодействий притягивания. Молекула становится в целом отталкивающей при увеличении ионной силы. При 200 мМ NaCl антитело обладает благоприятной коллоидной стабильностью. Эксперименты по высококонтрированному статическому рассеянию света показывают переменные вириалы ( $A_2$ ) в полном соответствии с обычными длинами волн SINS максимальной абсорбции (таблица 1).

**Пример 8: Моноклональное антитело № 3 (мкАт3)**

[0189] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт3 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 10).

[0190] мкАт3 является примером коллоидно-нестабильного

белка, который предопределяет неоптимальный состав и производство при высокой концентрации. При всех ионных силах и концентрациях белка мкАт3 демонстрирует взаимодействия притягивания. Эксперименты по высококонцентрированному статическому рассеянию света показывают отрицательные вириалы ( $A_2$ ) в полном соответствии с обычными длинами волн SINS максимальной абсорбции (таблица 1).

**Пример 9: Моноклональное антитело № 4 (мкАт4)**

[0191] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт4 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 11).

[0192] мкАт4 является примером коллоидно-стабильного белка с более низкой ионной силой, но демонстрирует меньшую растворимость при более высокой концентрации белка при низкой ионной силе. Эксперименты статического рассеяния света, которые изображают смешанные вириалы (отрицательные при более низкой ионной силе, положительные при высокой ионной силе), показывают расхождения с данными, генерируемыми CD-SINS, которые демонстрируют отталкивающий профиль для мкАт4 (таблица 1).

**Пример 10: Моноклональное антитело № 5 (мкАт5)**

[0193] Наночастицы золота размером 20 нм с концентрацией около  $6,3 \times 10^{11}$  частиц на миллилитр комбинировали с различными концентрациями человеческого мкАт5 в 10 мМ буфере MES при 2 мМ NaCl, 20 мМ NaCl или 200 мМ NaCl, pH 6. Отдельные образцы, содержащие 3,125 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл и 400 мкг/мл, подвергали абсорбционной спектроскопии. Эти спектрограммы выражали графически, и отношение интенсивности абсорбции максимальной

абсорбции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) к исходной абсорбции при 450 нм рассчитывали для каждой концентрации белка и наносили на график (фигура 12).

[0194] мкАт5 является примером коллоидно-смешанного белка, который является притягивающим с низкой ионной силой и демонстрирует улучшение функционального состояния при высокой концентрации белка с увеличением ионной силы. Эксперименты статического рассеяния света, которые изображают только отрицательные вириалы, показывают несоответствия с данными, сгенерированными CD-SINS, которые показывают смешанный профиль для мкАт4 (таблица 1).

#### **Пример 11: Скрининг и отбор наполнителей**

[0195] Составленное с высокой вязкостью антитело, имеющее неблагоприятный динамический профиль коллоидного взаимодействия при некоторых условиях состава (мкАт7), использовали для скрининга дополнительных наполнителей в отношении их способности улучшать профиль CG-SINS антитела. Профиль CG-SINS моноклонального антитела 7 (мкАт7), приготовленного в различных растворах, содержащих различные буферы и ионную силу (фигура 13), и сахар и/или аминокислотные наполнители (фигура 14), оставался ниже пороговое значение абсорбции<sub>макс</sub>/абсорбции<sub>0</sub>, подходящего для дозирования при высокой концентрации (например, ниже 1,7). Вязкость мкАт7, приготовленного в концентрации около 100 мг/мл, наблюдалась при ~ 100 сП.

[0196] Анализ CD-SINS использовали для скрининга коллоидного стабилизирующего действия различных замещенных бензоатных соединений на мкАт7. Замещенные бензойные кислоты включают м-гидроксibenзойную кислоту, п-гидроксibenзойную кислоту, м-метилбензойную кислоту, п-метилбензойную кислоту, м-этилбензойную кислоту, п-этилбензойную кислоту, м-аминобензойную кислоту, п-аминобензойную кислоту, сульфоновую кислоту и бензоат аммония. На Фиг. 15 изображена диаграмма рассеяния отношения абсорбции с CD-SINS для мкАт7, приготовленного с каждой из замещенных бензойных кислот. Когда п-аминобензойную кислоту (ПАБК, заштрихованные кружки на фигуре 15) комбинировали с составленным мкАт7, мкАт7 проявляло выгодную коллоидную

стабильность, о чем свидетельствуют отношения абсорбции по сравнению с пороговым значением, выгодным для диспергирования при высокой концентрации, то есть  $> 1,6$  или  $1,7$  как показано на фигуре 15.

[0197] ПАБК комбинировали зависимым от дозы образом с мкАт7 и подвергали анализу CD-SINS. Включение  $> 12$  мМ ПАБК (например, 18 мМ, 24 мМ, 30 мМ и 36 мМ ПАВА) с мкАт7 давало выгодный (то есть отталкивающий) профиль коллоидного взаимодействия (фигура 16). Влияние ПАБК на профиль коллоидного взаимодействия мкАт7, по-видимому, в направлении насыщения приблизительно при 20 мМ ПАБК.

[0198] 20 мМ ПАБК комбинировали с 5 г/л, 10 г/л, 30 г/л, 50 г/л, 70 г/л и 80 г/л мкАт7 и подвергали вискозиметрическому анализу с использованием конуса и метода смачивания пластины с использованием ротационного реометра (Pathak et al., *Biophys. J.* 104(4): 913-923, 2013 Feb 19). Результаты представлены на фигуре 17. Экстраполяция этих результатов до 100 г/л мкАт7 с использованием алгоритма Кригера-Догерти (см., например, Lukham and Ukeje, *J. Colloid Interface Sci.*, 220(2): 347-356, 1999 Dec 15) показала примерно трехкратное снижение вязкости при постоянном сдвиге в тех составах мкАт7, которые содержат 20 мМ ПАБК.

1. Способ определения потенциала белка к самоассоциации, включающий:

а. сочетание белка, наночастиц и забуференной соли с образованием образца;

б. возбуждение образца светом;

с. измерение света, прошедшего через образец;

д. вычисление коэффициента интенсивности абсорбции образца, причем белок является стабильным в высокой концентрации, когда коэффициент интенсивности абсорбции превышает пороговое значение.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, фрагмент антитела или

рецептор-Fc-слитый белок.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой человеческое моноклональное антитело.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок находится в образце в концентрации от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что наночастица представляет собой наночастицу золота.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что наночастица золота имеет диаметр от около 20 нм до около 100 нм.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что диаметр наночастицы золота составляет около 20 нм.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец содержит от около  $5 \times 10^{11}$  до около  $8 \times 10^{11}$  наночастиц на мл.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что образец содержит около  $6-6,5 \times 10^{11}$  наночастиц на мл.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что соль присутствует в образце в концентрации от около 2 мМ до около 250 мМ.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что соль представляет собой хлорид натрия.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что концентрация соли составляет около 2 мМ, около 20 мМ или около 200 мМ.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что проходящий свет измеряют на многих длинах волн в диапазоне от около 450 нм до около 750 нм.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что коэффициент интенсивности абсорбции представляет собой отношение максимума абсорбции к исходной абсорбции.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что пороговое значение коэффициента интенсивности абсорбции составляет около 1,7.

17. Способ по любому из пп. 1-17, дополнительно включающий повторение этапов (а) - (d) с использованием другой концентрации белка в образце.

18. Способ по любому из пп. 1-18, дополнительно включающий повторение этапов (а) - (d) с использованием другой концентрации

соли в образце.

19. Способ по любому из пп. 1-18, дополнительно включающий повторение этапов (a) - (d) с использованием другого рН в образце.

20. Способ по любому из пп. 1-19, дополнительно включающий:  
е. сочетание высокорастворимого белка в высокой концентрации с наполнителем для образования приготовленного лекарственного вещества.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что концентрация белка составляет от около 50 мг/мл до около 500 мг/мл.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что наполнитель выбран из группы, состоящей из модификатора тоничности, буфера, поверхностно-активного вещества, стабилизатора и их комбинации.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что модификатор тоничности представляет собой соль.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что соль представляет собой NaCl.

26. Биоаналитическая смесь, содержащая:

- а. по меньшей мере две наночастицы;
- б. белок по меньшей мере в двух фазах; и
- с. соль или буфер.

27. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что первая по меньшей мере из двух фаз белка представляет собой растворимую фазу.

28. Биоаналитическая смесь по п. 37, отличающаяся тем, что вторая, по меньшей мере, из двух фаз белка представляет собой адгезивную (прилипающую) фазу, при этом белок прилипает к поверхности каждой, по меньшей мере, из двух наночастиц.

29. Биоаналитическая смесь по п. 38, отличающаяся тем, что третья по меньшей мере из двух фаз белка представляет собой агрегированную фазу, в которой белок является самоассоциированным с образованием агрегата.

30. Биоаналитическая смесь по п. 39, отличающаяся тем, что один или несколько агрегированных белков также прилипают к поверхности наночастицы.

31. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что



каждая из по меньшей мере двух наночастиц содержит золото.

32. Биоаналитическая смесь по п. 41, отличающаяся тем, что каждая из по меньшей мере двух наночастиц включает диаметр от около 20 нм до около 100 нм.

33. Биоаналитическая смесь по п. 42, отличающаяся тем, что диаметр составляет около 20 нм.

34. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что каждая из по меньшей мере из двух наночастиц насыщена белком.

35. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что наночастицы присутствуют с плотностью от около  $6 \times 10^{11}$  до около  $7 \times 10^{11}$  микрочастиц на миллилитр смеси.

36. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что белок присутствует в концентрации от около 2 мкг/мл до около 512 мкг/мл.

37. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

38. Биоаналитическая смесь по п. 47, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела, аптамера и рецептор-Fc-слитого белка.

39. Биоаналитическая смесь по п. 48, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

40. Биоаналитическая смесь по п. 49, отличающаяся тем, что антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.

41. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что соль присутствует в концентрации от около 2 мМ до около 300 мМ.

42. Биоаналитическая смесь по п. 51, отличающаяся тем, что соль присутствует в концентрации около 2 мМ, около 20 мМ или около 200 мМ.

43. Биоаналитическая смесь по п. 36, отличающаяся тем, что соль содержит NaCl.

44. Способ составления фармацевтической композиции с низкой вязкостью, содержащей белок, при этом указанный способ включает:

а. определение потенциала белка к самоассоциации согласно

способу по любому из пп. 1-24;

b. сочетание уменьшающего вязкость наполнителя с указанным белком;

c. определение потенциала белка к самоассоциации согласно способу по любому из пп. 1-24 в присутствии снижающего вязкость наполнителя; и

d. приготовление белка с уменьшающим вязкость наполнителем на уровне, который снижает вязкость раствора белка по меньшей мере на 50% по сравнению с раствором без уменьшающего вязкость наполнителя.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что уменьшающим вязкость наполнителем является парааминобензойная кислота (ПАБК).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Биоаналитическая смесь, содержащая:
  - a. по меньшей мере две наночастицы золота, присутствующие с плотностью от приблизительно  $5 \times 10^{11}$  до приблизительно  $8 \times 10^{11}$  микрочастиц на миллилитр смеси;
  - b. белок в по меньшей мере двух фазах, при этом по меньшей мере две фазы выбраны из группы, состоящей из растворимой фазы, адгезивной фазы и агрегированной фазы; и
  - c. забуференная соль, где забуференная соль представляет собой буфер и соль или соль, которая также является буфером.
2. Биоаналитическая смесь по п. 1, где первая из по меньшей мере двух фаз белка является растворимой фазой.
3. Биоаналитическая смесь по п. 2, где вторая из по меньшей мере двух фаз белка является агрегированной фазой, где белок прилипает к поверхности каждой из по меньшей мере двух наночастиц.
4. Биоаналитическая смесь по п. 3, где третья из по меньшей мере двух фаз белка представляет собой агрегированную фазу, где белок является самоассоциированным с образованием агрегата.
5. Биоаналитическая смесь по п. 4, где один или более из агрегированных белков также прилипает к поверхности наночастицы.
6. Биоаналитическая смесь по п. 1, где каждая из по меньшей мере двух наночастиц включает золото.
7. Биоаналитическая смесь по п. 6, где каждая из по меньшей мере двух наночастиц включает диаметр от приблизительно 20 нм до приблизительно 100 нм.
8. Биоаналитическая смесь по п. 7, где каждая из по меньшей мере двух наночастиц включает диаметр приблизительно 20 нм.
9. Биоаналитическая смесь по п. 1, где каждая из по меньшей мере двух наночастиц насыщена белком.
10. Биоаналитическая смесь по п. 1, где наночастицы присутствуют в концентрации от приблизительно  $6 \times 10^{11}$  до приблизительно  $7 \times 10^{11}$  микрочастиц на миллилитр смеси.
11. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок присутствует в концентрации от приблизительно 2 мкг/мл до приблизительно 512 мкг/мл.

12. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой антигенсвязывающий белок.

13. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок выбран из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела, аптамера и рецептор-Fc-слитого белка.

14. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой антитело.

15. Биоаналитическая смесь по п. 14, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

16. Биоаналитическая смесь по п. 15, где моноклональное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

17. Биоаналитическая смесь по п. 16, где моноклональное антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.

18. Биоаналитическая смесь по п. 17, где моноклональное антитело представляет собой моноспецифическое моноклональное антитело.

19. Биоаналитическая смесь по п. 18, где моноклональное антитело представляет собой биспецифическое моноклональное антитело.

20. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой фрагмент антитела.

21. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой производное антитела.

22. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой рецептор-Fc-слитого белка.

23. Биоаналитическая смесь по п. 22, где рецептор-Fc-слитого белка представляет собой афлиберцепт.

24. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой нанотело.

25. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой химеру рекомбинантного антитела.

26. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой цитокин.

27. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет

собой хемокин.

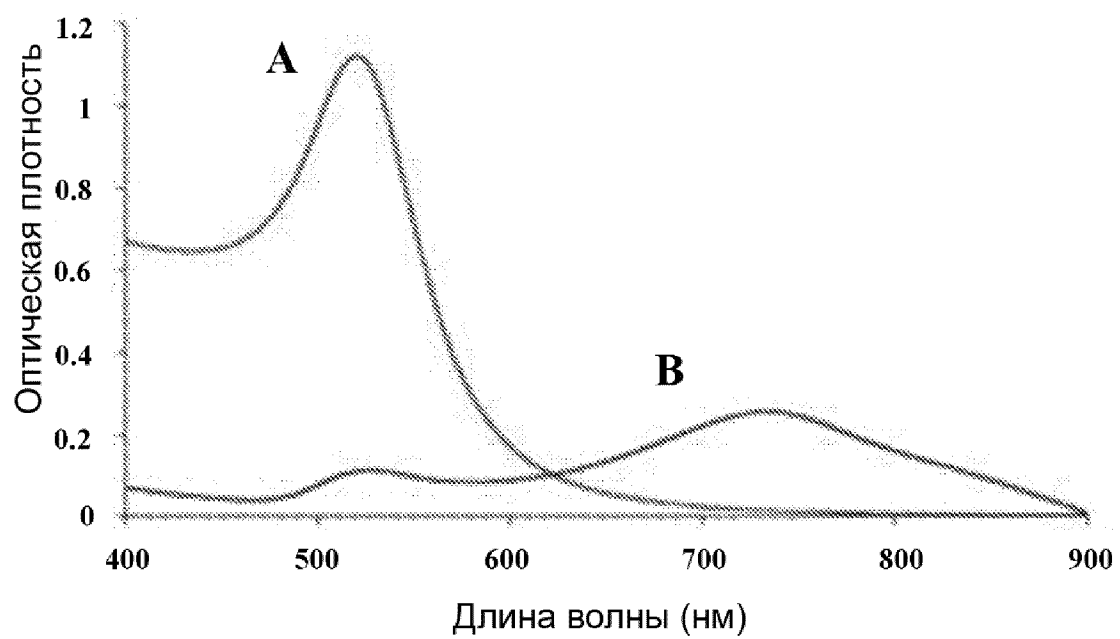
28. Биоаналитическая смесь по п. 1, где белок представляет собой пептидный гормон.

29. Биоаналитическая смесь по п. 1, где соль забуференной соли присутствует в концентрации приблизительно 2 мМ, в концентрации от приблизительно 2 мМ до приблизительно 300 мМ, в концентрации приблизительно 20 мМ или в концентрации приблизительно 200 мМ.

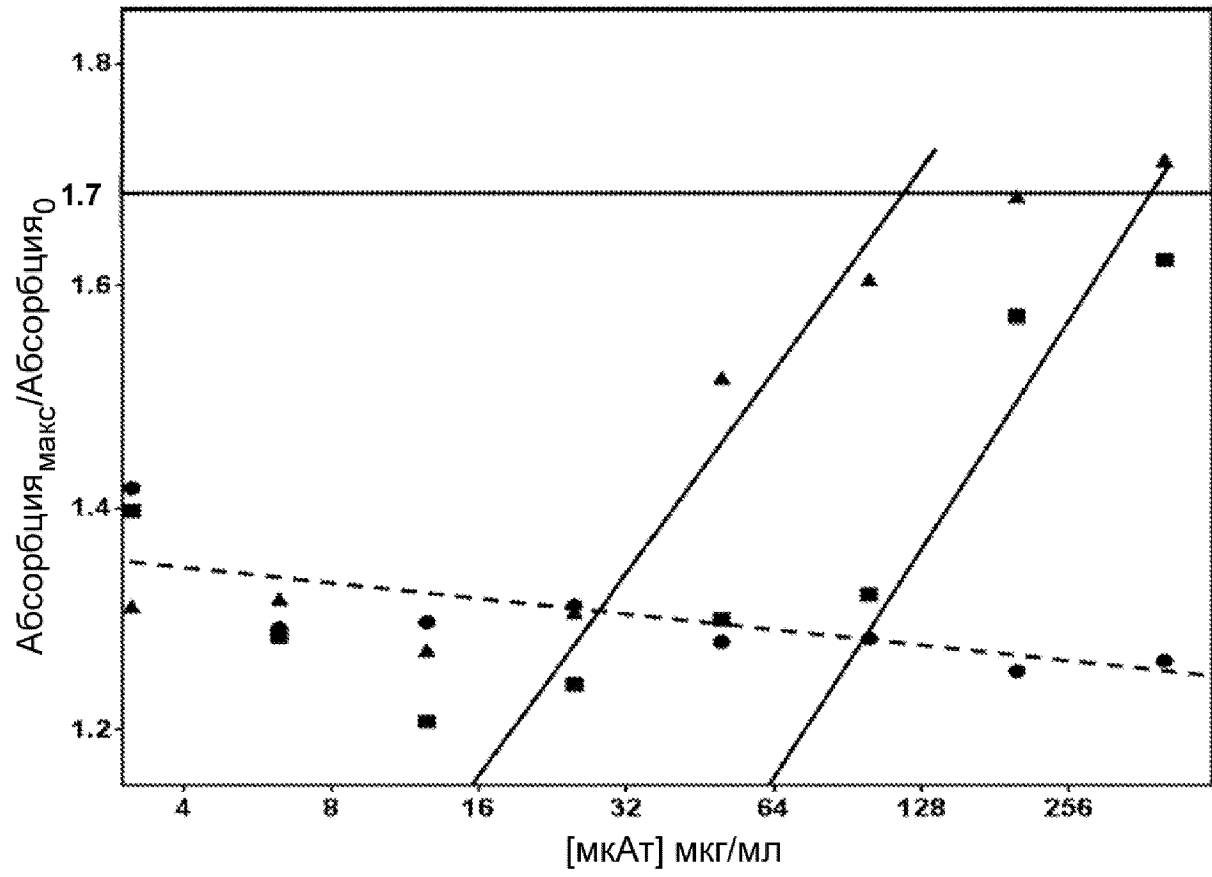
30. Биоаналитическая смесь по п. 1, где соль забуференной соли включает NaCl.

По доверенности

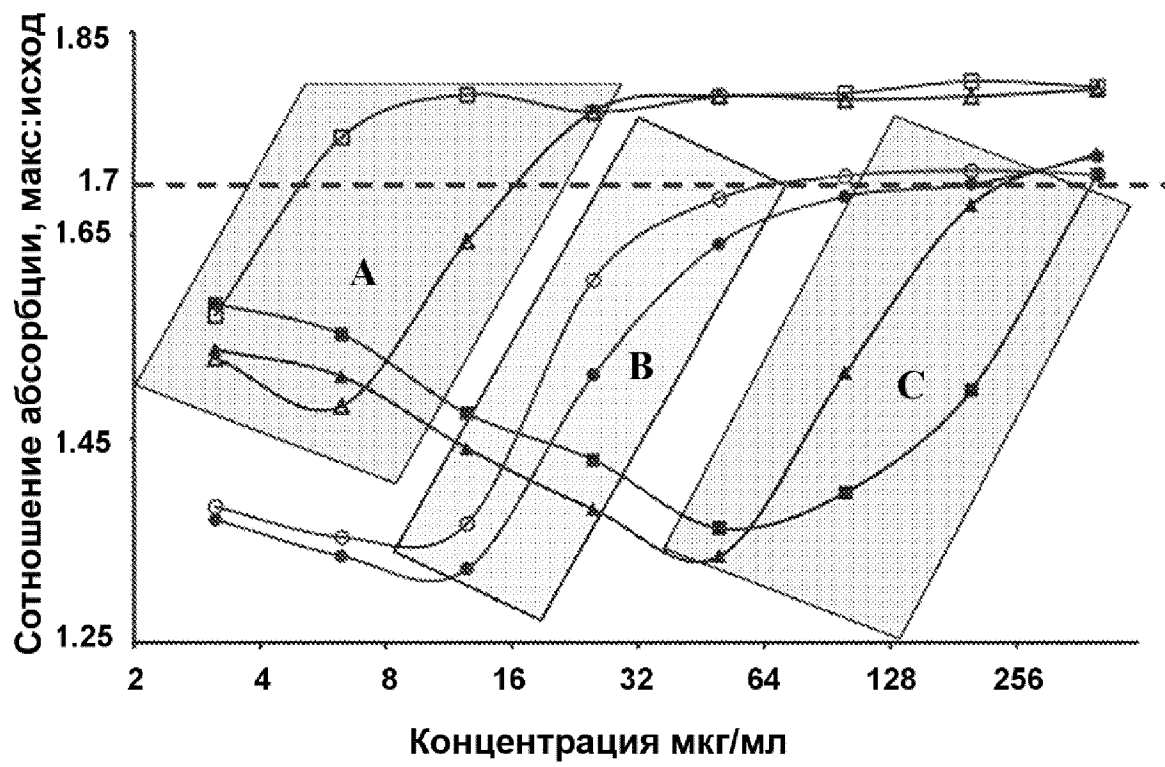
Фиг. 1



Фиг. 2

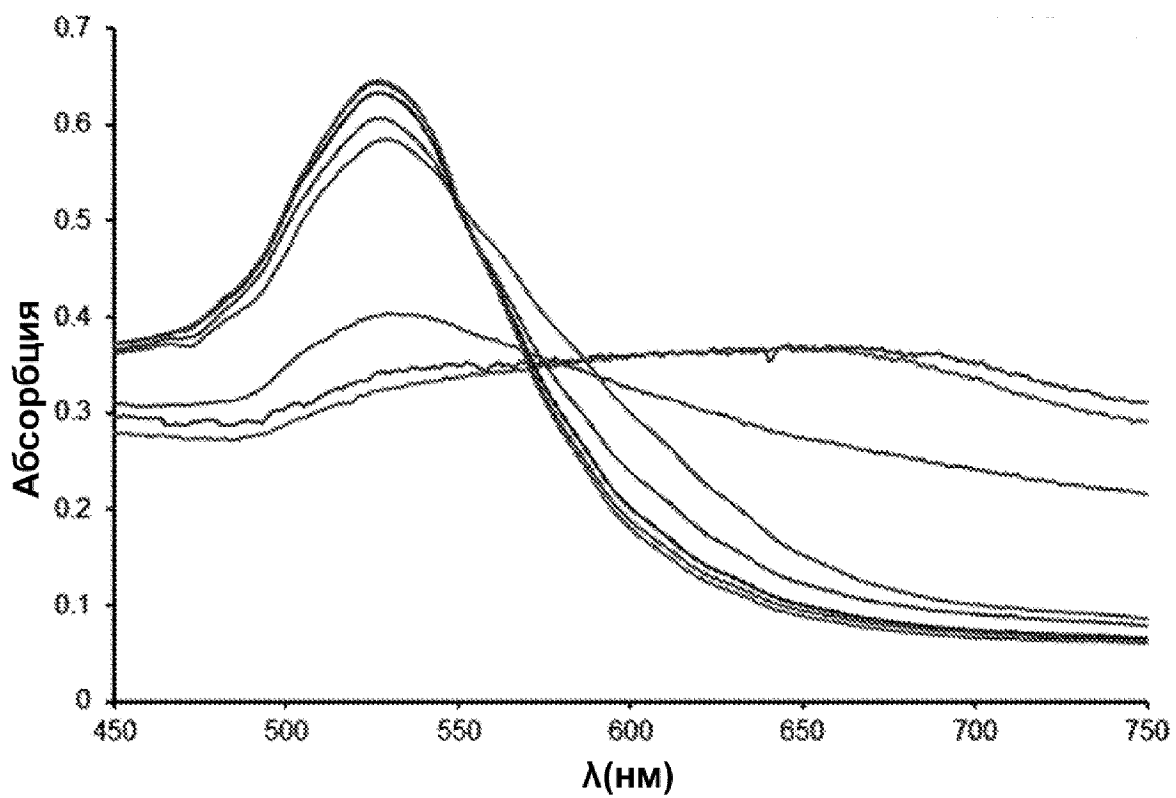


Фиг. 3

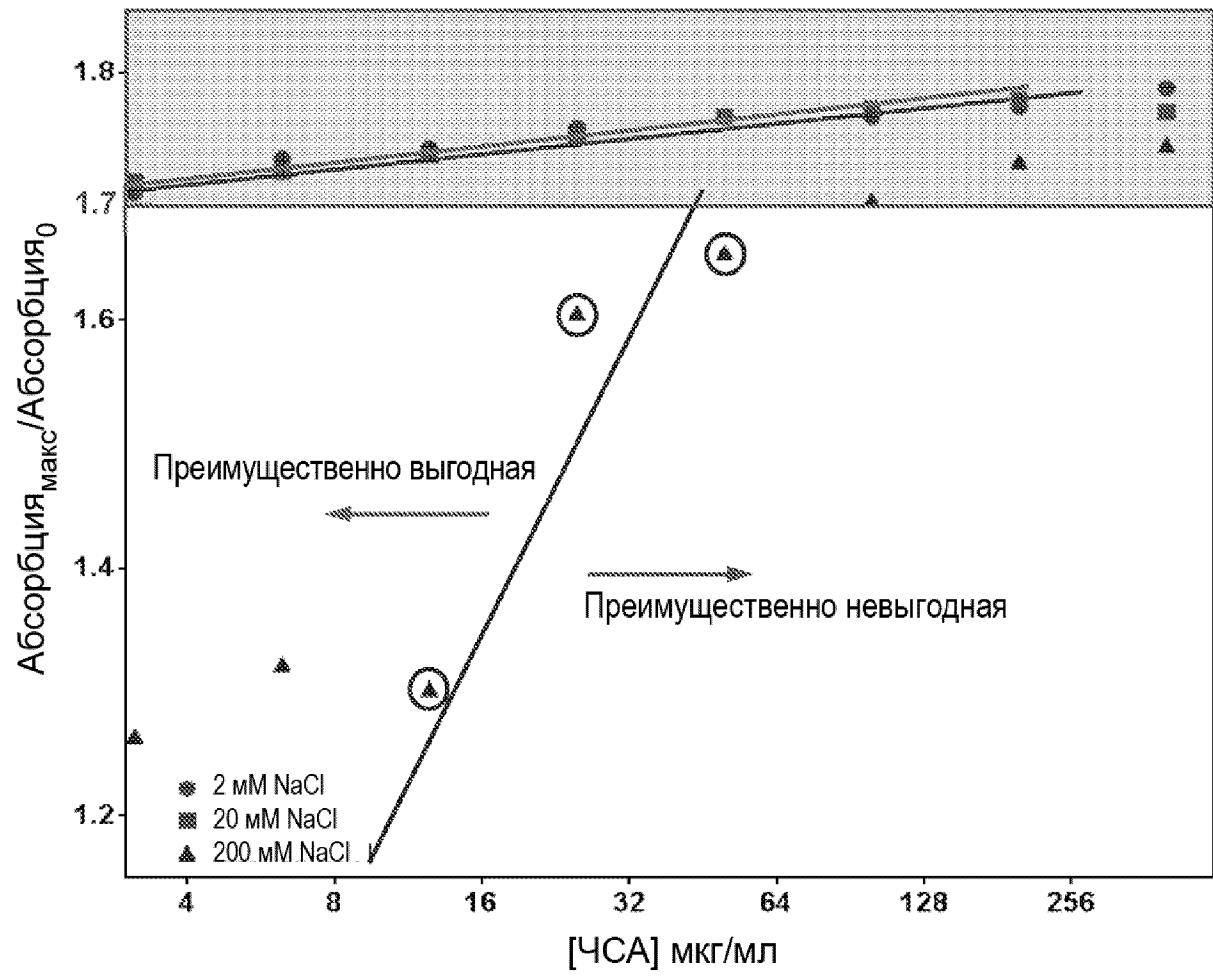




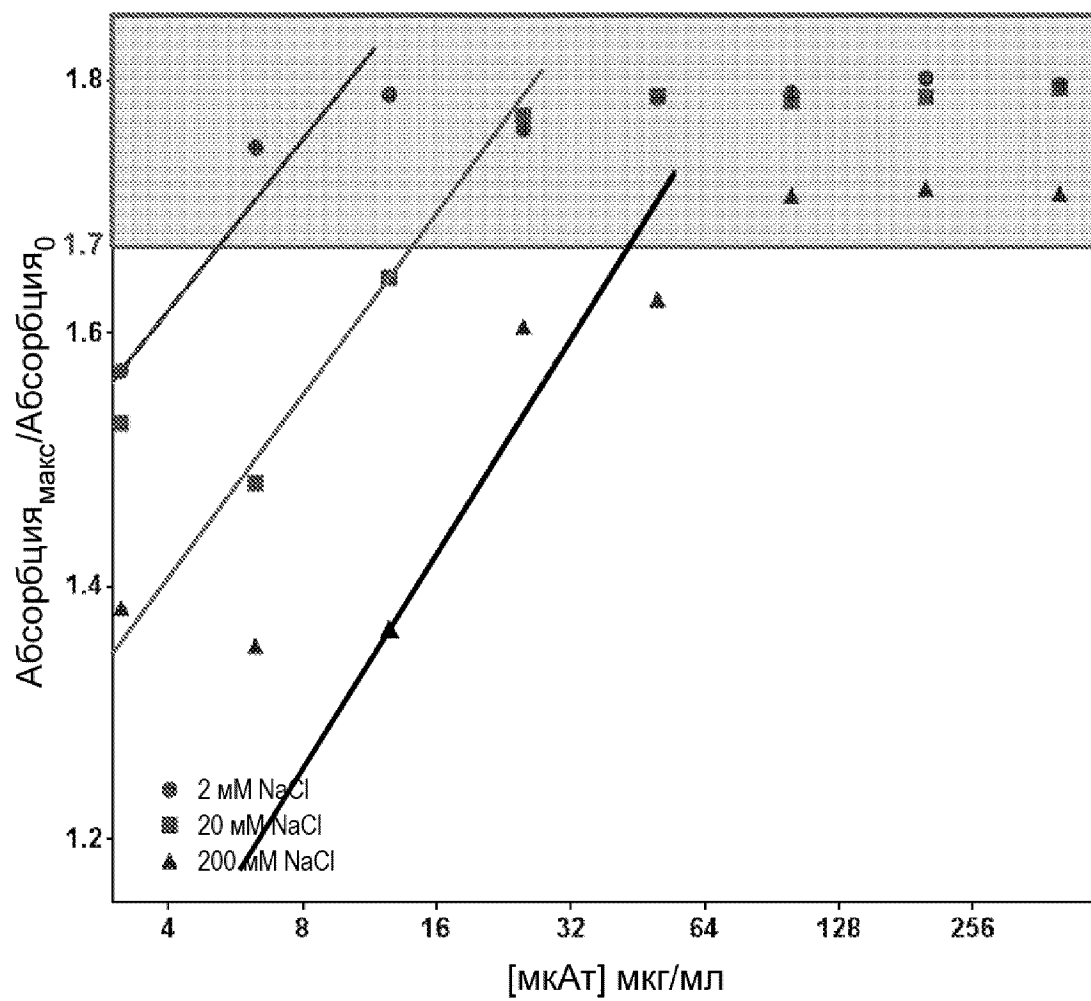
Фиг. 4



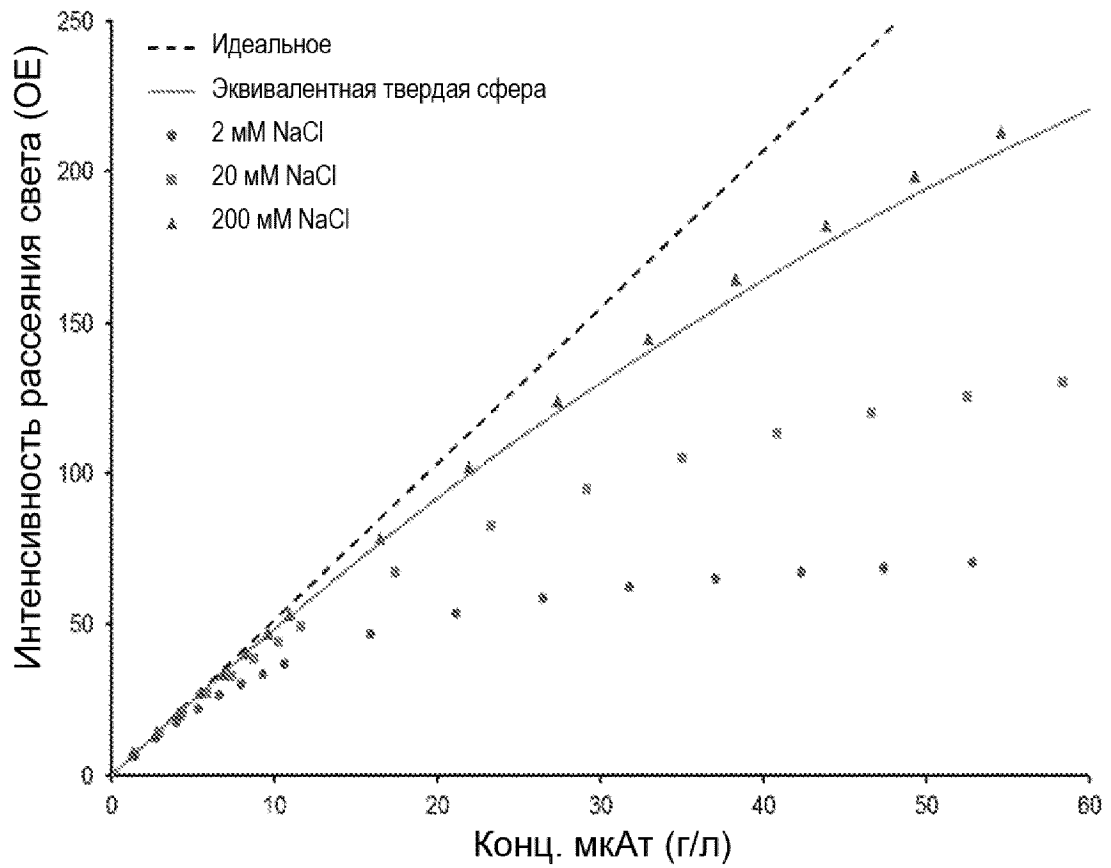
Фиг. 5



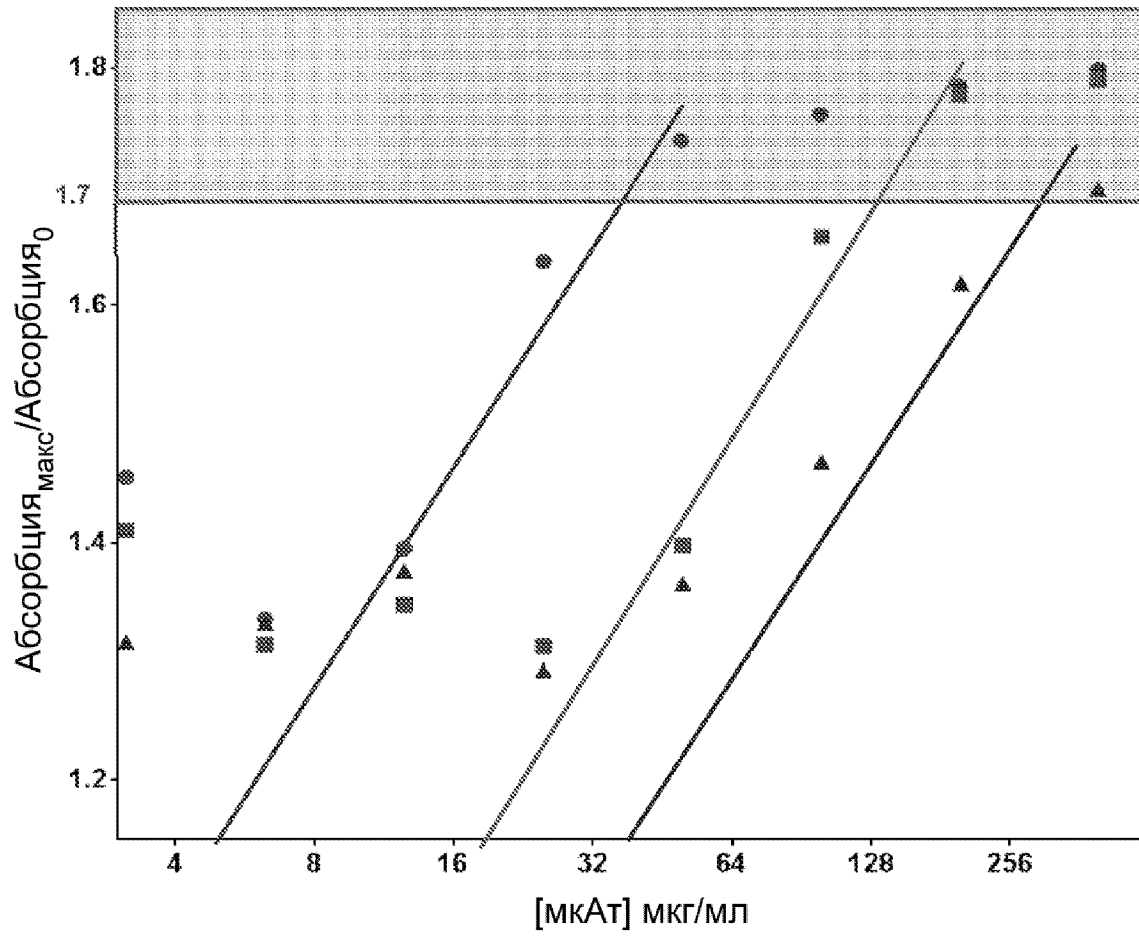
Фиг. 6



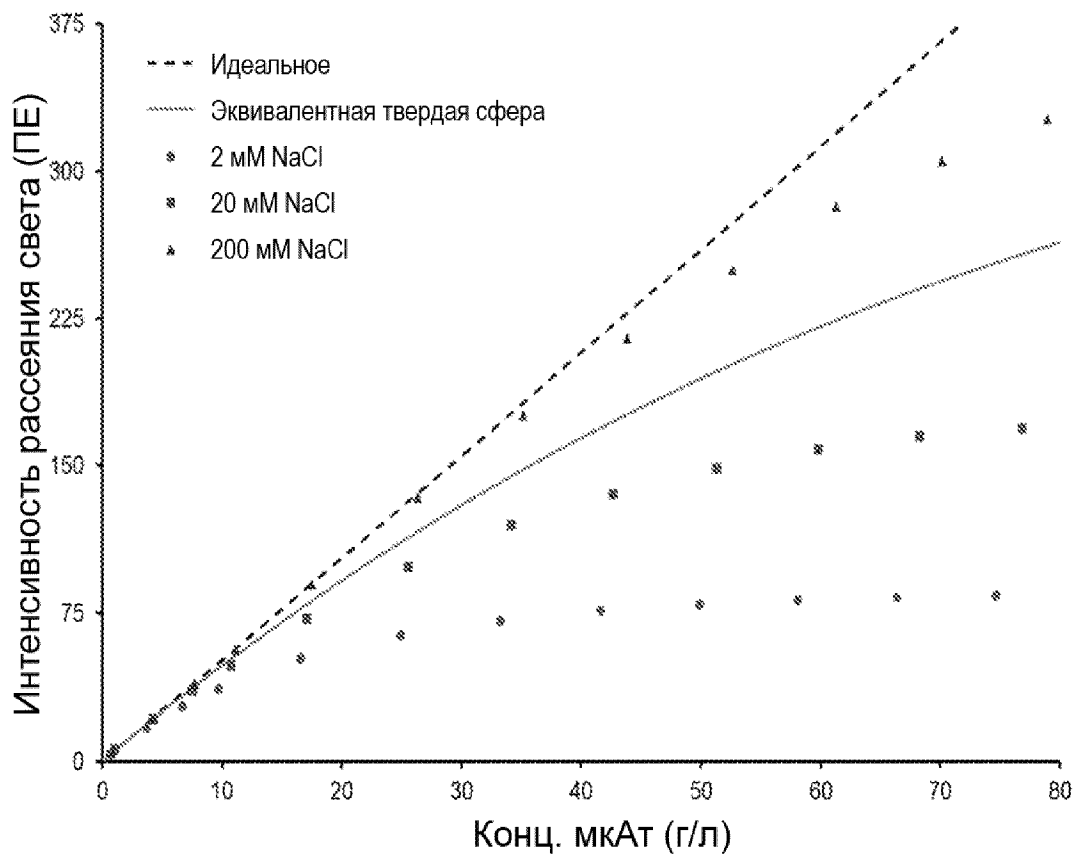
Фиг. 7



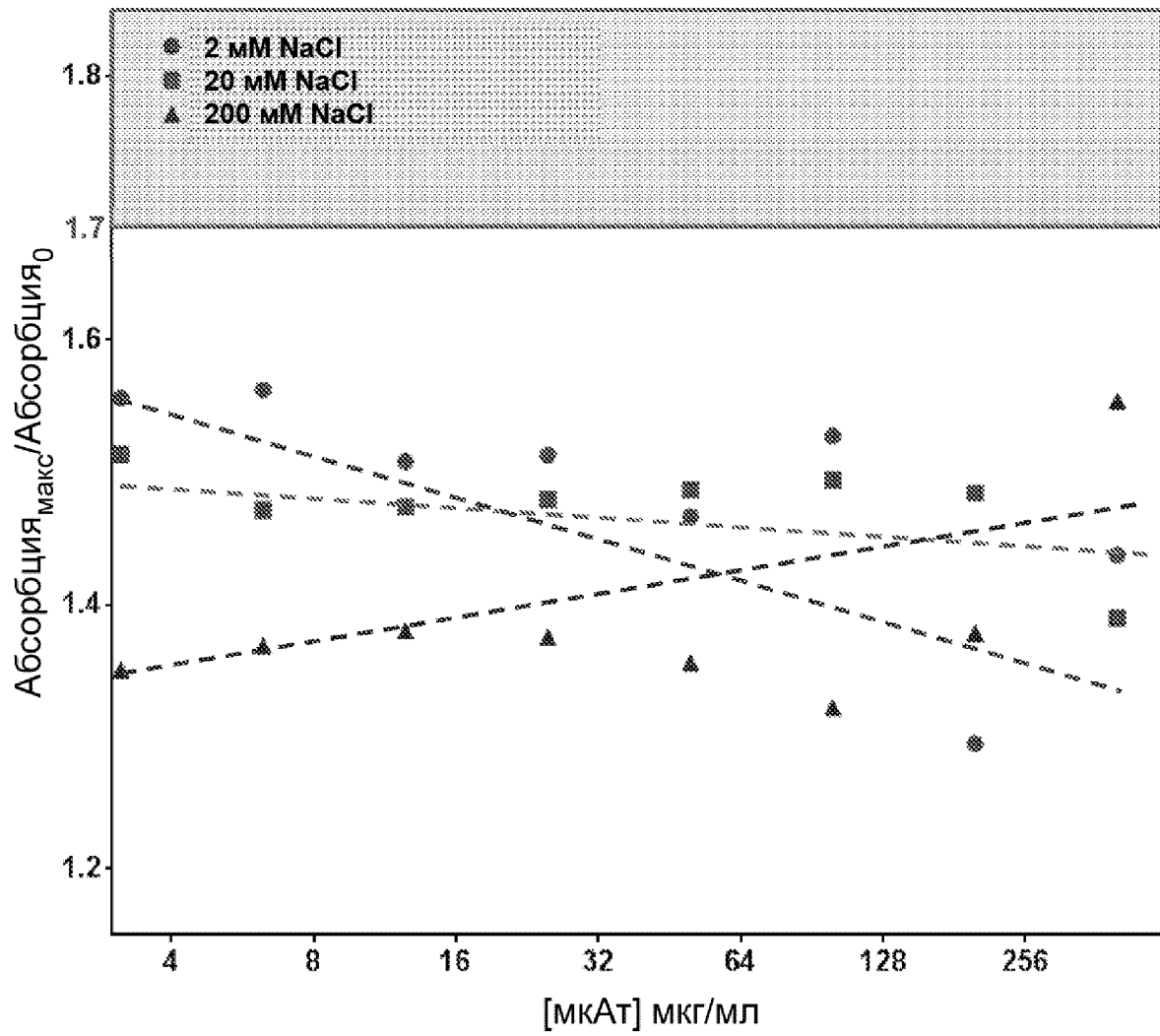
Фиг. 8



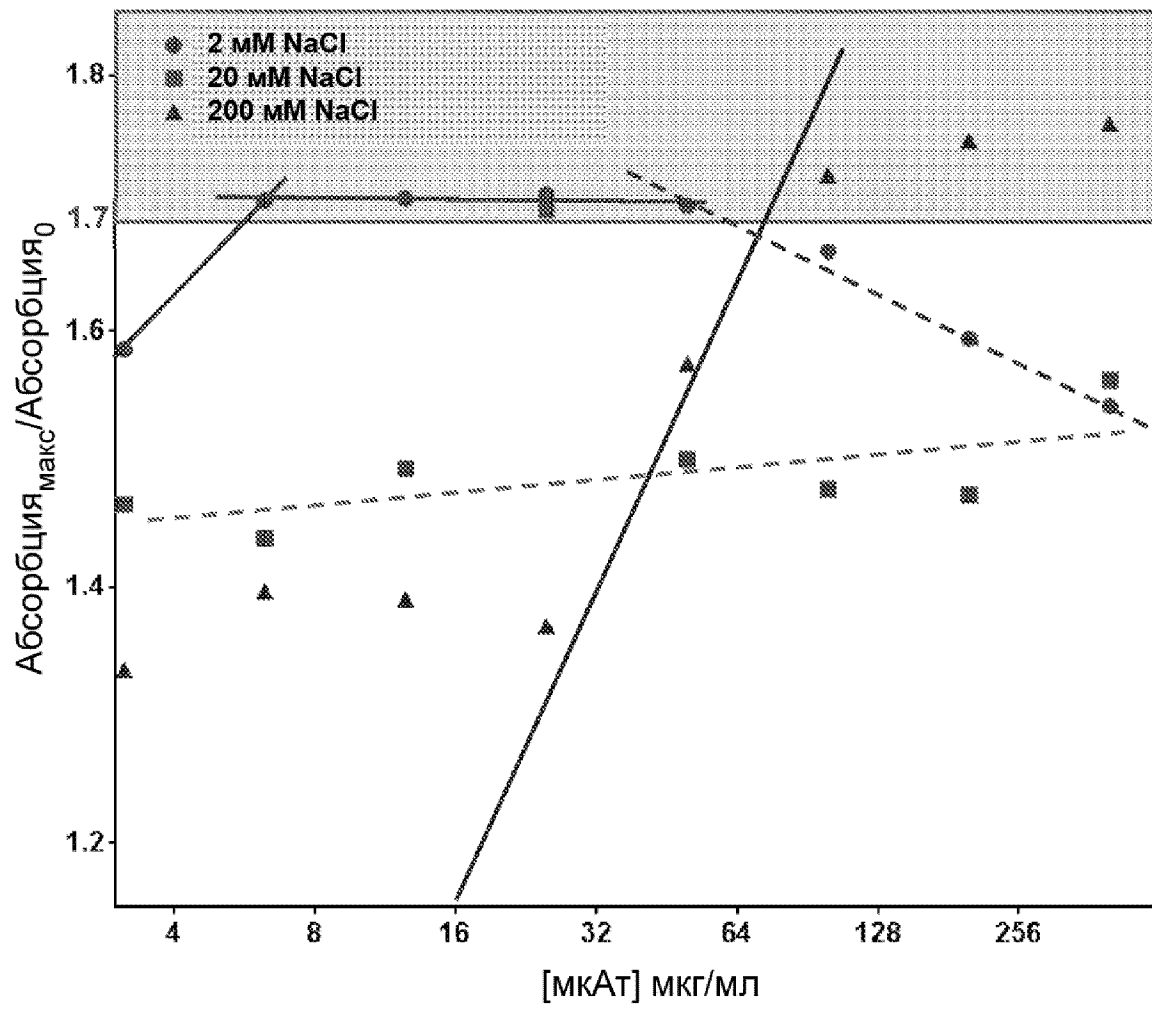
Фиг. 9



Фиг. 10

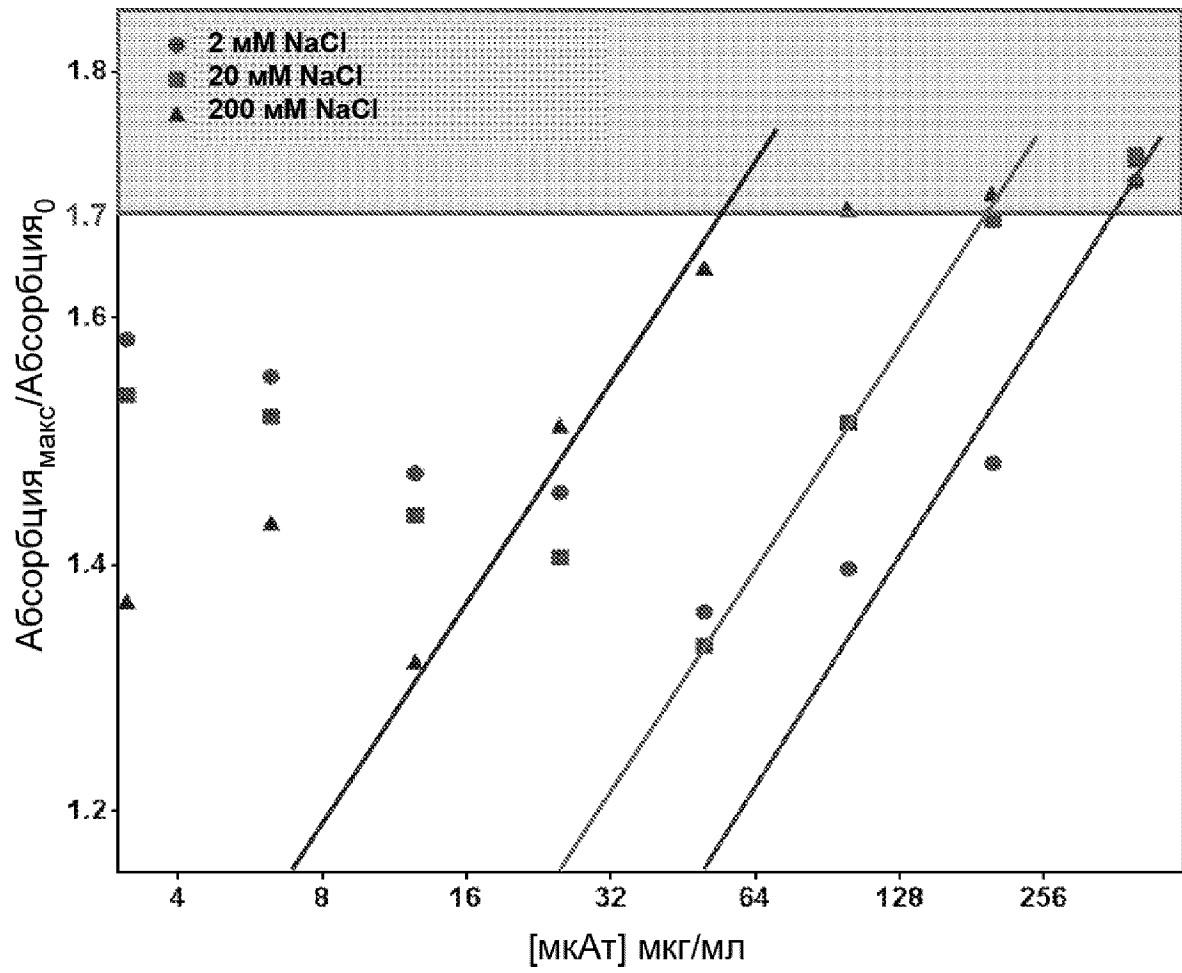


Фиг. 11

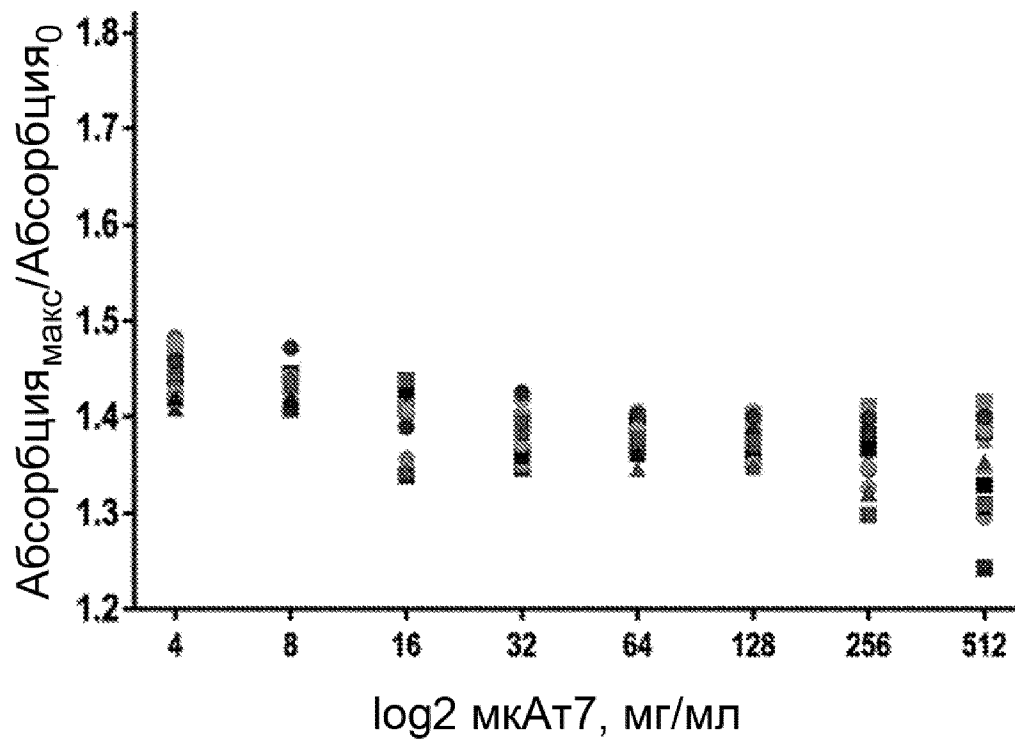




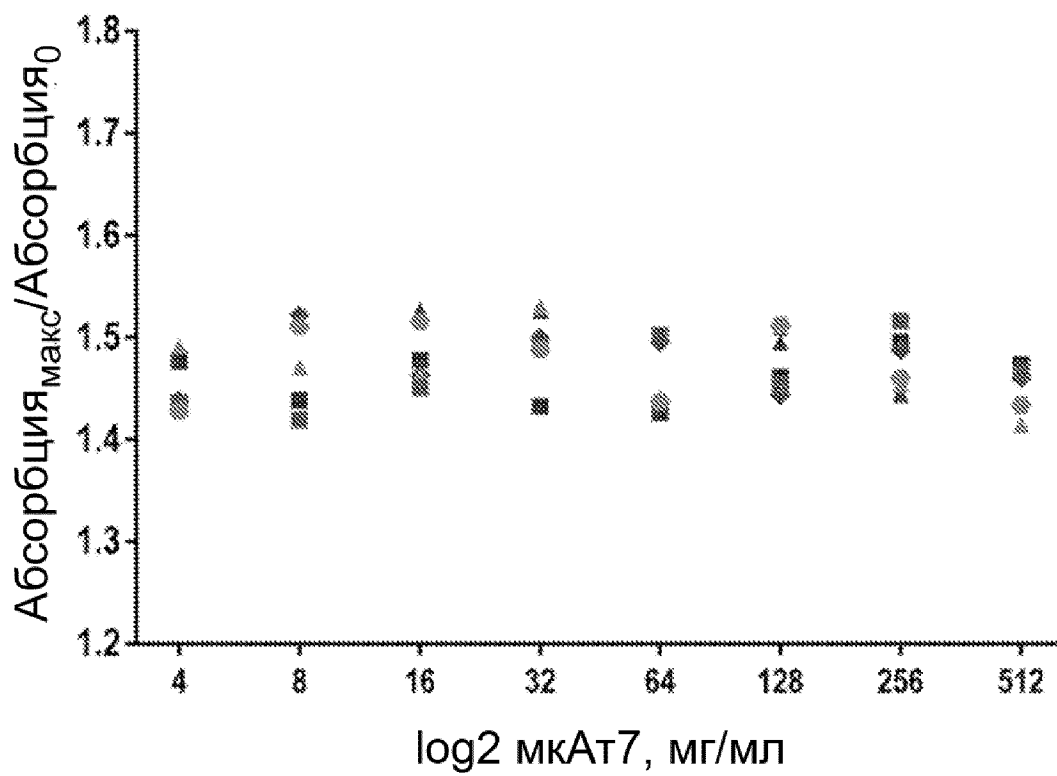
Фиг. 12



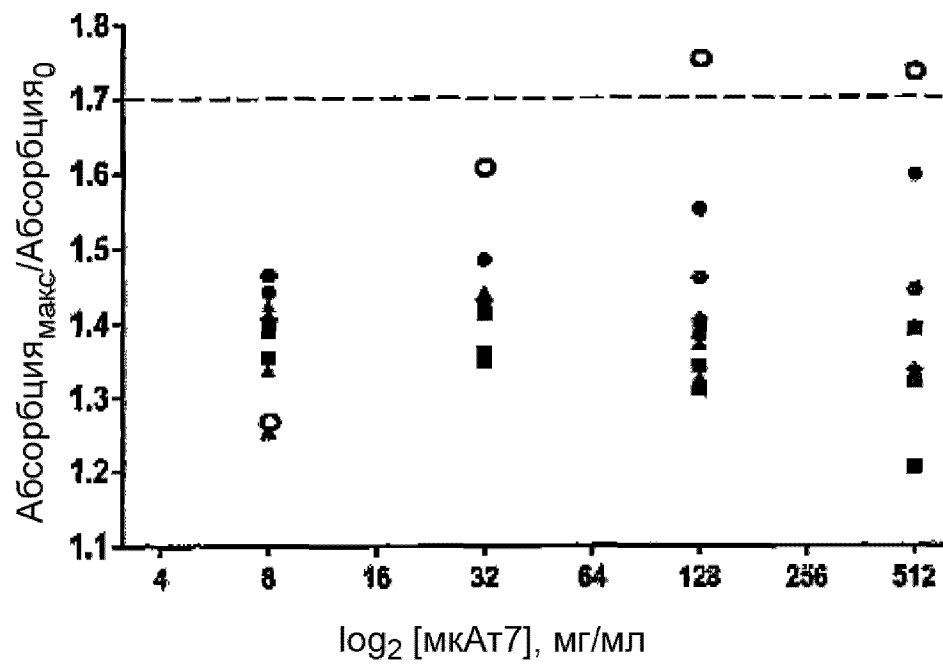
Фиг. 13



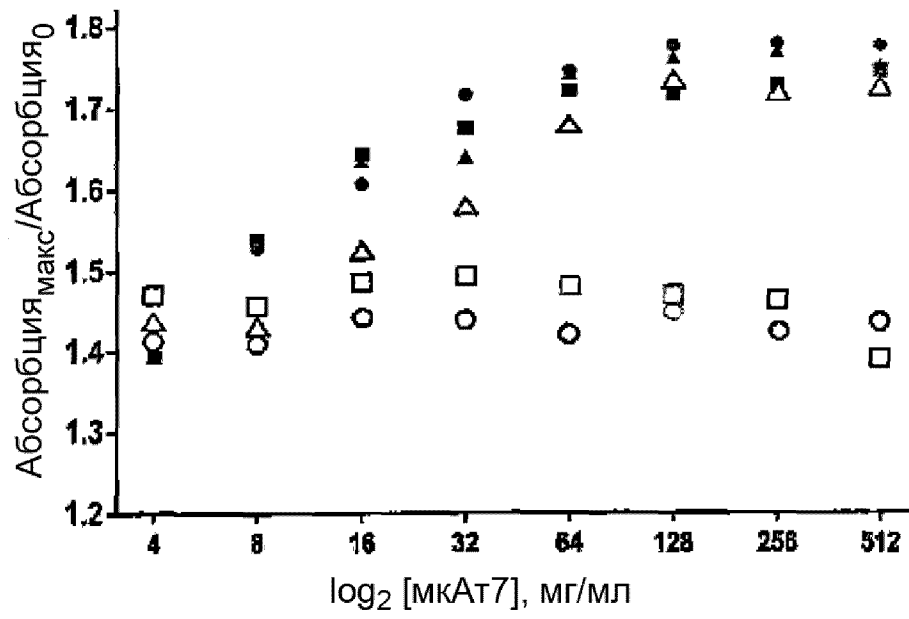
Фиг. 14



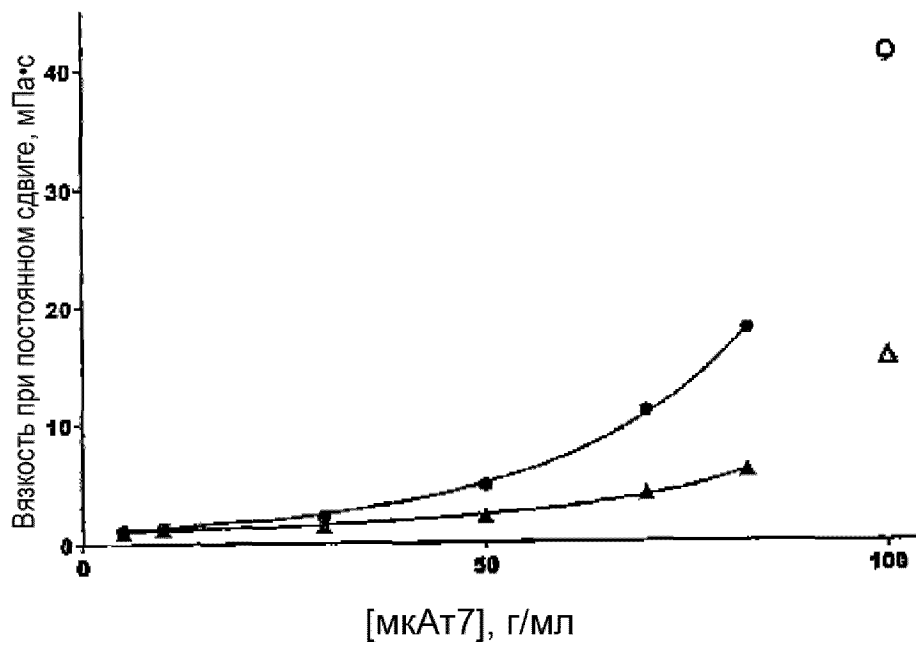
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202391050****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***G01N 33/538 (2006.01)**G01N 33/577 (2006.01)**G01N 33/68 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N 33/50, 33/538, 33/577, 33/68

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	SHANTANU V. Sule et al. High-throughput analysis of concentration-dependent antibody self-association. Biophysical Journal, 2011, Volume 101, 1749-1757	1-22, 29, 30
Y	[онлайн] [найдено 2023-06-23]. Найдено в <doi:10.1016/j.bpj.2011.08.036>	23-28
Y	WO 2015/067547 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 14.05.2015, параграфы [0069], [0077], [0061], [0094]	23-28
A	US 2007/0291265 A1 (MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY) 20.12.2007	1-30

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

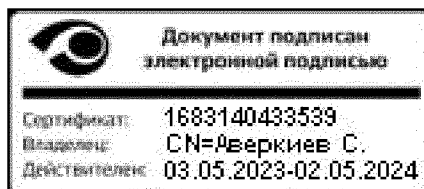
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 22 августа 2023 (22.08.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев