

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392765** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.05

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

(22) Дата подачи заявки
2022.04.01

(54) **СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И МОДУЛИРОВАНИЯ ГЛИКИРОВАНИЯ БЕЛКА**

(31) **63/170,330**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.04.02**

Цю Хайбо, Сюй Сяобинь, Камен

(33) **US**

**Дуглас, Ян Тэн-Чиэх, Грэхам Кеннет
(US)**

(86) **PCT/US2022/023127**

(87) **WO 2022/212889 2022.10.06**

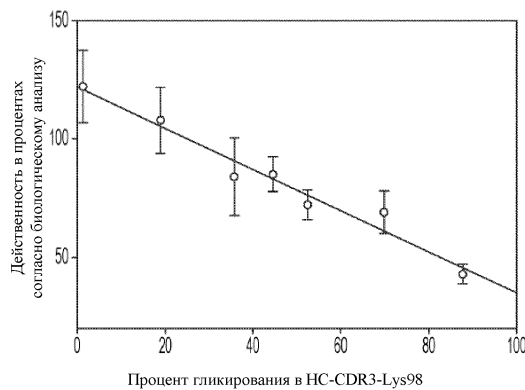
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) В ряде вариантов осуществления представлены способы прогнозирования процента гликирования аминокислоты в терапевтической биомолекуле. В качестве одного примера способ прогнозирования процента гликирования аминокислоты в биомолекуле включает определение первого ряда значений скорости реакции дегликирования для первого ряда значений температуры, выведение второго ряда из одного или более значений скорости реакции дегликирования для второго ряда значений температуры и применение второго ряда из одного или более значений скорости для прогнозирования процента гликирования при любом значении температуры, соответствующем второму ряду значений температуры, и в течение любого промежутка времени. Также представлены способы поддержания процента гликирования аминокислоты в пределах предварительно определенного диапазона процентов гликирования в течение срока годности терапевтической биомолекулы и способы обеспечения либо снижения, либо повышения действенности терапевтической биомолекулы в организме субъекта во время введения.



202392765 A1

202392765 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579321EA/023

СПОСОБЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И МОДУЛИРОВАНИЯ ГЛИКИРОВАНИЯ БЕЛКА

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] В настоящую заявку включен посредством ссылки перечень последовательностей, поданный в машиночитаемой форме как файл 10862WO01-Sequence.txt, созданный 1 апреля 2022 г. и содержащий 681 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к терапевтическим биомолекулам и, в частности, к способам определения и/или прогнозирования уровней гликирования и действенности терапевтических биомолекул *in vitro* и *in vivo*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Гликирование белков, неферментативная реакция восстановления сахара с аминокислотой, является распространенной посттрансляционной модификацией в биомолекулах, например, терапевтических биомолекулах, таких как моноклональные антитела (mAb). Когда происходит гликирование в области терапевтической биомолекулы, которая важна для ее функции, например, в области, определяющей комплементарность (CDR), терапевтического mAb, может быть ослаблена действенность и биологическая активность. Биомолекулы с восприимчивыми аминокислотными группами могут подвергаться процессу гликирования (или дегликирования) как *in vivo*, так и *in vitro*.

[0004] Например, все моноклональные антитела, в настоящее время одобренные Управлением США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), получают из культуры клеток млекопитающих. Во время процесса культивирования клеток mAb секретируются в среду для культивирования, где присутствует глюкоза в качестве источника энергии. Поскольку условия культивирования клеток подобны физиологическим условиям, вероятно, что большинство mAb будут подвергаться гликированию по меньшей мере в некоторой степени. После очистки mAb следуют составление, упаковывание и хранение, где гликирование mAb потенциально продолжается дальше или возвращается в изначальное состояние в зависимости от конкретных способов и условий. Механизмы и степень гликирования непредсказуемы вследствие сложности способа получения mAb, а анализ аминокислотных последовательностей или структурных мотивов в настоящее время не обеспечивает надежное прогнозирование горячих точек гликирования. Кроме того, на сегодня нет общего решения для обеспечения возможности прогнозирования степени гликирования и/или дегликирования mAb, которые могут происходить в условиях хранения и/или после введения субъекту, нуждающемуся в этом. В связи с тем, что гликирование терапевтических биомолекул, таких как mAb, может влиять на действенность таких биомолекул, в настоящее время существует потребность в методике, с помощью которой

можно надежно определять и/или прогнозировать гликирование и дегликирование терапевтических биомолекул как *in vitro* (например, в условиях хранения), так и *in vivo* (например, после введение нуждающемуся субъекту).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ прогнозирования процента гликирования аминокислоты в биомолекуле, включающий определение первого ряда значений скорости дегликирования для первого ряда значений температуры в течение первого промежутка времени; выведение второго ряда из одного или более значений скорости дегликирования для второго ряда значений температуры на основе первого ряда значений скорости дегликирования и применение второго ряда из одного или более значений скорости дегликирования для прогнозирования процента гликирования при любом значении температуры, соответствующем второму ряду значений температуры, и в течение промежутка, охватываемого вторым предварительно определенным временным отрезком.

[0006] В ряде вариантов осуществления первый ряд значений температуры содержит значения температуры, которые являются более высокими, чем значения во втором ряду значений температуры. Например, первый ряд температур может включать значения температуры, находящиеся в диапазоне 20-45°C, а второй ряд температур может включать значения температуры, находящиеся в диапазоне 2-8°C. В некоторых примерах второй ряд температур соответствует температуре, составляющей 5°C.

[0007] В некоторых вариантах осуществления первый предварительно определенный временной отрезок составляет менее 40 дней.

[0008] В некоторых вариантах осуществления второй предварительно определенный временной отрезок составляет по меньшей мере три месяца. Например, второй предварительно определенный временной отрезок может составлять 6 месяцев, или 9 месяцев, или 12 месяцев, или даже более 12 месяцев, как, например, 18 месяцев или 24 или 36 месяцев.

[0009] В ряде вариантов осуществления определение первого ряда значений скорости дегликирования для первого ряда значений температуры в течение первого промежутка времени включает измерение процента гликирования аминокислоты для каждого значения температуры, включенного в первый ряд значений температуры, в виде функции зависимости от времени, соответствующего по меньшей мере части первого промежутка времени, и проведение процедуры аппроксимации данных с получением первого ряда значений скорости дегликирования.

[0010] В ряде вариантов осуществления способ включает определение первого ряда значений скорости дегликирования в виде функции зависимости от двух или более разных значений pH. В некоторых примерах для каждого из двух или более разных значений pH способ дополнительно включает определение энергии активации, ассоциированной с дегликированием аминокислоты, на основе первого ряда значений скорости дегликирования. В некоторых примерах способ дополнительно включает выведение

второго ряда значений скорости дегликирования в виде функции зависимости от по меньшей мере одного из двух или более разных значений рН и применение второго ряда из одного или более значений скорости дегликирования для прогнозирования процента гликирования при любом значении температуры, соответствующем второму ряду температур, и в течение любого промежутка, охватываемого вторым предварительно определенным временным отрезком, в виде функции зависимости от по меньшей мере одного из двух или более разных значений рН.

[0011] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение первого ряда значений скорости дегликирования в отсутствие глюкозы, где аминокислота из биомолекулы подвергается гликированию до предварительно определенного первого процентного значения. В качестве примеров прогнозирования процента гликирования основано на втором ряду из одного или более значений скорости дегликирования, предварительно определенном первом процентном значении, до которого подвергается гликированию аминокислота из биомолекулы, и разнице между предварительно определенным первым процентным значением и гликированием, составляющим 0%.

[0012] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ поддержания процента гликирования аминокислоты в биомолекуле в пределах предварительно определенного диапазона процентов гликирования в течение срока годности биомолекулы. Способ включает инкубирование биомолекулы, характеризующейся первым процентным значением гликирования, с глюкозой в нескольких разных концентрациях и измерение процента гликирования с течением времени для каждой из нескольких разных концентраций глюкозы; определение равновесного процента гликирования для биомолекулы в виде функции зависимости от каждой из нескольких разных концентраций глюкозы на основе измерения процента гликирования с течением времени; установление равновесного процента гликирования и соответствующей концентрации глюкозы, которая приводит к поддержанию первого процентного значения гликирования в пределах предварительно определенного диапазона процентов гликирования, и инкубирование биомолекулы с глюкозой в соответствующей концентрации в течение срока годности биомолекулы.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня действенности биомолекулы в виде функции зависимости от процента гликирования аминокислоты.

[0014] В любом из различных вариантов осуществления биомолекула может представлять собой антитело. В некоторых примерах, где биомолекула представляет собой антитело, аминокислота расположена в пределах вариабельной области, которая влияет на связывание антигена. Например, аминокислота может быть расположена в пределах области, определяющей комплементарность (CDR). В качестве примеров CDR расположена в пределах вариабельной области тяжелой цепи. В некоторых случаях аминокислота расположена в пределах HCDR3.

[0015] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ снижения действенности терапевтической биомолекулы в организме субъекта во время введения. Способ включает установление терапевтической биомолекулы, содержащей один или более аминокислотных остатков, подвергаемых гликированию, где гликирование одного или более аминокислотных остатков обеспечивает снижение действенности терапевтической биомолекулы, и составление терапевтической биомолекулы с глюкозой в концентрации, составляющей более 150 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления концентрация глюкозы составляет более 200 мг/дл.

[0016] В некоторых вариантах осуществления гликирование одного или более аминокислотных остатков снижается, и действенность терапевтической биомолекулы повышается до состояния равновесия, определяемого концентрацией глюкозы в крови субъекта после введения терапевтической биомолекулы субъекту.

[0017] В некоторых вариантах осуществления сниженная действенность терапевтической биомолекулы во время введения обеспечивает снижение частоты возникновения синдрома высвобождения цитокинов или инфузионных реакций.

[0018] В любом из различных вариантов осуществления терапевтическая биомолекула может представлять собой антитело. В примерах, где терапевтическая биомолекула представляет собой антитело, одна или более аминокислот могут быть расположены в пределах вариабельной области, которая влияет на связывание антигена. Например, одна или более аминокислот могут быть расположены в пределах CDR. В качестве примеров CDR расположена в пределах вариабельной области тяжелой цепи. В некоторых случаях одна или более аминокислот расположены в пределах HCDR3.

[0019] В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ прогнозирования процента гликирования аминокислоты в терапевтической биомолекуле после введения терапевтической биомолекулы субъекту, где способ включает установление равновесного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой; установление скорости, с которой аминокислота подвергается гликированию или дегликированию; установление исходного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой в терапевтической биомолекуле, до введения и прогнозирование процента гликирования в виде функции зависимости от времени после введения терапевтической биомолекулы на основе скорости, разницы между исходным процентом гликирования и равновесным процентом гликирования и равновесного процента гликирования.

[0020] В некоторых вариантах осуществления способ, рассмотренный выше, дополнительно включает определение установленного равновесного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления способ, рассмотренный выше, дополнительно включает определение установленной скорости, с которой аминокислота подвергается гликированию или дегликированию. В некоторых вариантах осуществления способ, рассмотренный выше, дополнительно включает определение установленного исходного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой в терапевтической биомолекуле, до введения.

[0021] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение равновесного процента гликирования при температуре 35-40°C. В качестве примеров температура составляет 37°C.

[0022] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение скорости при температуре 35-40°C. В качестве примеров температура составляет 37°C.

[0023] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение равновесного процента гликирования *in vitro* в виде функции зависимости от одного или более значений концентрации глюкозы.

[0024] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение равновесного процента гликирования на основе равновесных уровней гликирования аминокислоты, достигаемых *in vivo*.

[0025] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение скорости *in vitro* при концентрации глюкозы, составляющей 3-8 мМ глюкозы.

[0026] В некоторых вариантах осуществления равновесный процент гликирования соответствует проценту при концентрации глюкозы, составляющей 3-8 мМ глюкозы.

[0027] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение скорости, разницы между исходным процентом гликирования и равновесным процентом гликирования и равновесного процента гликирования в модели первого порядка для прогнозирования процента гликирования.

[0028] В любом из различных вариантов осуществления, рассмотренных выше, способ дополнительно включает прогнозирование действенности терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от процента гликирования и времени, прошедшего после введения.

[0029] В любом из различных вариантов осуществления биомолекула может представлять собой антитело. В качестве примера аминокислота расположена в пределах варибельной области, которая влияет на связывание антигена. В качестве одного примера аминокислота расположена в пределах CDR. В некоторых примерах CDR расположена в пределах варибельной области тяжелой цепи. В частных примерах аминокислота расположена в пределах HCDR3.

[0030] В различных вариантах осуществления любые из признаков или компонентов вариантов осуществления, рассмотренных выше или в данном документе, можно комбинировать, и такие комбинации охватываются объемом настоящего изобретения. Любое конкретное значение, рассмотренное выше или в данном документе, можно комбинировать с другим родственным значением, рассмотренным выше или в данном документе, для перечисления диапазона, при этом указанные значения представляют собой верхний и нижний концы диапазона, и такие диапазоны, а также все значения, попадающие в пределы таких диапазонов, охватываются объемом настоящего изобретения. Другие варианты осуществления будут изложены в следующем подробном описании.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0031] В качестве примера, а не в целях ограничения на фигурах сопутствующих графических материалов проиллюстрированы варианты осуществления.

На **[0032] фигуре 1А** проиллюстрированы варианты mAb-1, отличающихся по заряду, разделенные посредством катионообменной хроматографии (СЕХ). Дорожка 105: mAb-1 в 10 мМ гистидине, рН 6,0, без обработки; дорожка 110: mAb-1 в 10 мМ гистидине, рН 6,0 и инкубированное при 37°C в течение 14 дней; дорожка 115: mAb-1 в 10 мМ гистидине, рН 6,0, с 0,1 М глюкозой и инкубированное при 37°C в течение 14 дней. Гликированное mAb-1 элюируется между двумя пунктирными линиями 120 (8,6 и 9,1 мин). Негликированное mAb-1 элюируется между двумя пунктирными линиями 125 (9,3 и 10,1 мин).

На **[0033] фигуре 1В** изображены хроматограммы в ультрафиолетовом спектре (УФ) пептидных карт контрольного (в чистом виде) mAb-1 (дорожка 130) и mAb-1, инкубированного при 37°C в течение 14 дней (дорожка 135) в отсутствие глюкозы. Условия для буфера были следующими: подвижная фаза А: 0,05% трифторуксусная кислота (ТФА) в воде; подвижная фаза В: 0,045% ТФА в ацетонитриле.

[0034] Фигура 2 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую, что корреляция между уровнем гликирования в HC-CDR3-Lys98 в mAb-1 и действенностью лекарственного средства, измеренная с помощью клеточного анализа действенности, является линейной и характеризуется коэффициентом корреляции, составляющим 0,97. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение результатов трехкратно повторенного анализа действенности.

[0035] Фигура 3А представляет собой диаграмму, иллюстрирующую кинетику гликирования и дегликирования 6,9 мкМ mAb-1 в 30 мМ HEPES, рН 7,4, при разных концентрациях глюкозы в случае инкубирования при 37°C в течение периода, составляющего 28 дней. Круги 306: глюкоза отсутствует; круги 308: 0,3 мМ глюкозы; круги 310: 0,6 мМ глюкозы; круги 312: 3 мМ глюкозы; круги 314: 6 мМ глюкозы; круги 316: 10 мМ глюкозы; круги 318: 28 мМ глюкозы; круги 320: 56 мМ глюкозы; круги 322: 111 мМ глюкозы. Сплошные линии получены из глобального анализа с применением кинетической модели при наилучшей аппроксимации $k_1=8,89 (\pm 1,79) \text{ М}^{-1} \text{ день}^{-1}$ и $k_{-1}=0,09 (\pm 0,02) \text{ день}^{-1}$.

[0036] Фигура 3В представляет собой диаграмму, иллюстрирующую термодинамический анализ реакции гликирования. Показанные данные определяли на основе наилучшей аппроксимации исходного уровня и размаха с применением уравнения 5 и уравнения 6 (относится к разделу Материалы и способы, следующему за разделом Примеры). Сплошная линия получена на основе термодинамического анализа с константой ассоциации при наилучшей аппроксимации $K=112 (\pm 40) \text{ М}^{-1}$.

На **[0037] фигурах 4А, 4В и 4С** изображены диаграммы, демонстрирующие кинетику дегликирования mAb-1 при разных температурах и рН. mAb-1 в 10 мМ гистидине, рН 6,0, 292 мМ сахарозы и 0,05% полисорбата 20 инкубировали при разных

температурах, круги 406: 20°C; круги 408: 30°C; круги 410: 35°C; круги 412: 40°C; круги 414: 45°C, и при pH 5,0 (фигура 4А), pH 5,5 (фигура 4В) и pH 6,0 (фигура 4С). Данные на фигурах 4А - 4С аппроксимировали с применением уравнения 6.

На [0038] **фигуре 4D** изображен анализ уравнения Аррениуса для дегликирования mAb-1 при разных значениях pH. Круги 420: pH 5,0; круги 422: pH 5,5; круги 424: pH 6,0. Линии представляют собой линейную аппроксимацию каждого набора данных при обозначенных значениях pH с коэффициентами корреляции, составляющими 0,98. Кажущуюся энергию активации (E_a) определяли по угловому коэффициенту прямой аппроксимации.

[0039] **Фигура 4E** представляет собой диаграмму, демонстрирующую сравнение прогнозируемой кинетики дегликирования и таковой в реальном времени при 5°C при разнящихся значениях pH. Треугольники 430: данные в реальном времени при pH 5,0; треугольники 435: данные в реальном времени при pH 5,5; треугольники 440: данные в реальном времени при pH 6,0. Линия 431: прогноз при pH 5,0; линия 436: прогноз при pH 5,5; линия 441: прогноз при pH 6,0. Линии 431, 436 и 441 представляют собой прогнозы касательно процента гликирования, созданные на основе анализа уравнения Аррениуса.

[0040] **Фигуры 5А, 5В и 5С** представляют собой диаграммы, демонстрирующие зависимость от pH уровней гликирования mAb-1 в состоянии равновесия. 6,9 мкМ mAb-1 инкубировали в 30 мМ буферах с разнящимися концентрациями глюкозы: 3 мМ (фигура 5А), 6 мМ (фигура 5В) и 11 мМ (фигура 5С), при 37°C в течение 28 дней. На фигурах 5А - 5С буферы были следующими: круги 505: ацетат; круги 510: гистидин; круги 515: HEPES; круги 520: фосфат. Равновесные уровни гликирования определяли на основе анализа кажущейся кинетики. Все три набора данных глобально анализировали с помощью уравнения 3, при этом демонстрировалось, что pK_a Lys98 составляет 6,7 (6,6, 6,9), и микроскопическая константа ассоциации K_2 для гликирования составляет $120 (\pm 26) M^{-1}$.

[0041] **Фигуры 6А, 6В, 6С, 6D и 6E** представляют собой диаграммы, на которых изображены равновесные проценты гликирования HC-CDR-Lys98 в виде функции зависимости от различных концентраций глюкозы при 45°C (фигура 6А), 37°C (фигура 6В), 30°C (фигура 6С), 25°C (фигура 6D) и 15°C (фигура 6E). Каждую точку данных получали на основе анализа кинетики с применением либо уравнения 5, либо 6 в зависимости от того, это реакция гликирования или дегликирования. Линии представляют собой анализ NLLS с применением уравнения 11.

[0042] **Фигура 7** представляет собой диаграмму, иллюстрирующую анализ уравнения Вант-Гоффа для равновесного состояния гликирования mAb-1. Константу ассоциации K определяли на основе термодинамического анализа гликирования mAb-1 при разных значениях температуры и концентрации глюкозы. Линия на диаграмме представляет собой линейную аппроксимацию всех данных с коэффициентом корреляции, составляющим 0,89.

На [0043] **фигурах 8А, 8В и 8С** изображена прогнозируемая структура двух плеч mAb-1. (Фигура 8А) Прогнозируемая локальная среда HC-CDR3-Lys98, где данный лизин

окружен ароматическими кольцами Tyr32, Phe27 и Tyr106 и алифатической боковой цепью Val2. (Фигура 8B) Прогнозируемая локальная среда HC-CDR3-Lys98 с глюкозным аддуктом, полученная в результате MD-симуляции. (Фигура 8C) Прогнозируемая локальная среда HC*-CDR3-Lys98, где данный Lys окружен Phe27, Tyr32, Tyr109 и Asp112. В отличие от HC-CDR3-Lys98, который обращен к ароматическим кольцам, HC*-CDR3-Lys98 обращен в сторону боковой цепи Asp112.

На [0044] фигурах 9A и 9B изображены измеренные и прогнозируемые уровни дегликирования HC-CDR3-Lys98 *in vivo* (фигура 9A) и соответствующие измерения при концентрации глюкозы *in vivo* (фигура 9B) в виде функции зависимости от времени.

На [0045] фигурах 10A, 10B, 11A, 11B, 12A и 12B изображены дополнительные графики, демонстрирующие данные касательно дегликирования терапевтических биомолекул *in vivo* после внутривенного введения с помощью инъекции обезьянам. На фигурах 10A, 11A и 12A проиллюстрирован процент гликирования HC-Lys98, нанесенный на график наряду с концентрацией mAb (мкг/мл), в виде функции зависимости от времени (дни), а на фигурах 10B, 11B и 12B проиллюстрирован процент гликирования HC-Lys98, нанесенный на график наряду с измеренной концентрацией глюкозы (мг/дл), в виде функции зависимости от времени (дни). Для каждого из протестированных mAb концентрация глюкозы в биореакторе для получения mAb составляла 300-1000 мг/дл.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0046] В следующем подробном описании ссылаются на сопутствующие графические материалы, которые образуют его часть и на которых показаны в целях иллюстрации варианты осуществления, которые можно осуществлять на практике. Следует понимать, что можно использовать другие варианты осуществления и можно вносить структурные или логические изменения без отступления от объема. Следовательно, следующее подробное описание не следует принимать в ограничивающем смысле.

[0047] Различные операции могут быть описаны в виде нескольких поочередных отдельных операций таким образом, что это может помочь в понимании вариантов осуществления; однако, порядок описания не следует толковать как подразумевающий, что порядок таких операций имеет значение.

[0048] В описании могут применяться термины «вариант осуществления» или «варианты осуществления», каждый из которых может относиться к одному или более одинаковым или разным вариантам осуществления. Кроме того, термины «предусматривающий», «включающий», «содержащий» и т. п., применяемые по отношению к вариантам осуществления, являются синонимичными и в общем подразумеваются как «открытые» термины (например, термин «включающий» следует интерпретировать как «включающий без ограничения», термин «содержащий» следует интерпретировать как «содержащий по меньшей мере», термин «включает» следует интерпретировать как «включает без ограничения», и т. д.).

[0049] Что касается применения любых терминов в форме множественного и/или единственного числа в данном документе, специалисты в данной области техники могут перевести множественное в единственное число и/или единственное в множественное число так, как это будет уместно в контексте и/или заявке. Различные преобразования единственное/множественное число могут быть явным образом изложены в данном документе для ясности.

[0050] Перед описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, применяемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления можно комбинировать друг с другом, и такие комбинации явно охватываются объемом настоящего изобретения.

[0051] Если не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Применяемый в данном документе термин «приблизительно» при применении в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отклоняться от указанного значения на не более 1%. Например, применяемое в данном документе выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.). Кроме того, указание диапазона числовых значений включает любое числовое значение, охватываемое указанным диапазоном, и/или любой диапазон значений, включенный в пределах указанного диапазона. Например, числовой диапазон 1-10 охватывает диапазон и дополнительно охватывает отдельные числовые значения (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) и диапазоны в пределах указанного числового диапазона (например, 1-2, 1-4, 2-5, 3-7, 4-9, 5-10 и так далее).

[0052] Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ СОКРАЩЕНИЯ

[0053] CDR: область, определяющая комплементарность

[0054] CEX: катионообменная хроматография

[0055] CSF: колониестимулирующий фактор

[0056] ESI: ионизация электрораспылением

[0057] HC: тяжелая цепь

- [0058] HCVR: переменная область тяжелой цепи
- [0059] IgG: иммуноглобулин G
- [0060] IgM: иммуноглобулин M
- [0061] IFU: инструкции по применению
- [0062] IEC: ионообменная хроматография
- [0063] LC-MS: жидкостная хроматография-масс-спектрометрия
- [0064] LCVR: переменная область легкой цепи
- [0065] mAb: моноклональное антитело
- [0066] MALDI: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- [0067] MG: листки-вкладыши
- [0068] MS/MS: тандемная масс-спектрометрия
- [0069] NLLS: нелинейный метод наименьших квадратов
- [0070] PPI: инструкции по применению лекарственного препарата
- [0071] PTM: посттрансляционные модификации
- [0072] TCEP-HCl: гидрохлорид трис(2-карбок시에тил)фосфина
- [0073] TFA: трифторуксусная кислота
- [0074] TNF: фактор некроза опухоли
- [0075] УФ: ультрафиолет

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0076] Термин «средство», применяемый в данном документе, относится к любому белку, пептиду, антителу, антигенсвязывающему фрагменту или другой молекуле, представляющей интерес. В качестве примеров средство представляет собой белок, пептид, антитело, антигенсвязывающий фрагмент и т. д. со способностью подвергаться гликированию при одном или более аминокислотных остатках, например, при аминокислотном остатке, важном для связывания с антигеном. Таким образом, средство может включать терапевтическое средство, диагностическое средство или фармацевтическое средство. Терапевтическое или фармацевтическое средство представляет собой такое средство, которое само по себе или вместе с дополнительным соединением вызывает желаемый ответ (как, например, вызывая терапевтический или профилактический эффект при введении субъекту, в том числе обеспечивая лечение субъекта, страдающего заболеванием или состоянием). Рассмотренное в данном документе средство может называться терапевтической биомолекулой.

[0077] Термин «антитело», применяемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями (т. е. «молекул полного антитела»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящего из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может относиться к изотипу IgG. В некоторых случаях

тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, необязательно включая химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса и/или гликированные и негликированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные посредством рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии данного антитела. Обзор структуры антител см. в Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003) и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983).

[0078] Термин антитело также охватывает «биспецифическое антитело», которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним отличающимся эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, которая включает одну тяжелую цепь, и одну легкую цепь, и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с отличающимся антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связывать один и тот же антиген, но в разных эпитопах или неперекрывающихся эпитопах. В некоторых случаях, обе половины биспецифического антитела содержат идентичные легкие цепи, в то же время сохраняя двойную специфичность. Биспецифические антитела в общем описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527 (30 декабря 2010 г.).

[0079] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «фрагмент антитела») относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH,

связанных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448 и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[0080] Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК, широко известных из уровня техники (см. Sambrook et al., 1989). Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей также известны из уровня техники. Например, с применением технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител изначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к желаемому антигену, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем экспрессируют ДНК в клетке, способной к экспрессии полностью человеческого антитела.

[0081] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут проявлять разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован аминокислотами, в пространственном отношении расположенными рядом, из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. При определенных условиях эпитоп может включать структурные единицы сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0082] Термин «человеческое антитело» предназначен для включения антител, содержащих переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулинов зародышевого типа. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулинов зародышевого типа (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и в частности в CDR3.

Однако термин «человеческое антитело», применяемый в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевого линии другого вида млекопитающего (например, мыши), привиты на человеческие FR последовательности. Термин включает антитела, полученные рекомбинантным путем у млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Термин не подразумевает включение антител, выделенных из человека-субъекта или полученных от него.

[0083] Термин «связывание» в контексте связывания антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела либо с антигеном, либо с другой молекулой (например, сахаром), как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между как минимум двумя объектами или молекулярными структурами, таким как взаимодействие антитело-антиген или взаимодействие антитело-сахар (например, глюкоза).

[0084] Например, аффинность связывания антитела, Ig или связывающего фрагмента антитела с антигеном, как правило, может соответствовать значению K_D , составляющему приблизительно 10^{-7} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе ВΙΑcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела, Ig или связывающего фрагмента антитела в качестве аналита (или антилиганда). Соответственно, антитело или другой связывающий белок связываются с предварительно определенным антигеном или рецептором с аффинностью, соответствующей значению K_D , которое в по меньшей мере десять крат ниже, как, например, по меньшей мере в 1000 крат ниже, как, например, по меньшей мере в 10000 крат ниже, например, по меньшей мере в 100000 крат ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином).

[0085] Как рассмотрено в данном документе, аффинность связывания антитела, Ig или связывающего фрагмента антитела с антигеном может быть изменена (например, уменьшена) с помощью РТМ (например, гликирования) в антителе, Ig или связывающем фрагменте антитела в области белка, важной для связывания между антителом, Ig или связывающим фрагментом антитела и антигеном. Уменьшенная аффинность связывания, в свою очередь, может привести к сниженной действенности антитела, Ig или связывающего фрагмента антитела. Как рассмотрено в данном документе, «действенность» по отношению к антителу, Ig или связывающему фрагменту антитела относится к мере активности лекарственного средства, выраженной как количество, требуемое для обеспечения эффекта конкретной интенсивности. Например, высокодейственное лекарственное средство (например, терапевтическое mAb) может вызывать заданный ответ при низких концентрациях, при этом лекарственное средство с низкой действенностью будет вызывать такой же ответ при более высоких концентрациях. Действенность mAb может быть измерена, например, в биологическом анализе на основе клеток, который для установления корреляции между концентрацией лекарственного

средство (например, mAb) и активностью опирается на интенсивность люминесцентного сигнала.

[0086] Термин «эффективное количество», применяемый в данном документе, относится к количеству средства, которое является достаточным для генерации желаемого ответа, такого как снижение или подавление одного или более признаков или симптомов, ассоциированных с состоянием или заболеванием. В общем, при введении субъекту будет применяться дозировка, с помощью которой достигаются требуемые концентрации в целевой ткани/клетке. В некоторых примерах «эффективное количество» представляет собой количество, которое обеспечивает лечение одного или более симптомов и/или первопричин любого нарушения или заболевания.

[0087] В некоторых примерах эффективное количество представляет собой количество фармацевтического препарата, самого по себе или вместе с фармацевтически приемлемым носителем или одним или более дополнительными терапевтическими средствами, которое вызывает желаемый ответ.

[0088] В качестве одного примера желаемый ответ представляет собой повышение времени жизни субъекта и/или улучшение качества жизни субъекта, например, за счет снижения числа и/или количества симптомов, ассоциированных с состоянием или заболеванием. В качестве другого примера требуемый ответ представляет собой повышение времени жизни субъекта и/или улучшение качества жизни субъекта за счет замедления или устранения прогрессирования заболевания, например, замедления или устранения прогрессирования рака.

[0089] Для того, чтобы фармацевтический препарат считался эффективным, нет необходимости в полном подавлении симптомов и/или первопричин заболевания, синдрома, вирусной инфекции и т. д. Например, фармацевтический препарат может обеспечивать уменьшение прогрессирования заболевания, синдрома, вирусной инфекции и т. д. на желаемую величину, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или даже по меньшей мере 100%, по сравнению с прогрессированием, характерным в отсутствие фармацевтического препарата.

[0090] В качестве другого или дополнительного примера оно представляет собой количество, достаточное для частичного или полного облегчения симптомов заболевания у субъекта. Лечение может вовлекать только временное замедление прогрессирования заболевания, но также может включать бессрочное прекращение или обращение прогрессирования заболевания.

[0091] Эффективные количества средств, описанных в данном документе, можно определять многими разными путями, такими как, например, путем анализа снижения в отношении одного или более признаков или симптомов, ассоциированных с состоянием или заболеванием, у субъекта или измерения уровня экспрессии одной или более молекул, как известно, ассоциированных с состоянием или заболеванием. Эффективные количества

также можно определять посредством различных анализов *in vitro*, *in vivo* или *in situ*, включая анализы, описанные в данном документе.

[0092] Раскрытые терапевтические средства можно вводить однократной дозой или несколькими дозами, например, ежечасно, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно на протяжении курса лечения. Эффективное количество может зависеть от субъекта, подвергаемого лечению, тяжести и типа состояния, подвергаемого лечению, и способа введения.

[0093] Термин «гликирование», применяемый в данном документе, относится к неферментативному гликозилированию при аминокислоте (аминокислотах) белка, в основном при концевой альфа-аминокислоте и эpsilon-аминокислоте в боковой цепи лизина. Гликирование является первой стадией перед более сложной реакцией Майяра. Гликирование может происходить, когда белок инкубируют, или иным способом приводят в контакт, с восстанавливающими сахарами (например, глюкозой, галактозой, фруктозой). В реакции гликирования восприимчивая (например, депротонированная) аминокислота обратимо конденсируется с альдегидной группой восстанавливающих сахаров с образованием нестабильного промежуточного соединения, представляющего собой шиффово основание, которое может подвергаться самопроизвольной многостадийной перегруппировке Амadorи с образованием более стабильного, ковалентно связанного кетоамина. Однако, в определенных условиях можно вызывать обратимую потерю сахарного аддукта кетоамином, продуктом реакции Амadorи.

[0094] Гликирование белков является встречающимся в природе процессом *in vivo*, например, было обнаружено, что сывороточный альбумин человека (HSA) и гемоглобин характеризуются различающимися степенями гликирования в зависимости от уровня глюкозы в крови и количества времени в системе кровообращения. Аналогично белки или пептиды с восприимчивыми аминокислотами могут подвергаться гликированию *in vitro*. В условиях стресса, таких как высокие температуры и/или окислительная среда, продукты реакции Амadorи могут подвергаться дополнительным реакциям с образованием реакционноспособных карбонильных и дикарбонильных соединений, которые затем вступают в реакцию с белками с образованием более стабильных и необратимых аддуктов, известных как конечные продукты гликирования (AGE).

[0095] Учитывая сложность коммерческого производства терапевтических антител, гликирование не является необычным, но кинетика и масштаб реакции в настоящее время не предсказуемы. Гликирование mAb может происходить во время процесса ферментации, где глюкоза является источником энергии для клеток, продуцирующих mAb. На уровень гликирования может влиять общая загрузка сахара во время процесса культивирования клеток млекопитающих. Переменные, включающие без ограничения температуру, pH, период времени, ионную силу и т. п., могут влиять на кинетику и масштаб гликирования. Типы присутствующих сахаров (например, гексозных сахаров) и определенная реакционная способность доступных аминокислот могут влиять на гликирование белков и могут повышать гетерогенность терапевтических белков.

[0096] В некоторых примерах гликирование может вноситься в белки (например, терапевтические mAb) в условиях хранения за счет включения восстанавливающих сахаров в состав для хранения. Даже если восстанавливающие сахара не включены в состав, они могут получаться за счет разрушения углеводов высшего порядка (например, сахарозы) в зависимости от условий, включающих без ограничения рН (например, кислое рН) и температуру (например, повышенные температуры).

[0097] До сих пор не было установлено определенной последовательности белка (например, первичной структуры) или обобщенной (например, вырожденной) последовательности, которая соответствует потенциальному сайту гликирования или которая сигнализирует о восприимчивости аминокислоты к гликированию. Однако, возможно, что трехмерные локальные среды потенциально могут влиять на появление гликирования. Например, реакционная способность аминогруппы может зависеть от локализованных условий, которые воздействуют на депротонирование амина и стабилизацию промежуточного соединения перед образованием продукта реакции Амадори, кетоамина. Если конкретно, гистидиновые остатки или основные остатки (аргининов и других лизинов) коррелируют с частотой гликирования в некоторых белках с известными структурами (например, алкогольдегидрогеназа печени, РНКаза А, ДНКаза I, альбумин, гемоглобин). Каталитический эффект карбоновых кислот (например, аспарагиновой кислоты) также коррелирует с гликированием.

[0098] В случае терапевтических биомолекул, таких как mAb, потенциальные эффекты гликирования, например, нарушение биологически функционального сайта или дополнительное разрушение, которое вызывает агрегацию, делают гликирование потенциальным критическим показателем качества (CQA). Рассмотренный в данном документе термин «CQA» относится к одному или более из физических, химических, биологических или микробиологических свойств или характеристик, которые должны находиться в пределах надлежащего предела, диапазона или распределения для обеспечения желаемого качества продукта.

[0099] Термин « K_D » (M), применяемый в данном документе, относится к равновесной константе диссоциации для конкретного взаимодействия связывающий белок-лиганд. Например, K_D может относиться к равновесной константе диссоциации между антителом, Ig или связывающим фрагментом антитела и антигеном или между антителом, Ig или связывающим фрагментом антитела и молекулой сахара (например, глюкозы). Между K_D и аффинностью связывания существует обратная зависимость, следовательно, чем меньше значение K_D , тем выше, т. е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступить во взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и, наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступить во взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . Равновесная константа диссоциации K_D равняется $1/K$.

[0100] Термин « k_1 » ($M^{-1} \times \text{день}^{-1}$), применяемый в данном документе, относится к константе скорости ассоциации для конкретного взаимодействия белок-сахар (например, антитело-глюкоза), а также называется скоростью гликирования.

[0101] Термин « k_{-1} » (день^{-1}), применяемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия белок-сахар (например, антитело-глюкоза), а также называется скоростью дегликирования.

[0102] Термин « K » (M^{-1}), применяемый в данном документе, относится к кажущейся константе ассоциации для конкретного взаимодействия белок-сахар (например, антитело-глюкоза). Константа ассоциации K может быть получена путем деления k_1 на k_{-1} .

[0103] Термины « K_1 » и « K_2 », применяемые в данном документе, относятся к равновесным константам, соответствующим реакции депротонирования белка и реакции гликирования белка соответственно, при этом каждая реакция соответствует равновесной модели для количественного анализа рН-зависимого гликирования. Более конкретно, K_1 , применяемая в данном документе, относится к равновесной константе для депротонирования амина в HC-CDR3-боковой цепи Lys98, а K_2 относится к равновесной константе для связывания глюкозы с депротонированным амином. pK_a ϵ -аминогруппы в HC-CDR3-Lys98 может быть определена на основе $pK_a = -\log(K_1)$, и, в отличие от K , K_2 является независимой от рН, микроскопической константой ассоциации для реакции гликирования. Более низкое значение pK_a является показателем более сильной кислоты, в то же время более высокое значение pK_a является показателем более слабой кислоты. pK_a конкретной группы аминокислоты может изменяться в зависимости от микроокружения белка.

[0104] Термины « $k_{app,1}$ » и « $k_{app,2}$ », применяемые в данном документе, относятся к кажущимся константам скорости реакции для реакций гликирования и дегликирования соответственно. Применяемый в данном документе термин «реакция гликирования» относится к повышению процента гликирования белка со временем, а термин «реакция дегликирования» относится к уменьшению процента гликирования белка с течением времени.

[0105] Термин « E_a », применяемый в данном документе, относится к кажущейся энергии активации, соответствующей минимальному количеству энергии, которое нужно обеспечить соединениям, чтобы произошла химическая реакция. E_a может быть рассчитана с помощью уравнения Аррениуса на основе кинетики дегликирования при разных температурах. E_a может быть снижена с повышением тем самым скорости реакции или может быть повышена, что, в свою очередь, может снижать скорость реакции. Одним фактором, который может обеспечить снижение энергии активации, является температура, например, повышение температуры может вызвать рост уровней энергии молекул, вовлеченных в конкретную реакцию, тем самым повышая скорость реакции. Энергию активации также можно изменять другими путями, например, конкретные реакции могут проходить быстрее или медленнее в зависимости от рН. В целом, способ

ускорения реакции путем снижения ее энергии активации называется катализом, а фактор, который приводит к снижению энергии активации называется катализатором. Следовательно, рассмотренные в данном документе катализаторы включают без ограничения температуру и pH.

[0106] Термин «поведение согласно уравнению Аррениуса» или «демонстрирует поведение согласно уравнению Аррениуса», применяемый в данном документе, относится к реакциям, для которых при построении графика натурального $\log (\ln) k_{app}$ от обратной функции температуры ($1/T$) получается прямая. Угловой коэффициент прямой графика уравнения Аррениуса пропорционален энергии активации E_a , где чем выше энергия активации (например, более крутой наклон), тем сильнее зависимость константы скорости от температуры (k_{app}) для конкретной реакции. Следовательно, в широком смысле, реакция, которая демонстрирует поведение согласно уравнению Аррениуса, относится к реакции, на которую воздействует температура.

[0107] «Приведение в контакт», как применяется в данном документе, включает объединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе.

[0108] Термин «восходящая масс-спектрометрия», применяемый в данном документе, относится к способам на основе масс-спектрометрии, в которых очищенные белки (или сложные смеси белков) подвергают протеолитическому расщеплению и пептидные продукты анализируют посредством MS.

[0109] Термин «нисходящая масс-спектрометрия», применяемый в данном документе, относится к способам на основе масс-спектрометрии, где ионы интактного белка вводят в газообразную фазу, и фрагментируют и анализируют в масс-спектрометре с получением молекулярной массы белка, а также маркеров молекулярной массы белковых ионных фрагментов.

[0110] Термин «цитокин», применяемый в данном документе, относится к разнородной группе растворимых белков и пептидов, высвобождаемых из клеток, которые выполняют роль гуморальных регуляторов в нано-пиколярных концентрациях и которые, либо при нормальном, либо при патологическом состояниях, модулируют виды функциональной активности отдельных клеток и тканей. Такие белки также непосредственно опосредуют взаимодействия между клетками и регулируют процессы, происходящие во внеклеточной среде. Многие факторы роста и цитокины выполняют роль факторов выживания клеток за счет предотвращения запрограммированной гибели клеток. Цитокины включают как встречающиеся в природе пептиды, так и варианты, которые сохраняют полную или частичную биологическую активность. Определенные цитокины обладают аутокринной, паракринной и/или эндокринной активностью и посредством связывания с рецепторами могут вызывать ряд ответов в зависимости от цитокина и клетки-мишени. Среди многих функций цитокинов представлены контроль пролиферации и дифференциации клеток, и регуляция ангиогенеза, и иммунные и воспалительные ответы.

[0111] Термин «цитокиновый шторм» или «синдром высвобождения цитокинов»,

применяемый в данном документе, относится к физиологической реакции, которая может возникать у людей или других животных, при которой врожденная иммунная система вызывает неконтролируемое и избыточное высвобождение провоспалительных цитокинов, которые могут принести крайне серьезный вред или даже вызвать смерть человека или животного, испытывающего цитокиновый шторм/синдром. Цитокиновые штормы ассоциированы с широким рядом инфекционных и неинфекционных заболеваний и в некоторых примерах могут быть вызваны в ответ на введение человеку или животному чужеродного вещества, такого как терапевтическая биомолекула (например, моноклональное антитело). Цитокины, ассоциированные с цитокиновым штормом, могут включать без ограничения интерфероны, интерлейкины, хемокины, колониестимулирующие факторы (CSF) и факторы некроза опухоли (TNF).

[0112] Термины «снижает» или «уменьшает», применяемые в данном документе, относятся к снижению качества, количества или силы чего-либо. В качестве одного примера гликирование терапевтической биомолекулы (например, терапевтического моноклонального антитела) может обеспечивать снижение действенности терапевтической биомолекулы в обстоятельствах, когда происходит гликирование, в области терапевтической биомолекулы, важной для ее функции, например, в области, которая придает специфичность между терапевтической биомолекулой и молекулой-мишенью. В примере, где терапевтическая биомолекула представляет собой антитело, гликирование в одной или более CDR, соответствующих HC или LC, предпочтительно в CDR, соответствующей HC, более предпочтительно CDR3 HC, может обеспечивать снижение действенности антитела.

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

[0113] Как рассмотрено в данном документе, существует необходимость в методике, которую можно применять для надежного прогнозирования скоростей, с которыми происходит гликирование/дегликирование в биомолекуле как *in vitro*, так и *in vivo*, конкретно в терапевтической биомолекуле (например, терапевтическом антителе), в виде функции зависимости от по меньшей мере одного или более из концентрации сахара (например, концентрации глюкозы), времени, температуры и других переменных, включающих без ограничения pH.

Способы прогнозирования процента гликирования в биомолекуле *in vitro*

[0114] Терапевтическая биомолекула, такая как моноклональное антитело, может содержать любое число потенциальных сайтов для реакции гликирования, следовательно установление и определение характеристик гликирования в терапевтических биомолекулах может быть трудным. Гликирование в определенных областях терапевтической биомолекулы, не важное для специфического распознавания (например, связывания) целевого антигена, может переноситься без снижения действенности, однако стабильность может подвергаться влиянию. В качестве альтернативы гликирование аминокислотного основания, важного для связывания целевого антигена, может обеспечивать снижение действенности, что, в свою очередь, может неблагоприятным

образом повлиять на эффективное количество терапевтического средства, предназначенного для введения субъекту, нуждающемуся в этом. В случае, где эффективное количество биотерапевтического средства, предназначенного для введения субъекту, снижается на неизвестную величину вследствие сниженной действенности в результате гликирования, эффективность лечения может быть ухудшена. Например, гликирование аминокислоты в CDR (например, CDR1, CDR2, CDR3) HC антитела или в некоторых примерах LC антитела может обеспечивать снижение действенности. Следовательно, в случае терапевтических биомолекул, таких как mAb, гликирование является потенциальной CQA, для которой необходимы способы прогнозирования гликирования/скоростей дегликирования *in vitro*, например, в условиях хранения.

[0115] В пределах объема настоящего изобретения находятся способы анализа для оценки гликирования терапевтических биомолекул (например, антител). Примеры включают без ограничения способы, основанные на заряде, способы LC-MS, колориметрические анализы и боронатную аффинную хроматографию. Из способов, основанных на заряде, капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF) или капиллярное изоэлектрическое фокусирование под визуальным контролем (icIEF) предусматривает способы разделения, основанные на заряде, способные к выявлению гликирования вследствие потери положительного заряда в конкретных сайтах гликирования. Другим способом, основанным на заряде, является ионообменная хроматография (ИЕС), которую можно применять для разделения гликированных и негликированных белков, которые имеют отличия в поверхностных зарядах. В катионообменной хроматографии (СЕХ) применяется отрицательно заряженная ионообменная смола с аффинностью в отношении молекул с суммарными положительными поверхностными зарядами, и она может применяться как для препаративных, так и для аналитических целей и является применимой для разделения биомолекул при большом диапазоне молекулярных масс. СЕХ опирается на принцип, состоящий в том, что суммарный поверхностный заряд белка изменяется с pH таким образом, который диктуется изоэлектрической точкой (pI) белка. При pH равном pI белка белок не будет нести суммарного заряда. В качестве альтернативы при pH, ниже чем pI белка или выше чем pI белка, белок будет нести суммарный положительный или суммарный отрицательный заряд соответственно. Поскольку гликирование влияет на заряд белка СЕХ можно применять для разделения гликированных и негликированных форм одного и того же белка, например, терапевтического моноклонального антитела.

[0116] Способы LC-MS можно применять для определения уровня гликирования либо посредством матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI), либо посредством ионизации электрораспылением (ESI). Например, поскольку каждый сайт гликирования показывает сдвиг массы, составляющий +162 Да, можно применять подход с использованием нисходящей масс-спектрометрии в качестве быстрой оценки уровня гликирования в конкретной биомолекуле. Для определения расположения конкретного сайта гликирования можно применять подход с использованием восходящего

пептидного картирования. Например, по той причине, что трипсин ингибируется за счет гликирования остатков лизина, пропущенное триптическое расщепление с прибавлением массы, составляющим +162 Да, может указывать на гликированный остаток лизина.

[0117] Что касается колориметрических анализов, кетоамин, образованный в результате гликирования антитела, можно количественно определить с помощью анализа восстановления нитросинего тетразолия (NBT). NBT восстанавливается кетоаминовой формой гликированного белка, что приводит к изменению поглощения при 525 нм.

[0118] Что касается боронатной аффинной хроматографии (BAC), она представляет собой методику выделения и обогащения цис-диол-содержащих соединений. Боронатные функциональные группы на неподвижной фазе образуют тетраэдрический анион в условиях щелочного pH, который может взаимодействовать с цис-1,2-диольными структурами, обнаруженными на молекулах сахаров, и отделять гликированные разновидности соединений от негликированных. Для элюирования гликированных разновидностей соединений взаимодействия можно нарушать путем снижения pH или добавления конкурирующего источника гидроксильных групп, например, сорбита.

[0119] Как было упомянуто, гликирование терапевтической биомолекулы может влиять или может не влиять на действенность. Влияние гликирования на действенность можно изучить путем создания растворов биомолекул с различающимися уровнями гликирования (например, от 0% до 100%, от 1% до 90% и так далее). В качестве одного примера растворы биомолекул с различающимися уровнями гликирования можно получать путем смешивания гликированных и негликированных версий биомолекулы в различных соотношениях. Затем разные растворы биомолекул тестируют в любом анализе, целесообразном для оценки активности растворов. Например, растворы биомолекул можно тестировать в анализе на основе клеток или не на основе клеток, в которых средства для получения данных анализа относятся к действенности различных растворов биомолекул. В качестве иллюстративного примера для оценки действенности различных растворов биомолекул анализ на основе клеток может опираться на уровни экспрессии репортерного гена (например, люциферазы). Действенность может представлять собой меру способности конкретного раствора биомолекул репрессировать экспрессию или усиливать экспрессию по сравнению с другими растворами биомолекул, которые в ином одинаковые, за исключением того, что характеризуются большими или меньшими значениями процента гликирования. На основе полученных данных можно строить график для наглядной демонстрации показателя действенности (например, процента действенности) в виде функции зависимости от процента гликирования в различных растворах биомолекул. В качестве примеров чем больше процент гликирования, тем меньше действенность биомолекулы, и чем меньше процент гликирования, тем больше действенность.

[0120] Измерения действенности можно дополнительно подтвердить одним или более другими анализами, например, анализами связывания. Анализы связывания, целесообразные в случае настоящего изобретения, могут включать без ограничения

анализы, в которых оценивают аффинность связывания терапевтической биомолекулы (или ее части) с мишенью (например, антигеном). Такие анализы включают без ограничения анализы связывания на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET), анализы связывания на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), изотермическую титрационную калориметрию (ИТС), технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, в приборе VIAcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и терапевтической биомолекулы в качестве аналита или антилиганда) и т. п. Влияние на аффинность связывания терапевтической биомолекулы может быть выражена в виде функции зависимости от степени, до которой биомолекула подвергается гликированию, учитывая, что гликирование соответствует аминокислотному остатку, участвующему в распознавании и связывании молекулы-мишени. Например, аффинность между терапевтической биомолекулой и молекулой-мишенью может уменьшаться с повышением процента гликирования, и данное взаимоотношение аффинность-процент гликирования может коррелировать с действенностью терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от гликирования и/или быть ее показателем.

[0121] Поскольку действенность может изменяться в виде функции зависимости от гликирования терапевтических биомолекул, таких как терапевтические антитела, способность прогнозировать уровни гликирования терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от одной или более переменных, включающих без ограничения время, pH, температуру, ионную силу и т. п., может улучшить способность обеспечивать введение терапевтической биомолекулы с конкретной желаемой действенностью. Например, гликирование моноклонального антитела может происходить во время процесса ферментации, где глюкоза является источником энергии для клеток, продуцирующих mAb, и/или на уровень гликирования может влиять общая загрузка сахара во время процесса культивирования клеток млекопитающих. Затем уровень гликирования может дополнительно изменяться (например, повышаться или уменьшаться) с течением времени в зависимости от условий, в которых хранится антитело до введения. Например, биомолекула может подвергаться дегликированию в случае, когда сахар (например, глюкоза) не включен в состав для хранения или включен на уровне, который благоприятствует дегликированию. В качестве альтернативы возможно, что биомолекула может подвергаться дополнительному гликированию в случае, когда сахар включен в состав для хранения, например, где сахар включен в концентрации, которая благоприятствует повышенному гликированию.

[0122] В данном документе отмечено, что скорости дегликирования могут быть более быстрыми при более высоких температурах, и более медленными при более низких температурах. Поскольку условия хранения терапевтических биомолекул, в общем, характеризуются низкими температурами (например, 5°C или меньше, например 4°C или меньше или 0°C или меньше, как, например, -20°C или меньше, например -80°C), способность точно знать значения скорости дегликирования при таких низких

температурах была бы преимуществом. Однако, измерение значений скорости дегликирования при таких низких температурах может быть проблемным и времязатратным. Взамен этого, была бы преимуществом методика, которая обеспечивает возможность определения значений скорости дегликирования при более высоких температурах (например, 20-50°C), чтобы затем значения скорости дегликирования можно было прогнозировать при более низких температурах (например, 5°C или меньше).

[0123] Таким образом, в одном варианте осуществления в данном документе раскрыта методика измерения параметров дегликирование при более высоких температурах, чтобы параметры дегликирования можно было прогнозировать при более низких температурах (например, температурах, при которых хранятся терапевтические биомолекулы). В качестве примера методика включает определение кажущихся констант скорости реакции (например, « k_{app2} », как раскрыто в данном документе) для реакции дегликирования с применением кажущейся реакции дегликирования первого порядка (см. уравнение 6 в разделе Материалы и способы, следующем после раздела Примеры) при более высоких температурах (например, двух или более значениях температуры от 20°C до 60°C, например, 20-50°C, как, например, 20-45°C) в течение предварительно определенных временных отрезков (например, 5-40 дней) в отсутствие сахара (например, глюкозы) и построение графиков натуральных \log кажущихся констант скорости реакции от обратной функции температуры ($1000/K$). В обстоятельствах, где натуральный \log кажущихся констант скорости уменьшается примерно линейно с уменьшением температуры, данные можно аппроксимировать к прямой (например, коэффициент корреляции составляет 0,95 или выше, например, 0,98 или выше) для обеспечения возможности экстраполяции кажущихся констант скорости реакции дегликирования до более низких температур, таких как температуры, при которых хранятся терапевтические биомолекулы (например, 5°C или меньше). Таким образом, кажущиеся константы скорости реакции дегликирования можно прогнозировать при более низких температурах, опираясь на фактические данные, полученные при более высоких температурах. С применением прогнозируемой кажущейся константы скорости дегликирования при конкретной более низкой температуре (например, 5°C) можно сделать симуляцию прогнозируемого профиля дегликирования (например, с помощью уравнения 6 в разделе Материалы и способы, следующем после раздела Примеры) для этой конкретной более низкой температуры за любой желаемый временной отрезок (например, от 10 дней до 1 года, или даже больше чем один год, как, например, два года, три года, пять лет или больше). Если конкретно, прогнозируемый профиль дегликирования может предусматривать изменение процента гликирования конкретной терапевтической биомолекулы с течением времени при выбранной температуре.

[0124] Как рассмотрено выше, другие переменные, такие как pH, могут влиять на реакции гликирования/дегликирования. Следовательно, в ряде вариантов осуществления рассмотренная выше методика может быть проведена при двух или более (например, 3) разных уровнях pH. Для определения кажущейся энергии активации (E_a) для реакций

дегликирования при разных уровнях рН можно применять уравнение Аррениуса (уравнение 7 в разделе Материалы и способы, следующем после раздела Примеры). Если конкретно, кажущаяся энергия активации (E_a) при каждом значении рН может быть определена на основе углового коэффициента прямой, полученной при линейной аппроксимации графика натурального \log определенных кажущихся констант скорости реакции от обратной функции температуры. Это обеспечивает возможность понимания того, как рН влияет на значения скорости дегликирования, например, более низкие значения кажущейся энергии активации могут соответствовать более высоким скоростям дегликирования, а более высокие значения кажущейся энергии активации могут соответствовать более медленным скоростям дегликирования. Эту информацию можно применять/опираться на нее при составлении конкретной композиции, содержащей терапевтическую биомолекулу, для хранения. В качестве примера можно выбирать значение рН, соответствующее более высокой кажущейся энергии активации, если целью является замедление скорости дегликирования во время хранения. В качестве другого примера можно выбирать значение рН, соответствующее более низкой кажущейся энергии активации, если целью является повышение скорости дегликирования во время хранения.

[0125] Благодаря обеспечению способности прогнозирования процента гликирования в виде функции зависимости от времени при температурах, при которых хранятся терапевтические биомолекулы, может быть возможным введение эффективного количества терапевтической биомолекулы субъекту, нуждающемуся в этом, независимо от того, как долго хранилась терапевтическая биомолекула. Например, в ситуации, где дегликирование терапевтической биомолекулы происходит во время хранения, субъекту может быть введена меньшая дозировка, если биомолекула хранилась дольше (например, процент гликирования является меньшим, и, следовательно, действенность является более высокой), и субъекту может быть введена большая дозировка, если биомолекула хранилась в течение меньшего промежутка времени (например, процент гликирования больший, и, следовательно, действенность является меньшей), так, чтобы субъекту доставлялась одинаковая действенность терапевтического средства, независимо от времени хранения. В качестве дополнительных или альтернативных примеров может быть желательна корректировка дозировки согласно функции зависимости от времени в ответ на ухудшение или улучшение признаков или симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, и в таких примерах можно применять функцию зависимости действенности терапевтического средства от времени хранения, чтобы убедиться, что откорректированная дозировка соответствует желаемой действенности терапевтической биомолекулы, введение которой осуществляется.

[0126] Информация, касающаяся действенности по отношению к дозировке в виде функции зависимости от времени в условиях хранения (например, при конкретной температуре), может быть включена, например, в качестве части одного или более из инструкций по применению лекарственного препарата (PPI), инструкций по применению

(IFU), листов-вкладышей (MG) и т. п. Рассмотренные в данном документе PPI относятся к этикетке для пациента, которая является частью одобренной FDA этикетки для лекарственных средств. PPI разрабатываются изготовителем, одобряются FDA и требуется их распространение на конкретные продукты или классы продуктов. Другие PPI могут быть представлены изготовителем на рассмотрение FDA добровольно и одобрены FDA, но их обращение не является обязательным. Рассмотренные в данном документе IFU относятся к этикетке для пациента, которая разрабатывается изготовителем, одобряется FDA и распространяется на конкретные продукты, которые имеют сложные инструкции по введению доз, чтобы помочь пациенту применить продукт надлежащим образом. Рассмотренные в данном документе MG представляют собой отпечатанные на бумаге информационные материалы, которые поставляются вместе со многими рецептурными лекарственными препаратами. В инструкции обращено внимание на факторы, которые являются специфичными для конкретных лекарственных средств и классов лекарственных средств, и они содержат одобренную FDA информацию, которая может помочь пациентам избежать серьезных неблагоприятных явлений. FDA требует, чтобы MG выпускались вместе с определенными рецептурными лекарственными средствами и биологическими продуктами, если управление определяет, что 1) определенная информация необходима для предотвращения неблагоприятных эффектов, 2) процесс принятия решения пациентом должен опираться на информацию об известном побочном эффекте от продукта, или 3) строгое соблюдение пациентом указаний по применению продукта является обязательным для его эффективности.

[0127] Например, пациент может быть проинформирован посредством PPI, IFU, MG или т. п. касательно подходящей дозировки конкретного терапевтического средства, которую следует принимать, в виде функции зависимости от продолжительности хранения. Кроме того или в качестве альтернативы, врач или фармацевт может порекомендовать или выписать конкретную дозировку, которая зависит от прогнозируемого взаимоотношения между действенностью, дозировкой лекарственного средства и временем хранения.

[0128] Описанная выше методика может применяться для терапевтических биомолекул, где это желательно, чтобы в условиях хранения в состав не был включен сахар (например, глюкоза). Другими словами, такая методика опирается на определение процента гликирования до хранения, где конкретная терапевтическая биомолекула подвергается дегликированию с течением времени во время хранения.

Способы поддержания процента гликирования биомолекулы во время хранения

[0129] В другом варианте осуществления в данном документе отмечено, что в некоторых примерах является желательным обеспечение того, чтобы процент гликирования терапевтической биомолекулы, такой как терапевтическое антитело, оставался постоянным (например, не варьировался на более 0,1%, или более 0,5%, или более 1%, или более 5%, или более 10%) на протяжении предварительно определенного

количества времени в условиях хранения. Например, аналогично рассмотренному выше, конкретный процент гликирования может быть ассоциирован с конкретной действенностью, и может быть желательным поддержание этого конкретного процента гликирования и, следовательно, конкретной действенности в течение продолжительности хранения терапевтической биомолекулы до введения терапевтического средства субъекту, нуждающемуся в этом. В таком примере можно понять, что дозировку можно корректировать для повышения активности терапевтического средства, не учитывая любое изменение действенности в результате изменений уровней гликирования.

[0130] Чтобы получить концентрацию сахара (например, глюкозы), подлежащую включению в состав, который содержит терапевтическую биомолекулу, способную обратимо подвергаться реакциям гликирования/дегликирования, можно принимать во внимание по меньшей мере две переменные. Если конкретно, по меньшей мере две переменные могут относиться к действенности терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от уровня гликирования (например, процента гликирования) и равновесного уровня гликирования (например, процента равновесного гликирования). Когда желаемый уровень действенности экспериментально определен согласно функции зависимости от уровня гликирования, следующей стадией может быть определение концентрации сахара (например, глюкозы), необходимой в составе для поддержания конкретного уровня гликирования с течением времени в условиях хранения. Способ определения концентрации сахара, необходимой в составе для поддержания конкретного уровня гликирования, может включать инкубирование биомолекулы, характеризующейся процентом гликирования, соответствующим желаемому уровню действенности, с глюкозой в ряде разных концентраций и определение равновесного процента гликирования биомолекулы для каждой из разных концентраций глюкозы. В такой методике диапазон концентраций глюкозы может быть выбран так, чтобы убедиться, что ожидается, что по меньшей мере часть концентраций глюкозы приведет к тому, что биомолекула подвергнется повышенному гликированию с течением времени, и что по меньшей мере другая часть концентраций глюкозы приведет к тому, что биомолекула подвергнется реакции дегликирования с течением времени, при этом как реакция гликирования, так и реакция дегликирования достигают состояния равновесия (например, достижение плато) после некоторого количества времени. За счет выбора диапазона концентраций сахара так, чтобы происходили как реакции гликирования, так и реакции дегликирования, вероятным или ожидаемым может быть то, что по меньшей мере одна или более из протестированных концентраций сахара приведет к небольшому изменению процента гликирования с течением времени или не приведет к нему. Можно понять, что концентрации сахара, которые не приводят к дополнительным реакциям гликирования или дегликирования, предусматривают концентрацию, которая, если включена в состав, будет достаточной для поддержания желаемого процента гликирования на протяжении временного отрезка, в течение которого храниться терапевтическая биомолекула.

[0131] Например, это может быть концентрация сахара, которая приводит к

изменению процента гликирования, составляющему менее 0,1%, или менее 0,5%, или менее 1%, или менее 5%, или в некоторых примерах может быть приемлемым даже изменение, составляющее менее 10%. Ссылаясь на фигуру 3А с учетом примера 3 ниже, концентрация глюкозы, выбранная в диапазоне концентраций от 3 мМ до 6 мМ, может пониматься как таковая, которая соответствует концентрации глюкозы, в случае которой ожидается небольшое изменение процента гликирования или не ожидается его.

[0132] Также в пределах объема настоящего изобретения находится методика, в которой терапевтическая биомолекула может быть инкубирована с сахаром в конкретной концентрации (например, глюкозы) так, что достигается желаемый процент гликирования в пределах некоторого предварительно определенного количества времени (например, в пределах 1 дня, в пределах двух дней, в пределах 5 дней, в пределах 10 дней, в пределах 15 дней, в пределах одного месяца и так далее). В качестве иллюстративного примера желаемый процент гликирования терапевтической биомолекулы может предусматривать 40%, а исходный процент гликирования может предусматривать 25-27% после ее очистки. Концентрация глюкозы, подлежащая включению в состав, может быть эмпирически определена так, чтобы в пределах предварительно определенного количества времени процент гликирования терапевтической биомолекулы достигал желаемого равновесного уровня гликирования, составляющего 40%, а затем поддерживался в этом состоянии равновесия впоследствии в условиях хранения. В качестве примеров терапевтическую биомолекулу можно выдерживать при более высокой температуре (например, 20-40°C или какой угодно температуре, при которой проводили определения равновесного состояния гликирования) пока не будет заключено, что достигнут желаемый процент гликирования, а затем терапевтическую биомолекулу можно переносить в условия хранения (например, 5°C или меньше).

Способы снижения исходной действенности терапевтической биомолекулы *in vivo*

[0133] В данном документе отмечено, что обратимая природа гликирования в виде функции зависимости от концентрации сахара (например, глюкозы) может в некоторых обстоятельствах обеспечить способность контролировать действенность терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от степени (например, процента гликирования), до которой терапевтическая биомолекула подвергается гликированию. Как рассмотрено выше, один способ, с помощью которого можно контролировать действенность, может включать смешивание терапевтических биомолекул с разными процентами гликирования при определенных соотношениях с получением тем самым раствора терапевтических биомолекул с конкретным процентом гликирования. Другой пример может включать инкубирование терапевтической биомолекулы, которая подвергается гликированию до некоторой степени, с предварительно определенным количеством сахара (например, глюкозы) так, чтобы терапевтическая биомолекула достигала равновесного состояния гликирования при желаемом проценте гликирования. В таких примерах пациенту можно вводить терапевтическую биомолекулу,

характеризующуюся предварительно определенной действенностью.

[0134] Однако, дополнительно в данном документе отмечено, что вследствие обратимой природы гликирования в некоторых примерах реакции гликирования/дегликирования, вовлекающие терапевтическую биомолекулу, могут происходить *in vivo* после введения субъекту. Происходит ли реакция гликирования или реакция дегликирования *in vivo*, может зависеть от ряда факторов, включающих без ограничения исходный процент гликирования терапевтической биомолекулы при введении субъекту и концентрацию сахара (например, глюкозы) в организме субъекта, получающего терапевтическую биомолекулу. Например, терапевтическая биомолекула, характеризующаяся очень низким или отсутствующим гликированием при введении с течением времени пребывания в системе кровообращения, может стать гликированной до некоторого равновесного процента гликирования, основанного на концентрации глюкозы в кровотоке. С другой стороны терапевтическая биомолекула, которая гликирована в более значительной степени (например, гликирование 50%), может подвергаться реакции дегликирования с течением времени пребывания в системе кровообращения с достижением аналогичным образом некоторого равновесного процента гликирования, основанного на концентрации глюкозы в кровотоке. В случае, где реакция гликирования происходит с течением времени пребывания в системе кровообращения (например, терапевтическая биомолекула становится более гликированной), действенность биомолекулы с течением времени может быть снижена по сравнению с исходной действенностью биомолекулы при введении. В качестве альтернативы в случае, где реакция дегликирования происходит с течением времени пребывания в системе кровообращения (например, терапевтическая биомолекула становится менее гликированной), действенность биомолекулы с течением времени пребывания в системе кровообращения может быть повышена по сравнению с исходной действенностью биомолекулы при введении.

[0135] В данном документе отмечено, что в некоторых примерах может быть преимуществом введение нуждающемуся пациенту терапевтической биомолекулы с исходной действенностью, которая затем изменяется с течением времени (действенность повышается или уменьшается) после введения. Например, известно, что введение чужеродного вещества, такого как терапевтическая биомолекула, субъекту в некоторых обстоятельствах может вызвать некоторый уровень цитокинового шторма у субъекта. Один вариант уменьшения потенциала терапевтической биомолекулы для вызывания цитокинового шторма или другой нежелательный ответ в организме субъекта может включать введение субъекту терапевтической биомолекулы при сниженной действенности с ожиданием, что эта действенность повысится с течением времени пребывания в системе кровообращения. Этого можно достигнуть за счет регулирования процента гликирования терапевтической биомолекулы до первого процентного значения гликирования для введения субъекту, чтобы при введении терапевтической биомолекулы процент гликирования изменялся (например, уменьшался) до второго процентного

значения гликирования (равновесного процента гликирования) с течением времени пребывания в системе кровообращения. Это может обеспечить эффект доставки, в одной дозировке, терапевтической биомолекулы, которая изначально характеризуется сниженной действенностью, которая уменьшает потенциал вызывания цитокинового шторма и действенность которой повышается с течением времени пребывания в системе кровообращения.

[0136] Для обеспечения терапевтической биомолекулы со сниженной действенностью, которая повышается с течением времени пребывания в системе кровообращения после ее введения исходный процент гликирования должен быть более высоким, чем равновесный процент гликирования терапевтической биомолекулы *in vivo*. Равновесный процент гликирования терапевтической биомолекулы *in vivo* представляет собой функцию зависимости от концентрации глюкозы в системе кровообращения (например, средней концентрации глюкозы) на протяжении временного отрезка, в течение которого терапевтическая биомолекула находится в системе кровообращения. Например, уровни глюкозы у субъекта могут варьироваться с течением времени согласно функции зависимости от одной или более переменных, включающих без ограничения потребление пищи, продолжительность и/или интенсивность физической нагрузки, уровни стресса, продолжительность голодания и т. д. Следовательно, средние уровни глюкозы с течением времени таким образом могут быть более низкими для одних индивидуумов и более высокими для других индивидуумов. Например, индивидуумы с плохой регуляцией сахара в крови (например, инсулиновой резистентностью) в среднем могут быть склонны к более высоким значениям уровня глюкозы в крови.

[0137] В качестве иллюстративного примера при введении терапевтической биомолекулы субъекту терапевтическая биомолекула может достигать равновесного процента гликирования, составляющего 20-25%, по прошествии некоторого количества времени. Факторы, которые могут влиять на время, требующееся для достижения состояния равновесия, могут включать без ограничения исходный процент гликирования, скорость реакции дегликирования (или в некоторых примерах скорость реакции гликирования) (например, которая может представлять собой функцию того, насколько восприимчивы к гликированию конкретные аминокислоты) и вариабельность концентрации глюкозы с течением времени. Следовательно, с учетом примера выше терапевтическая биомолекула, характеризующаяся исходным процентом гликирования, составляющим 50%, путем уменьшения может достичь равновесного процента гликирования, составляющего 20-25%, по прошествии некоторого количества времени. С другой стороны, если терапевтическая биомолекула подлежит введению с процентом гликирования, меньшим, чем равновесный процент гликирования *in vivo*, например, 5% гликирование, то терапевтическая биомолекула может подвергаться гликированию с течением времени *in vivo* с достижением равновесного процента гликирования, составляющего 20-25%, с течением времени пребывания в системе кровообращения. Конечно, возможны разные значения равновесного процента гликирования для разных

индивидуумов в зависимости от уровней глюкозы индивидуумов. Например, равновесный процент гликирования может составлять 30-35% для индивидуума с более высокими средними уровнями глюкозы, а для индивидуумов с более низкими средними уровнями глюкозы равновесный процент гликирования может составлять 15-20%.

[0138] Следовательно, степень, до которой терапевтическая биомолекула изменяет действенность с течением времени *in vivo* от исходной действенности до конечной действенности (например, действенности, определяемой потенциалом равновесного состояния гликирования *in vivo*), можно понять как функцию зависимости от разницы исходного процента гликирования и равновесного процента гликирования *in vivo*. Соответственно, исходный процент гликирования может быть выбран так, чтобы терапевтическая биомолекула демонстрировала предварительно определенный уровень сниженной действенности (например, большой исходный процент гликирования), который повышается с течением времени до действенности, определяемой концентрацией глюкозы в системе кровообращения, или так, чтобы терапевтическая биомолекула демонстрировала предварительно определенный уровень повышенной действенности, которая уменьшается с течением времени до действенности, определяемой концентрацией глюкозы в системе кровообращения.

[0139] В примере, где исходный процент гликирования является более высоким, чем равновесный процент гликирования *in vivo*, и, следовательно, демонстрируется сниженная действенность при исходном введении субъекту, которая затем повышается с течением времени, исходная сниженная действенность может привести к одному или более из следующих эффектов. Например, сниженная исходная действенность может характеризоваться эффектом уменьшения в отношении одного или более признаков или симптомов, ассоциированных с цитокиновым штормом или другим неблагоприятным иммунным ответом, возникающие в результате введения терапевтической биомолекулы, по сравнению с в остальном такой же терапевтической биомолекулой без исходной сниженной действенности (например, гликированной до меньшей степени). Например, сниженная исходная действенность может привести к уменьшенной степени высвобождения одного или более цитокинов по сравнению с в остальном такой же терапевтической биомолекулой с отсутствием сниженной исходной действенности. Один или более цитокинов, степень высвобождения которых может быть уменьшена, могут включать без ограничения интерфероны, интерлейкины, хемокины, CSF, TNF и т. п. Снижение в отношении одного или более признаков или симптомов может включать снижение в отношении одного или более из покраснения, опухания или отека, лихорадки, боли, потери функции или других признаков или симптомов, ассоциированных с острым воспалением.

[0140] Дополнительно в данном документе отмечено, что в регуляции действенности терапевтической биомолекулы с течением времени *in vivo* могут состоять дополнительные или альтернативные преимущества. Если конкретно, концентрация терапевтической биомолекулы в системе кровообращения может уменьшаться с течением

времени в зависимости от одного или более соответствующих фармакокинетических параметров. Поскольку концентрация уменьшается с течением времени, это уменьшение обеспечивает снижение эффективного количества терапевтической биомолекулы в системе кровообращения. В данном документе отмечено, что данное снижение эффективного количества терапевтической биомолекулы в растворе может быть по меньшей мере частично ослаблено за счет доставки терапевтической биомолекулы при сниженной исходной действенности, которая затем повышается с течением времени пребывания в системе кровообращения до большей действенности, ассоциированной с равновесным процентом гликирования *in vivo*. Если конкретно, поскольку концентрация терапевтической биомолекулы уменьшается, действенность может соответственно повышаться, следовательно, компенсируя уменьшение концентрации с точки зрения эффективности терапевтического средства до по меньшей мере некоторой степени.

[0141] Таким образом, на основе вышесказанного можно понять, что для придания терапевтической биомолекуле сниженной исходной действенности, которая повышается *in vivo* с течением времени, прошедшим после введения, требуется, чтобы исходный процент гликирования был большим, чем равновесный процент гликирования *in vivo*. Поскольку средние значения уровня глюкозы могут варьироваться для индивидуумов, один аспект методики, раскрытой в данном документе, касающийся сниженной исходной действенности, которая повышается во время пребывания в системе кровообращения, может включать получение профиля концентраций глюкозы индивидуума до введения терапевтической биомолекулы, то есть степени, до которой снижается исходная действенность, и изменения действенности с течением времени можно эффективно контролировать/прогнозировать. Получение профиля концентраций глюкозы может быть выполнено путем получения результатов измерений глюкозы в крови в течение предварительно определенного периода времени, достаточного для отражения типичных концентраций глюкозы в крови, ассоциированных с индивидуумом. Результаты измерения глюкозы можно получать, например, посредством одного или более из традиционного глюкометра с забором крови из пальца и/или системы непрерывного мониторинга уровня глюкозы в крови. Понимая профиль концентраций глюкозы индивидуума (например, среднюю концентрацию глюкозы в виде функции зависимости от времени), можно выбрать исходный процент гликирования терапевтической биомолекулы на основе желаемой степени, до которой действенность снижается изначально, и которая повышается с течением времени до конечной действенности, диктуемой профилем концентраций глюкозы у субъекта.

[0142] В качестве иллюстративного примера типичная концентрация глюкозы в биореакторе может составлять 300-1000 мг/дл. В зависимости от концентрации, восприимчивости одной или более аминокислот к гликированию и т. д. конкретная терапевтическая биомолекула, полученная в таком биореакторе, может быть гликирована до некоторого уровня, который может быть эмпирически определен. В некоторых примерах процент гликирования конкретной терапевтической биомолекулы из

биореактора после очистки может быть большим, или в других примерах меньшим, чем равновесный процент гликирования терапевтической биомолекулы, реализуемый после введения субъекту *in vivo*. Степенью гликирования терапевтической биомолекулы можно дополнительно управлять в зависимости от желаемого исходного процента гликирования, например, путем смешивания определенных соотношений разных растворов терапевтической биомолекулы, гликированных до разных степеней, путем инкубирования терапевтической биомолекулы с концентрациями глюкозы так, чтобы достигалась желаемая исходная концентрация для равновесного состояния гликирования и т. п. Однако, как рассмотрено подробно выше, в отсутствие глюкозы терапевтическая биомолекула может подвергаться дегликированию с течением времени при хранении. Таким образом, в случае, где желательно, чтобы субъекту был доставлен конкретный исходный процент гликирования, например такой, что биомолекула демонстрирует сниженную исходную действенность, как было рассмотрено, то необходимо, чтобы биомолекула была составлена с некоторым количеством сахара (например, глюкозы) для поддержания желаемого исходного процента гликирования с течением времени при хранении до введения. В целом, можно понять, что такая концентрация сахара в составе может быть такой, чтобы исходный процент гликирования терапевтической биомолекулы поддерживался при проценте гликирования, большем, чем соответствующий равновесному проценту гликирования, реализуемому *in vivo* после введения. Равновесный процент гликирования, реализуемый *in vivo*, зависит от профилей глюкозы в крови индивидуумов, которые могут находиться в типичном диапазоне 70-180 мг/дл для здоровых индивидуумов и диапазон которых может быть большим (например, 70-500 мг/дл или даже выше) для индивидуумов с осложнениями вследствие основного заболевания, такого как диабет (например, I типа или II типа). Поскольку в случае, где желательно предоставить терапевтическую биомолекулу со сниженной исходной действенностью, которая затем повышается с течением времени пребывания в системе кровообращения, прошедшим после введения (исходный процент гликирования является большим, чем соответствующий равновесному проценту гликирования, достигаемому *in vivo*), можно понять, что может быть необходимо составить терапевтическую биомолекулу с концентрацией сахара (например, концентрацией глюкозы), которая по меньшей мере в какой-то степени выше, чем средние значения уровня глюкозы в крови у конкретного индивидуума. Следовательно, в качестве примеров терапевтическая биомолекула может быть составлена с глюкозой при концентрации, составляющей 150 мг/дл или выше, или 160 мг/дл или выше, или 170 мг/дл или выше, или 180 мг/дл или выше, или 190 мг/дл или выше, или 200 мг/дл или выше, или 210 мг/дл или выше, или 220 мг/дл или выше, или 230 мг/дл или выше, или 240 мг/дл или выше, или 250 мг/дл или выше, или 260 мг/дл или выше, или 270 мг/дл или выше, или 280 мг/дл или выше, или 290 мг/дл или выше, или 300 мг/дл или выше, или 310 мг/дл или выше, или 320 мг/дл или выше, или 330 мг/дл или выше, или 340 мг/дл или выше, или 350 мг/дл или выше, или 360 мг/дл или выше, или 370 мг/дл или выше, или 380 мг/дл или выше, или 390 мг/дл или

выше, или 400 мг/дл или выше, или 410 мг/дл или выше, или 420 мг/дл или выше, или 430 мг/дл или выше, или 440 мг/дл или выше, или 450 мг/дл или выше, или 460 мг/дл или выше, или 470 мг/дл или выше, или 480 мг/дл или выше, или 490 мг/дл или выше, или 500 мг/дл или выше, или 520 мг/дл или выше, или 540 мг/дл или выше, или 560 мг/дл или выше, или 580 мг/дл или выше, или 600 мг/дл или выше, или 620 мг/дл или выше, или 640 мг/дл или выше, или 660 мг/дл или выше, или 680 мг/дл или выше, или 700 мг/дл или выше, или 720 мг/дл или выше, или 740 мг/дл или выше, или 760 мг/дл или выше, или 780 мг/дл или выше, или 800 мг/дл или выше, или 820 мг/дл или выше, или 840 мг/дл или выше, или 860 мг/дл или выше, или 880 мг/дл или выше, или 900 мг/дл или выше, или 920 мг/дл или выше, или 940 мг/дл или выше, или 960 мг/дл или выше, или 980 мг/дл или выше, или 1000 мг/дл или выше, или 1100 мг/дл или выше, или 1200 мг/дл или выше, или 1300 мг/дл или выше, или 1400 мг/дл или выше, или 1500 мг/дл или выше, или 1600 мг/дл или выше, или 1700 мг/дл или выше, или 1800 мг/дл или выше, или 1900 мг/дл или выше, или 2000 мг/дл или выше.

Способы прогнозирования процента гликирования аминокислоты в терапевтической биомолекуле *in vivo*

[0143] Процент гликирования аминокислоты в терапевтической биомолекуле (например, терапевтическом антителе) может влиять на действенность, и, следовательно, действенность может варьироваться с течением времени в организме субъекта, получающего терапевтическую биомолекулу. Следовательно, способность прогнозировать процент гликирования с течением времени после введения может применяться для улучшения схем лечения.

[0144] В данном документе отмечено, что параметры, определенные *in vitro*, касающиеся значений скорости гликирования/дегликирования для конкретной терапевтической биомолекулы, можно применять в сочетании с равновесными уровнями (например, процентами) гликирования (полученными в исследованиях *in vitro* и/или *in vivo*) и исходным (например, перед введением) уровнем (например, процентом) гликирования для прогнозирования процента гликирования в виде функции зависимости от времени, прошедшего после введения терапевтической биомолекулы субъекту. Если конкретно, ссылаясь на уравнения 5 и 6 (см. раздел Материалы и способы, следующий после раздела Примеры), можно применять три аппроксимирующих параметра для обеспечения прогнозирования процента гликирования *in vivo* в виде функции зависимости от времени, при этом аппроксимирующие параметры представляют собой размах (например, разницу между исходным уровнем гликирования и равновесным уровнем гликирования), начальный уровень и скорость гликирования/дегликирования. Для реакции гликирования (уравнение 5) равновесный уровень гликирования представляет собой размах плюс исходный уровень. Для реакции дегликирования (уравнение 6) равновесный уровень гликирования представляет собой исходный уровень.

[0145] Исходный уровень гликирования может быть определен посредством LC-MS/MS, как рассмотрено выше, и в некоторых примерах можно применять смешивание

конкретных соотношений терапевтических биомолекул, гликированных до варьирующих степеней, для создания терапевтических биомолекул, гликированных до некоторого предварительно определенного процента.

[0146] Значения скорости гликирования/дегликирования, применимые для прогнозирования процента гликирования *in vivo* в виде функции зависимости от времени, можно получать *in vitro* при температуре, аналогичной температуре тела (например, 35-40°C, например 37°C), и при концентрациях глюкозы, которые, как ожидается, как правило обнаруживаются в организме соответствующего субъекта (например, людей, обезьян, собак, кошек, мышей и т. п.). Например, значения уровня глюкозы в крови, в общем, могут варьироваться от приблизительно 4 mM до приблизительно 7 mM, следовательно для методики прогнозирования *in vivo*, применимой, например, для людей или обезьян, эксперименты для определения значений скорости гликирования/дегликирования можно выполнять в присутствии от приблизительно 3 mM до приблизительно 8 mM глюкозы, например, приблизительно 4-7 mM глюкозы, например, любой концентрации глюкозы, соответствующей значению, выбранному из 3-8 mM глюкозы.

[0147] Равновесный процент гликирования можно определять одним или более способами. Равновесный процент гликирования представляет собой функцию зависимости от концентрации глюкозы, наблюдаемой у конкретной терапевтической биомолекулы. В примере 3 ниже наряду с соответствующими фигурами 3А - 3В рассматривается/проиллюстрировано, как можно получать равновесный процент гликирования на основе исследований *in vitro*, где терапевтическую биомолекулу инкубируют с глюкозой в разнящихся концентрациях. Если конкретно, равновесный процент гликирования, определенный *in vitro* при концентрации или концентрациях, которые по сути аналогичны таковым, наблюдаемым *in vivo* (например, 3-7 mM глюкозы), можно применять в виде равновесного процента гликирования для методики прогнозирования *in vivo*.

[0148] Дополнительно или в качестве альтернативы равновесный процент гликирования можно определять на основе исследований *in vivo*, где один или более субъектов получают конкретную терапевтическую биомолекулу, и затем получают образцы сыворотки крови в различные моменты времени и проводят LC-MS/MS с определением уровней гликирования, ассоциированных с терапевтической биомолекулой в системе кровообращения. Если уровни гликирования достигают плато (например, не выходят за рамки предварительно определенного диапазона для предварительно определенного количества времени), то может быть определено, что процент гликирования, соответствующий плато, предусматривает равновесный процент гликирования.

[0149] В пределах объема настоящего изобретения равновесные уровни гликирования для конкретных терапевтических биомолекул могут коррелировать с уровнями глюкозы *in vivo*, например, средними уровнями глюкозы за некоторое

предварительно определенное количество времени (например, 2-60 дней или любое число дней между этими точками). Уровни глюкозы *in vivo* можно определять, например, посредством системы непрерывного мониторинга уровня глюкозы в крови (CGM) или другим способом, таким как традиционные устройства с забором крови из пальца. Следовательно, на основе такой ассоциации субъекту с первым значением уровня глюкозы может соответствовать первое значение равновесного процента гликирования для конкретной терапевтической биомолекулы, при этом субъекту со вторым значением уровня глюкозы может соответствовать второе значение равновесного процента гликирования для этой же терапевтической биомолекулы. Установление корреляции между значениями уровня глюкозы для конкретных индивидуумов и ожидаемыми равновесными процентами гликирования для конкретной терапевтической биомолекулы может улучшить точность в выражении прогнозирования процента гликирования для конкретной терапевтической биомолекулы *in vivo*.

[0150] В качестве одного примера значения равновесного процента гликирования можно получать в ходе клинического испытания конкретной терапевтической биомолекулы. В таком примере значения уровня глюкозы в крови можно регулярно подвергать мониторингу, чтобы можно было выяснить корреляцию между значениями уровня глюкозы в крови и равновесным процентом гликирования. Затем, данная корреляция может применяться впоследствии в методике прогнозирования процентов гликирования *in vivo* для последующих индивидуумов, где уровни глюкозы в крови у этих индивидуумов либо измеряются, либо выводятся (например, выводятся на основе качественных признаков, таких как вес, уровень физической нагрузки, пищевые привычки и т. п., и/или на основе одного или более прошедших тестов на глюкозу, проведенных в качестве части посещения больницы или врача, или других результатов лабораторных испытаний), и эти уровни глюкозы в крови применяют для выведения равновесного процента гликирования.

[0151] Как было упомянуто, способность прогнозировать процент гликирования в виде функции зависимости от времени после введения терапевтической биомолекулы субъекту может обеспечивать возможность прогнозирования действенности, ассоциированной с этой терапевтической биомолекулой *in vivo*, в виде функции зависимости от времени. Например, до введения действенность в виде функции зависимости от процента гликирования может быть установлена *in vitro* (см. пример 1 и фигуру 2). Полученные данные можно аппроксимировать к уравнению, которое обеспечивает возможность прогнозировать действенность для любого процента гликирования, составляющего от 0% до 100%. Таким образом, прогнозирование процента гликирования *in vivo*, в свою очередь, может обеспечивать возможность прогнозирования действенности терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от времени, прошедшего после введения субъекту.

ПРИМЕРЫ

[0152] Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов

средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к применяемым числам (например, количеству, температуре и т. п.), но необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по весу, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. С помощью анализа вариантов mAb-1, отличающихся по заряду, посредством СЕХ и пептидного картирования с использованием LC-MS выявляют разновидности соединений с обратимым гликированием в HC-CDR3-Lys98

[0153] СЕХ применяли для разделения вариантов mAb-1, отличающихся по заряду. Две основных разновидности соединений элюировались на 8,9 и 9,5 минутах, и ряд минорных разновидностей соединений элюировались раньше, чем 8,6 минуты, и позже, чем 10 минут (фигура 1A). Фракции этих двух основных разновидностей соединений в mAb-1 в чистом виде, элюирующих на 8,9 и 9,5 минутах, составляли примерно 27% и 47% общей площади пика соответственно. После инкубирования mAb-1 в 10 mM гистидине, pH 6,0, и при 37°C в течение 14 дней относительное количество образца, элюированного на 8,9 минуты, уменьшалось, а относительное количество образца, элюированного на 9,5 минуты, повышалось на примерно такое же количество (см. дорожку 110, фигура 1A), что свидетельствует от том, что продолжающаяся реакция в пределах белка приводит к взаимному превращению образцов, элюированных на 8,9 и 9,5 минутах, что может отображать отличие их поверхностного заряда.

[0154] Чтобы понять химическую природу этих двух вариантов mAb-1, отличающихся по заряду, их очищали посредством СЕХ с последующим анализом посредством пептидного картирования с использованием LC-MS с установлением и количественным определением посттрансляционных модификаций (PTM) в этих двух вариантах. Данный анализ показал сдвиг массы, составляющий +162,7 Да, в HC-CDR3-Lys98 в разновидности соединения, элюирующей на 8,9 минуты, но не в разновидности соединения, элюирующей на 9,5 минуты. Данный сдвиг массы приписывали гликированию в HC-CDR3-Lys98. Дополнительный анализ указывал, что уровни гликирования в разновидностях соединения, элюирующих на 8,9 минуты и 9,5 минуты, составляли 88% и 1% соответственно. Других PTM, которые бы значительно отличались в пределах этих двух разновидностях соединения, не было установлено. Аналогично, в другой CDR3 тяжелой цепи (HC*) находится лизин в положении 98 (известный как HC*-CDR3-Ly98) с отсутствием выявляемого уровня гликирования.

[0155] Анализ посредством пептидного картирования с использованием LC-MS mAb-1 в чистом виде (см. дорожку 130 на фиг. 1B) и mAb-1 после инкубации при 37°C в

течение 14 дней (см. дорожку 135 на фиг. 1B) в отсутствие глюкозы показал уменьшение пика гликированного пептида HC-CDR3-Lys98 и сопутствующее увеличение пика нативного (т. е. негликированного) пептида HC-CDR3-Lys98 в mAb-1, инкубированном при 37°C (фигура 1B), что согласуется с результатам СЕХ. Уровни гликирования в mAb-1 в чистом виде (дорожка 130) и в mAb-1 после инкубации при 37°C (дорожка 135) в отсутствие глюкозы составляли 32,0% и 2,0% соответственно, подтверждая обратимую природу данной реакции и согласованность уровней гликирования, количественно определенных посредством СЕХ и LC-MS (как правило, отличающихся на $\leq 5\%$).

[0156] Чтобы узнать, обусловлено ли данное гликирование глюкозой, mAb-1 инкубировали с 0,1 М глюкозой при 37°C в течение 14 дней. Наблюдали повышение количества разновидностей соединения с гликированным HC-CDR3-Lys98 с сопутствующим снижением количества негликированных разновидностей соединения (см. дорожку 115, фигура 1A). Аналогично уровень гликирования повышался согласно определению посредством пептидного картирования с использованием LC-MS (данные не показаны). Анализы посредством СЕХ и LC-MS вместе указывали на то, что реакция гликирования является обратимой и что уровень гликирования зависит от присутствия глюкозы в растворе.

Пример 2. Степень гликирования в HC-CDR3-Lys98 коррелирует с действенностью лекарственного средства

[0157] Чтобы определить, влияет ли гликирование в HC-CDR3-Lys98 на биологическую активность, гликированные и негликированные формы mAb-1, очищенные посредством полупрепаративной СЕХ-хроматографии, смешивали при различных соотношениях с созданием образцов mAb-1 с уровнем гликирования, находящимся в диапазоне от 1% до 88% (что определено посредством пептидного картирования на основе LC-MS), и подвергали клеточному анализу действенности. Результаты указывают на линейную и обратную корреляцию между уровнем гликирования в HC-CDR3-Lys98 и действенностью, при этом более высокий уровень гликирования в HC-CDR3-Lys98 ассоциирован с более низким уровнем действенности лекарственного средства (фигура 2). Кроме того, аффинность связывания с соответствующим антигеном, измеренная с помощью Biacore, указывает на то, что mAb-1 с гликированием, составляющим 88%, характеризуется примерно двукратным уменьшением значений скорости ассоциации по сравнению с mAb-1 с гликированием, составляющим 1%, что приводит к приблизительно двукратному уменьшению аффинности связывания (данные не показаны). Это согласуется с результатами анализа действенности на основе клеток. Введение мутации в данный HC-CDR3-Lys98 с получением аргинина обеспечивает снижение аффинности связывания в более чем 20 крат (данные не показаны). Эти результаты вместе свидетельствуют о том, что HC-CDR3-Lys98 является критическим для связывания mAb-1 с антигеном и его гликирование может ослаблять аффинность связывания.

Пример 3. Реакция гликирования HC-CDR3-Lys98 зависит от концентрации

глюкозы в растворе

[0158] Чтобы понять влияние глюкозы на гликирование в HC-CDR3-Lys98 6,9 мкМ mAb-1 (~ 1 мг/мл) инкубировали с глюкозой в разных концентрациях, от 0,3 мМ до 111 мМ, при 37°C в течение 28 дней. Уровень гликирования в mAb-1 в начале инкубации составлял примерно 27% в HC-CDR3-Lys98. В ходе инкубации уровень гликирования в HC-CDR3-Lys98 медленно уменьшался, когда растворы содержали ≤ 3 мМ глюкозы. При более высокой концентрации глюкозы (≥ 6 мМ) свободная глюкоза ковалентно связывается с негликированным HC-CDR3-Lys98, повышая уровень гликирования с течением времени до достижения равновесного состояния (фигура 3А).

[0159] Анализировали кинетику гликирования с помощью моделей первого порядка (уравнение 5 и 6) путем разрешения трех аппроксимирующих параметров, кажущейся константы скорости, k_{app} , и размаха, A , и исходного уровня, b , для каждого условия в растворе (таблица 1), где уровень гликирования в состоянии равновесия определяли на основе выражения $A+b$ для реакции гликирования, и на основе b для реакции дегликирования. Термодинамическую модель (уравнение 9), основанную на простой химической реакции: (G: свободная глюкоза; P: негликированный mAb-1; PG: гликированный mAb-1, схема 2 в примере 8), применяли для непосредственной аппроксимации равновесного уровня гликирования при различных концентрациях глюкозы (фигура 3В), что давало константу ассоциации K при наилучшей аппроксимации, равняющуюся $112 (\pm 40) \text{ M}^{-1}$ (таблица 2). Кроме того, кинетическую модель, основанную на этой же химической реакции, применяли для определения скоростей гликирования (k_1) и дегликирования (k_{-1}) (уравнение 8). Глобальный анализ данных на основе разных концентраций глюкозы давал при наилучшей аппроксимации $k_1=8,89 (\pm 1,79) \text{ M}^{-1} \text{ день}^{-1}$ и $k_{-1}=0,09 (\pm 0,02) \text{ день}^{-1}$. Константа ассоциации, K , рассчитанная на основе k_1 и k_{-1} , составляет 99 M^{-1} , статистически идентичная K , полученной на основе термодинамического анализа. Константа диссоциации ($K_D=1/K$) данной реакции составляет примерно 8-10 мМ, что свидетельствует о том, что уровень гликирования в HC-CDR3-Lys98 будет зависеть от фактической концентрации глюкозы в среде для культивирования клеток в любой заданный момент времени, как правило, находящейся в диапазоне от 5 мМ до 55 мМ. Следовательно, для получения mAb-1 с постоянным профилем вариантов, отличающихся по заряду, важно поддерживать постоянный уровень глюкозы во время процесса культивирования клеток.

[0160] Таблица 1. Кажущаяся кинетика дегликирования mAb-1 в разных условиях в растворе

Тип буфера	pH буфера	[Глюкоза] (M)	Температура реакции (°C)	[mAb-1] (M)	$k_{app}(\text{день}^{-1})^a$	Разм. (%) ^b
HEPES	7,4	0,1	37	$6,9 \times 10^{-6}$	Не применимо	$57 (\pm 6)$

HEPES	7,4	0,06	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,93 ($\pm 0,16$)	53 (± 5)
HEPES	7,4	0,03	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,33 ($\pm 0,04$)	42 (± 2)
HEPES	7,4	0,01	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,27 ($\pm 0,03$)	19 (± 1)
HEPES	7,4	0,006	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,14 ($\pm 0,10$)	5 (± 1)
HEPES	7,4	0,003	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,17 ($\pm 0,03$)	7 (± 1)
HEPES	7,4	0,0006	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,13 ($\pm 0,01$)	22 (± 1)
HEPES	7,4	0,0003	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,08 ($\pm 0,01$)	25 (± 1)
HEPES	7,4	0	37	$6,9 \times 10^{-6}$	0,10 ($\pm 0,01$)	29 (± 1)
Гистидин	6,0	0	45	$1,4 \times 10^{-5}$	0,18 ($\pm 0,03$)	26 (± 2)
Гистидин	6,0	0	40	$1,4 \times 10^{-5}$	0,075 (\pm 0,010)	26 (± 1)
Гистидин	6,0	0	35	$1,4 \times 10^{-5}$	0,058 (\pm 0,008)	27 (± 1)
Гистидин	6,0	0	30	$1,4 \times 10^{-5}$	0,035 (\pm 0,005)	28 (± 1)
Гистидин	6,0	0	20	$1,4 \times 10^{-5}$	0,009 (\pm 0,001)	27 (± 1)
Гистидин	5,5	0	45	$1,4 \times 10^{-5}$	0,14 ($\pm 0,02$)	26 (± 2)
Гистидин	5,5	0	40	$1,4 \times 10^{-5}$	0,062 (\pm 0,008)	26 (± 1)
Гистидин	5,5	0	35	$1,4 \times 10^{-5}$	0,047 (\pm 0,006)	27 (± 1)
Гистидин	5,5	0	30	$1,4 \times 10^{-5}$	0,027 (\pm 0,004)	27 (± 1)
Гистидин	5,5	0	20	$1,4 \times 10^{-5}$	0,006 (\pm 0,001)	27 (± 1)

Гистидин	5,0	0	45	$1,4 \times 10^{-5}$	0,085 (\pm 0,013)	25 (\pm 1)
Гистидин	5,0	0	40	$1,4 \times 10^{-5}$	0,036 (\pm 0,005)	26 (\pm 1)
Гистидин	5,0	0	35	$1,4 \times 10^{-5}$	0,028 (\pm 0,004)	27 (\pm 1)
Гистидин	5,0	0	30	$1,4 \times 10^{-5}$	0,016 (\pm 0,003)	27 (\pm 1)
Гистидин	5,0	0	20	$1,4 \times 10^{-5}$	0,003 (\pm 0,001)	27 (\pm 1)

^a Кажущуюся константу скорости, k_{app} , определяли на основе модели первого порядка либо для реакции гликирования (уравнение 5), либо дегликирования (уравнение 6).

^b Размах, *разм.*, определяли на основе модели первого порядка либо для реакции гликирования (уравнение 5), либо дегликирования (уравнение 6).

[0161] Таблица 2. Термодинамические параметры дегликирования mAb-1 в разных условиях в растворе

Тип буфера	pH буфера	Температура реакции (°C)	[mAb-1] (M)	K (M ⁻¹) ^a	ΔG (ккал/моль) ^b
HEPES	7,4	37	$6,9 \times 10^{-6}$	112 (\pm 40)	-2,91 (-3,10, -2,64)
Гистидин	6,0	45	$6,9 \times 10^{-6}$	16 (\pm 7)	-1,75 (-1,98, -1,39)
Гистидин	6,0	37	$6,9 \times 10^{-6}$	23 (\pm 9)	-1,93 (-2,14, -1,63)
Гистидин	6,0	30	$6,9 \times 10^{-6}$	25 (\pm 8)	-1,94 (-2,11, -1,71)
Гистидин	6,0	25	$6,9 \times 10^{-6}$	26 (\pm 9)	-1,93 (-2,11, -1,68)
Гистидин	6,0	15	$6,9 \times 10^{-6}$	32 (\pm 16)	-1,98 (-2,22, -1,59)

^a Кажущуюся константу ассоциации, K, определяли на основе модели связывания 1:1 (уравнение 9).

^b ΔG реакции гликирования рассчитывают на основе $\Delta G = -RT \ln K_{app}$, где R представляет собой газовую постоянную, и T представляет собой абсолютную температуру в градусах

Кельвина для эксперимента.

Пример 4. Кинетика дегликирования HC-CDR3-Lys98 зависит от температуры и pH в растворе и соответствует поведению согласно уравнению Аррениуса

[0162] Влияние температуры на кинетику дегликирования исследовали путем инкубирования 13,8 мкМ mAb-1 в растворах без глюкозы (10 мМ гистидина, 0,05% полисорбата 20 и 292 мМ сахарозы) и при значениях температуры, находящихся в диапазоне от 20°C до 45°C, в течение не более 35 дней. Исходные mAb-1 были на примерно 27% гликированными в HC-CDR3-Lys98. При всех протестированных температурах mAb-1 подвергалось дегликированию с течением времени. Данная реакция является специфичной исключительно для восстанавливающего сахара, поскольку присутствие избыточного количества невосстанавливающего сахара, сахарозы, не влияет на уровень гликирования. Другим критическим фактором, который влияет на кинетику гликирования, является pH. Действительно, при одинаковых температурах инкубации и без глюкозы кажущееся дегликирование происходит быстрее при pH 6,0, чем при pH 5,0 (фигуры 4А - 4С).

[0163] Кинетическую модель первого порядка применяли для определения значений скорости дегликирования с целью понять зависимость дегликирования mAb-1 от температуры (таблица 1). При всех трех условиях pH (pH 5,0, pH 5,5 и pH 6,0) натуральный log кажущихся констант скорости линейно уменьшался с уменьшением температуры, что свидетельствует о том, что кинетика дегликирования соответствует поведению согласно уравнению Аррениуса в диапазоне от 20°C до 45°C (фигура 4D). С применением уравнения Аррениуса (уравнение 7) рассчитывали кажущуюся энергию активации, E_a , и она составляла 23,5 ($\pm 2,1$), 23,1 ($\pm 1,8$) и 21,4 ($\pm 1,7$) ккал/моль при значении pH, равном 5,0, 5,5 и 6,0 соответственно. Более низкая E_a при более высоком значении pH свидетельствует о том, что энергетический барьер дегликирования является более низким, поскольку наблюдали более высокие скорости реакции при более высоком значении pH. Это согласуется с pH-зависимой скоростью реакции.

[0164] Далее, поведение согласно уравнению Аррениуса экстраполировали для определения значений скорости дегликирования при 5°C. Константы скорости дегликирования при 5°C, определенные путем экстраполяции, составляют 0,0011, 0,0007 и 0,0004 день⁻¹ при значениях pH, составляющих 6,0, 5,5 и 5,0 соответственно. Эти значения скорости позволяют симулировать профили дегликирования при 5,0°C с применением уравнения 6, где A_2 задают как уровень гликирования в $t=0$, а k_{app} задают как экстраполированное значение скорости дегликирования (0,0011, 0,0007 и 0,0004 день⁻¹ при значениях pH, составляющих 6,0, 5,5 и 5,0 соответственно) при 5,0°C. Как показано на фигуре 4E симулированные профили и данные касательно дегликирования в реальном времени при 5°C согласуются в течение по меньшей мере 36 месяцев, что указывает на то, что кинетика дегликирования 1) соответствует поведению согласно уравнению Аррениуса даже при более низких температурах (например, 5°C) и 2) может быть хорошо спрогнозирована на основе экспериментов с кратковременной инкубацией при более

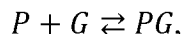
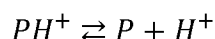
высоких температурах.

Пример 5. Зависимость равновесного состояния гликирования от pH указывает на низкое значение pK_a аминокетильной группы в HC-CDR3-боковой цепи Lys98

[0165] Чтобы понять зависимость гликирования от pH, 6,9 мкМ mAb-1 инкубировали в разных буферах со значением pH, находящимся в диапазоне от 5 до 8, и с глюкозой в концентрациях, варьирующих от 3 мМ до 11 мМ, до тех пор, пока гликирование не достигнет состояния равновесия. Равновесный уровень гликирования определяли с применением моделей кажущейся кинетики первого порядка и наносили на график в виде функции зависимости от pH (фигуры 5А - 5С). При постоянном pH (например, pH 7,0) более высокий равновесный уровень гликирования наблюдали при более высоких концентрациях глюкозы, что согласовывалось с предыдущими результатами. При постоянных концентрациях глюкозы уровень гликирования нелинейно повышался с повышением pH. Компоненты буфера не оказывали явного эффекта на уровень гликирования mAb-1 (фигуры 5А - 5С).

[0166] Простую равновесную модель применяли для количественного анализа pH-зависимого гликирования. Эта модель являет собой две реакции: депротонирование амина при HC-CDR3-боковой цепи Lys98 и связывание глюкозы с депротонированным амином, как показано ниже.

[0167] Схема 1,



где PH^+ и P представляют собой mAb-1 с протонированным и депротонированным амином при HC-CDR3-боковой цепи Lys98 соответственно, G представляет собой свободную глюкозу, H^+ представляет собой свободный протон, PG представляет собой mAb-1, гликированный при HC-CDR3-Lys98, K_1 представляет собой константу равновесия для реакции депротонирования и K_2 представляет собой константу равновесия для реакции гликирования.

[0168] Общую наблюдаемую фракцию гликированного mAb-1 (% гликирования) можно записать таким образом:

$$\% \text{ гликирования} = \left(\frac{[PG]}{[P_t]} \right) \cdot 100 \text{ уравнение 1,}$$

где $[PG]$ представляет собой концентрацию гликированного mAb-1 и $[P_t]$ представляет собой концентрацию общего mAb-1. В соответствии с законом сохранения массы на схеме 1 $[P_t]$ равняется сумме $[P]$, $[PH^+]$ и $[PG]$, где $[P]$ представляет собой концентрацию депротонированного mAb-1 и $[PH^+]$ представляет собой концентрацию протонированного mAb-1.

[0169] Следовательно, уравнение 1 можно выразить следующим образом:

$$\% \text{ гликирования} = \left(\frac{[PG]}{[P] + [PH^+] + [PG]} \right) \cdot 100 = \left(\frac{K_2 [P] [G]}{[P] + \left(\frac{[P] [H^+]}{K_1} \right) + K_2 [P] [G]} \right) \cdot 100 \text{ уравнение 2,}$$

с последующей перегруппировкой с получением уравнения 3,

$$\% \text{гликирования} = \left(\frac{K_1 K_2 [G]}{[H^+] + K_1 + K_1 K_2 [G]} \right) \cdot 100 \text{ уравнение 3,}$$

где $[G]$ и $[H^+]$ представляют собой концентрации свободной глюкозы и свободных протонов в растворе соответственно. pK_a ϵ -аминогруппы в HC-CDR3-Lys98 может быть определена на основе $pK_a = -\log(K_1)$, и K_2 является независимой от pH, микроскопической константой ассоциации для реакции гликирования.

[0170] Уравнение 3 применяли для глобальной аппроксимации трех наборов данных для состояния равновесия, показанных на фигурах 5A - 5C. В анализе с помощью нелинейного метода наименьших квадратов (NLLS) $[H^+]$ определяли на основе измеренного pH; $[G]$ получали косвенным образом путем решения в диапазоне значений, составляющем $0 < [G] < [G_t]$ ($[G_t]$ представляет собой общую концентрацию глюкозы, определенную на основе концентраций добавленной и связанной глюкозы), при этом $[P_t]$ задавали как 6,9 мкМ для каждого условия. Данный анализ при наилучшей аппроксимации давал глобальные параметры: $K_1 = 2,03 (\pm 0,76) \times 10^{-7}$ М, и $K_2 = 120 (\pm 26) \text{ M}^{-1}$, согласно которым pK_a ϵ -аминогруппы в HC-CDR3-Lys98 была вычислена как 6,7 (6,6, 6,9). Это значение pK_a является более низким, чем типичное значение pK_a ϵ -аминогруппы лизина (10,4) в воде.

Пример 6. Термодинамический анализ указывает на то, что реакция гликирования обусловлена энтальпией

[0171] Чтобы понять движущую силу реакции гликирования, измеряли кажущуюся константу ассоциации, K , для связывания глюкозы с HC-CDR3-Lys98 путем инкубирования 6,9 мкМ mAb-1 с глюкозой в разных концентрациях и при значениях температуры, находящихся в диапазоне от 15°C до 45°C. Равновесный уровень гликирования определяли для каждого условия, затем проводили анализ с помощью NLLS с определением K при каждом значении температуры (фигуры 6A - 6E и таблица 2). Значение K слегка уменьшалось с повышением температуры, что свидетельствует о том, что реакция не обусловлена изменением энтропии. С применением анализа уравнения Вант-Гоффа (построение графика $\ln(K)$ от $1/T$) (фигура 7) определяли изменения энтальпии ($\Delta H = -4,0 (\pm 0,8) \text{ ккал/моль}$) и энтропии ($\Delta S = -0,007 (\pm 0,003) \text{ ккал/моль}\cdot\text{K}$), указывающие на то, что гликирование в HC-CDR3-Lys98 преимущественно обусловлено энтальпией. Небольшое и отрицательное изменение энтропии свидетельствует о том, что общая микросреда может быть более ограничена при гликировании. В таблице 3 ниже проиллюстрировано обобщение информации касательно кинетики и термодинамики на основе схем 1, 2 и анализа уравнения Вант-Гоффа для реакции гликирования mAb-1 при 37°C.

[0172] Таблица 3. Обобщение информации касательно кинетики и термодинамики реакции гликирования mAb-1 при 37°C

	Анализ кинетики и	Анализ	Анализ уравнения

	термодинамики на основе схемы 2			термодинамики на основе схемы 1		Вант-Гоффа	
	k_1 (M^{-1} день $^{-1}$)	k_1 (M^{-1})	$K^\#$ (M^{-1})	K_1 (M)	K_2 (M^{-1})	ΔH (ккал/ моль)	ΔS (ккал/ моль·K)
Информация касательно кинетики и термодинамики							
Параметры при наилучшей аппроксимации	8,89 (± 1,79)	0,09 (± 0,02)	112 (± 40)	2,03 (± 0,76) × 10 $^{-7}$	120 (± 26)	-4,0 (± 0,8)	-0,007 (± 0,003)

[#]K определяли на основе уравнения 9.

Пример 7. Структурный анализ свидетельствует о том, что HC-CDR3-Lys98 окружен менее полярной микросредой

[0173] Лизины с пониженными значениями pK_a , как правило, обнаруживаются погруженными в белок или окружены менее полярной микросредой. Сдвиг pK_a может применяться для расчета кажущейся диэлектрической константы, ϵ_{app} , с применением формулы Борна:

$$1.36z(pK_{a,ref} - pK_a) = \frac{332 \cdot Z^2}{2r_{cav}} \left(\frac{1}{\epsilon_{app}} - \frac{1}{\epsilon_{H_2O} e^{kr_H}} \right) + \frac{332 \cdot Z^2}{2r_H} \left(\frac{1}{\epsilon_{H_2O} e^{kr_H}} - \frac{1}{\epsilon_{app}} \right)$$

уравнение 4,

где z представляет собой зарядовое число боковой цепи лизина, $pK_{a, ref}$, представляет собой эталонную pK_a для лизина в воде, Z представляет собой валентность переносимого иона, r_{cav} представляет собой радиус полости ионизируемой части лизина, r_H представляет собой гидродинамический радиус mAb-1, ϵ_{H_2O} представляет собой диэлектрическую константу воды, и k представляет собой обратную дебаевскую длину mAb-1. Согласно данному способу допускается, что отличие внутренней энергии между заряженным лизином в воде и HC-CDR3-Lys98 в локальной среде является единственным фактором, способствующим сдвигу pK_a . С применением следующих параметров: $pK_{a, ref}=10,4$, $Z=1$, $r_{cav}=2 \text{ \AA}$, $r_H=49 \text{ \AA}$, $\epsilon_{H_2O}=74,2$ (при 37°C), и $k=8.7E-4 (1/\text{\AA})$, расчетная кажущаяся диэлектрическая константа, ϵ_{app} , составляет 13,0, что значительно ниже, чем соответствующее диэлектрическое свойство в воде, что указывает на то, что локальная среда HC-CDR3-Lys98 является менее гидратированной.

[0174] Чтобы понять локальную среду HC-CDR3-Lys98 строили гомологичную модель путем конструирования одного гетеродимера из HC и легкой цепи (LC) за один раз (фигура 8A и 8B). Прогнозируемые структуры mAb-1 свидетельствуют о том, что боковая

цепь HC-CDR3-Lys98 находится в неполярной среде, окруженной ароматическими кольцами Tyr32, Phe27 и Tyr106 (фигура 8A) и алифатической боковой цепью Val2. Напротив, HC*-CDR3-Lys98 находится в более полярной среде, где боковая цепь обращена к гидроксильной группе Tyr32 и Tyr109 и находится в непосредственной близости к карбоксильной группе боковой цепи Asp112, которая потенциально может образовывать ионную связь, стабилизирующую локальную среду HC*-CDR3-Lys98 (фигура 8C). Проводили симуляцию молекулярной динамики (MD) для соединения глюкозы с HC-CDR3-Lys98 (фигура 8B). ΔG для данного взаимодействия оценивали как -2,8 ккал/моль, что отлично согласовалось с экспериментальными данными (таблица 2). Результаты анализов *in silico* вместе согласуются с термодинамическими измерениями, что свидетельствует о том, что HC-CDR3-Lys98 находится в менее гидратированной и менее ионизируемой среде.

Пример 8. Дегликирование HC-CDR3-Lys98 *in vivo*, прогнозируемое на основе анализа *in vivo*

[0175] Изменение уровня гликирования HC-CDR3-Lys98 изучали на отличном от человека примате. Однократную дозу (0,5 мг/кг) mAb-1 вводили обезьяне с последующими отборами образцов сыворотки крови обезьяны в различные временные точки (перед введением дозы, через 5 минут, 5 часов, 1 день, 3 дня, 7 дней, 14 дней, 28 дней и 42 дня). С применением LC-MS/MS для определения характеристик mAb-1 в этих образцах сыворотки крови выявили, что уровни гликирования *in vivo* уменьшались с 34,4% в образце на 5 минуте после введения до 23,7% в образце в 42 день после введения (фигура 9A). Значения концентрации глюкозы в сыворотке крови также измеряли, и они колебались около 100 мг/дл (т. е. 5,6 mM, фигура 9B). При данном диапазоне концентраций глюкозы ожидали, что уровень гликирования будет слегка уменьшаться с течением времени перед достижением состояния равновесия. Действительно, через 14 дней после введения уровень гликирования HC-CDR3-Lys98 был стабильным, составляя около 25%, что указывало на то, что уровень гликирования HC-CDR3-Lys98 *in vivo* обусловлен значениями концентрации глюкозы в сыворотке крови.

[0176] Чтобы сравнить кинетику *in vitro* и *in vivo* генерировали прогнозируемый профиль с применением параметров, определенных *in vitro*. Симулировали уровень гликирования с применением уравнения 6 с b , заданным как значение равновесного уровня гликирования (24,0%), A_2 , заданном как разница между уровнями гликирования в состоянии равновесия и перед введением дозы (10,5%), и k_{app} , заданную как 0,14 (день⁻¹), как показано в таблице 1. Этот прогнозируемый профиль гликирования отлично согласовался с уровнем гликирования *in vivo*, измеренным посредством LC-MS/MS, что свидетельствует о том, что механизм гликирования/дегликирования, определенный *in vitro* и *in silico*, не подвергался влиянию среды *in vivo* (см. линию, соответствующую прогнозируемым уровням гликирования на фигуре 9A).

[0177] На фигурах 10A - 12B изображены дополнительные необработанные данные *in vivo*, полученные с использованием обезьян, аналогичные рассмотренным выше со

ссылкой на фигуры 9А - 9В. Если конкретно, тестируемые антитела со способностью подвергаться гликированию в НС-Lys-98 разбавляли 0,9% соевым раствором с 0,05% полисорбата 80, затем вводили посредством внутривенной инфузии обезьянам. В таблице 4 ниже проиллюстрирована информация касательно образцов.

[0178] Таблица 4. Информация касательно образцов для исследований *in vivo*

День исследования	Время после введения дозы (ч)	Тестируемое mAb А, 0,5 мг/кг (группа 6)			Тестируемое mAb В, 0,5 мг/кг (группа 7)			Тестируемое mAb В, 1,0 мг/кг (группа 8)		
		I11947	I11948	I11949	I11950	I11951	I11952	I11953	I11954	I11955
		М	М	М	М	М	М	М	М	М
		(мкг/мл)								
D1	0	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения
D1	5 мин (0,083 ч)	17,4	12,2	14,6	17,0	12,8	12,7	28,8	27,2	26,3
D1	5	14,6	10,1	11,1	12,7	10,6	10,3	24,4	23,6	21,1
D2	24	9,12	7,38	6,80	8,20	7,43	7,55	19,0	18,2	15,2
D3	48	7,85	5,34	6,0	6,70	5,64	5,31	11,9	13,3	12,8
D4	72	5,97	4,61	5,03	5,59	4,78	4,36	11,8	11,0	10,4
D6	120	5,32	4,02	4,36	4,87	3,42	3,74	9,21	9,39	9,15
D8	168	4,68	3,66	3,82	4,28	2,92	3,16	7,99	8,03	8,03
D11	240	4,34	2,86	2,84	3,74	2,31	2,59	7,35	6,50	6,99
D15	336	3,48	1,96	2,15	3,08	1,56	2,12	5,77	4,99	5,49
D19	432	3,00	1,35	1,54	2,68	1,23	1,73	4,56	4,31	4,78
D22	504	2,56	1,13	1,34	2,18	0,883	1,36	3,79	3,32	3,89
D25	576	1,86	0,731	0,927	2,15	0,799	1,19	3,22	3,20	3,33
D29	672	1,53	0,504	0,708	1,69	0,532	0,891	2,44	2,30	2,51
D33	768	1,20	0,351	0,528	1,33	0,434	0,742	1,96	1,84	2,05
D36	840	1,04	0,253	0,397	1,09	0,317	0,577	1,68	1,42	1,65
D39	912	0,854	0,166	0,351	0,988	0,264	0,521	1,41	1,27	1,41
D43	1008	0,749	0,110	0,282	0,741	0,194	0,380	1,21	0,951	1,12

[0179] Образцы, отмеченные жирным шрифтом выше в таблице 4, выбирали для количественного определения гликирования НС-Lys98. Данные изображены на фигурах 10А - 12В. Если конкретно, на фигуре 10А, фигуре 11А и фигуре 12А изображен процент гликирования НС-Lys98, нанесенный на график наряду с концентрацией mAb, а на фигуре 9В, фигуре 10В и фигуре 11В изображен процент гликирования НС-Lys98, нанесенный на график наряду с измеренной концентрацией глюкозы (мг/дл).

[0180] В случае данных, относящихся к фигурам 10А - 12В, уровни глюкозы в крови у обезьян составляли приблизительно 3-7 мМ. Уровень гликирования mAb в

системе кровообращения достигал устойчивого состояния при 20-30% через около 15 дней, и данный уровень гликирования оставался стабильным в течение по меньшей мере еще 25 дней при осуществлении мониторинга mAb у обезьян. На основе данных, полученных у обезьян *in vivo*, и типичного диапазона концентраций глюкозы у человека (например, 4-7 мМ), можно ожидать, что mAb, которое вводят с уровнем гликирования, находящимся в диапазоне 20-35% (например, уровень 20-35% поддерживается во время хранения и обращения), может подвергаться небольшим изменениям в отношении уровня гликирования антитела в системе кровообращения или не подвергаться им.

Материалы и способы, связанные с предыдущими примерами

Общие сведения касательно материалов

[0181] Моноклональное, биспецифическое антитело на основе IgG4, также называемое mAb-1, было изготовлено Regeneron Pharmaceuticals, Тарритаун, Нью-Йорк, и его применяли во всех указанных исследованиях. mAb-1 содержало две разные тяжелые цепи, называемые HC и HC* соответственно. Концентрированный исходный раствор mAb-1 перед применением хранили в замороженном виде. Все другие применяемые химические соединения характеризовались аналитической степенью чистоты.

Общие сведения касательно экспериментов

[0182] Все реакции проводили в стеклянных флаконах 1 типа, и герметично закрывали эластомерными пробками и алюминиевыми колпачками с пластиковыми обжимным колпачком с отламывающейся крышечкой, и хранили в инкубаторах с регулируемой температурой. Для разных диапазонов значений pH применяли четыре разных буферных средства: ацетат для pH 5,0-5,5, гистидин для pH 5,0-6,5, HEPES для pH 6,5-8,0 и фосфат для pH 6,0-8,0. Все образцы белков получали путем непосредственного смешивания исходных растворов mAb-1 с другими компонентами буфера. Осуществляли мониторинг pH каждого образца белка во время инкубации, чтобы убедиться, что не происходило сдвига pH. Концентрации белков определяли посредством поглощения УФ-излучения при 280 нм с применением коэффициента экстинкции, составляющего $9,97 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Анализ гликирования HC-CDR3-Lys98 и получение образцов

[0183] Реакцию гликирования в боковой цепи HC-CDR3-Lys98 измеряли двумя способами, СЕХ и пептидного картирования с использованием LC-MS.

[0184] СЕХ. Способ СЕХ осуществляли на системе для UPLC Waters Acquity с использованием колонки YMC-BioPro SP-F, поддерживаемой при 25°C. От 10 мкг до 50 мкг mAb-1 загружали в колонку для СЕХ в буфере для связывания: 50 мМ MES, pH 6,5, с 20 мМ NaCl, и элюировали градиентом с линейным изменением концентрации, составляющим 0,5 мМ NaCl/мин от 20 мМ до 150 мМ NaCl, при скорости потока 0,5 мл/мин. Осуществляли мониторинг элюирования при длине волны 280 нм и хроматограмму обрабатывали с помощью программного обеспечения для работы с данными Empower 3, где относительную фракцию каждого варианта, отличающегося по заряду, рассчитывали на основе общей площади хроматограммы.

[0185] Пептидное картирование с использованием LC-MS: образцы mAb-1 денатурировали и восстанавливали с помощью 5 мМ гидрохлорида трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР-НСl) при 80°C в течение 10 мин. Восстановленные цистеиновые остатки алкилировали с помощью 5 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Перед расщеплением концентрацию мочевины разбавляли до 1,25 М. Добавляли трипсин (Promega, Саннивейл, Калифорния) или эндопротеиназу Asp-N (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс) при соотношении фермент:субстрат 1:20 и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Расщепление останавливали путем добавления 20% трифторуксусной кислоты (TFA; Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). До проведения анализа расщепленные образцы хранили при -80°C. Расщепленные образцы загружали и разделяли с применением колонки C18 Acquity UPLC ВЕН (Waters, Милфорд, Массачусетс) на системе для UPLC Waters Acquity, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). Подвижная фаза А представляла собой 0,05% TFA в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% TFA в ацетонитриле. Для разделения пептидов применяли градиент от 0,1% подвижной фазы В до 35% подвижной фазы В за 75 мин при скорости потока, составлявшей 0,25 мл/мин. Сбор данных с помощью MS состоял из полного сканирования массы с последующими тандемными процедурами сканирования массы (MS/MS) 5 наиболее интенсивных ионов из каждого полного сканирования. Идентификацию пептидов осуществляли с помощью Proteome Discover 1.4 (версии 1.4.0.288, Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния) и проверяли в ручном режиме. Количественное определение пептидов осуществляли путем интегрирования ионных пиков экстрагированных пептидов с применением Skyline daily (MacCoss Lab, отдел геномных исследований, Вашингтонский университет) с массовым окном, составлявшим 5 ppm.

Получение образцов mAb-1 с разными уровнями гликирования в HC-CDR3-Lys98

[0186] mAb-1 с разными уровнями гликирования в HC-CDR3-Lys98 очищали посредством способа СЕХ. Полностью гликированное mAb-1 очищали путем сбора и объединения фракций, которые элюировались между 8,6 мин и 9,1 мин при СЕХ. Аналогично, негликированное mAb-1 очищали путем сбора фракций, которые элюировались между 9,3 мин и 10,1 мин при СЕХ. Каждую из очищенных гликированной и негликированной форм mAb-1 подвергали диализу против 10 мМ гистидина, рН 6.0. Анализ LC-MS подтверждал уровень гликирования в HC-CDR3-Lys98. Гликированный и негликированный образцы смешивали в разных соотношениях с созданием растворов mAb-1 с разнящимися процентами гликирования в HC-CDR3-Lys98.

Биологический анализ активности mAb-1 in vitro

[0187] Последовательные разведения mAb-1 добавляли в трех повторностях к первым клеткам-мишеням (Jurkat/NFAT-Luc, 10000 клеток/лунка) в присутствии вторых клеток-мишеней (клеток OVCAR-3, 10000 клеток/лунка). Разбавления и биологический анализ антител проводили в полных средах для клеток Jurkat (среда RPMI 1640,

дополненная 10% FBS и 1 X пенициллин-стрептомицином, L-глутамином). Лунки, не содержавшие антитело, применяли в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 4-6 часов, а затем доводили до комнатной температуры в течение 15 минут. Субстрат люциферазы One-Glo (100 мкл) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 3-5 минут. Люминесцентный сигнал измеряли с применением считывающего устройства для планшетов Perkin Elmer Victor X5 и измеренные значения анализировали с помощью четырехпараметрического логистического уравнения по всей 11-точечной кривой ответа с применением GraphPad Prism.

Анализ кинетики и термодинамики

[0188] Анализ кажущейся кинетики проводили с применением следующих двух моделей:

[0189] реакции гликирования (т. е. повышения процента гликированного HC-CDR3-Lys98 с течением времени):

$$\% \text{ гликирования} = A_1(1 - e^{(-k_{app,1} \cdot t)}) + b \text{ уравнение 5;}$$

[0190] реакции дегликирования (т. е. уменьшения процента гликированного HC-CDR3-Lys98 с течением времени):

$$\% \text{ гликирования} = A_2 \cdot e^{(-k_{app,2} \cdot t)} + b \text{ уравнение 6;}$$

где A_1 и A_2 представляют собой значения размаха, $k_{app,1}$ и $k_{app,2}$ представляют собой кажущиеся константы скорости реакции, t представляет собой время и b представляет собой исходный уровень.

[0191] В процедуре аппроксимации данных t задавали как независимый параметр, и обеспечивали варьирование A_1 , A_2 , $k_{app,1}$, $k_{app,2}$ и b , чтобы найти значения при наилучшей аппроксимации. Для условий без глюкозы b задавали как 0, чтобы избежать чрезмерной параметризации. Для реакции гликирования равновесный уровень гликирования (т. е. плато) может быть определен на основе суммы A_1 и b . Для реакции дегликирования равновесный уровень гликирования определяется на основе b .

[0192] Уравнение Аррениуса применяли для расчета кажущейся энергии активации, E_a , на основе кинетики дегликирования при разных температурах,

$$\ln(k_{app,2}) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \text{ уравнение 7,}$$

где A представляют собой константу, R представляет собой газовую постоянную и T представляет собой абсолютную температуру в градусах Кельвина. Линейное взаимоотношение между $\ln(k_{app,2})$ и $1/T$ указывает на то, что реакция соответствует поведению согласно уравнению Аррениуса, где E_a можно определять на основе углового коэффициента.

[0193] Для более подробного анализа кинетики реакцию между глюкозой и mAb-1 можно выразить следующим образом:

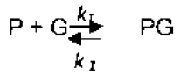


схема 2,

где P представляет собой негликированное mAb-1, G представляет собой глюкозу, PG представляет собой гликированное mAb-1 и k_1 и k_{-1} представляют собой константы как скорости ассоциации, так и диссоциации соответственно. При условии, где исходная концентрация свободной глюкозы, $[G_0]$, является намного большей, чем исходная концентрация негликированного mAb-1, $[P_0]$, кинетическое описание процента гликирования в момент времени t можно описать следующим образом:

$$\% \text{ гликирования} = \left(\frac{k_1[G_0]}{k_1[G_0] + k_{-1}} (1 - e^{-(k_1[G_0] + k_{-1})t}) + e^{-(k_1[G_0] + k_{-1})t} \cdot \frac{[PG_0]}{[P_t]} \right) \cdot 100$$

уравнение 8,

где $[P_t]$ представляет собой общую концентрацию белка mAb-1, и $[PG_0]$ представляет собой исходную концентрацию белка гликированного mAb-1. В процедуре аппроксимации данных $[G_0]$, $[PG_0]$ и $[P_t]$ были заданы, в то же время обеспечивали изменения k_1 и k_{-1} , чтобы найти значения при наилучшей аппроксимации.

[0194] На основе схемы 2 состояние равновесия процента гликирования может быть описано следующим образом:

$$\% \text{ гликирования} = \left(\frac{K[P_e][G_e]}{[P_e] + K[P_e][G_e]} \right) \cdot 100 \text{ уравнение 9,}$$

где $[G_e]$ и $[P_e]$ представляют собой концентрации свободной глюкозы и негликированного mAb-1 соответственно в состоянии равновесия. В процедуре аппроксимации данных $[G_e]$ и $[P_e]$ получали косвенным образом путем решения в диапазоне значений $0 < [G] < [G_t]$ и $0 < [P] < [P_t]$, где $[G_t]$ и $[P_t]$ представляют собой общие концентрации глюкозы и mAb-1 соответственно, и обеспечивали изменения K, чтобы определить значение при наилучшей аппроксимации.

Моделирование структуры mAb-1

[0195] Прогнозируемые структурные модели mAb-1 создавали с применением Molecular Operating Environment (MOE - Chemical Computing Group, Монреаль, Канада). Базу данных структур антител применяли для создания гомологичной модели отдельных димеров из тяжелой и легкой цепей. Fab-домены конструировали путем прививания подходящих шаблонов каркасной области и петель с последующей минимизацией энергии. Проводили эксперименты с соединением путем моделирования ковалентного взаимодействия между ϵ -аминогруппой боковой цепи лизина и альдегидной группой глюкозы, где локальную среду корректировали с помощью механизма индуцированного соответствия.

Расчет значений неопределенности в анализе посредством нелинейного метода наименьших квадратов

[0196] Во время процедуры аппроксимации данных все уравнения были запрограммированы в программном обеспечении Scientist (Micromath, Сент-Луис,

Миссури). На основе анализа посредством NLLS определяли параметры при наилучшей аппроксимации со значениями неопределенности, приведенными в скобках. В случае симметричных погрешностей значения неопределенности регистрировали в виде \pm погрешность в пределах 95% доверительных интервалов. В случае несимметричных погрешностей значения неопределенности регистрировали (нижняя граница, верхняя граница) как в пределах 95% доверительных интервалов.

Информация касательно доклинических образцов

[0197] Доклинические образцы сыворотки крови получали из исследований фармакокинетики (PK) у яванских макаков с введением однократной дозы. mAb-1 вводили субъектам внутривенно (IV). Яванским макакам вводили дозу 0,5 мг/кг и образцы сыворотки крови собирали в обозначенные моменты времени (перед введением дозы, через 5 минут, 5 часов, 1 день, 3 дня, 7 дней, 14 дней, 28 дней и 42 дня). До проведения анализов образцы сыворотки крови хранили при -80°C . Концентрацию mAb-1 в сыворотке крови в каждый момент времени сбора измеряли с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Если коротко, обеспечивали захват mAb-1 на планшете для микротитрования, покрытом мишенью лекарственного средства. mAb-1, захваченный на планшете, определяли с применением биотинилированного мышинового моноклонального антитела к IgG4 человека с последующим определением с помощью NeutraAvidin, конъюгированного с пероксидазой хрена (NeutraAvidin-HRP). Затем добавляли субстрат на основе люминола, специфический для пероксидазы, с достижением интенсивности сигнала, которая пропорциональна концентрации mAb-1. Уровни глюкозы в сыворотке крови измеряли с применением системы для мониторинга уровня глюкозы в крови Freestyle Lite (Abbott Laboratories, Чикаго, Иллинойс).

Аффинная очистка mAb-1 из образцов сыворотки крови

[0198] mAb-1 очищали из собранных образцов сыворотки обезьян посредством аффинной очистки. Если коротко, биотинилированное антитело к антигенам человека конъюгировали с магнитными гранулами со стрептавидином T1 Dynabeads MyOne (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем конъюгированные гранулы инкубировали с образцами сыворотки крови при комнатной температуре в течение 30 минут. Гранулы промывали буфером HBS-EP (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания), а затем элюировали с помощью 0,1% муравьиной кислоты (FA) и 50% ацетонитрила.

Расщепление трипсином

[0199] Очищенные образцы mAb1 высушивали с применением вакуумного концентратора (LABCONCO, Канзас-Сити, Миссури). Высушенные образцы ресуспендировали в 100 мМ трис-HCl, содержащей 8 М мочевины и 10 мМ гидрохлорида трис-(2-карбоксиил)фосфина (TCEP-HCl), а затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Восстановленные цистеиновые остатки алкилировали с помощью 10 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. После алкилирования, перед расщеплением концентрацию мочевины разбавляли до 1,25 М.

Трипсин (Promega, Саннивейл, Калифорния) добавляли к образцам при соотношении фермент:субстрат 1:10 и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Расщепление прекращали путем добавления 20% муравьиной кислоты. До проведения анализа расщепленные образцы хранили при -80°C.

LC-MS/MS и анализ данных

[0200] Пептиды, созданные путем расщепления трипсином, разделяли с применением колонки C18 Acquity UPLC CSH, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм (Waters, Милфорд, Массачусетс) на системе для UPLC Acquity I-Class (Waters, Милфорд, Массачусетс), соединенной с масс-спектрометром Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). Подвижная фаза А представляла собой 0,1% FA в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% FA в ацетонитриле. Для разделения пептидов применяли градиент, повышающийся от 2% подвижной фазы В до 30%, подвижной фазы В за 56 мин при скорости потока, составлявшей 0,25 мл/мин. Сбор данных с помощью MS состоял из полного сканирования массы с последующими тандемными процедурами сканирования массы (MS/MS) 5 наиболее интенсивных ионов из каждого полного сканирования. Идентификация пептидов и PTM проводили с помощью Bruker (версии 2.16.11, Protein Metrics Inc., Сан-Карлос, Калифорния) и подтверждали в ручном режиме. Для количественного определения относительного содержания PTM получали экстрагированные ионные хроматограммы, основанные на значении масса/заряд первого пика изотопа как модифицированного пептида, так и нативного пептида, и экстрагированные площади пиков интегрировали с применением Skyline-daily (версии 4.1.1.18151, MacCoss Lab, Вашингтонский университет, Вашингтон) с применением массового окна, составлявшего 5 ppm. Процентную долю каждого PTM-варианта рассчитывали с применением площади пика на экстрагированной ионной хроматограмме (EIC) для модифицированного пептида относительно суммы площадей пиков модифицированного и нативного пептидов.

Краткое рассмотрение предыдущих примеров

[0201] Во время процесса культивирования клеток глюкоза является обязательным источником энергии для выращивания клеток. Для поддержания высокой скорости роста клеток глюкозу постоянно подают в биореактор, где неизрасходованная глюкоза приводит к гликированию HC-CDR3-Lys98. Концентрация глюкозы, присутствующей в реакторе, влияет на уровень гликирования. Анализ кинетики свидетельствует о том, что как только mAb-1 подвергается гликированию, дегликирование происходит относительно медленно по сравнению с реакцией гликирования. В итоге во время процесса очистки (без присутствия глюкозы) уровень гликирования стремиться к постоянному и прямо коррелирует с уровнем гликирования, который имел место в биореакторе. Хотя уровень гликирования остается относительно постоянным во время очистки, когда mAb-1 находится в жидком составе и хранится при 5°C, данные показывают, что гликированный mAb-1 подвергается постоянной и измеряемой степени дегликирования. Было продемонстрировано, что получение mAb-1 в лиофилизированном составе, значительно

останавливало реакцию дегликирования, вероятно благодаря удалению воды, требуемой для гидролиза.

[0202] Кинетика реакции дегликирования соответствует поведению согласно уравнению Аррениуса при температуре, находящейся в диапазоне от 5°C до 45°C (фигуры 4A - 4D). В результате данные, полученные при более высоких температурах (20-45°C), можно применять в сочетании с моделью Аррениуса для прогнозирования поведения дегликирования при более низких температурах, таких как 5°C. Рассчитанная энергия активации на основе уравнения Аррениуса указывает на то, что дегликирование является рН-зависимым, при этом более низкая энергия активации характерна для более высокого значения рН. Это свидетельствует о том, что скорость дегликирования, вероятно, будет более быстрой при более высоком значении рН. Результаты экспериментов подтвердили этот прогноз и продемонстрировали, что кажущаяся константа скорости дегликирования при 20°C повышается 3-кратно, если рН раствора повышается от 5,0 до 6,0 (таблица 1). Это наблюдение, вероятно, объясняется повышенной скоростью обратной реакции для продукта реакции Амадори (кетоамина) и сопутствующим высвобождением глюкозы из шиффового основания при более высоком значении рН.

[0203] Хотя кажущаяся реакция дегликирования была более быстрой при более высоком значении рН, в устойчивом состоянии равновесный уровень гликирования mAb-1 был большим при более высоких значениях рН (фигуры 5A - 5C), что свидетельствует о том, что гликированный лизин является более стабильным при более высоком значении рН. Кроме того, данные показали, что присутствие гистидина и ионов фосфата/карбоната в целом не стимулирует реакцию гликирования. Это было неожиданным, поскольку существует доказательство, которое указывает на то, что гистидин и ионы фосфата/карбоната облегчают перегруппировку Амадори. Альтернативной гипотезой, которая могла бы объяснить поведение, состоит в том, что гликирование в HC-CDR3-Lys98 не обусловлено стабилизирующим промежуточным соединением, представляющим собой шиффово основание, или продуктом реакции Амадори, а, напротив, обусловлено снижением значения pK_a в HC-CDR3-Lys98. Когда глобально анализировали данные в состоянии равновесия при разных значениях рН с применением простой модели депротонирования, для HC-CDR3-Lys98 получали более низкое, чем нормальное значение pK_a , составлявшее 6,7. Данное значение pK_a свидетельствует о том, что при рН 7,4 84% HC-CDR3-Lys98 будут депротонированными. Анализируя сдвиг pK_a с помощью формулы Борна получали кажущуюся диэлектрическую константу, составляющую 13,0. В то время как данное значение является слегка большим, чем диэлектрическое свойство, наблюдаемое внутри белка, оно значительно ниже, чем диэлектрическая константа воды, что подразумевает, что микросреда HC-CDR3-Lys98 является менее гидратированной, чем таковая, которую можно ожидать на поверхности белка. Кроме того, анализ термодинамики свидетельствует о том, что в общем реакции гликирования содействует энтальпия, и не содействует энтропия. Результаты дают основание предположить следующий механизм гликирования: при гликировании имеет место незначительная

структурная перегруппировка, обуславливающая более ограниченную локальную микросреду. Во время этого процесса перегруппировки менее гидратированная природа микросреды ограничивает степень перемещения воды. Следовательно, реакция обусловлена изменением энтальпии.

[0204] Большинство примеров ϵ -аминогрупп лизина со сниженными значениями pK_a обнаруживаются погруженными внутрь белков, выполняя, например, функции фермента или преобразования энергии. Однако, HC-CDR3-Lys98 находится на поверхности и является критическим для взаимодействия с антигеном. Напротив, HC*-CDR3-Lys98 (соответствующая аминокислота в другой CDR данного биспецифического антитела) также экспонирована на поверхности, а уровень гликирования при этом был ниже уровня обнаружения, что свидетельствует о том, что локальная среда при HC-CDR3-Lys98 облегчает гликирование. Симулированная структура mAb-1 указывает, что микросреда HC-CDR3-Lys98 является менее полярной, чем у HC*-CDR3-Lys98, не только вследствие окружающих аминокислот, но также вследствие ориентации их боковых цепей. В пределах 4,5 Å HC-CDR3-Lys98 окружена ароматическими кольцами аминокислот, расположенных в пространстве смежным образом. Ближайшая полярная группа является боковой цепью Tyr32, расположенной на расстоянии примерно 4,7 Å; однако, лизин и тирозин не склонны образовывать ионное взаимодействие. С другой стороны, HC*-CDR3-Lys98 обращен к боковым цепям Asp112 и Tyr109 и потенциально может образовывать солевой мостик с карбоксильной группой Asp112 (на расстоянии лишь 1,8 Å). По причине природы локальной среды возможно, что HC-CDR3-Lys98 может характеризоваться большей гибкостью в отношении гликирования, чем HC*-CDR3-Lys98. После гликирования аддукт глюкоза-лизин может подвергаться структурной перегруппировке и становиться более ограниченным, что прогнозируется согласно отрицательному изменению энтропии.

[0205] Объем настоящего изобретения не ограничен определенными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации охватываются объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ прогнозирования процента гликирования аминокислоты в биомолекуле, включающий

определение первого ряда значений скорости дегликирования аминокислоты для первого ряда значений температуры в течение первого промежутка времени;

выведение второго ряда из одного или более значений скорости дегликирования аминокислоты для второго ряда значений температуры из одного или более значений температуры на основе первого ряда значений скорости дегликирования и

применение второго ряда из одного или более значений скорости дегликирования для прогнозирования процента гликирования при любом значении температуры, соответствующем второму ряду значений температуры, и в течение промежутка, охватываемого вторым предварительно определенным временным отрезком.

2. Способ по п. 1, где первый ряд значений температуры содержит значения температуры, которые являются более высокими, чем значения во втором ряду значений температуры.

3. Способ по п. 2, где первый ряд значений температуры включает значения температуры, находящиеся в диапазоне от 20°C до 45°C, и где второй ряд значений температуры включает значения температуры, находящиеся в диапазоне от 2°C до 8°C.

4. Способ по п. 3, где второй ряд значений температуры соответствует значению температуры, составляющему 5°C.

5. Способ по п. 1, где первый предварительно определенный временной отрезок составляет менее 40 дней, и где второй предварительно определенный временной отрезок составляет от 3 месяцев до 36 месяцев.

6. Способ по п. 1, где определение первого ряда значений скорости дегликирования для первого ряда значений температуры в течение первого промежутка времени дополнительно включает

измерение процента гликирования аминокислоты для каждого значения температуры, включенного в первый ряд значений температуры, в виде функции зависимости от времени, соответствующего по меньшей мере части первого промежутка времени, и

проведение процедуры аппроксимации данных с получением первого ряда значений скорости дегликирования.

7. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение первого ряда значений скорости дегликирования в виде функции зависимости от двух или более разных значений pH и

определение для каждого из двух или более разных значений pH энергии активации, ассоциированной с дегликированием аминокислоты, на основе первого ряда значений скорости дегликирования.

8. Способ по п. 7, дополнительно включающий

выведение второго ряда значений скорости дегликирования в виде функции

зависимости от по меньшей мере одного из двух или более разных значений рН и

применение второго ряда значений скорости дегликирования для прогнозирования процента гликирования при любом значении температуры, соответствующем второму ряду значений температуры, и в течение любого промежутка, охватываемого вторым предварительно определенным временным отрезком, в виде функции зависимости от по меньшей мере одного из двух или более разных значений рН.

9. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение первого ряда значений скорости дегликирования в отсутствие глюкозы, где аминокислота из биомолекулы подвергается гликированию до предварительно определенного первого процентного значения, и

где прогнозирование процента гликирования основано на втором ряду из одного или более значений скорости дегликирования, предварительно определенном первом процентном значении, до которого подвергается гликированию аминокислота из биомолекулы, и разнице между предварительно определенным первым процентным значением и гликированием, составляющим 0%.

10. Способ поддержания процента гликирования аминокислоты в биомолекуле в пределах предварительно определенного диапазона процентов гликирования в течение срока годности биомолекулы, включающий:

инкубирование биомолекулы, характеризующейся первым процентным значением гликирования при нескольких разных концентрациях глюкозы, и измерение процента гликирования с течением времени для каждой из нескольких разных концентраций глюкозы;

определение равновесного процента гликирования для биомолекулы в виде функции зависимости от каждой из нескольких разных концентраций глюкозы на основе измерения процента гликирования с течением времени;

установление равновесного процента гликирования и соответствующей концентрации глюкозы, которая приводит к поддержанию первого процентного значения гликирования в пределах предварительно определенного диапазона процентов гликирования, и

инкубирование биомолекулы с глюкозой в соответствующей концентрации в течение срока годности биомолекулы.

11. Способ по п. 10, дополнительно включающий определение уровня действенности биомолекулы в виде функции зависимости от процента гликирования аминокислоты.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где биомолекула представляет собой антитело.

13. Способ по п. 12, где аминокислота расположена в пределах вариабельной области, которая влияет на связывание антигена.

14. Способ по п. 13, где аминокислота расположена в пределах области, определяющей комплементарность (CDR).

15. Способ по п. 14, где CDR расположена в пределах вариабельной области

тяжелой цепи.

16. Способ по п. 15, где аминокислота расположена в пределах HCDR3.

17. Способ снижения действенности терапевтической биомолекулы в организме субъекта во время введения, включающий

установление терапевтической биомолекулы, содержащей один или более аминокислотных остатков, подвергаемых гликированию, где гликирование одного или более аминокислотных остатков обеспечивает снижение действенности терапевтической биомолекулы, и

составление терапевтической биомолекулы с глюкозой в концентрации, составляющей более 150 мг/дл.

18. Способ по п. 17, где концентрация глюкозы составляет более 200 мг/дл.

19. Способ по п. 17 или п. 18, где гликирование одного или более аминокислотных остатков снижается, и действенность терапевтической биомолекулы повышается до состояния равновесия, определяемого концентрацией глюкозы в крови субъекта после введения терапевтической биомолекулы субъекту.

20. Способ по любому из пп. 17-19, где сниженная действенность терапевтической биомолекулы во время введения обеспечивает снижение частоты возникновения синдрома высвобождения цитокинов или инфузионных реакций.

21. Способ по любому из пп. 17-20, где терапевтическая биомолекула представляет собой антитело.

22. Способ по п. 21, где одна или более аминокислот расположены в пределах вариабельной области, которая влияет на связывание антигена.

23. Способ по п. 22, где одна или более аминокислот расположены в пределах области, определяющей комплементарность (CDR).

24. Способ по п. 23, где CDR расположена в пределах вариабельной области тяжелой цепи.

25. Способ по п. 24, где одна или более аминокислот расположены в пределах HCDR3.

26. Способ прогнозирования процента гликирования аминокислоты в терапевтической биомолекуле после введения терапевтической биомолекулы субъекту, включающий

установление равновесного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой;

установление скорости, с которой аминокислота подвергается гликированию или дегликированию;

установление исходного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой в терапевтической биомолекуле, до введения, и

прогнозирование процента гликирования в виде функции зависимости от времени после введения терапевтической биомолекулы на основе скорости, разницы между исходным процентом гликирования и равновесным процентом гликирования и

равновесного процента гликирования.

27. Способ по п. 26, дополнительно включающий определение установленного равновесного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой.

28. Способ по п. 26 или п. 27, дополнительно включающий определение установленной скорости, с которой аминокислота подвергается гликированию или дегликированию.

29. Способ по любому из пп. 26-28, дополнительно включающий определение установленного исходного процента гликирования, ассоциированного с аминокислотой в терапевтической биомолекуле, до введения.

30. Способ по п. 27, где определение установленного равновесного процента гликирования включает определение равновесного процента гликирования при температуре, составляющей от 35°C до 40°C.

31. Способ по п. 30, где температура составляет 37°C.

32. Способ по п. 28, где определение установленной скорости включает определение скорости при температуре, составляющей от 35°C до 40°C.

33. Способ по п. 32, где температура составляет 37°C.

34. Способ по п. 27, где определение установленного равновесного процента гликирования включает определение равновесного процента гликирования *in vitro* в виде функции зависимости от одного или более значений концентрации глюкозы.

35. Способ по п. 27, где определение установленного равновесного процента гликирования включает определение равновесного процента гликирования на основе равновесных уровней гликирования аминокислоты, достигаемых *in vivo*.

36. Способ по п. 28, где определение установленной скорости включает определение скорости *in vitro* при концентрации глюкозы, составляющей от 3 mM до 8 mM глюкозы.

37. Способ по п. 26, где равновесный процент гликирования соответствует проценту при концентрации глюкозы, составляющей от 3 mM до 8 mM глюкозы.

38. Способ по любому из пп. 26-37, дополнительно включающий применение скорости, разницы между исходным процентом гликирования и равновесным процентом гликирования и равновесного процента гликирования в модели первого порядка для прогнозирования процента гликирования.

39. Способ по любому из пп. 26-38, дополнительно включающий прогнозирование действенности терапевтической биомолекулы в виде функции зависимости от процента гликирования и времени, прошедшего после введения.

40. Способ по любому из пп. 26-39, где биомолекула представляет собой антитело.

41. Способ по п. 40, где аминокислота расположена в пределах вариабельной области, которая влияет на связывание антигена.

42. Способ по п. 41, где аминокислота расположена в пределах области, определяющей комплементарность (CDR).

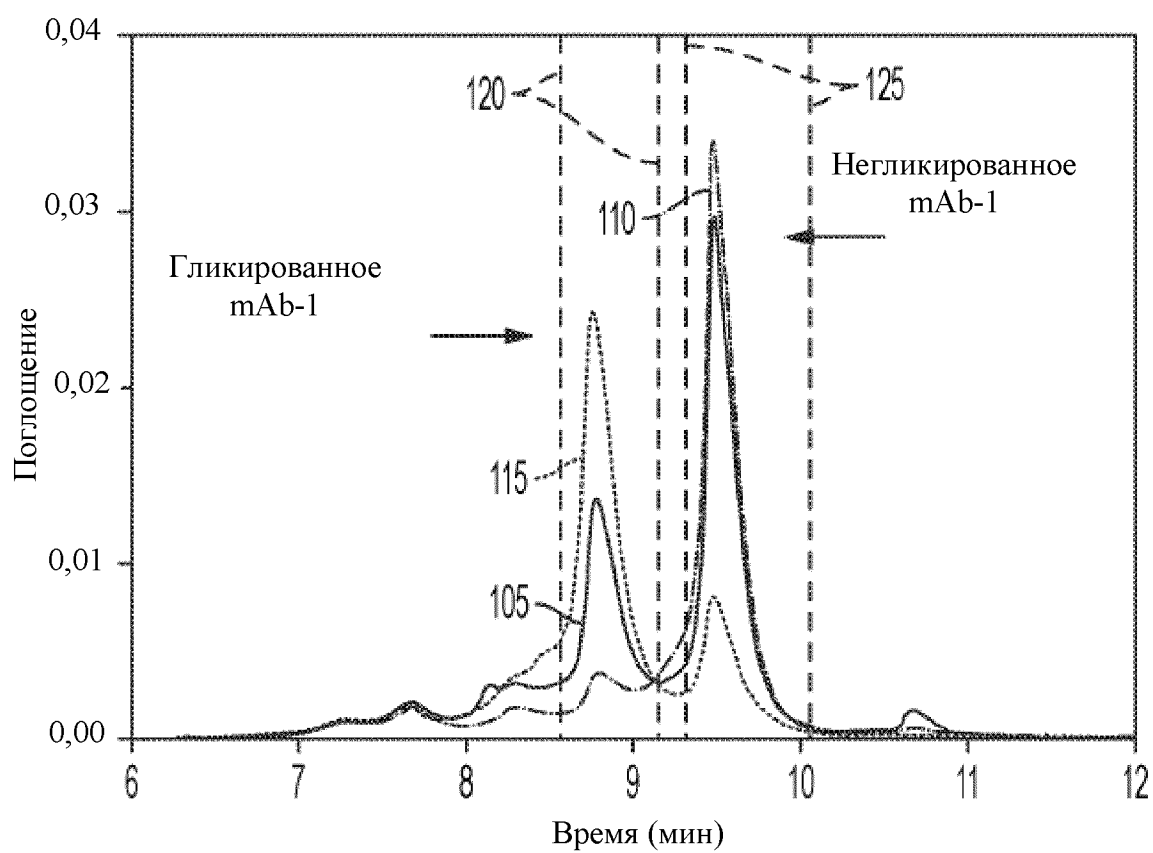
43. Способ по п. 42, где CDR расположена в пределах вариабельной области

тяжелой цепи.

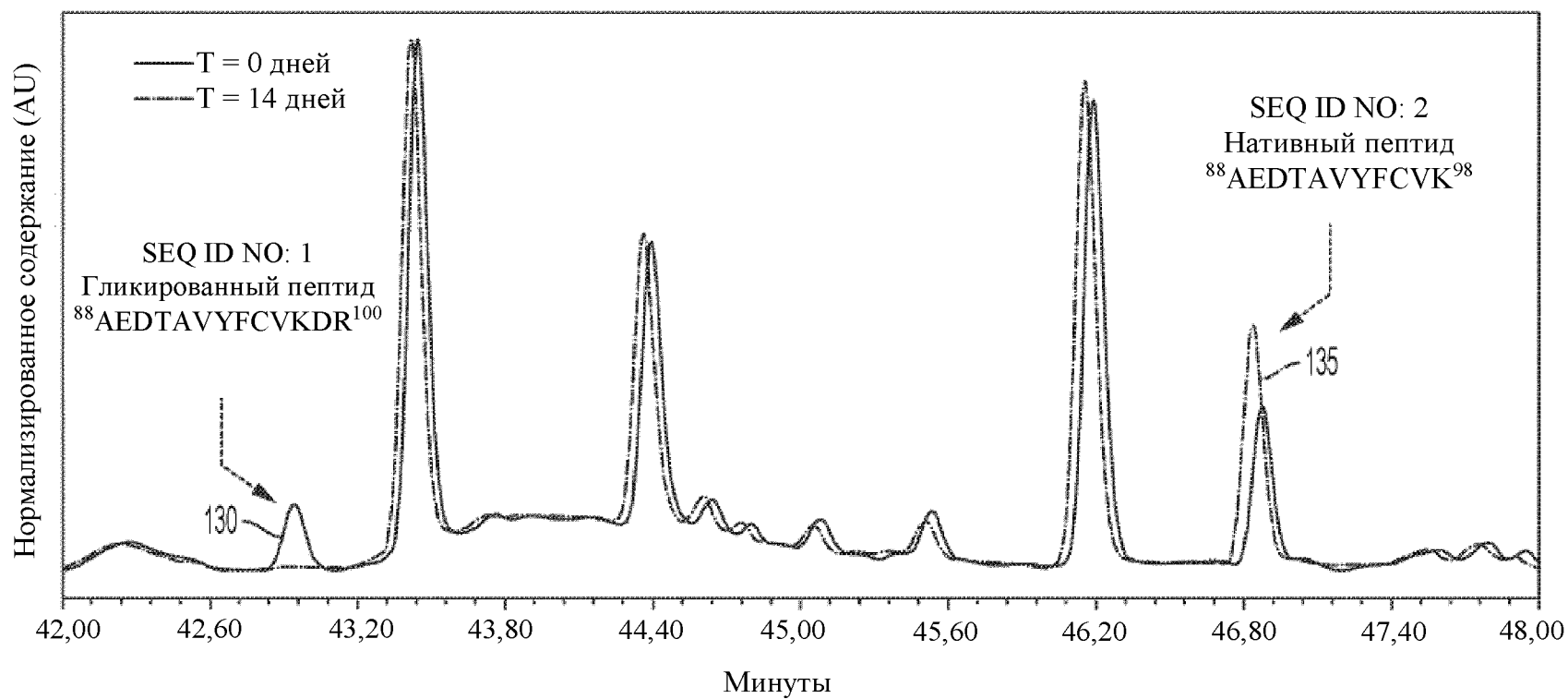
44. Способ по п. 43, где аминокислота расположена в пределах HCDR3.

По доверенности

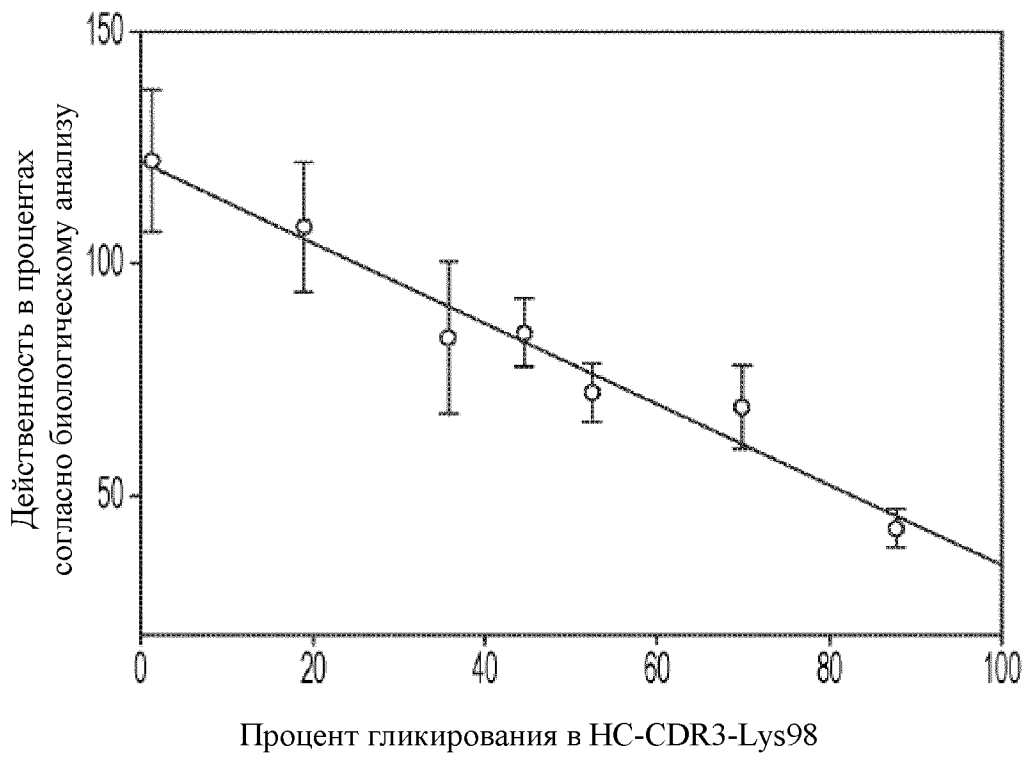
1/16



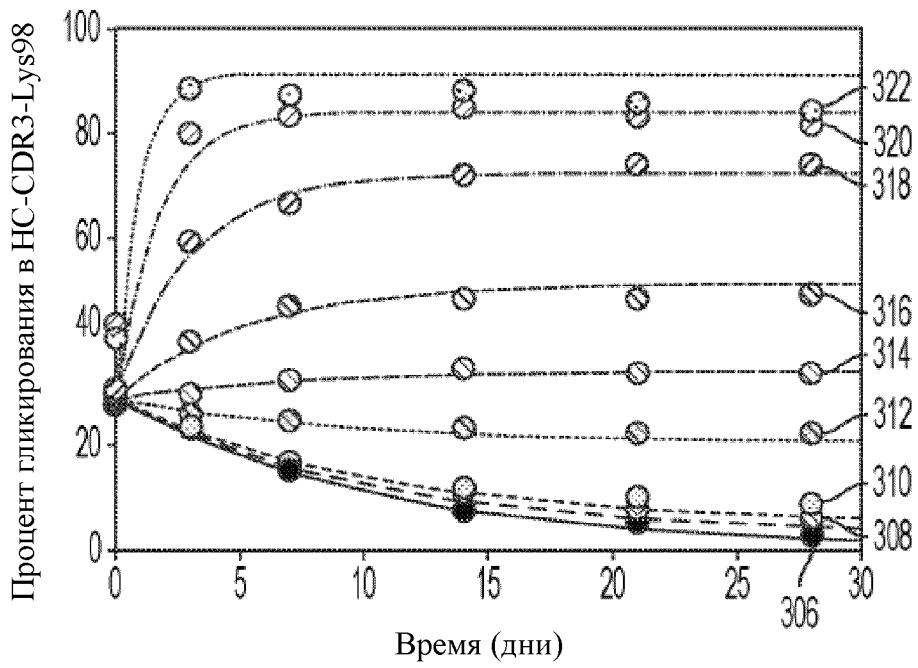
ФИГ. 1А



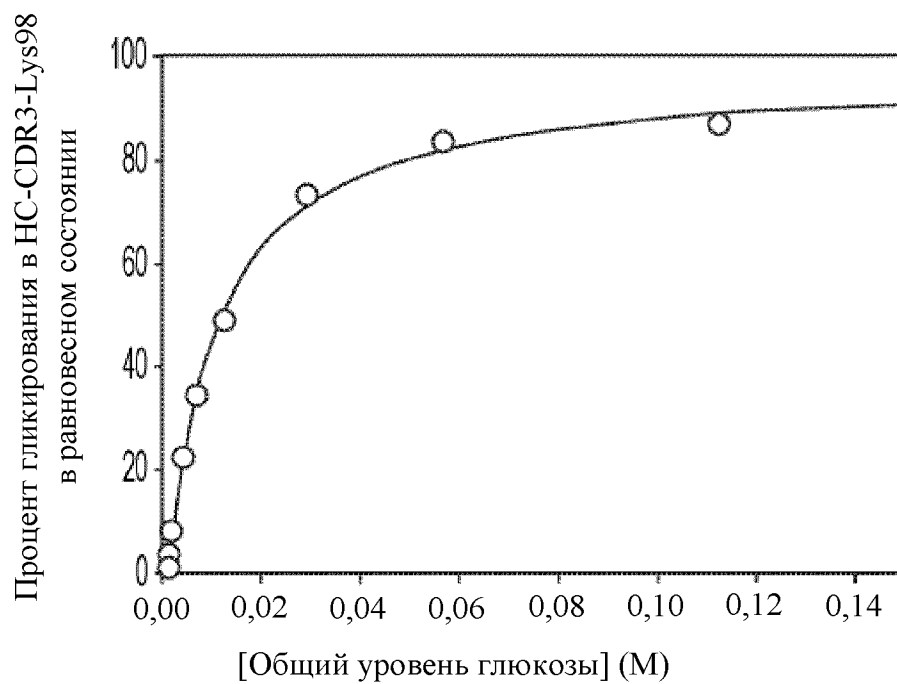
ФИГ. 1В



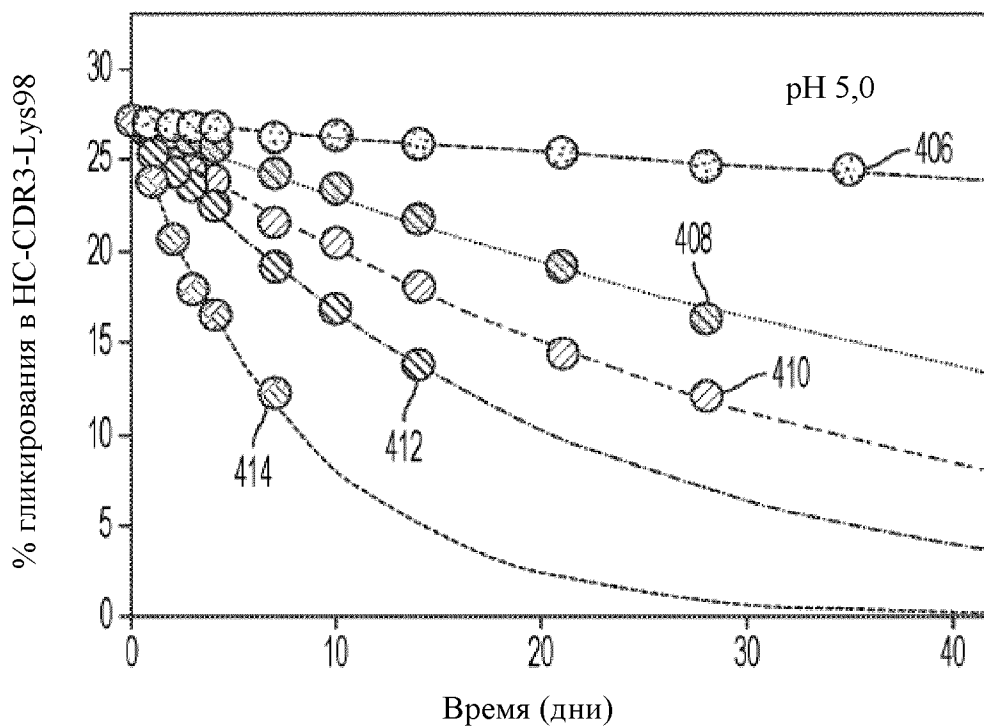
ФИГ. 2



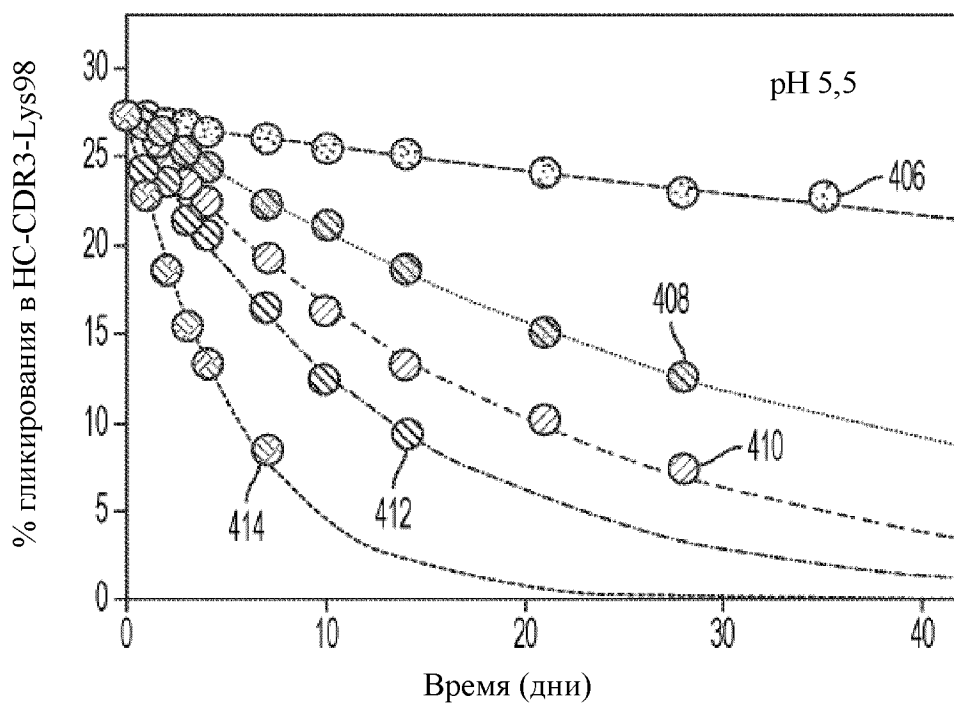
ФИГ. 3А



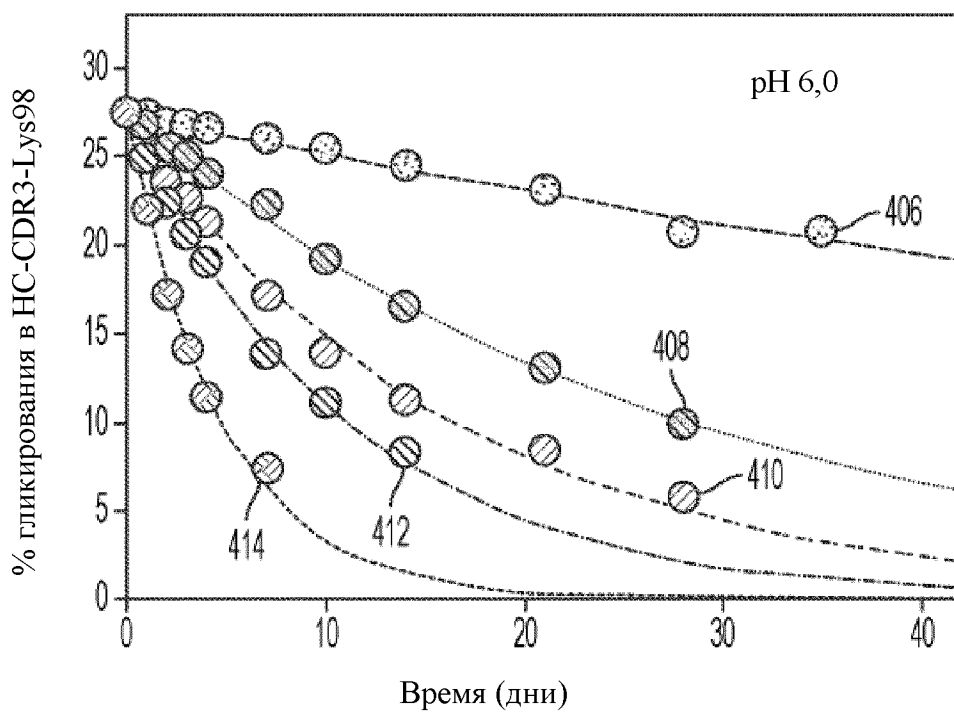
ФИГ. 3В



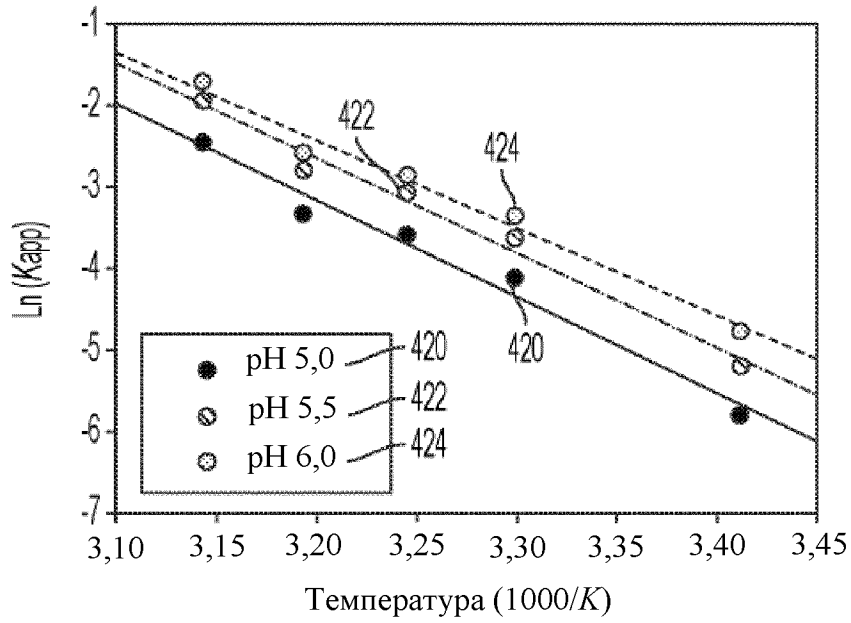
ФИГ. 4А



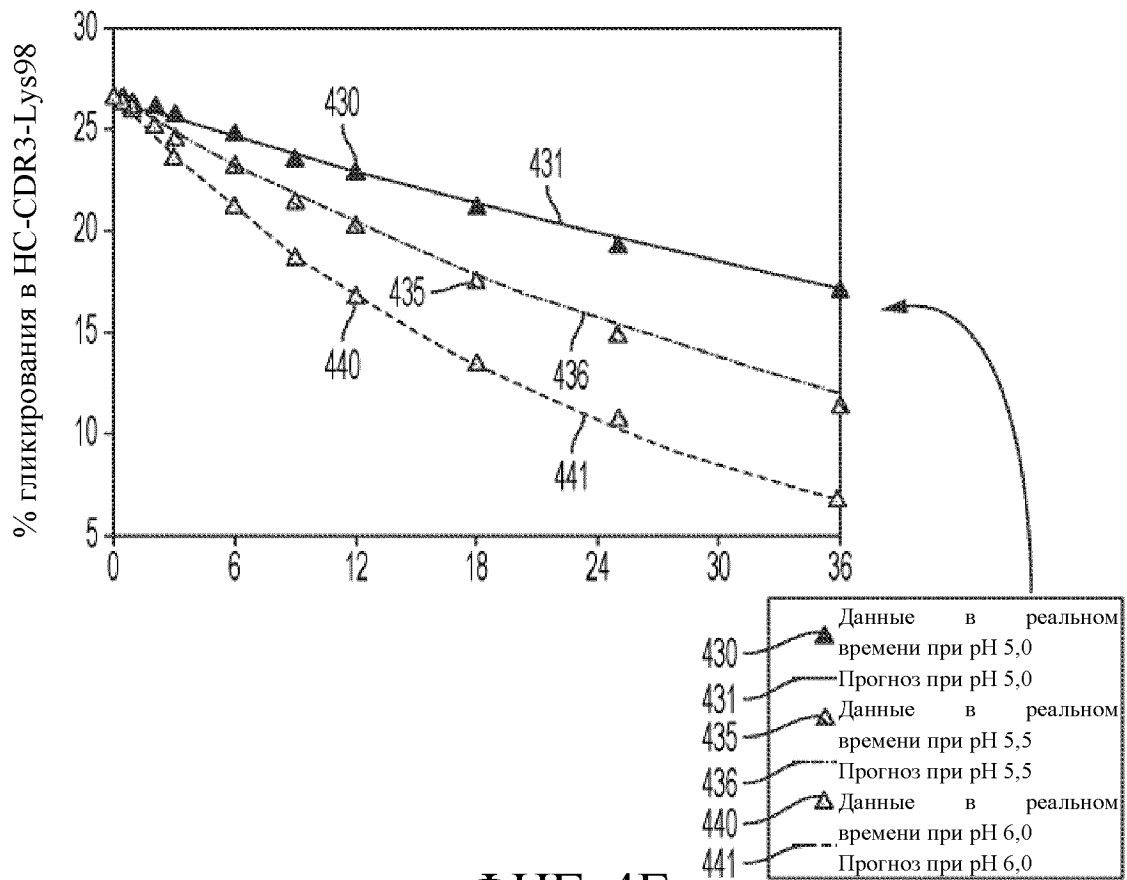
ФИГ. 4В



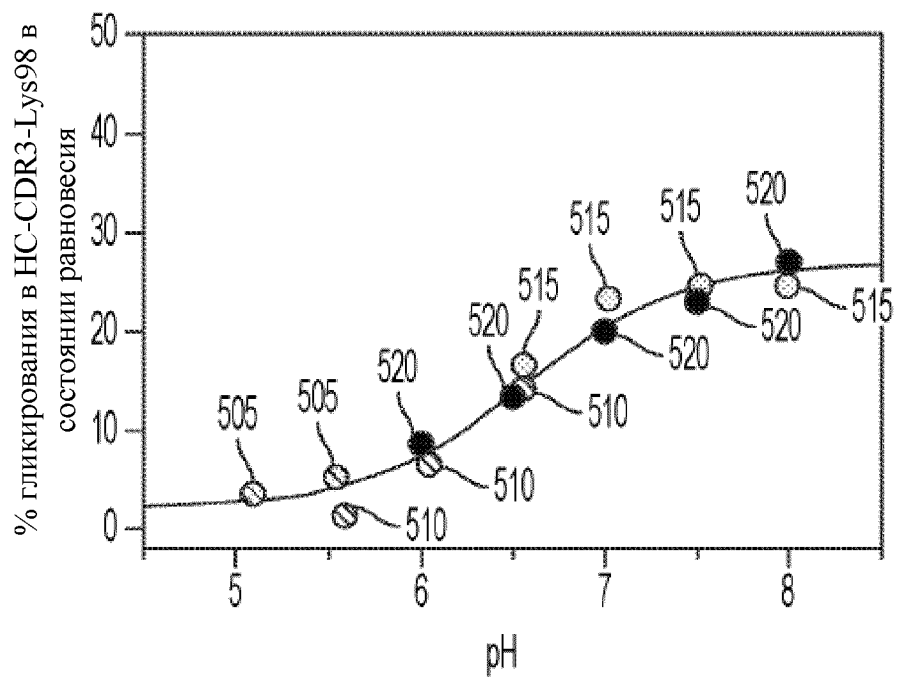
ФИГ. 4С



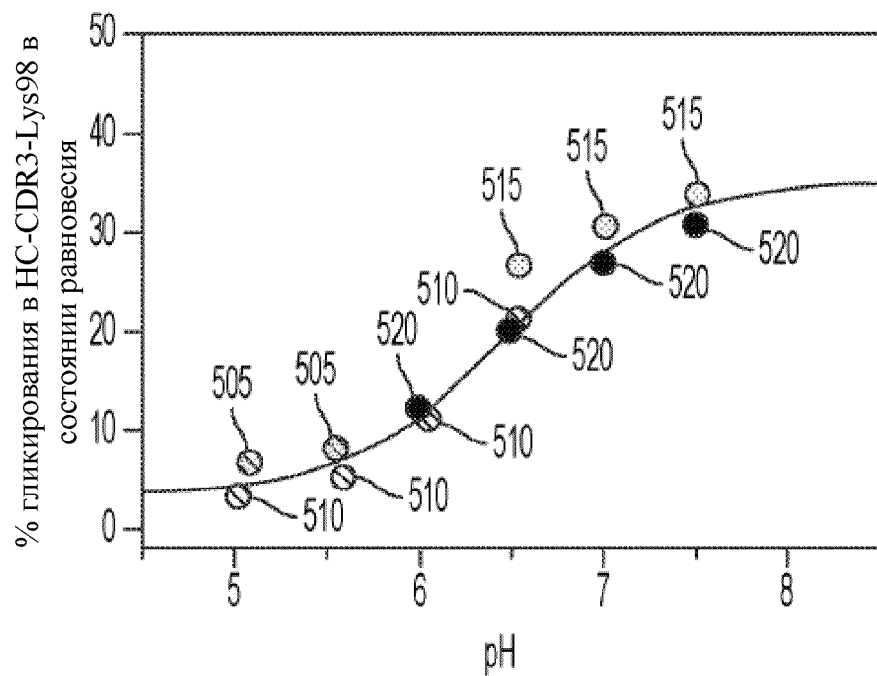
ФИГ. 4D



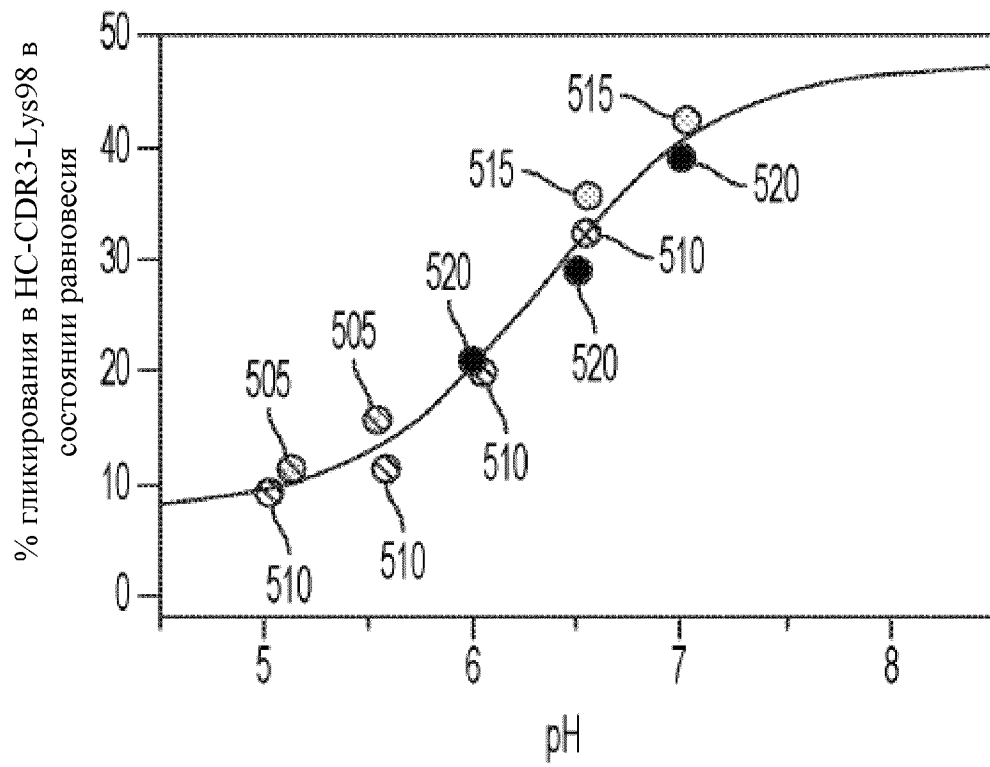
ФИГ. 4E



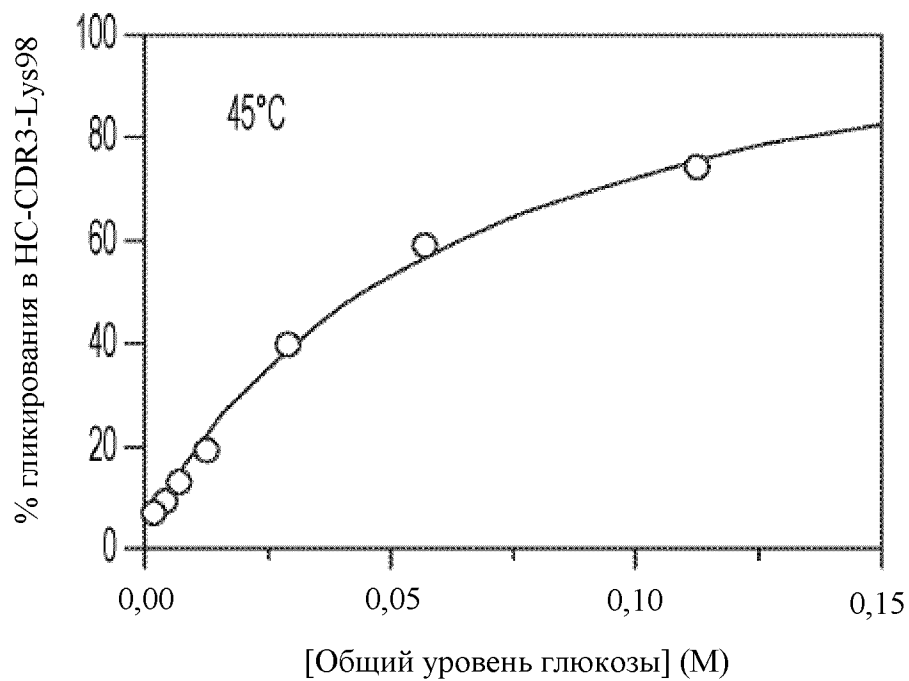
ФИГ. 5А



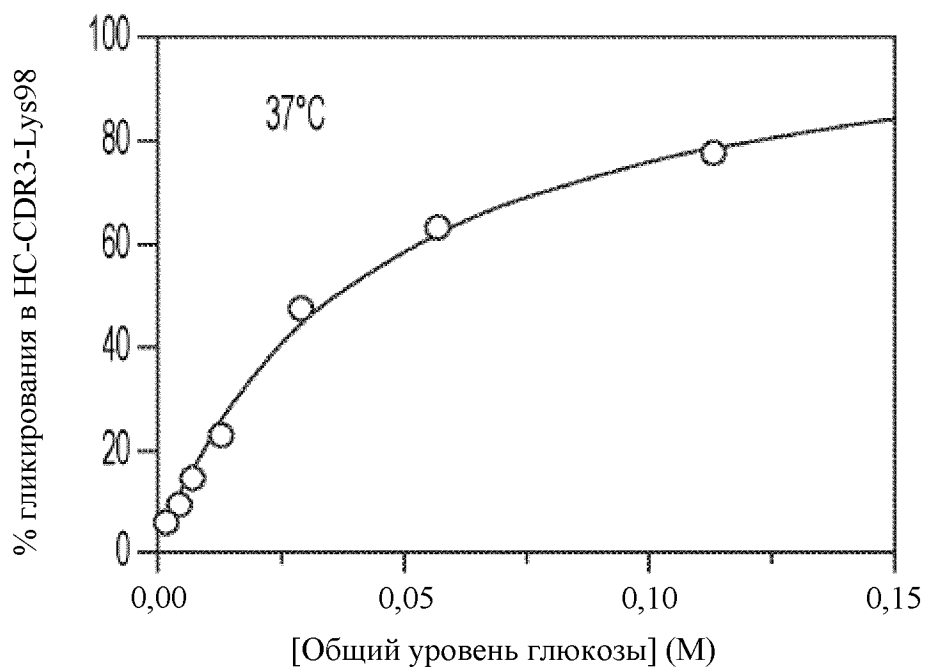
ФИГ. 5В



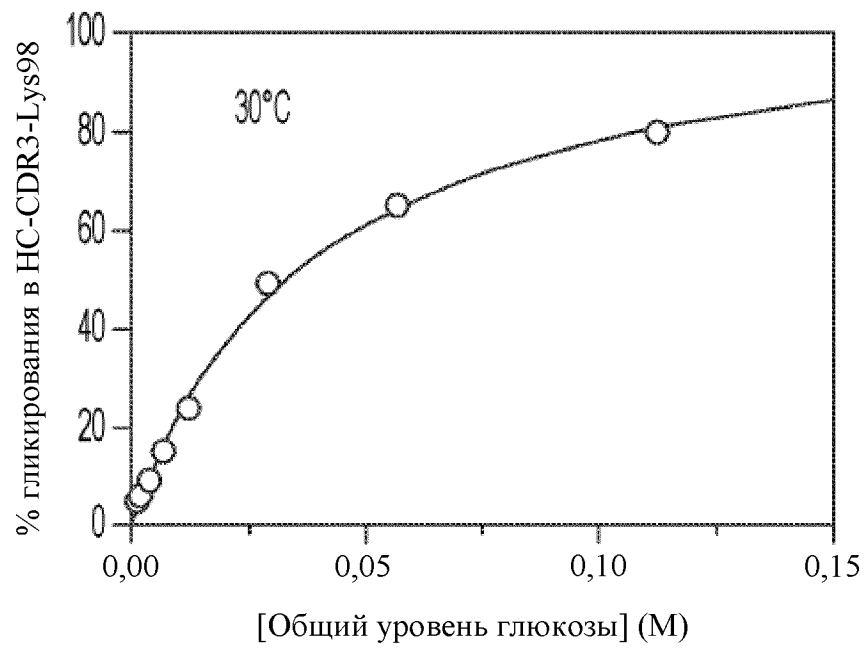
ФИГ. 5С



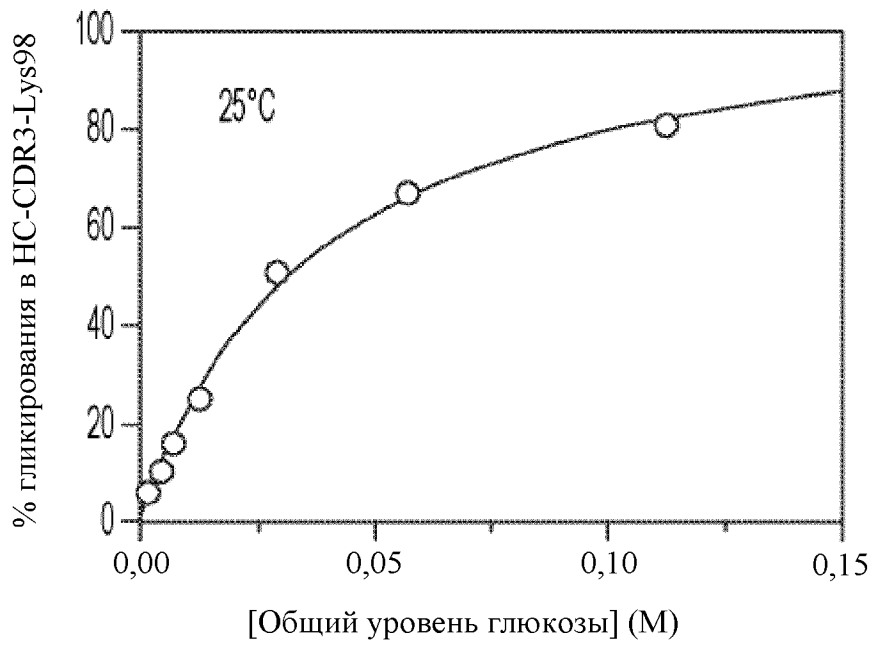
ФИГ. 6А



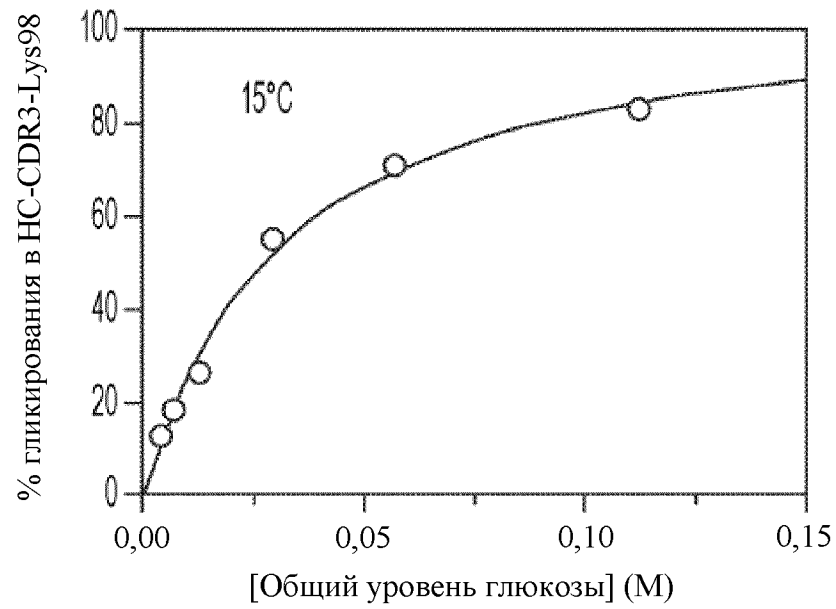
ФИГ. 6В



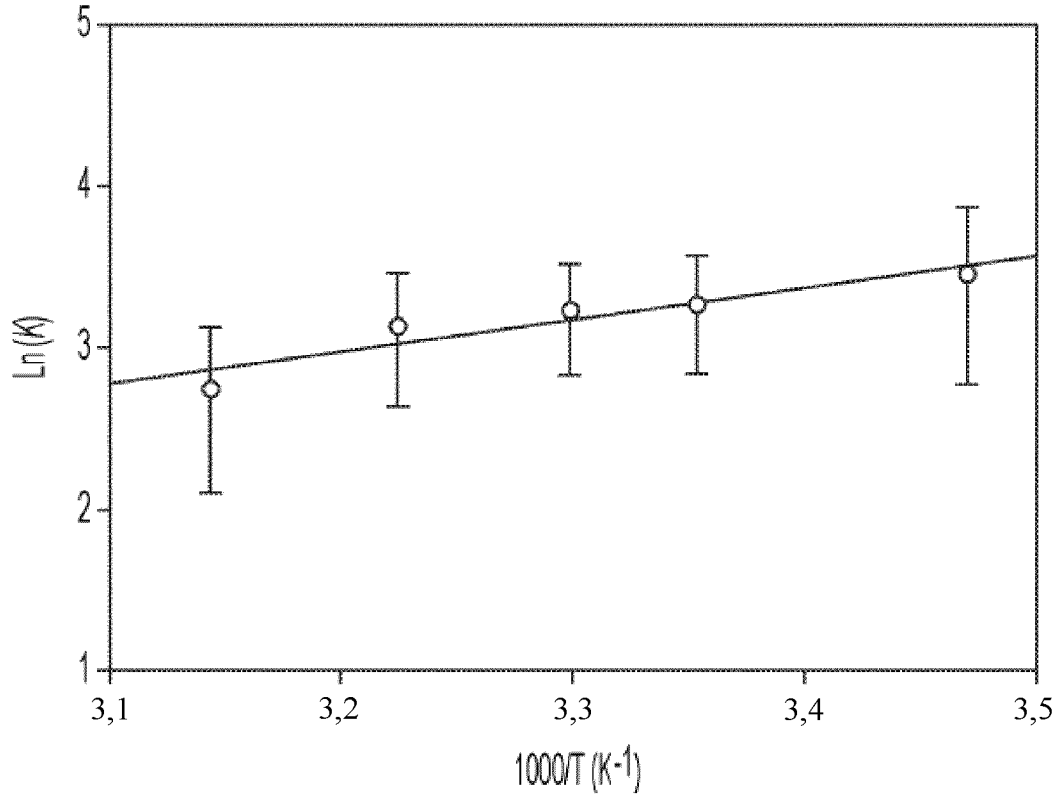
ФИГ. 6С



ФИГ. 6D

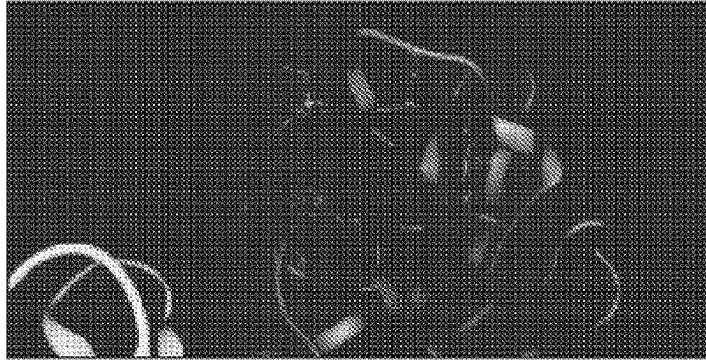


ФИГ. 6Е



ФИГ. 7

12/16



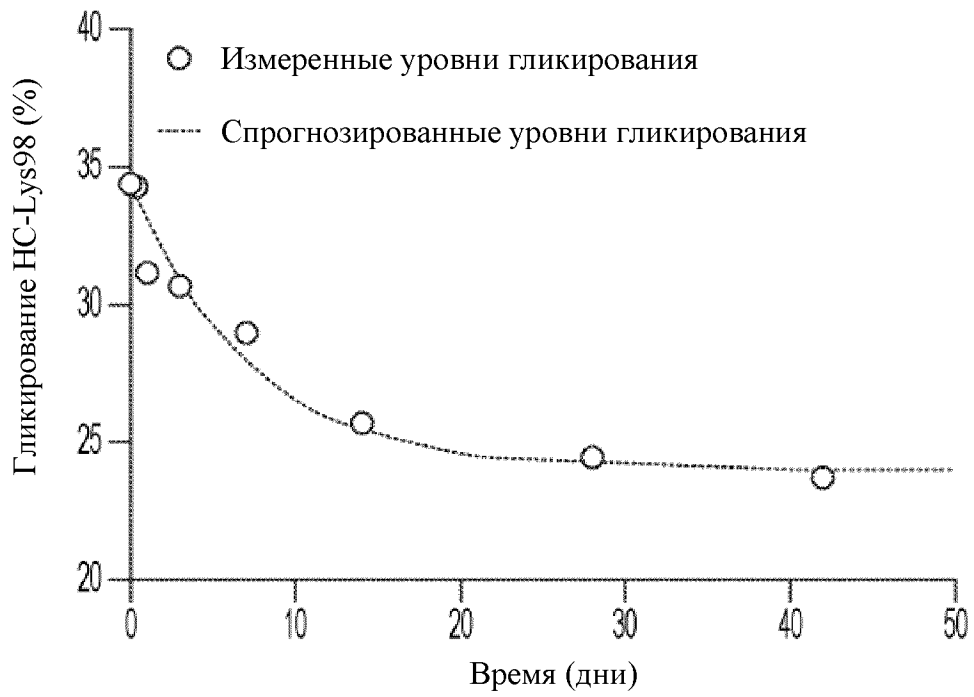
ФИГ. 8А



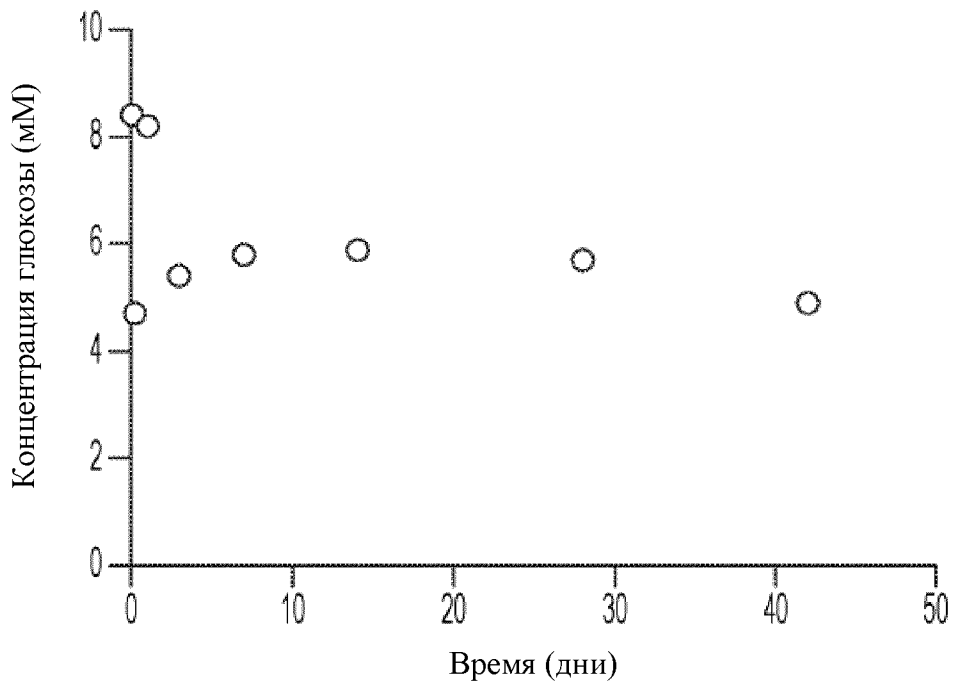
ФИГ. 8В



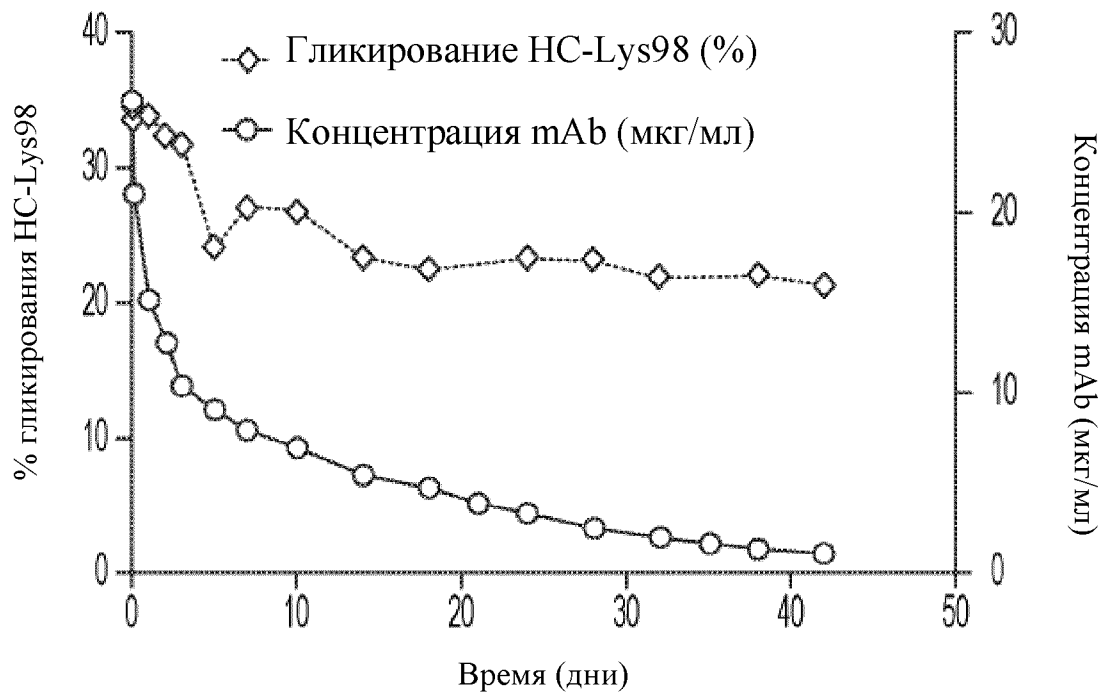
ФИГ. 8С



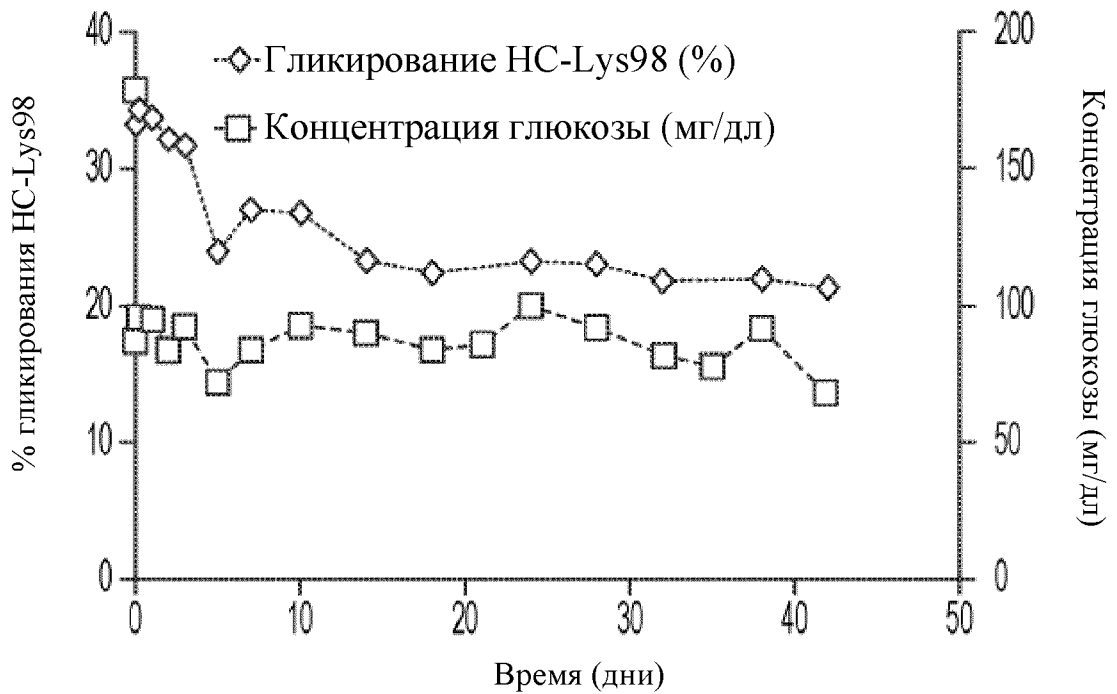
ФИГ. 9А



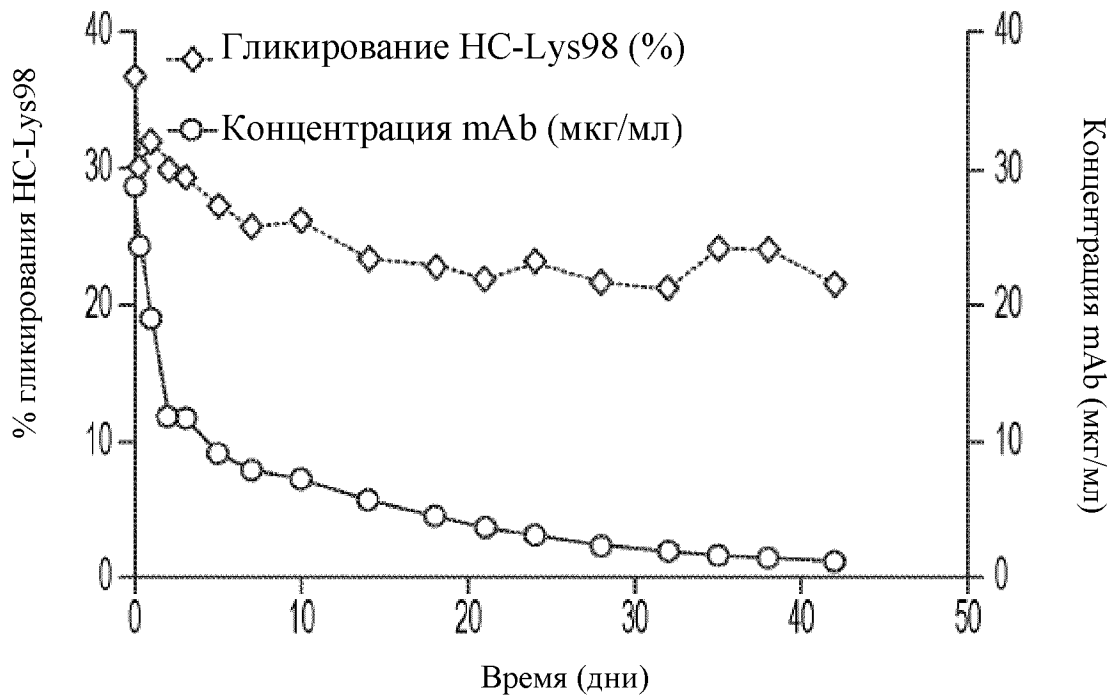
ФИГ. 9В



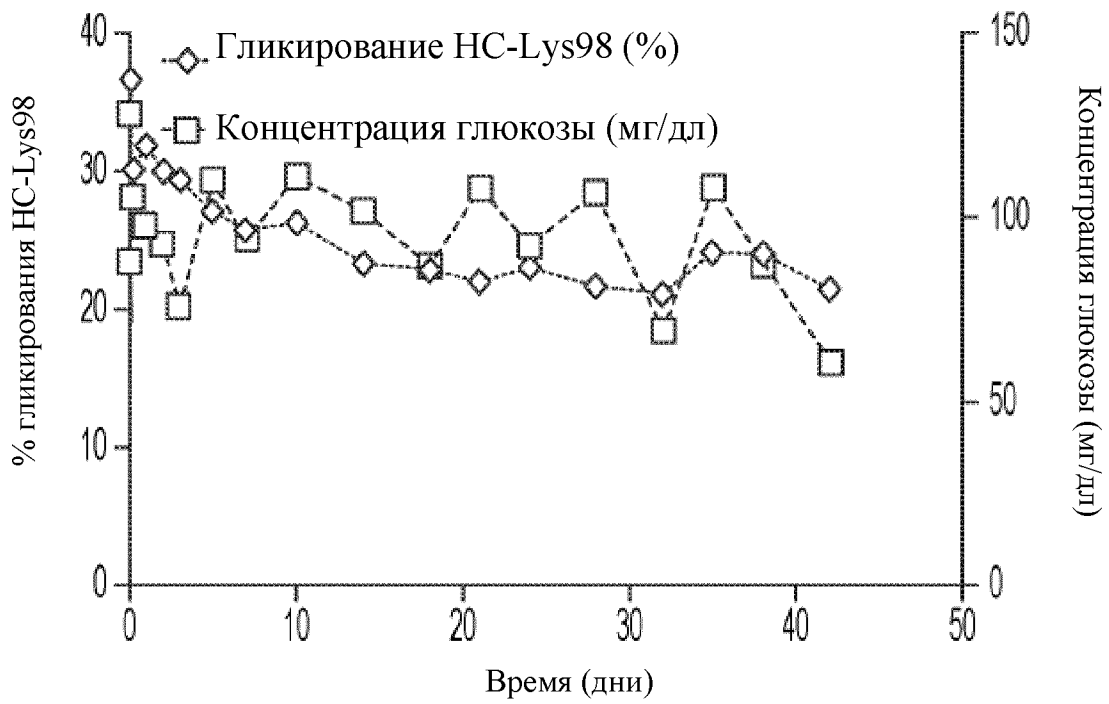
ФИГ. 10А



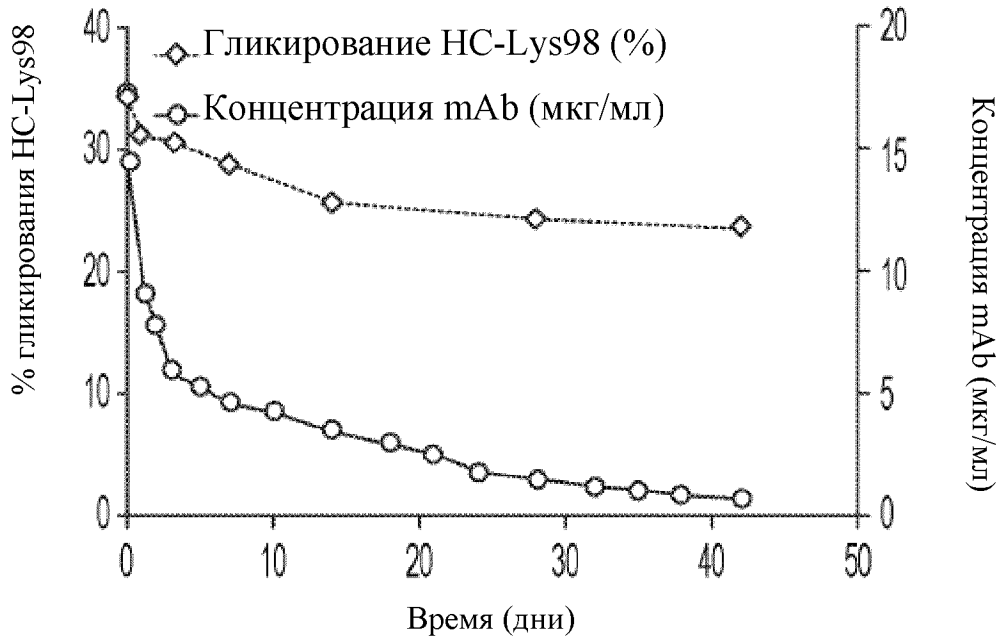
ФИГ. 10В



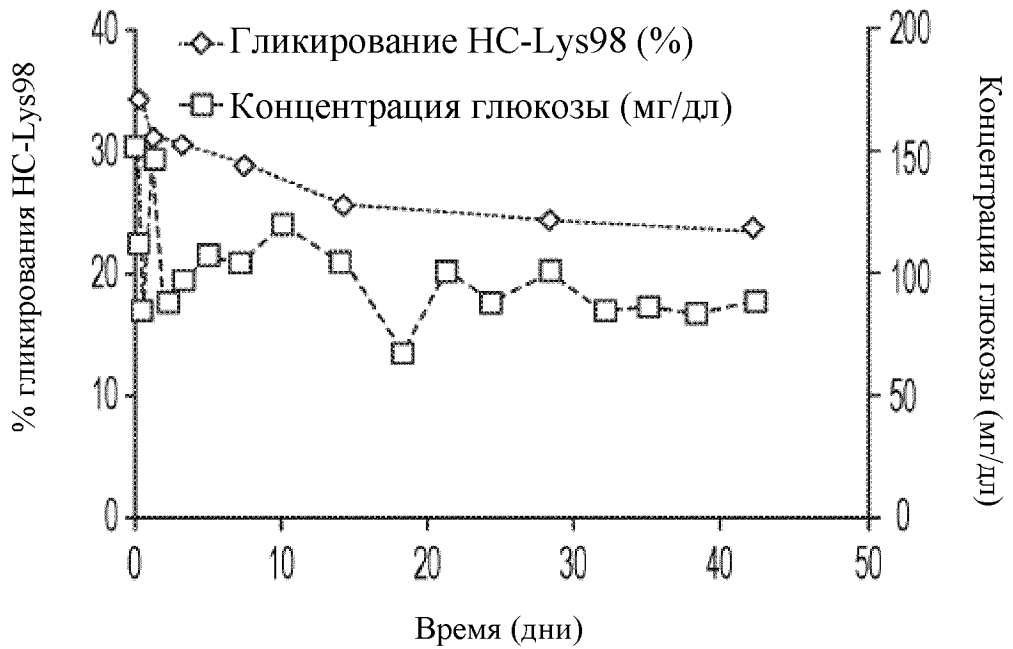
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 12А



ФИГ. 12В