

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044658**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.20

(21) Номер заявки
202092335

(22) Дата подачи заявки
2019.04.01

(51) Int. Cl. **C07K 16/06** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ЭРЕНУМАБА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/651,651**

(32) **2018.04.02**

(33) **US**

(43) **2021.01.22**

(86) **PCT/US2019/025223**

(87) **WO 2019/195185 2019.10.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лоусон Кеннет, Ридер Ноэль,
Хапуараччи Суминда, Рамирес Хосе
Грегорио (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Wagner-Rousset: "Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies - ScienceDirect", Journal of Chromatography A, 1 January 2017 (2017-01-01), p. 147-154, XP055607807, retrieved from the Internet: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317303242> [retrieved on 2019-07-22], p. 149, 152; fig. 1, 2
WO-A1-2016171742
WO-A1-2016044224

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, включая изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты и HMW-разновидности. Также описаны фармацевтические составы, содержащие композиции на основе эренумаба, и способы применения и определения характеристик композиций.

B1

044658

044658

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/651651, поданной 2 апреля 2018 г., которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте.

Описание текстового файла, поданного в электронном виде

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Копия перечня последовательностей в машиночитаемой форме, которая была создана 1 марта 2019 г., называется A-2190-WO-PCT_SeqList_ST25 и имеет размер 15 килобайт.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к идентификации и определению характеристик вариантов эренумаба, которые оказывают воздействие на функциональную активность эренумаба. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, фармацевтическим составам, содержащим композиции, и способам применения и определения характеристик композиций.

Предпосылки создания изобретения

Эренумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело, которое специфически связывается с рецептором пептида человека, кодируемого геном, родственным гену кальцитонина (CGRP), и предотвращает связывание лиганда CGRP с рецептором и активацию рецептора. CGRP участвует в патогенезе мигрени (Дарем, *New England Journal of Medicine*, vol. 350:1073-1075, 2004; Edvinsson et al., *Neurotherapeutics*, vol. 7:164-175, 2010). В клинических испытаниях фазы 2 и фазы 3 у пациентов с хронической или эпизодической мигренью, подвергавшихся лечению эренумабом, наблюдалось уменьшение количества дней с мигренью в месяц по сравнению с пациентами, получающими плацебо (Terper et al., *Lancet Neurol.*, vol. 16:425-434, 2017; Goadsby et al., *New England Journal of Medicine*, vol. 377:2123-2132, 2017).

Сложные терапевтические биопрепараты, такие как моноклональные антитела, могут обладать множеством качественных характеристик продукта, которые могут оказывать влияние на безопасность и/или эффективность биопрепарата. Как правило, требуется всесторонняя структурная и функциональная оценка молекулы для идентификации таких характеристик и понимания их влияния на свойства молекулы. Понимание характеристик молекулы важно для обеспечения получения однородного продукта.

Варианты биопрепарата могут возникать в ходе процесса изготовления или в условиях хранения. Такие варианты продукта можно разделить на родственные продукту вещества или родственные продукту примеси. Родственные продукту вещества представляют собой те молекулярные варианты требуемого продукта, которые образовались в ходе изготовления или хранения продукта, которые обладают свойствами, сопоставимыми со свойствами требуемого продукта, и не считаются примесями. Напротив, родственные продукту примеси представляют собой молекулярные варианты требуемого продукта, которые не обладают свойствами, сопоставимыми со свойствами требуемого продукта в отношении эффективности продукта и безопасности пациента. Таким образом, идентификация и определение характеристик родственных продукту примесей, в частности, полезно для изготовления и контроля качества биологического продукта, представляющего собой лекарственное средство.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на идентификации и определении характеристик родственных продукту примесей эренумаба, в частности вариантов эренумаба, которые обладают пониженной функциональной активностью. Контроль и мониторинг количеств данных вариантов в терапевтических композициях на основе эренумаба гарантируют, что композиции на основе эренумаба обладают необходимой активностью для достижения требуемых клинических эффектов. Соответственно в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция на основе эренумаба, содержащая эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты, варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, высокомолекулярные (HMW) разновидности или их комбинации, где количества вариантов эренумаба в композиции контролируются в определенных диапазонах.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, содержащие эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где один или несколько вариантов эренумаба включают изомеризованный вариант и дезамидированный вариант. В некоторых вариантах осуществления изомеризованный вариант содержит остаток изоаспарагиновой кислоты или сукцинимид в аминокислотном положении 105 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3) эренумаба. В этих и других вариантах осуществления дезамидированный вариант содержит остаток аспарагина в аминокислотном положении 102 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3) эренумаба, превращенный в остаток аспарагиновой кислоты, сукцинимид или остаток изоаспарагиновой кислоты. Количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции может составлять менее приблизительно 30%, менее приблизительно 15%, менее приблизительно 8% или менее приблизительно 4%, например, как определено с

помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, представляющей собой хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC).

В настоящем изобретении также предусмотрены композиции на основе эренумаба и одного или нескольких кислых вариантов эренумаба. Количество кислых вариантов в композиции может составлять менее приблизительно 40%, например, от приблизительно 25% до приблизительно 38% или от приблизительно 26% до приблизительно 34%. В некоторых вариантах осуществления количество кислых вариантов в композициях на основе эренумаба определяют с помощью катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (CEX-HPLC). Кислые варианты эренумаба включают варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, дезамидированные варианты, фрагментированные варианты, варианты с неконсенсусным гликозилированием, HMW-разновидности и их комбинации. В определенных вариантах осуществления кислые варианты включают варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, фрагментированные варианты или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе эренумаба и варианты эренумаба, представляющие собой дисульфидные изоформы. Варианты эренумаба, представляющие собой дисульфидные изоформы, могут включать изоформу IgG2-B и/или изоформу IgG2-A/B. Количество изоформы IgG2-B в композиции может составлять менее приблизительно 20%, например менее приблизительно 10% или менее приблизительно 8%, например от приблизительно 4% до приблизительно 6%. Количество изоформы IgG2-A/B в композиции может составлять от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 26% до приблизительно 38% или от приблизительно 34% до приблизительно 37%. В определенных вариантах осуществления количество дисульфидных изоформ определяют с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в невосстанавливающих условиях (RP-HPLC).

Настоящее изобретение также включает композиции, содержащие эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, различающихся по размеру, таких как низкомолекулярные (LMW) разновидности, среднемолекулярные (MMW) разновидности и высокомолекулярные (HMW) разновидности. В определенных вариантах осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет менее приблизительно 3,0%, например приблизительно 2,5% или менее, приблизительно 2,1% или менее, приблизительно 1,8% или менее, приблизительно 1,4% или менее или приблизительно 1,2% или менее. В одном конкретном варианте осуществления HMW-разновидности эренумаба состоят преимущественно из ковалентно связанного димера эренумаба. Количество HMW-разновидностей в композициях на основе эренумаба можно определять с помощью эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предусмотрены способы оценивания или оценки качества композиций на основе эренумаба. В одном варианте осуществления способы включают получение композиции на основе эренумаба, которая содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба; измерение количества одного или нескольких вариантов эренумаба в композиции; сравнение измеренного количества одного или нескольких вариантов эренумаба с предварительно определенным эталонным критерием; и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе эренумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Способы могут включать одно, два или три из следующего: (1) измерение количества изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции (например, по проценту площади пиков пре-пиков при HIC-HPLC); (2) измерение количества кислых вариантов в композиции (например, по проценту площади пиков кислотных пиков при CEX-HPLC); и/или (3) измерение количества HMW-разновидностей в композиции (например, по проценту площади пиков пре-пиков при SE-UHPLC). В определенных вариантах осуществления все три измерения осуществляют на композиции на основе эренумаба.

Фармацевтические составы, содержащие композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе, также включены в настоящее изобретение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат композицию на основе эренумаба, описанную в данном документе, и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как буферы, сахара и поверхностно-активные вещества. Фармацевтические составы можно помещать в устройство для инъекций, такое как предварительно наполненный шприц или автоинъектор. В таких вариантах осуществления объем инъекции в случае предварительно наполненных шприцев или автоинъекторов составляет менее приблизительно 2 мл, например приблизительно 1 мл.

Настоящее изобретение также включает способы лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента с применением композиций на основе эренумаба и фармацевтических составов по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления способы включают введение пациенту фармацевтического состава, содержащего композицию на основе эренумаба, описанную в данном документе. Головная боль может представлять собой мигренозную головную боль, кластерную головную боль или другой тип нарушения, проявляющегося головной болью, такой как головная боль напряженного типа, гемиплегическая мигрень, менструальная мигрень и ретинальная мигрень. В определенных вариантах осуществления пациент, подлежащий лечению в соответст-

вии со способами или путями применения по настоящему изобретению, характеризуется мигренью или диагнозом мигрени, такой как эпизодическая мигрень или хроническая мигрень.

Конкретно рассмотрено применение композиций на основе эренумаба в любом из способов, раскрытых в данном документе, или для получения лекарственных препаратов для введения в соответствии с любым из способов, раскрытых в данном документе. Например, настоящее изобретение включает композицию на основе эренумаба или фармацевтический состав, описанный в данном документе, для применения в способе лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента. Настоящее изобретение также охватывает применение композиции на основе эренумаба или фармацевтического состава, описанного в данном документе, для получения лекарственного препарата для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A и 1B показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (фиг. 1A; SEQ ID NO: 1) и легкой цепи (фиг. 1B; SEQ ID NO: 2) эренумаба. Определяющие комплементарность участки (CDR) в каждой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Тяжелая цепь содержит сайт N-связанного гликозилирования при остатке аспарагина в положении 306.

На фиг. 1C и 1D показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (фиг. 1C; SEQ ID NO: 3) и легкой цепи (фиг. 1D; SEQ ID NO: 4) с общими посттрансляционными модификациями на N- и C-концах эренумаба. CDR в каждой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. pE представляет собой пироглутамат.

На фиг. 1E и 1F показаны аминокислотные последовательности переменного участка тяжелой цепи (фиг. 1E; SEQ ID NO: 5) и переменного участка легкой цепи (фиг. 1F; SEQ ID NO: 6) эренумаба. CDR в каждом переменном участке выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фиг. 2A и 2B показан репрезентативный профиль HIC-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, в полном масштабе (фиг. 2A) и в увеличенном масштабе (фиг. 2B). Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, анализировали с помощью HIC-HPLC с применением в качестве подвижной фазы ацетата натрия с pH 5,5, с элюированием в линейном убывающем градиенте сульфата аммония и выявлением при поглощении 280 нм.

На фиг. 3 показаны перекрытия фракций, собранных с помощью HIC-HPLC, и действующего вещества, представляющего собой эренумаб, проанализированные с помощью HIC-HPLC. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и фракции, собранные с применением полупрепаративной HIC-HPLC (F1-F7), анализировали с помощью HIC-HPLC с применением в качестве подвижной фазы ацетата натрия с pH 5,5, с элюированием в линейном убывающем градиенте сульфата аммония и выявлением при поглощении 280 нм. Каждая панель представляет собой график зависимости поглощения при 280 нм от времени элюирования в минутах. Перекрытие всех семи фракций HIC-HPLC с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, показано на панели 8.

Фиг. 4 представляет собой перекрытие триптической пептидной карты участка элюирования, полученной в восстанавливающих условиях, для пептидов в пределах CDR3 тяжелой цепи эренумаба для обогащенных фракций HIC-HPLC (F2-F6) и нефракционированного действующего вещества, представляющего собой эренумаб (DS). Пептид TH12H13 соответствует аминокислотным остаткам 99-113 в SEQ ID NO: 1, и TH13 соответствует аминокислотным остаткам 101-113 в SEQ ID NO: 1.

Фиг. 5 представляет собой профиль HIC-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого термическому стрессу. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, инкубированное при 50°C в течение 14 дней, анализировали с помощью HIC-HPLC применением в качестве подвижной фазы ацетата натрия, pH 5,5, с элюированием в линейном градиенте сульфата аммония и выявлением при поглощении 280 нм. Верхний график соответствует моменту времени день 14.

На фиг. 6 показан профиль триптической пептидной карты, полученной в восстанавливающих условиях, в увеличенном масштабе для действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при 50°C в течение 14 дней. Пептид TH12H13 соответствует аминокислотным остаткам 99-113 в SEQ ID NO: 1, и TH13 соответствует аминокислотным остаткам 101-113 в SEQ ID NO: 1. Пептид TH26 соответствует аминокислотным остаткам 311-326 в SEQ ID NO: 1, и обнаруженный фрагмент выявлен из-за неспецифического расщепления между L³¹⁵ и T³¹⁶.

Фиг. 7 представляет собой профиль HIC-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при pH 7,4 и 37°C. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, разбавленное до 10 мг/мл с помощью PBS, pH 7,4, и инкубированное при 37°C в течение 14 дней, анализировали с помощью HIC-HPLC с применением в качестве подвижной фазы ацетата натрия, pH 5,5, с элюированием в линейном градиенте сульфата аммония и выявлением при поглощении 280 нм. Контрольный образец разбавляли в буфере для составления, pH 5,2, и инкубировали при 37°C в течение 14 дней наряду с образцом в стрессовых условиях с физиологическим pH.

Фиг. 8 представляет собой профиль HIC-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при pH 8,0 и 25°C. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, разбавленное до 10 мг/мл основанием Tris, pH 8,0, и инкубированное при 25°C в течение 14 дней,

анализировали с помощью HIC-HPLC с применением в качестве подвижной фазы ацетата натрия, pH 5,5, с элюированием в линейном градиенте сульфата аммония и выявлением при поглощении 280 нм. Контрольный образец разбавляли в буфере для составления, pH 5,2, и инкубировали при 25°C в течение 14 дней наряду с образцом в стрессовых условиях с высоким pH.

Фиг. 9 представляет собой график процента относительной активности партий эренумаба в виде зависимости от процента площади пиков пре-пиков в анализе HIC-HPLC тех же партий для четырех различных условий хранения. Для каждой температуры показаны соответствующие линии регрессии из линейного регрессионного анализа данных. Для условия 40°C наклон линии регрессии статистически отличается от нуля и демонстрирует, как процент относительной активности уменьшается с увеличением процента площади пре-пиков HIC-HPLC.

На фиг. 10 показаны график и соответствующая линия регрессии для данных при условии хранения при 40°C на фиг. 9, при этом соответствующая линия продлена до пересечения порога 70% относительной активности. Линия порога 70% относительной активности пересекает линию регрессии около 28,85% площади пре-пиков HIC-HPLC.

На фиг. 11 показан репрезентативный профиль CEХ-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, анализировали с помощью CEХ-HPLC с применением в качестве подвижной фазы фосфата натрия, pH 6,6, с элюированием в линейном градиенте хлорида натрия и выявлением при поглощении 280 нм.

На фиг. 12 показаны перекрытия фракций, собранных с помощью CEХ-HPLC, и действующего вещества, представляющего собой эренумаб, проанализированные с помощью CEХ-HPLC. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и фракции, собранные с помощью полупрепаративной CEХ-HPLC (F1-F9), анализировали с помощью CEХ-HPLC с применением в качестве подвижной фазы фосфата натрия, pH 6,6, с элюированием в линейном градиенте хлорида натрия и выявлением при поглощении 280 нм. Каждая панель представляет собой график зависимости поглощения при 280 нм от времени элюирования в минутах.

На фиг. 13А и 13В показаны профили RP-HPLC фракций кислых пиков и главных пиков CEХ-HPLC (фиг. 13А) и фракций основных пиков CEХ-HPLC (фиг. 13В). Действующее вещество, представляющее собой эренумаб (DS), и фракции CEХ-HPLC (F1-F9) анализировали с помощью RP-HPLC с применением колонки Waters ВЕН300 С4 (размер частиц 1,7 мкм, 2,1×50 мм) и элюировали с применением подвижной фазы, содержащей 0,1% TFA, в градиенте 1-пропанола при 75°C с выявлением при 215 нм. IgG2-А, IgG2-А/В и IgG2-В соответствуют различным дисульфидным изоформам эренумаба. Структуры различных дисульфидных изоформ схематически показаны на фиг. 15А-15С.

На фиг. 14 показаны пептидные карты Lys-С невосстановленного (верхний график) и восстановленного (нижний график) эренумаба. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, денатурировали и расщепляли эндопротеазой Lys-С. Меченые пики на карте, полученной в восстанавливающих условиях, идентифицируют пептиды, присутствующие на пептидной карте Lys-С, полученной в восстанавливающих условиях, но отсутствующие на пептидной карте Lys-С, полученной в невосстанавливающих условиях. Описание каждого из меченых пептидов перечислено в табл. 18 и 19.

Фиг. 15А представляет собой схематическое изображение структуры дисульфидной изоформы эренумаба IgG2-А, идентифицированной с помощью пептидной карты Lys-С в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях.

Фиг. 15В представляет собой схематическое изображение структуры дисульфидной изоформы эренумаба IgG2-А/В, идентифицированной с помощью пептидной карты Lys-С в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях.

Фиг. 15С представляет собой схематическое изображение структуры дисульфидной изоформы эренумаба IgG2-В, идентифицированной с помощью пептидной карты Lys-С в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях.

Фиг. 16А представляет собой профиль RP-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, в невосстанавливающих условиях в увеличенном масштабе. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, анализировали с помощью RP-HPLC с применением колонки Waters ВЕН300 С4 (размер частиц 1,7 мкм, 2,1×50 мм) и элюировали с применением подвижной фазы, содержащей 0,1% TFA, в градиенте 1-пропанола при 75°C с выявлением при 215 нм. IgG2-А, IgG2-А/В и IgG2-В соответствуют различным дисульфидным изоформам эренумаба. Структуры различных дисульфидных изоформ схематически показаны на фиг. 15А-15С.

Фиг. 16В представляет собой перекрытие профилей RP-HPLC фракций CEХ-HPLC, обогащенных вариантом, представляющим собой дисульфидную изоформу, относительно действующего вещества, представляющего собой эренумаб. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и фракции CEХ-HPLC анализировали с помощью RP-HPLC с применением колонки Waters ВЕН300 С4 (размер частиц 1,7 мкм, 2,1×50 мм) и элюировали с применением подвижной фазы, содержащей 0,1% TFA, в градиенте 1-пропанола при 75°C с выявлением при 215 нм.

На фиг. 17А и 17В показан репрезентативный профиль SE-UHPLC действующего вещества, пред-

ставляющего собой эренумаб, в полном масштабе (фиг. 17А) и в увеличенном масштабе (фиг. 17В). Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, анализировали с помощью SE-UHPLC с применением в качестве подвижной фазы 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,8, и выявлением при поглощении 280 нм. Пик буфера отмечен звездочкой (*).

На фиг. 18 показаны перекрытия фракций, собранных с помощью SE-UHPLC, и действующего вещества, представляющего собой эренумаб, проанализированные с помощью SE-UHPLC. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и фракции, собранные с помощью полупрепаративной SE-HPLC, анализировали с помощью SE-UHPLC с применением в качестве подвижной фазы 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,8, и выявлением при поглощении 280 нм. Каждая панель представляет собой график зависимости поглощения при 280 нм от времени элюирования в минутах для каждой фракции, перекрывающийся на профиле SE-UHPLC для действующего вещества, представляющего собой эренумаб. Перекрытие всех трех фракций SE-UHPLC с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, показано на панели 4.

Фиг. 19 представляет собой профиль rCE-SDS фракций, собранных с помощью SE-UHPLC, и действующего вещества, представляющего собой эренумаб, в увеличенном масштабе. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб (DS), и фракции SE-UHPLC (главная, HMW1, HMW2) денатурировали и восстанавливали перед электрокинетическим вводом в капилляр из плавленого кварца без покрытия, заполненный буфером для геля с SDS, при 25°C. Поглощение мониторили при 220 нм. Системный пик отмечен звездочкой (*). LMW=низкомолекулярные разновидности; MMW=среднемолекулярные разновидности; HMW=высокомолекулярные разновидности; LC=легкая цепь; HC=тяжелая цепь; NGHC=негликозилированная тяжелая цепь; пост-HC=посттяжелая цепь.

Фиг. 20 представляет собой профиль SE-UHPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого термическому стрессу. Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, инкубированное при 50°C в течение до 14 дней, анализировали с помощью SE-UHPLC с применением в качестве подвижной фазы 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,8, и выявлением при поглощении 280 нм. Верхний график соответствует моменту времени день 14.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к идентификации и определению характеристик вариантов эренумаба, которые проявляют пониженную функциональную активность. В частности, варианты эренумаба, обладающие определенными структурными модификациями, гораздо менее эффективны, чем эренумаб, для блокирования активации рецептора CGRP лигандом CGRP. Такие варианты, каждый из которых описан в данном документе более подробно, включают изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, кислые варианты и HMW-разновидности. Посредством ограничения количества этих вариантов в действующем веществе, представляющем собой эренумаб, и продукте, представляющем собой лекарственное средство на основе эренумаба, можно поддерживать общую активность композиций на основе эренумаба или согласовывать ее с композициями на основе эренумаба, используемыми в ходе клинических испытаний, и наблюдать клиническую эффективность. Соответственно в настоящем изобретении предусмотрены композиции, содержащие эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где количества вариантов эренумаба в композиции контролируются в определенных диапазонах или пределах, как описано в данном документе.

Термин эренумаб относится к антителу IgG2, содержащему последовательность вариабельного участка тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5 и последовательность вариабельного участка легкой цепи под SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления эренумаб содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 2. В таких вариантах осуществления эренумаб представляет собой антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 1 и каждая из легких цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 2. При рекомбинантном получении эренумаб может претерпевать обычные посттрансляционные модификации на концах тяжелых и легких цепей, такие как удаление С-концевого остатка лизина в положении 456 тяжелой цепи и циклизация N-концевых остатков глутамин в легких и тяжелых цепях в пироглутамат. Таким образом, термин эренумаб может также относиться к антителу IgG2, у которого отсутствует С-концевой остаток лизина в одной или обеих тяжелых цепях, и/или которое содержит остаток пироглутамата в качестве N-концевого остатка вместо остатка глутамин в одной или обеих легких цепях и/или одной или обеих тяжелых цепях. Например, в некоторых вариантах осуществления эренумаб представляет собой антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 3 и каждая из легких цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 4. В других вариантах осуществления эренумаб представляет собой антитело, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и каждая из легких цепей содержит последовательность под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах осуществления вариант эренумаба, присутствующий в композициях по настоящему изобретению, представляет собой вариант, отличающийся зарядом. Вариант, отличающийся зарядом, относится к варианту эренумаба, который обладает отличающимся профилем заряда, возни-

кающим, *inter alia*, в результате посттрансляционных модификаций, которые непосредственно изменяют суммарный заряд антитела, индуцируют конформационные изменения или оказывают влияние на локальное распределение заряда. Такие посттрансляционные модификации могут включать дезамидирование, изомеризацию, гликирование, окисление и сialiлированное гликозилирование. Варианты, различающиеся по заряду, можно отделять от эренумаба и выявлять с применением ионообменной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии или хроматографии гидрофобных взаимодействий. Варианты эренумаба, различающиеся по заряду, могут включать без ограничения изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, кислые варианты и гликозилированные варианты.

В некоторых вариантах осуществления вариант эренумаба, отличающийся зарядом, представляет собой изомеризованный вариант. Изомеризованный вариант эренумаба относится к варианту эренумаба, в котором один или несколько остатков аспарагиновой кислоты в полипептиде тяжелой цепи или полипептиде легкой цепи превращаются в изоаспарагиновую кислоту или сукцинимид. В одном варианте осуществления изомеризованный вариант эренумаба содержит остаток изоаспарагиновой кислоты или сукцинимид в аминокислотном положении 105 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3) эренумаба. Как описано в примере 1, превращение остатка аспарагиновой кислоты в положении 105 в CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи в изоаспарат значительно снижает ингибирующую активность эренумаба.

В других вариантах осуществления вариант эренумаба, отличающийся зарядом, представляет собой дезамидированный вариант. Дезамидированный вариант эренумаба относится к варианту эренумаба, в котором один или несколько остатков аспарагина в полипептиде тяжелой цепи или полипептиде легкой цепи превращаются в аспарагиновую кислоту, которая, в свою очередь, может превращаться в сукцинимид или изоаспарагиновую кислоту. В одном варианте осуществления дезамидированный вариант содержит остаток аспарагина в аминокислотном положении 102 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3) эренумаба, превращенный в аспарагиновую кислоту, сукцинимид или изоаспарагиновую кислоту. Как описано в примере 1, дезамидирование остатка аспарагина в положении 102 в CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи значительно снижает ингибирующую активность эренумаба. В другом варианте осуществления дезамидированный вариант содержит остаток аспарагина в аминокислотном положении 393 и/или 398 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях эренумаба, превращенный в аспарагиновую кислоту, сукцинимид или изоаспарагиновую кислоту.

Способы выявления и количественного определения изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов эренумаба включают хроматографию гидрофобных взаимодействий, такую как способ высокоэффективной жидкостной хроматографии, представляющей собой хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC), описанный в примере 1, пептидное картирование, такое как способ пептидного картирования ESI-MS/MS, описанный в примере 1, ионообменную хроматографию, такую как способ катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (CEX-HPLC), описанный в примере 3, обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-HPLC) и другие способы, известные специалистам в данной области техники, такие как способы, описанные в Kameoka et al., *Journal of Biochemistry*, vol. 134:129-135, 2003; Zhang et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 30:1479-1490, 2003; Yang et al., *Electrophoresis*, vol. 31:1764-1772, 2010; Faseri et al., *Journal of Chromatography A*, vol. 1498:215-223, 2017; и Leblanc et al., *Journal of Chromatography B*, vol. 1048:130-139, 2017.

Композиции по настоящему изобретению содержат контролируемые количества изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов эренумаба таким образом, что общая активность композиций на основе эренумаба поддерживается на уровне, по наблюдениям обладающем клинической эффективностью. См. примеры 1 и 2. Например, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где один или несколько вариантов эренумаба включают изомеризованный вариант и дезамидированный вариант и где количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет менее приблизительно 30%. Количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции может составлять менее приблизительно 25%, менее приблизительно 20%, менее приблизительно 17%, менее приблизительно 15%, менее приблизительно 12%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 8%, менее приблизительно 6% или менее приблизительно 4%. В одном варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет менее приблизительно 15%. В другом варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет менее приблизительно 8%. В еще одном варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет менее приблизительно 4%. В некоторых вариантах осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции может составлять от приблизительно 0,5% до приблизительно 30%, от приблизительно 1% до приблизительно 20%, от приблизительно 1% до приблизительно 17%, от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 1% до приблизительно 12%, от приблизительно 1% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,5% до при-

близительно 8%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 6%, от приблизительно 1% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 3,5%, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5% или от приблизительно 1,7% до приблизительно 2,1%. В одном варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от приблизительно 1% до приблизительно 10%. В другом варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от приблизительно 1% до приблизительно 4%. В еще одном варианте осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 3,5%.

Количество изомеризованных и дезамидированных вариантов эренумаба в композициях по настоящему изобретению можно определять любым из описанных выше способов выявления и количественного определения этих вариантов. В определенных вариантах осуществления количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции определяют с помощью НИС-НPLC. Изомеризованные варианты (например, изомеризация Asp¹⁰⁵ в тяжелой цепи) и дезамидированные варианты (например, дезамидирование Asn¹⁰² в тяжелой цепи) являются преобладающими разновидностями во фракциях пре-пиков НИС-НPLC. См. примеры 1 и 2. Таким образом, количество этих вариантов в композиции на основе эренумаба можно определять по проценту площади пиков пре-пиков на хроматограмме НИС-НPLC. Пре-пики на хроматограмме НИС-НPLC относятся к пикам с высотой пика выше предела выявления, время удерживания которых короче времени удерживания для главного пика, который обычно представляет собой пик на хроматограмме с наибольшей высотой пика. См. фиг. 2А, 2В, 5, 7 и 8. Главный пик соответствует эренумабу (например, антителу, содержащему две тяжелые цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 1 или 3 и две легкие цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 2 или 4), который является основной формой молекулы антитела в композиции. Процент площади пиков пре-пиков можно рассчитать по следующей формуле:

$$\% \text{ пре-пиков} = \frac{\text{Площадь пре-пиков}}{\text{Общая интегрированная площадь пиков}} \times 100$$

где общая интегрированная площадь пика представляет собой объединенную площадь всех пиков на хроматограмме с высотой пика выше предела выявления.

Подобным образом можно рассчитать процент площади пика главного пика по следующей формуле:

$$\% \text{ главного пика} = \frac{\text{Площадь главного пика}}{\text{Общая интегрированная площадь пиков}} \times 100$$

где общая интегрированная площадь пика представляет собой объединенную площадь всех пиков на хроматограмме с высотой пика выше предела выявления.

В некоторых вариантах осуществления способ НИС-НPLC осуществляют, как описано в примере 1.

В определенных вариантах осуществления количество изомеризованных вариантов (например, изомеризация Asp¹⁰⁵ в тяжелой цепи) и дезамидированных вариантов (например, дезамидирование Asn¹⁰² в тяжелой цепи) в композиции по настоящему изобретению составляет приблизительно 15% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В одном варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 10% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В другом варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 8% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В другом варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 6% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В еще одном варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 4% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В еще одном варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 3,2% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В другом варианте осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 2,7% или менее, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В некоторых вариантах осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет от приблизительно 1% до приблизительно 10%, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В других вариантах осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет от приблизительно 1% до приблизительно 4%, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC. В еще одних вариантах осуществления количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 3,5%, как измерено по пре-пикам при НИС-НPLC.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают изомеризованные варианты и дезамидированные варианты и где

(i) количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 90% или более, приблизительно

92% или более, приблизительно 93,9% или более, приблизительно 94,4% или более, приблизительно 96,2% или более, приблизительно 96,8% или более или приблизительно 97,3% или более, как измерено по главному пику при HIC-HPLC; и

(ii) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 10% или менее, приблизительно 8% или менее, приблизительно 6,1% или менее, приблизительно 5,6% или менее, приблизительно 3,8% или менее, приблизительно 3,2% или менее или приблизительно 2,7% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC.

В одном варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 92% или более, как измерено по главному пику при HIC-HPLC, и количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 8% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В другом варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 96,8% или более, как измерено по главному пику при HIC-HPLC, и количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 3,2% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В еще одном варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 97,3% или более, как измерено по главному пику при HIC-HPLC, и количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 2,7% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В этих и других вариантах осуществления HIC-HPLC осуществляют, как описано в примере 1, и количества определяют по проценту площади пика для главного пика и пре-пиков.

Как описано в примере 2, изомеризация Asp¹⁰⁵ в CDR3 тяжелой цепи была высокочувствительной к условиям форсированного термического стресса, а дезамидирование как в CDR3 тяжелой цепи (Asn¹⁰²), так и в Fc-участке (Asn³⁹³ и Asn³⁹⁸) усиливалось при воздействии повышенного pH (например, pH 7,4 или выше). Таким образом, образование изомеризованных и дезамидированных вариантов эренумаба можно контролировать в ходе процесса изготовления и хранения посредством ограничения времени воздействия температур выше комнатной температуры и основных растворов, например, растворов с pH выше 7,0, на композиции на основе эренумаба. Например, в некоторых вариантах осуществления удерживание пула в ходе процесса или хранения композиций на основе эренумаба осуществляют при комнатной температуре в течение не более 14 дней. В других вариантах осуществления длительное хранение композиций на основе эренумаба осуществляют при температурах ниже 15°C, например от 2 до 8°C. Изомеризованные варианты и дезамидированные варианты эренумаба также можно удалять из композиций на основе эренумаба с помощью способов очистки, таких как хроматография гидрофобных взаимодействий или ионообменная хроматография. Как изомеризованные варианты, так и дезамидированные варианты эренумаба элюируются раньше, чем эренумаб при HIC и, таким образом, эти варианты можно удалять из композиции на основе эренумаба посредством сбора и удаления таких ранее элюированных фракций. Дезамидированные варианты эренумаба обычно обладают большим отрицательным зарядом, чем эренумаб и, следовательно, будут элюироваться раньше, чем эренумаб, при катионообменной хроматографии, или будут элюироваться позже, чем эренумаб, при анионообменной хроматографии. Таким образом, более кислые дезамидированные варианты можно удалять из композиций на основе эренумаба посредством сбора элюируемых из катионообменной или анионообменной смолы фракций в соответствующее время.

В определенных вариантах осуществления вариант эренумаба, отличающийся зарядом, в композициях по настоящему изобретению представляет собой кислый вариант. Кислый вариант относится к варианту эренумаба, который приобрел отрицательный заряд или потерял положительный заряд, или характеризуется измененным профилем поверхностного заряда из-за конформационных изменений и, таким образом, обладает более кислыми свойствами по сравнению с эренумабом. Кислые варианты эренумаба проявляют пониженную ингибирующую активность по сравнению с эренумабом. См. пример 3 и табл. 14. Кислые варианты можно отделять от эренумаба, выявлять и количественно определять с применением любого способа, который позволяет разделять белки на основе характеристик заряда, такого как гель-электрофорез с изоэлектрическим фокусированием, капиллярный гель-электрофорез с изоэлектрическим фокусированием, катионообменная хроматография (СЕХ) и анионообменная хроматография (АЕХ). При анализе с помощью ионообменной хроматографии кислые варианты можно идентифицировать по их времени удерживания относительно главного пика, который соответствует эренумабу. Например, кислые варианты элюируются раньше, чем главный пик СЕХ, то есть время удерживания кислых вариантов короче, чем время удерживания для главного пика при СЕХ. При применении АЕХ кислые варианты элюируются позже главного пика и, таким образом, характеризуются более длительным временем удерживания, чем время удерживания для главного пика при АЕХ.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, содержащие контролируемые количества кислых вариантов эренумаба таким образом, что общая активность композиций на основе эренумаба поддерживается на уровне, по наблюдениям обладающем клинической эффективностью. См. пример 3. Соответственно в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая эренумаб и один или несколько кислых вариантов эренумаба, где количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно

40%. Количество кислых вариантов в композиции может составлять менее приблизительно 38%, менее приблизительно 37%, менее приблизительно 36%, менее приблизительно 35%, менее приблизительно 34%, менее приблизительно 33%, менее приблизительно 32%, менее приблизительно 31%, менее приблизительно 30%, менее приблизительно 29%, менее приблизительно 28%, менее приблизительно 27% или менее приблизительно 26%. В одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно 38%. В другом варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно 35%. В еще одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно 32%. В еще одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно 30%. В некоторых вариантах осуществления количество кислых вариантов в композиции может составлять от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 25% до приблизительно 38%, от приблизительно 24% до приблизительно 35%, от приблизительно 28,5% до приблизительно 37,5%, от приблизительно 26% до приблизительно 34%, от приблизительно 28% до приблизительно 32%, от приблизительно 32,5% до приблизительно 37,5%, от приблизительно 28,7% до приблизительно 31,3% или от приблизительно 26,5% до приблизительно 33,6%. В одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 25% до приблизительно 38%. В другом варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 26% до приблизительно 34%. В еще одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 28% до приблизительно 32%.

Количество кислых вариантов эренумаба в композициях по настоящему изобретению можно определять любым из описанных выше способов выявления и количественного определения этих вариантов. В определенных вариантах осуществления количество кислых вариантов в композиции определяют с помощью ионообменной хроматографии. В одном конкретном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции определяют с помощью СЕХ-НPLC, например, способом, описанным в примере 3. Кислые варианты эренумаба элюируются раньше, чем эренумаб (главный пик) при разделении с помощью СЕХ, а основные варианты эренумаба элюируются позже, чем эренумаб (главный пик). См. фиг. 11. Количество кислых вариантов в композициях на основе эренумаба можно определять по проценту площади пиков кислотных пиков на хроматограмме СЕХ-НPLC. Кислотные пики представляют собой пики с высотой пика выше предела выявления, которые характеризуются более коротким временем удерживания, чем время удерживания для главного пика. Основные пики представляют собой пики с высотой пика выше предела выявления, которые характеризуются более длительным временем удерживания, чем время удерживания для главного пика. Процент площади пика требуемого компонента (например, кислотных пиков, главного пика или основных пиков) можно рассчитать посредством деления площади пика требуемого компонента (например, кислотных пиков, главного пика или основных пиков) на общую интегрированную площадь пиков и умножения результата на 100. В определенных вариантах осуществления способ СЕХ-НPLC осуществляют, как описано в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают кислые варианты, и количество кислых вариантов в композиции составляет приблизительно 40% или менее, приблизительно 38% или менее, приблизительно 36% или менее, приблизительно 35% или менее, приблизительно 34% или менее или приблизительно 32% или менее, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 25% до приблизительно 38%, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В другом варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 26% до приблизительно 34%, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В еще одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 26,5% до приблизительно 33,6%, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В еще одном варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 28,7% до приблизительно 31,3%, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В другом варианте осуществления количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 32,5% до приблизительно 37,5%, как измерено по кислотным пикам при СЕХ-НPLC. В этих и других вариантах осуществления СЕХ-НPLC осуществляют, как описано в примере 3, и количества кислых вариантов определяют по проценту площади пиков для кислотных пиков.

Кислые варианты могут включать варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, дезамидированные варианты, фрагментированные варианты, варианты с неконсенсусным гликозилированием, высокомолекулярные (HMW) разновидности и их комбинации. В определенных вариантах осуществления кислые варианты включают варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы (описанные более подробно в данном документе), фрагментированные варианты или их комбинации. Как описано в примере 3, кислые фракции, обогащенные фрагментированными вариантами или вариантами, представляющими собой дисульфидные изоформы, в частности дисульфидной изоформой IgG2-B, проявляют пониженную активность по сравнению с эренумабом.

В некоторых вариантах осуществления кислые варианты включают фрагментированные варианты.

Фрагментированные варианты могут образовываться посредством гидролиза пептидных связей, приводящего к расщеплению полипептида легкой цепи и/или полипептида тяжелой цепи. Следовательно, фрагментированные варианты эренумаба относятся к фрагментам легкой цепи эренумаба (SEQ ID NO: 2 или 4) или фрагментам тяжелой цепи эренумаба (SEQ ID NO: 1 или 3), которые состоят из меньшего количества аминокислот, чем полноразмерные цепи. Фрагментированные варианты можно измерять с применением капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS), например, как способ rCE-SDS, описанный в примере 3, который позволяет разделять такие фрагментированные варианты на низкомолекулярные (LMW) и среднемолекулярные (MMW) разновидности. LMW-разновидности эренумаба представляют собой фрагменты с молекулярным весом меньше, чем у интактной легкой цепи эренумаба, молекулярный вес которой составляет приблизительно 22790 Да. MMW-разновидности эренумаба представляют собой фрагменты с молекулярным весом больше, чем у интактной легкой цепи эренумаба, но меньше, чем у интактной тяжелой цепи эренумаба, молекулярный вес которой составляет приблизительно 50165 Да (дегликозилированной). После разделения с помощью rCE-SDS LMW-разновидности эренумаба мигрируют перед пиком легкой цепи эренумаба, а MMW-разновидности эренумаба мигрируют между пиком легкой цепи эренумаба и пиком тяжелой цепи эренумаба. См., например, фиг. 19.

Количество кислых вариантов в композициях на основе эренумаба можно уменьшать с помощью хроматографических способов, которые позволяют разделять белки на основе характеристик заряда, таких как ионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий или хроматография в смешанном режиме. См., например, способы, описанные в патентах США № 8946395; 9067990; 9249218; и 9346879. Как описано выше, кислые варианты эренумаба элюируются раньше, чем эренумаб (главный пик), при разделении с помощью катионообменной хроматографии. Таким образом, кислые варианты можно собирать и удалять до элюирования эренумаба главного пика, либо сбор фракций эренумаба можно начинать после элюирования кислых вариантов. При разделении с помощью анионообменной хроматографии кислые варианты эренумаба элюируются позже, чем эренумаб (главный пик) и, таким образом, количество кислых вариантов можно уменьшать или их можно удалять из композиции на основе эренумаба посредством прекращения сбора фракций эренумаба до элюирования кислых вариантов.

В определенных вариантах осуществления кислые варианты включают варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы. Антитела IgG2 могут демонстрировать различные структурные изоформы в зависимости от расположения дисульфидных связей в шарнирном участке. В классической дисульфидной изоформе, известной как IgG2-A, Fab-плечи не связаны дисульфидными связями с шарнирным участком, и каждый из четырех остатков цистеина в шарнирном участке (например, C232, C233, C236 и C239 в SEQ ID NO: 1 или 3) одной тяжелой цепи образует дисульфидную связь с соответствующим остатком цистеина в шарнирном участке другой тяжелой цепи. См. фиг. 15A. Вариант, представляющий собой дисульфидную изоформу, относится к варианту антитела IgG2, у которого соединение посредством дисульфидной связи отличается от того, которое обнаруживается в классической изоформе IgG2-A. В некоторых вариантах осуществления вариант, представляющий собой дисульфидную изоформу, представляет собой изоформу IgG2-B. В структуре изоформы IgG2-B оба Fab-плеча связаны с шарнирным участком посредством одного или нескольких остатков цистеина в шарнирном участке с образованием дисульфидных связей с остатками цистеина в константном участке CN1 тяжелой цепи и/или константном участке CL легкой цепи. См. фиг. 15C. Например, в одном варианте осуществления изоформа IgG2-B содержит следующее соединение посредством дисульфидной связи между первой тяжелой цепью (HC1), первой легкой цепью (LC1), второй тяжелой цепью (HC2) и второй легкой цепью (LC2), при этом аминокислотные положения относятся к SEQ ID NO: 1 или 3 для тяжелых цепей и SEQ ID NO: 2 или 4 для легких цепей:

C232 из HC1 с C157 из HC2;
 C233 из HC1 с C215 из LC1;
 C232 из HC2 с C157 из HC1;
 C233 из HC2 с C215 из LC2;
 C236 из HC1 с C236 из HC2;
 C239 из HC1 с C239 из HC2.

В других вариантах осуществления вариант, представляющий собой дисульфидную изоформу, представляет собой изоформу IgG2-A/B. В структуре изоформы IgG2-A/B только одно Fab-плечо связано с шарнирным участком посредством одного или нескольких остатков цистеина в шарнирном участке с образованием дисульфидных связей с остатками цистеина в константном участке CN1 тяжелой цепи и/или константном участке CL легкой цепи. См. фиг. 15B. В одном варианте осуществления изоформа IgG2-A/B содержит следующее соединение посредством дисульфидной связи между HC1, LC1, HC2 и LC2, при этом аминокислотные положения относятся к SEQ ID NO: 1 или 3 для тяжелых цепей и SEQ ID NO: 2 или 4 для легких цепей:

C232 из HC1 с C157 из HC2;
 C232 из HC2 с C215 из LC2;
 C233 из HC1 с C233 из HC2;

C236 из HC1 с C236 из HC2;

C239 из HC1 с C239 из HC2.

Настоящее изобретение включает композиции, содержащие эренумаб и один или несколько его вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы. Варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, могут включать изоформы IgG2-B, изоформы IgG2-A/B или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит эренумаб и один или несколько его вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы, где один или несколько вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы, включают изоформу IgG2-B, и где количество изоформы IgG2-B в композиции составляет менее приблизительно 20%. Количество изоформы IgG2-B в композиции может составлять менее приблизительно 18%, менее приблизительно 16%, менее приблизительно 14%, менее приблизительно 12%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 9%, менее приблизительно 8%, менее приблизительно 7% или менее приблизительно 6%. В одном варианте осуществления количество изоформы IgG2-B в композиции составляет менее приблизительно 10%. В другом варианте осуществления количество изоформы IgG2-B в композиции составляет менее приблизительно 8%. В определенных вариантах осуществления количество изоформы IgG2-B в композиции может составлять от приблизительно 0,5% до приблизительно 20%, от приблизительно 1% до приблизительно 16%, от приблизительно 3% до приблизительно 12%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 8%, от приблизительно 1% до приблизительно 6%, от приблизительно 4% до приблизительно 6%, от приблизительно 4,4% до приблизительно 5,9% или от приблизительно 4,6% до приблизительно 5,2%. В одном варианте осуществления количество изоформы IgG2-B в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 8%. В другом варианте осуществления количество изоформы IgG2-B в композиции составляет от приблизительно 4% до приблизительно 6%.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат эренумаб и один или несколько его вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы, где один или несколько вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы, включают изоформу IgG2-A/B. Количество изоформы IgG2-A/B в композиции может составлять от приблизительно 10% до приблизительно 56%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 26% до приблизительно 38%, от приблизительно 27% до приблизительно 32%, от приблизительно 32% до приблизительно 38%, от приблизительно 34% до приблизительно 37% или от приблизительно 34,2% до приблизительно 35,5%. В одном варианте осуществления количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 32% до приблизительно 38%. В другом варианте осуществления количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 34% до приблизительно 37%.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат изоформу эренумаба IgG2-A, изоформу эренумаба IgG2-A/B и изоформу эренумаба IgG2-B, где

(i) количество изоформы IgG2-A в композиции составляет от приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 52% до приблизительно 66%, от приблизительно 56% до приблизительно 60% или от приблизительно 57,4% до приблизительно 59,3%;

(ii) количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 26% до приблизительно 38%, от приблизительно 32% до приблизительно 38%, от приблизительно 34% до приблизительно 37% или от приблизительно 34,2% до 35,5%; и

(iii) количество изоформы IgG2-B в композиции составляет от приблизительно 3% до приблизительно 12%, от приблизительно 1% до приблизительно 10%, от приблизительно 4% до приблизительно 8% или от приблизительно 4,6% до приблизительно 5,2%.

Способы выявления и количественного определения дисульфидных изоформ включают обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию в невосстанавливающих условиях (RP-HPLC), такую как способ RP-HPLC, описанный в примерах 3 и 4, а также в Wyruch et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283(23):16194-16205, 2008; пептидное картирование, такое как способ пептидного картирования Lys-C, описанный в примере 4; и способы, основанные на масс-спектрометрии, такие как способы, описанные в Zhang et al., *Anal Chem.*, vol. 82(3):1090-1099, 2010; и Zhang et al., *Biochemistry*, vol. 54:1956-1962, 2015. В определенных вариантах осуществления количество дисульфидных изоформ (например, IgG2-A, IgG2-A/B и IgG2-B) в композициях по настоящему изобретению определяют с помощью RP-HPLC в невосстанавливающих условиях, необязательно с применением процентов площади пиков для каждой из изоформ в профиле RP-HPLC (см., например, фиг. 16A).

Долю дисульфидных изоформ можно изменять, подвергая композиции, содержащие различные изоформы, воздействию только окислительно-восстановительных (редокс) средств или их комбинаций с хаотропными средствами с применением способов, описанных в Dillon et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283(23):16206-16215, 2008, публикации по РСТ № WO 2006/047340 или публикации по РСТ № WO 2006/060083, все из которых настоящим включены посредством ссылки. Например, долю изоформ IgG2-A можно увеличить, подвергнув композиции, содержащие различные изоформы, воздействию редокс-средств (например, цистеин/цистин или глутатион/окисленный глутатион) и хаотропных средств (например, гидрохлорид гуанидина). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления количество изоформ эренумаба IgG2-B, которые значительно менее активны, чем изоформы IgG2-A/B и IgG2-A,

можно уменьшать или изоформы можно удалять из композиций, подвергнув композиции воздействию редокс-средств в комбинации с хаотропными средствами, необязательно в соответствии со способами, описанными в Dillon et al., 2008; WO 2006/047340; или WO 2006/060083.

В определенных вариантах осуществления вариант эренумаба, присутствующий в композициях по настоящему изобретению, представляет собой вариант, отличающийся размером. Вариант эренумаба, отличающийся размером, относится к варианту, который обладает либо более низким молекулярным весом, чем мономер эренумаба, либо более высоким молекулярным весом, чем мономер эренумаба. Применяемый в данном документе термин мономер эренумаба относится к интактному антители, содержащему две тяжелые цепи и две легкие цепи, при этом мономер характеризуется молекулярным весом, составляющим приблизительно 146194 Да при измерении дегликозилированных тяжелых и легких цепей без N- или C-концевых модификаций. Варианты, различающиеся по размеру, включают фрагментированные варианты, такие как LMW-разновидности и MMW-разновидности, описанные выше, а также высокомолекулярные (HMW) разновидности. HMW-разновидности эренумаба относятся к соединениям, молекулярный вес которых больше, чем у мономера эренумаба. HMW-разновидности могут включать димеры, мультимеры и другие агрегированные формы эренумаба, которые образуются посредством ковалентной и нековалентной самоассоциации. В некоторых вариантах осуществления HMW-разновидности эренумаба включают ковалентно связанный димер эренумаба (т.е. два ковалентно связанных мономера эренумаба). В определенных вариантах осуществления ковалентно связанный димер эренумаба представляет собой восстанавливаемый димер, при этом димер восстанавливается до отдельных тяжелых и легких цепей в восстанавливающих и денатурирующих условиях.

Способы выявления и количественного определения вариантов эренумаба, различающихся по размеру, включают эксклюзионную хроматографию, такую как способ эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), описанный в примере 5, капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (CE-SDS), выполняемый в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, такой как способы rCE-SDS и nrCE-SDS, описанные в примере 3, ультрацентрифугирование со скоростной седиментацией и SE-HPLC с выявлением статического светорассеяния для определения молярной массы.

Фракции, обогащенные HMW-разновидностями, значительно менее активны в отношении ингибирования лиганд-индуцированной активации рецептора CGRP по сравнению с эренумабом. См. пример 5 и табл. 26. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе эренумаба, содержащие контролируемые количества HMW-разновидностей таким образом, что общая активность композиций на основе эренумаба поддерживается на уровне, по наблюдениям обладающем клинической эффективностью. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат эренумаб и HMW-разновидности эренумаба, где количество HMW-разновидностей в композиции составляет менее приблизительно 3,0%. Количество HMW-разновидностей в композиции может составлять приблизительно 2,5% или менее, приблизительно 2,4% или менее, приблизительно 2,3% или менее, приблизительно 2,2% или менее, приблизительно 2,1% или менее, приблизительно 2,0% или менее, приблизительно 1,8% или менее, приблизительно 1,6% или менее, приблизительно 1,4% или менее, приблизительно 1,2% или менее, приблизительно 1,0% или менее, приблизительно 0,8% или менее, приблизительно 0,6% или менее или приблизительно 0,4% или менее. В одном варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,8% или менее. В другом варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,4% или менее. В еще одном варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,2% или менее. В еще одном варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 0,6% или менее. В некоторых вариантах осуществления количество HMW-разновидностей в композиции может составлять от приблизительно 0,3% до приблизительно 2,4%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2%, от приблизительно 0,6% до приблизительно 2,1%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 1,8%, от приблизительно 1,0% до приблизительно 1,6% или от приблизительно 0,6% до приблизительно 1,4%. В одном варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2%. В другом варианте осуществления количество HMW-разновидностей в композиции составляет от приблизительно 0,6% до приблизительно 2,1%.

Количество вариантов, различающихся по размеру, в композициях по настоящему изобретению можно определять любым из описанных выше способов выявления и количественного определения этих вариантов. В определенных вариантах осуществления количество вариантов, различающихся по размеру (например, HMW-разновидностей), определяют с помощью SE-UHPLC. HMW-разновидности эренумаба элюируются раньше, чем мономер эренумаба (главный пик) при SE-UHPLC и, таким образом, соответствуют пре-пикам на хроматограмме SE-UHPLC, тогда как LMW- и MMW-разновидности элюируются позже, чем мономер эренумаба и, таким образом, соответствуют пост-пикам на хроматограмме SE-UHPLC. См. пример 5 и фиг. 17A и 17B. Соответственно количество этих вариантов, различающихся по размеру, в композиции на основе эренумаба можно определять по проценту площади пиков пре-пиков (HMW-разновидности) или пост-пиков (LMW- и MMW-разновидности) на хроматограмме SE-UHPLC. В

некоторых вариантах осуществления способ SE-UHPLC осуществляют, как описано в примере 5.

В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, различающихся по размеру, где варианты эренумаба, различающиеся по размеру, включают HMW-разновидности эренумаба и где

(i) количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 97,5% или более, приблизительно 97,9% или более, приблизительно 98,2% или более, приблизительно 98,4% или более, приблизительно 98,6% или более, приблизительно 98,8% или более, приблизительно 99,2% или более или приблизительно 99,4% или более, как измерено по главному пику при SE-UHPLC; и

(ii) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 2,5% или менее, приблизительно 2,1% или менее, приблизительно 1,8% или менее, приблизительно 1,6% или менее, приблизительно 1,4% или менее, приблизительно 1,2% или менее, приблизительно 0,8% или менее или приблизительно 0,6% или менее, как измерено по пре-пикам при SE-UHPLC.

В одном варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 97,9% или более, как измерено по главному пику при SE-UHPLC, и количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 2,1% или менее, как измерено по пре-пикам при SE-UHPLC. В другом варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 98,2% или более, как измерено по главному пику при SE-UHPLC, и количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,8% или менее, как измерено по пре-пикам при SE-UHPLC. В еще одном варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 98,8% или более, как измерено по главному пику при SE-UHPLC, и количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,2% или менее, как измерено по пре-пикам при SE-UHPLC. В еще одном варианте осуществления количество эренумаба в композиции составляет приблизительно 98,6% или более, как измерено по главному пику при SE-UHPLC, и количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,4% или менее, как измерено по пре-пикам при SE-UHPLC. В этих и других вариантах осуществления SE-UHPLC осуществляют, как описано в примере 5, и количества определяют по проценту площади пика для главного пика и пре-пиков.

Количество вариантов, различающихся по размеру (например, HMW-разновидностей), в композициях на основе эренумаба можно уменьшать с применением способов, которые позволяют разделять белки на основе размера или гидродинамического объема, таких как эксклюзионная хроматография и стадии фильтрации. Кроме того, аффинная хроматография (например, хроматография с применением белка A), катионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий и хроматография в смешанном режиме также способны эффективно снижать уровень HMW-разновидностей. См., например, способы, описанные в Shukla et al., *Journal of Chromatography B*, vol. 848:28-39, 2007; Chen et al., *Journal of Chromatography A*, vol. 1217:216-224, 2010; патенты США № 6620918; 9505803; и 9783570. Как описано выше, HMW-разновидности эренумаба элюируются раньше, чем эренумаб (главный пик), при разделении с помощью эксклюзионной хроматографии. Таким образом, HMW-разновидности можно собирать и удалять до элюирования эренумаба главного пика, либо сбор фракций эренумаба можно начинать после элюирования HMW-разновидностей.

Композиции на основе эренумаба по настоящему изобретению можно анализировать в отношении одного или нескольких вариантов эренумаба, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композиции, содержащие эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты, HMW-разновидности или их комбинации, и где композиции содержат контролируемые количества каждого из этих вариантов. В одном варианте осуществления композиция содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты, HMW-разновидности или их комбинации, и где композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (a) количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 25% до приблизительно 38%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 2,1% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (c) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 8,0% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В другом варианте осуществления композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (a) количество кислых вариантов в композиции составляет менее приблизительно 38%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 2,5% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (c) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 10% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В другом варианте осуществления композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (a) количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 32,5% до приблизительно 37,5%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,8% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (c) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет прибли-

зительно 6,1% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В еще одном варианте осуществления композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (а) количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 26,5% до приблизительно 33,6%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,2% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (с) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 3,2% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В еще одном варианте осуществления композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (а) количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 26,5% до приблизительно 33,6%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 1,2% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (с) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 2,7% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC. В другом варианте осуществления композиция обладает одной или несколькими, или всеми из следующих характеристик: (а) количество кислых вариантов в композиции составляет от приблизительно 28,7% до приблизительно 31,3%, как измерено с помощью CEX-HPLC; (b) количество HMW-разновидностей в композиции составляет приблизительно 0,6% или менее, как измерено с помощью SE-UHPLC; и (с) количество изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции составляет приблизительно 2,1% или менее, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC.

Композиции на основе эренумаба по настоящему изобретению можно получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь и легкую цепь, в клетке-хозяине, частичной очистки или очистки эренумаба из культур клеток-хозяев или лизатов клеток-хозяев и анализа полученных композиций в отношении одного или нескольких вариантов эренумаба, подробно описанных в данном документе, в соответствии со способами, более подробно описанными ниже.

Для рекомбинантного получения эренумаба одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь (например, полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1) и легкую цепь (например, полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2), встраивают в один или несколько векторов экспрессии. Нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, можно встраивать в один вектор экспрессии, или их можно встраивать в отдельные векторы экспрессии. Применяемый в данном документе термин "вектор экспрессии" или "конструкция для экспрессии" относится к рекомбинантной молекуле ДНК, содержащей требуемую кодирующую последовательность и соответствующие регуляторные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Вектор экспрессии может включать последовательности, которые оказывают влияние на транскрипцию, трансляцию или регулируют их и при наличии интронов оказывают влияние на сплайсинг РНК кодирующего участка, функционально связанного с ними. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминирования и полиаденилирования. Если требуется, секреторная последовательность сигнального пептида также может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Векторы могут также включать один или несколько генов селективируемых маркеров для облегчения отбора клеток-хозяев, в которые были встроены векторы. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи эренумаба, а также подходящие последовательности сигнального пептида и другие компоненты векторов экспрессии для рекомбинантной экспрессии эренумаба описаны в публикации по РСТ № WO 2010/075238, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте.

После того как вектор экспрессии был сконструирован, и одна или несколько молекул нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты тяжелой и легкой цепей эренумаба, были вставлены в соответствующий(ие) сайт(ы) вектора или векторов, готовый(ые) вектор(ы) может(могут) быть вставлен(ы) в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектором экспрессии для эренумаба выбранной клетки-хозяина можно осуществлять с помощью хорошо известных способов, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ частично будет зависеть от типа применяемой клетки-хозяина.

Данные способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области техники и изложены, например, в Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1989).

При культивировании в соответствующих условиях клетка-хозяин синтезирует эренумаб, который впоследствии может быть собран из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые требуются или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость фолдинга в биологически активную молекулу.

Иллюстративные клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот. Прокариотические клетки-хозяева включают зубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E.coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacillus*, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии рекомбинантных полипептидов. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи наиболее часто применяются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в данном документе, такие как *Pichia*, например, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomycetes*, например, *Schwanniomycetes occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyrocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A nidulans* и *A niger*.

Клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител можно получать из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты, а также соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступно множество вирусных штаммов для трансфекции таких клеток, например, вариант L-1 NPV *Autographa californica* и штамм Bm-5 NPV *Bombyx mori*.

Клетки-хозяева позвоночных также являются подходящими хозяевами, и рекомбинантное получение антител из таких клеток стало рутинной процедурой. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения импортизованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая без ограничения клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки линии CHO1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:4216, 1980); линию клеток CV1 почки обезьяны, трансформированную с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональную линию клеток почки человека (клетки линии 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., J. Gen Virol., 36:59, 1977); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Vid. Reprod., 23:243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки линии TRI (Mather et al., Annals N.Y., Acad. Sci., 383:44-68, 1982); клетки линии MRC 5 или клетки линии FS4; клетки миеломы млекопитающих и ряд других линий клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки линии CHO являются предпочтительными клетками-хозяевами для экспрессии эренумаба.

Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют описанными выше векторами экспрессии для получения эренумаба и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Клетки-хозяева, применяемые для получения эренумаба, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM, Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любую из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz., 58:44, 1979; Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255, 1980; патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; или WO 87/00195, можно применять в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно при необходимости дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GentaMycin™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно

присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п. являются такими, которые ранее применялись для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области техники.

В ходе культивирования клеток-хозяев антитело можно получать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве, или оно может секретироваться непосредственно в среду. Если антитело получают внутриклеточно, на первой стадии клетки-хозяева лизируют (например, с помощью механического воздействия, осмотического шока или ферментативных способов), а дебрис в форме частиц (например, клетки-хозяева и лизированные фрагменты) удаляют, например, с помощью центрифугирования, микрофльтрации или ультрафльтрации. Если антитело секретируется в культуральную среду, антитело можно отделить от клеток-хозяев с помощью центрифугирования или микрофльтрации и, необязательно, в дальнейшем сконцентрировать с помощью ультрафльтрации. Эренумаб можно дополнительно очищать или частично очищать с применением, например, одной или нескольких стадий хроматографии, такой как аффинная хроматография (например, аффинная хроматография с белком А или белком G), катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, гидроксиапатитная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий или хроматография в смешанном режиме.

Как только композицию на основе эренумаба получили или изготовили, композицию можно оценивать в отношении наличия и количества одного или нескольких вариантов эренумаба, описанных в данном документе, включая изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты и варианты, различающиеся по размеру (например, HMW-разновидности). Соответственно настоящее изобретение включает способы оценки качества композиции на основе эренумаба, включая получение композиции на основе эренумаба, которая содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба; измерение количества одного или нескольких вариантов эренумаба в композиции; сравнение измеренного количества одного или нескольких вариантов эренумаба с предварительно определенным эталонным критерием; и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе эренумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. В некоторых вариантах осуществления способы включают одно, два или три из (1) измерения количества изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции; (2) измерения количества кислых вариантов в композиции; и/или (3) измерения количества HMW-разновидностей в композиции. В определенных вариантах осуществления все три измерения осуществляют на композиции на основе эренумаба.

Предварительно определенный эталонный критерий для каждого варианта эренумаба может представлять собой пороговое количество или диапазон количеств варианта, которые не оказывают значительного влияния на активность композиции на основе эренумаба в отношении ингибирования лиганд-индуцированной активации рецептора CGRP. Например, предварительно определенный эталонный критерий для каждого варианта эренумаба может представлять собой любой из пределов или диапазонов, раскрытых в настоящем документе для каждого из вариантов, поскольку композиции на основе эренумаба с данными пределами/диапазонами вариантов обладали активностью, сравнимой с композициями на основе эренумаба, которые оценивались в клинических испытаниях и демонстрировали клиническую эффективность.

В определенных вариантах осуществления способов, если измеренное количество варианта эренумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию, то композицию на основе эренумаба можно классифицировать как приемлемую и продвинуть на следующую стадию процесса изготовления или распространения, например, посредством получения фармацевтического состава из композиции (например, посредством объединения с одним или несколькими вспомогательными веществами или разбавителями); посредством получения фармацевтического продукта из композиции (например, посредством заполнения флаконов, шприцев, автоинъекторов или других контейнеров или устройств для доставки); упаковки композиции с инструкциями по применению, разбавителями и/или устройствами для доставки; или выпуска композиции для коммерческой продажи или доставки дистрибьюторам. В некоторых вариантах осуществления способов фармацевтический состав композиции на основе эренумаба получают, если измеренное количество варианта эренумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию. В других вариантах осуществления способов фармацевтический продукт из композиции на основе эренумаба получают, если измеренное количество варианта эренумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию. Способы получения фармацевтических составов и фармацевтических продуктов из композиций на основе эренумаба более подробно описаны ниже. Если измеренное количество варианта эренумаба в композиции не соответствует предварительно определенному эталонному критерию, то в некоторых вариантах осуществления способов композиции на основе эренумаба можно классифицировать как неприемлемую и удалить, уничтожить или подвергнуть дополнительным стадиям изготовления, таким как дополнительная очистка для удаления или уменьшения количества варианта эренумаба в композиции таким образом, чтобы удовлетворялся предварительно определенный эталонный критерий.

кислых вариантов в композиции на основе эренумаба составляет от приблизительно 25% до приблизительно 38%. В другом конкретном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества кислых вариантов в композиции на основе эренумаба составляет от приблизительно 26,5% до приблизительно 33,6%. В определенных вариантах осуществления количество кислых вариантов в композиции на основе эренумаба измеряют с помощью СЕХ-НРЛС, например, по проценту площади пиков кислотных пиков при СЕХ-НРЛС. В таких вариантах осуществления способ СЕХ-НРЛС можно осуществлять, как описано в примере 3.

В другом варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе эренумаба включают получение композиции на основе эренумаба, которая содержит эренумаб и НМВ-разновидности эренумаба; измерение количества НМВ-разновидностей в композиции; сравнение измеренного количества НМВ-разновидностей с предварительно определенным эталонным критерием; и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе эренумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба может составлять менее приблизительно 3,0%, например, приблизительно 2,5% или менее, приблизительно 2,4% или менее, приблизительно 2,3% или менее, приблизительно 2,2% или менее, приблизительно 2,1% или менее, приблизительно 2,0% или менее, приблизительно 1,8% или менее, приблизительно 1,6% или менее, приблизительно 1,4% или менее, приблизительно 1,2% или менее, приблизительно 1,0% или менее, приблизительно 0,8% или менее, приблизительно 0,6% или менее или приблизительно 0,4% или менее. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба составляет приблизительно 2,5% или менее. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба составляет приблизительно 1,8% или менее. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба составляет приблизительно 1,4% или менее. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба составляет приблизительно 1,2% или менее. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба составляет приблизительно 0,6% или менее. Предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба может, в некоторых вариантах осуществления, представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,3% до приблизительно 2,4% композиции на основе эренумаба, от приблизительно 0,6% до приблизительно 2,1% композиции на основе эренумаба, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2% композиции на основе эренумаба или от приблизительно 0,6% до приблизительно 1,4% композиции на основе эренумаба. В определенных вариантах осуществления количество НМВ-разновидностей в композиции на основе эренумаба измеряют с помощью SE-UHPLC, например, по проценту площади пиков пре-пиков при SE-UHPLC. В таких вариантах осуществления способ SE-UHPLC можно осуществлять, как описано в примере 5.

В определенных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы включают

(a) получение композиции на основе эренумаба, которая содержит эренумаб и один или несколько вариантов эренумаба, где варианты эренумаба включают изомеризованные варианты, дезамидированные варианты, кислые варианты, НМВ-разновидности или их комбинации;

(b) оценку композиции на основе эренумаба посредством осуществления одного, двух или трех из следующего:

(i) измерение количества изомеризованных вариантов и дезамидированных вариантов в композиции по пре-пикам при НИС-НРЛС и сравнение измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 10% или менее,

(ii) измерение количества кислых вариантов в композиции по кислотным пикам при СЕХ-НРЛС и сравнение измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим от приблизительно 25% до приблизительно 38%, и/или

(iii) измерение количества НМВ-разновидностей в композиции по пре-пикам при SE-UHPLC и сравнение измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 2,5% или менее; и

(c) получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе эренумаба, если сравнение или сравнения на стадии (b) указывают на то, что предварительно определенный(определенные) эталонный(эталонные) критерий/критерии удовлетворяется(удовлетворяются).

В некоторых вариантах осуществления осуществляют все три стадии (b-i), (b-ii) и (b-iii). В других вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-i) и (b-ii). В еще одних вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-ii) и (b-iii). В определенных вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-i) и (b-iii).

В определенных других вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы

В некоторых вариантах осуществления осуществляют все три стадии (b-i), (b-ii) и (b-iii). В других вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-i) и (b-ii). В еще одних вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-ii) и (b-iii). В определенных вариантах осуществления осуществляют только стадии (b-i) и (b-iii).

Способы по настоящему изобретению для оценки качества или оценивания композиций на основе эренумаба, которые описаны выше, можно использовать в разном контексте. Например, способы можно применять в качестве способов контроля качества на различных стадиях процесса изготовления эренумаба (например, в качестве способов контроля в ходе процесса). В некоторых вариантах осуществления способы можно применять при завершении большей части или всего процесса изготовления, например, в качестве способов выпуска партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб (например, активного фармацевтического ингредиента или API), или продукта, представляющего собой лекарственное средство на основе эренумаба (например, API, составленного с одним или несколькими вспомогательными веществами для применения в отношении человека). Способы также можно применять для оценки композиций на основе эренумаба, которые хранились в течение различных периодов времени, для облегчения определения сроков годности лекарственного средства. Способы также можно применять для повторной оценки композиций на основе эренумаба, для которых предварительно определенные эталонные критерии изначально не удовлетворялись, и которые были подвергнуты повторной обработке (например, подвергнуты дополнительным операциям очистки).

Таким образом, композиция на основе эренумаба, используемая в способах, может представлять собой любую композицию, которая содержит эренумаб и потенциально один или несколько вариантов эренумаба. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе эренумаба получают из линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), которая экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь под SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь под SEQ ID NO: 2. В таких вариантах осуществления композиция на основе эренумаба представляет собой сбор культуры клеток (например, осветленный супернатант культуры клеток или осветленный лизат клеток). В других таких вариантах осуществления композиция на основе эренумаба представляет собой частично очищенный препарат на основе эренумаба, который был подвергнут одной или нескольким операциям очистки (например, пул или фракцию из одной или нескольких стадий хроматографии или фильтрации). В одном варианте осуществления композиция на основе эренумаба представляет собой пул элюирования из материала катионообменной хроматографии. В другом варианте осуществления композиция на основе эренумаба представляет собой действующее вещество, представляющее собой эренумаб (например, активный фармацевтический ингредиент или API). В еще одном варианте осуществления композиция на основе эренумаба представляет собой продукт, представляющий собой лекарственное средство на основе эренумаба (например, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, или API, составленный с одним или несколькими вспомогательными веществами для применения в отношении человека).

Биологическую активность композиций на основе эренумаба можно оценивать как часть способов оценки качества, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления способы включают оценку способности композиций на основе эренумаба ингибировать индуцированную лигандом CGRP активацию рецептора CGRP человека. Различные анализы для оценки активации рецепторов CGRP известны из уровня техники и включают анализы на основе клеток, позволяющие измерять индуцированные лигандом CGRP мобилизацию кальция и образование cAMP. Иллюстративный анализ cAMP на основе клеток описан в примере 1. Другие подходящие анализы активации рецептора CGRP описаны в Aiyar et al., *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 197:179-185, 1999; Pin et al., *European Journal of Pharmacology*, vol. 577:7-16, 2007; патенте США № 8168592 и WO 2010/075238, все из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение включает фармацевтические составы, содержащие любую из композиций на основе эренумаба, описанных в данном документе, и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. "Фармацевтически приемлемый" относится к молекулам, соединениям и композициям, которые нетоксичны для людей-реципиентов в используемых дозах и концентрациях и/или не вызывают аллергических или нежелательных реакций при введении людям. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав может содержать материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции на основе эренумаба. В таких вариантах осуществления подходящие материалы включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как ацетатный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин,

желатин или иммуноглобулины); средства для окрашивания, эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сорбитановые сложные эфиры, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. Способы и подходящие материалы для составления молекул для терапевтического применения известны в фармацевтических дисциплинах и описаны, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по настоящему изобретению содержат композицию на основе эренумаба, описанную в данном документе, буфер, который поддерживает pH раствора в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, стабилизирующее средство и, необязательно, поверхностно-активное вещество. Подходящие буферы включают без ограничения глутаматный, ацетатный, Tris, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и фосфатный буферы. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит ацетатный буфер. Ацетатный буфер можно получать из уксусной кислоты или ацетатной соли, например, ацетата натрия. Можно применять другие соли, например, такие как соли калия, соли аммония, соли кальция или магниевые соли ацетата. Фармацевтические составы, содержащие ацетатный буфер, обычно характеризуются pH от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5 или pH от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,2, включая pH приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4 и приблизительно 5,5.

Стабилизирующее средство относится к вспомогательному веществу, которое стабилизирует нативную конформацию антитела и/или предотвращает или снижает физическую или химическую деградацию антитела. Подходящие стабилизирующие средства включают без ограничения полиолы (например, сорбит, глицерин, маннит, ксилит, мальтит, лактит, эритрит и трейт), сахара (например, фруктозу, глюкозу, глицеральдегид, лактозу, арабинозу, маннозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, сорбозу, сукралозу, мелезитозу и рафинозу) и аминокислоты (например, глицин, метионин, пролин, лизин, аргинин, гистидин или глутаминовую кислоту). В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит сахар в качестве стабилизирующего средства. В этих и других вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество представляет собой вещество, которое снижает поверхностное натяжение жидкости, в которой оно растворено. Поверхностно-активные вещества можно включать в фармацевтические составы в различных целях, включая, например, предотвращение или контроль агрегации, образования частиц и/или адсорбции на поверхности в жидких составах, или предотвращение или контроль этих явлений в ходе процесса лиофилизации и/или восстановления в лиофилизированных составах. Поверхностно-активные вещества включают, например, амфипатические органические соединения, которые проявляют частичную растворимость как в органических растворителях, так и в водных растворах. Общие характеристики поверхностно-активных веществ включают их способность снижать поверхностное натяжение воды, снижать поверхностное натяжение на границе раздела фаз между маслом и водой, а также образовывать мицеллы. Поверхностно-активные вещества, которые можно включать в фармацевтические составы по настоящему изобретению, включают как неионные, так и ионные поверхностно-активные вещества. Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды, такие как октилглюкозид и децилмальтозид, жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид MEA, кокамид DEA и кокамид TEA. Конкретные примеры неионных поверхностно-активных веществ включают полисорбаты, включая, например, полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81, полисорбат 85 и т.п.; полочсамеры, включая, например, полочсамер 188, также известный как полочсалкол или полимер этиленоксида и пропиленоксида, полочсамер 407 или полиэтиленполипропиленгликоль и т.п., и полиэтиленгликоль (PEG). Подходящие ионные поверхностно-активные вещества включают, например, анионные, катионные и цвиттерионные поверхностно-активные вещества. Анионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения поверхностно-активные вещества на основе сульфонатов или карбоксилатов, такие как мыла, соли жирных кислот, додецилсульфат натрия (SDS), лаурилсульфат аммония и другие соли алкилсульфатов. Катионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения поверхностно-активные вещества на основе четвертичного аммония, такие как бромид цетилтриметиламмония (СТАВ), другие соли алкилтриметилам-

мония, хлорид цетилпиридиния, полиэтокселированный талловый амин (РОЕА) и хлорид бензалкония. Цвиттерионные или амфотерные поверхностно-активные вещества включают, например, додецилбетаин, додецилдиметиламиноксид, кокамидопропилбетаин и кокоамфоглицинат. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит неионное поверхностно-активное вещество. В одном варианте осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В другом варианте осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы содержат любую из композиций на основе эренумаба, описанных в данном документе (например, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл композиции на основе эренумаба), от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ ацетата, от приблизительно 6% до приблизительно 9% (вес/объем) сахарозы и от приблизительно 0,008% до приблизительно 0,012% (вес/объем) полисорбата 80 или полисорбата 20. рН этих составов находится в диапазоне от приблизительно 4,9 до приблизительно 5,5 (например, рН приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3 или приблизительно 5,4). В одном конкретном варианте осуществления фармацевтический состав содержит 70 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 25 мМ ацетата, приблизительно 7,3% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80, где рН фармацевтического состава составляет приблизительно $5,2 \pm 0,2$. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтический состав содержит 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 34 мМ ацетата, приблизительно 6,5% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80, где рН фармацевтического состава составляет приблизительно $5,2 \pm 0,2$.

Фармацевтические составы предпочтительно подходят для парентеральной инъекции (например, внутривенной или подкожной инъекции). Иллюстративные лекарственные формы, подходящие для парентеральной инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Предпочтительно, фармацевтический состав является стерильным и достаточно жидким для обеспечения доставки посредством шприца или другого устройства для инъекций (т.е. состав не является чрезмерно вязким, настолько, чтобы предотвратить прохождение через шприц или другое устройство для инъекций). Стерилизацию можно осуществлять посредством фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с применением данного способа фильтрации можно проводить либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Фармацевтические составы для парентерального введения можно хранить в лиофилизованной форме или в виде раствора. Составы для парентерального введения можно помещать в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для раствора для внутривенного введения с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций. Составы для парентерального введения также можно хранить в шприцах, устройствах-автоинъекторах или шприцах-ручках для инъекций, или картриджах, приспособленных для применения с такими устройствами для инъекций.

Фармацевтическими составами, описанными выше, можно наполнять флаконы, шприцы, автоинъекторы или другие контейнеры или устройства для доставки и, необязательно, упаковывать с инструкциями по применению (например, указаниями по применению, содержащими инструкции по применению фармацевтических составов для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли, например, мигренозной головной боли) с получением фармацевтических продуктов. В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы, описанные в данном документе, помещают в устройство для инъекций для самостоятельного введения. Такие устройства коммерчески доступны и включают без ограничения автоинъекторы, дозирующие шприцы-ручки, микроинфузионные помпы и предварительно заполненные шприцы. Иллюстративные устройства, в которые можно помещать фармацевтические составы по настоящему изобретению, включают автоинъекторы (например, SureClick®, EverGentle®, Avanti®, DosePro®, Molly® и Leva®), шприцы-ручки для инъекций (например, шприц-ручка Madie®, шприц-ручка DCP™, одноразовая ручка BD Vystra™, многоразовая ручка BD™) и предварительно заполненные шприцы (BD Sterifill™, BD Hupak™, предварительно заполненные шприцы от Baxter). В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав помещают в шприц и хранят в нем для получения предварительно заполненного шприца. В других вариантах осуществления фармацевтический состав помещают в автоинъектор. Объем инъекции предварительно заполненного шприца или автоинъектора может составлять приблизительно 2 мл или менее, приблизительно 1,5 мл или менее или приблизительно 1 мл или менее. В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы, описанные в данном документе, помещают в шприц или автоинъектор с объемом инъекции приблизительно 1 мл.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен предварительно заполненный шприц, содержащий от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, от приблизительно 20 мМ до прибли-

тельно 40 мМ ацетата, от приблизительно 6% до приблизительно 9% (вес/объем) сахарозы и от приблизительно 0,008% до приблизительно 0,012% (вес/объем) полисорбата 80 или полисорбата 20 при рН от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5. В одном варианте осуществления предварительно заполненный шприц содержит 70 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 25 мМ ацетата, приблизительно 7,3% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80 при рН приблизительно 5,2±0,2. В другом варианте осуществления предварительно заполненный шприц содержит 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 34 мМ ацетата, приблизительно 6,5% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80 при рН приблизительно 5,2±0,2. В любом из этих вариантов осуществления объем инъекции для предварительно заполненного шприца может составлять приблизительно 1 мл.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен автоинъектор, содержащий от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ ацетата, от приблизительно 6% до приблизительно 9% (вес/объем) сахарозы и от приблизительно 0,008% до приблизительно 0,012% (вес/объем) полисорбата 80 или полисорбата 20 при рН от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5. В одном варианте осуществления автоинъектор содержит 70 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 25 мМ ацетата, приблизительно 7,3% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80 при рН приблизительно 5,2±0,2. В другом варианте осуществления автоинъектор содержит 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, приблизительно 34 мМ ацетата, приблизительно 6,5% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80 при рН приблизительно 5,2±0,2. В любом из этих вариантов осуществления объем инъекции для автоинъектора может составлять приблизительно 1 мл.

Композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе, и фармацевтические составы, содержащие такие композиции, можно применять для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли. Соответственно настоящее изобретение включает способы лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента, включающие введение пациенту любой из композиций на основе эренумаба или фармацевтических составов, содержащих композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе эренумаба или фармацевтические составы, содержащие композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе, для применения для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента. В других вариантах осуществления настоящее изобретение включает применение композиций на основе эренумаба или фармацевтических составов, содержащих композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе, для получения лекарственного препарата для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента. "Предупреждение или снижение частоты возникновения головной боли" относится к снижению частоты, продолжительности или тяжести головной боли по сравнению с частотой, продолжительностью или тяжестью головной боли до введения композиции/состава, или по сравнению с частотой, продолжительностью или тяжестью головной боли у пациента, которому не вводили композицию/состав (т.е. у контрольного субъекта).

В определенных вариантах осуществления способы или пути применения по настоящему изобретению позволяют лечить, предупреждать или снижать частоту возникновения мигренозной головной боли у нуждающегося в этом пациента посредством введения пациенту любой из композиций на основе эренумаба или фармацевтических составов, содержащих композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе. "Мигренозная головная боль" представляет собой головную боль, связанную с тошнотой или рвотой или чувствительностью к свету или звуку и/или головной болью, характеризующейся по меньшей мере двумя из следующих признаков боли: односторонней болью, пульсирующей болью, интенсивностью боли от средней до сильной или болью, обостряющейся при физической активности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтический состав, содержащий 70 мг или 140 мг композиции на основе эренумаба, описанной в данном документе, вводят пациенту один раз в месяц для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения мигренозной головной боли у пациента. В таких вариантах осуществления фармацевтический состав можно доставлять посредством подкожной инъекции, например, с применением одного из устройств для инъекций (например, предварительно заполненного шприца или автоинъектора), описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления пациенты, подлежащие лечению в соответствии со способами по настоящему изобретению, характеризуются, страдают эпизодической мигренью или характеризуются диагнозом эпизодической мигрени. Эпизодическую мигрень диагностируют, когда пациенты с мигренью в анамнезе (например, по меньшей мере пять приступов мигренозной головной боли в течение жизни) проводят 14 или меньше дней с мигренозной головной болью в месяц. "День с мигренозной головной болью" включает любой календарный день, в течение которого пациент испытывает начало, про-

должение или рецидив "мигренозной головной боли" с аурой продолжительностью более 30 мин или без нее. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые характеризуются, страдают эпизодической мигренью или характеризуются диагнозом эпизодической мигрени, проводят по меньшей мере четыре, но менее 15 дней с мигренозной головной болью в месяц в среднем. В связанных вариантах осуществления пациенты, которые характеризуются, страдают эпизодической мигренью или характеризуются диагнозом эпизодической мигрени, проводят менее 15 дней с головной болью в месяц в среднем. Применяемый в данном документе термин "день с головной болью" представляет собой любой календарный день, в течение которого пациент испытывает мигренозную головную боль или любую головную боль, которая продолжается более 30 мин или требует лечения острой головной боли. В определенных вариантах осуществления пациента можно классифицировать как характеризующегося или страдающего эпизодической мигренью высокой частоты. Пациенты с эпизодической мигренью высокой частоты являются пациентами, которые проводят 8-14 дней с мигренозной головной болью в месяц. В других вариантах осуществления пациента можно классифицировать как характеризующегося или страдающего эпизодической мигренью низкой частоты. Пациенты с эпизодической мигренью низкой частоты являются пациентами, которые проводят менее 8 дней с мигренозной головной болью в месяц.

В некоторых вариантах осуществления пациенты, подлежащие лечению в соответствии со способами по настоящему изобретению, характеризуются, страдают хронической мигренью или характеризуются диагнозом хронической мигрени. Хроническую мигрень диагностируют, когда пациенты с мигренью (т.е. пациенты с по меньшей мере пятью приступами мигренозной головной боли в течение жизни) проводят 15 или более дней с головной болью в месяц и по меньшей мере 8 дней с головной болью, которые являются днями с мигренозной головной болью. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые характеризуются, страдают хронической мигренью или характеризуются диагнозом хронической мигрени, проводят 15 или более дней с мигренозной головной болью в месяц в среднем.

В определенных вариантах осуществления пациенты с мигренью, подлежащие лечению в соответствии со способами по настоящему изобретению, ранее не получали каких-либо терапевтических средств для профилактики мигрени. В других вариантах осуществления у пациентов с мигренью, подлежащих лечению в соответствии со способами по настоящему изобретению, одно или несколько терапевтических средств для профилактики мигрени были неэффективными или непереносимыми. В одном таком варианте осуществления пациент не отвечал на терапию с применением по меньшей мере одного средства для профилактики мигренозной головной боли. "Отсутствие ответа на лечение" или "неэффективность лечения" относится к отсутствию эффективности средства для профилактики при снижении частоты, продолжительности и/или тяжести мигренозной головной боли у пациента после стандартного терапевтического режима приема средства. Например, в одном варианте осуществления пациент, предшествующее лечение которого средством для профилактики мигрени было неэффективным, является пациентом, который испытывал такое же или большее количество дней с мигренозной головной болью в месяц после введения средства для профилактики мигрени по сравнению с количеством дней с мигренозной головной болью в месяц перед лечением с помощью средства. Отсутствие ответа на предшествующее лечение средством для профилактики мигрени также может включать неспособность переносить средство для профилактики мигрени. Например, в некоторых вариантах осуществления пациент, предшествующее лечение которого средством для профилактики мигрени оказалось неэффективным, является пациентом, который не способен переносить побочные эффекты, связанные со средством. В таких вариантах осуществления побочные эффекты, связанные со средством, могут обостряться или могут быть несовместимыми с другим медицинским состоянием, которым характеризуется пациент. В определенных вариантах осуществления было неэффективным или непереносимым лечение пациента одним или несколькими средствами, выбранными из бета-блокаторов (например, пропранолола, тимолола, атенолола, метопролола и надолола), противоэпилептических средств (например, дивалпрокса, вальпроата натрия, вальпроевой кислоты, топирамата и габапентина), трициклических антидепрессантов (например, amitриптилина, нортриптилина, доксемина и флуоксетина) и онаботулотоксина А.

Композиции на основе эренумаба, описанные в данном документе, и фармацевтические составы, содержащие такие композиции, также можно применять для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения других типов нарушений, проявляющихся головной болью, таких как головные боли напряженного типа, кластерные головные боли, гемиплегическая мигрень, менструальная мигрень и ретинальная мигрень. Другие заболевания или состояния, связанные с передачей сигнала рецептором CGRP/CGRP, также можно лечить или снижать их выраженность с помощью композиций на основе эренумаба и фармацевтических составов, содержащих такие композиции, описанные в данном документе. Заболевания или состояния, связанные с передачей сигнала рецептора CGRP/CGRP, включают без ограничения хроническую боль (например, ноцицептивную боль, невропатическую боль, воспалительную боль, фибромиалгию, артритную боль), аллодинию, воспаление (например, нейрогенное воспаление, псориаз, остеоартрит), диабет II типа, гиперактивный мочевой пузырь и астму.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению предпочтительно вводят пациентам парентерально. Парентеральное введение включает интраперитонеальное, внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрикожное, подкожное, интрацеребральное, интрацеребровентрикулярное и

интратекальное введение. В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы вводят пациентам внутривенно. В других вариантах осуществления фармацевтические составы вводят пациентам подкожно, например, посредством подкожной инъекции. Инъекции можно доставлять пациентам с применением одного или нескольких устройств (например, предварительно заполненных шприцев и автоинъекторов), описанных в данном документе.

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и достигнутые результаты, предусмотрены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация и определение характеристик вариантов эренумаба, различающихся по заряду, с помощью HIC-HPLC.

Эренумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело подкласса IgG2. Антитело получают рекомбинантно в клетках яичника китайского хомячка (CHO), и оно состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей подкласса лямбда. Каждая тяжелая цепь содержит 456 аминокислот с четырьмя внутрицепочечными дисульфидными связями. Каждая легкая цепь содержит 216 аминокислот с двумя внутрицепочечными дисульфидными связями. Эренумаб содержит шесть межцепочечных дисульфидных связей, всего 18 внутрицепочечных и межцепочечных дисульфидных связей. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи эренумаба показаны на фиг. 1A и 1B соответственно. Каждая тяжелая цепь содержит N-связанный гликан в сайте консенсусного гликозилирования на остатке аспарагина в положении 306 в SEQ ID NO: 1. Как часто наблюдается в случае антител, продуцируемых клетками млекопитающих, C-концевой остаток лизина в положении 456 тяжелой цепи обычно удаляется карбоксипептидазами, присутствующими во время продуцирования в культуре клеток. Кроме того, N-концевые остатки глутамина как в тяжелой, так и в легкой цепях часто превращаются в пироглутамат во время продуцирования. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи эренумаба с этими N- и C-концевыми модификациями показаны на фиг. 1C и 1D соответственно. Рассчитанная масса дегликозилированного эренумаба с удаленным из обеих тяжелых цепей C-концевым лизином и образованием N-концевого пироглутамата в полной тяжелой и легкой цепях составляет 145872 Дальтон.

Эренумаб специфически связывается с внеклеточным доменом рецептора пептида, кодируемого геном, родственном гену кальцитонина (CGRP), и предотвращает связывание CGRP с рецептором и активацию рецептора. CGRP представляет собой нейропептид, который модулирует ноцицептивную передачу сигнала и представляет собой вазодилататор, связанный с патофизиологией мигрени. Эренумаб эффективно и специфично конкурирует с CGRP за связывание с рецептором CGRP и ингибирует индуцированную CGRP активацию внутриклеточного сигнального каскада с участием циклического аденозинмонофосфата (сAMP). Эренумаб не проявляет значительной фармакологической активности в отношении рецепторов аденомедулина, кальцитонина или амилина и не обладает агонистической активностью в отношении рецептора CGRP.

Для изучения структурных и функциональных свойств действующего вещества проводили определение биохимических, биофизических и биологических характеристик действующего вещества, представляющего собой эренумаб, полученного с применением способа изготовления в промышленном масштабе. В данном примере описываются идентификация и определение характеристик вариантов эренумаба, различающихся по заряду, которые демонстрировали снижение функции ингибирования рецептора CGRP. Гетерогенность заряда эренумаба в данном примере оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, представляющей собой хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC).

HIC-HPLC позволяет разделять белки главным образом на основе гидрофобности поверхности молекулы, а также может зависеть от структурной гетерогенности и других модификаций, которые оказывают влияние на молекулярные взаимодействия с матрицей колонки. Пик элюирования при HIC-HPLC зависит от общей гидрофобности поверхности, при этом молекулы с более высокой гидрофобностью поверхности элюируются позже, чем молекулы с более низкой гидрофобностью поверхности.

Образцы действующего вещества, представляющего собой эренумаб, загружали в колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий (ProPac HIC-10, размер частиц 5 мкм, 4,6×250 мм, ThermoFisher Scientific). Подвижная фаза А содержала 10 мМ ацетата натрия, 1 М сульфата аммония при pH 5,5, а подвижная фаза В состояла из 10 мМ ацетата натрия при pH 5,5. Белки разделяли в убывающем градиенте концентрации солей, создаваемом с помощью 25-100% подвижной фазы В от 0 мин до 52 мин и обратно к 25% подвижной фазе В от 55,5 до 75 мин. Элюент мониторили по поглощению UV при 280 нм. Колонка работала при 35°C, и подвижную фазу подавали на колонку со скоростью потока, составляющей 0,5 мл/мин.

Профиль HIC-HPLC содержал три отдельных участка, включая пре-пики, главный пик и пост-пики (фиг. 2A и 2B). Было выделено семь фракций в участках пре-пиков, главного пика и пост-пиков. Собранные фракции повторно анализировали с помощью HIC-HPLC, чтобы продемонстрировать, что фракции обладали достаточной чистотой для определения характеристик. Профили HIC-HPLC и чистота выделенных фракций показаны на фиг. 3 и в табл. 1 соответственно.

Таблица 1

Процент площади пиков НИС-HPLC, обогащенных фракций

Описание образца	Пре-пики				Главный пик	Пост-пики	
	% F1	% F2	% F3	% F4		% F5	% F6
Действующее вещество	0,7	0,5	0,3	0,4	94,0	1,5	2,4
Фракция пре-пика F1	94,3	-	-	-	5,7	-	-
Фракция пре-пика F2	-	93,5	-	-	6,5	-	-
Фракция пре-пика F3	-	17,8	72,9	-	9,3	-	-
Фракция пре-пика F4	-	-	-	88,1	11,9	-	-
Главная фракция F5	-	-	-	-	100,0	-	-
Фракция пост-пика F6	-	-	-	-	9,8	69,8	20,4
Фракция пост-пика F7	-	-	-	-	5,6	15,3	79,1

¹ Все фракции НИС-HPLC собирали из одной партии действующего вещества. Фракция, представляющая интерес на основании временного окна сбора и относительной чистоты, выделена и подчеркнута. Невыявленные пики обозначены с помощью тире.

Фракции пре-пика, главного пика и пост-пика на фиг. 3 и в табл. 1 характеризовали с помощью различных аналитических методик, включая эксклюзионную сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-UHPLC), триптическое пептидное картирование в восстанавливающих условиях с LC-MS/MS и биоанализ на основе клеток.

Нефракционированное действующее вещество и семь фракций НИС-HPLC анализировали с помощью SE-UHPLC с применением аналитической колонки ВЕН200 для UHPLC (размер частиц 1,7 мкм, 4,6×150 мм, Waters Corporation) и подвижной фазы, содержащей 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,8. Анализ SE-UHPLC продемонстрировал, что все фракции пре-пиков и пост-пиков обогащены высокомолекулярными (HMW) разновидностями, тогда как только самая ранняя фракция пре-пика (F1) и самая поздняя фракция пост-пика (F7) обогащены низкомолекулярными (LMW) разновидностями, по сравнению с нефракционированным действующим веществом (табл. 2).

Таблица 2

Процент площади пиков SE-UHPLC обогащенных фракций НИС-HPLC

Описание образца	% HMW	% главного компонента	% LMW
Действующее вещество	0,4	99,4	<0,3 ¹
Фракция пре-пика F1	5,1	93,3	1,6
Фракция пре-пика F2	2,8	96,7	0,5
Фракция пре-пика F3	2,8	96,7	0,5
Фракция пре-пика F4	5,0	94,7	0,3
Главная фракция F5	0,6	99,3	<0,3 ¹

Фракция пост-пика F6	12,7	87,0	0,3
Фракция пост-пика F7	16,8	80,8	2,4

¹ Предел количественного определения=0,3%.

Биохимические модификации эренумаба, присутствующие в обогащенных фракциях пре-пика, главного пика и пост-пика, а также нефракционированное действующее вещество оценивали с помощью триптического пептидного картирования в восстанавливающих условиях с выявлением посредством тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS/MS). Действующее вещество и семь фракций HPLC денатурировали в 7,5 М растворе гидрохлорида гуанидина и обрабатывали 0,5 М восстанавливающим средством дитиотреитолом (DTT), и все остатки цистеина алкилировали посредством добавления 0,5 М йодацетата натрия (IAA). Восстановленные и алкилированные образцы обессоливали с помощью гель-фильтрации с последующим расщеплением трипсином при 37°C в течение 35 мин. Расщепленные образцы разделяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) с применением колонки C18 (размер частиц 1,8 мкм, 2,1×150 мм) и 0,1% TFA в качестве подвижной фазы в градиенте ацетонитрила при скорости потока, составляющей 0,3 мл/мин. Выявление пептидов осуществляли по поглощению ультрафиолетового (UV) света при 215 нм с идентификацией пиков с помощью онлайн ESI-MS/MS. Затем паттерн фрагментации каждого пептидного иона изучали в сравнении с его ожидаемым спектром MS/MS.

Перекрытие фракций действующего вещества и обогащенных фракций представлено на фиг. 4, где показан участок элюирования двух пептидов в пределах CDR3 тяжелой цепи: TH12H13 (аминокислотные остатки 99-113 в SEQ ID NO: 1) и TH13 (аминокислотные остатки 101-113 в SEQ ID NO: 1). Фракции пре-пиков F2, F3 и F4, а также фракция пост-пика F6 продемонстрировали вариации в пептиде CDR3 (TH13) относительно действующего вещества. Для фракций F1 и F7 различий в пептиде TH13 не наблюдалось. Фракции пре-пиков F2, F3 и F4, а также фракция пост-пика F6 были обогащены как дезамидированными вариантами, так и изомеризованными вариантами (изоаспартат (изоAsp) и промежуточное соединение сукцинимида) в пределах пептида TH13 CDR3 тяжелой цепи. Наблюдали дезамидирование остатка аспарагина в положении 102 и изомеризацию остатка аспарагиновой кислоты в положении 105 (оба положения относительно SEQ ID NO: 1). По наблюдениям, два отдельных пептида, идентифицированные как IsoAsp¹⁰⁵, элюируются с разным временем удерживания. Эти пептиды, вероятно, являются структурными энантиомерами, образующимися во время изомеризации аспарагиновой кислоты. Также наблюдали дополнительный вариант пептида TH13, соответствующий промежуточному соединению сукцинимида в положении 105, элюировавшийся после нативного пептида. Уровни модификации примерно определяли посредством сравнения площадей пиков хроматограммы по выделенному иону (EIC) для модифицированных пептидов с площадями пиков, полученных от немодифицированных пептидов. Масс-анализ подтвердил наличие повышенного уровня вариантов дезамидирования и изоAsp в пределах участков пре-пиков и пост-пиков (табл. 3).

Таблица 3

Краткое описание наблюдаемых модификаций обогащенных фракций HPLC согласно триптической пептидной карте, полученной в восстанавливающих условиях

Описание образца	% изомеризации ¹ Asp ¹⁰⁵	% модификации		
		% сукцинимида в положении Asp ¹⁰⁵	% дезамидирования Asn ¹⁰²	% расщепления Leu ¹⁹⁵ /Ser ¹⁹⁶
Действующее вещество	ND	0,2	ND	0,4
Фракция пре-пика F1	0,6	0,2	ND	10,9
Фракция пре-пика F2	26,4	1,4	0,1	1,0
Фракция пре-пика F3	19,6	12,6	1,2	0,5
Фракция пре-пика F4	5,5	4,3	11,6	0,4

Главная фракция F5	ND	0,1	ND	0,3
Фракция пост-пика F6	13,2	0,1	ND	0,6
Фракция пост-пика F7	2,4	0,1	ND	1,1

ND=Не выявлено.

¹ Сумма обоих вариантов TH13 IsoAsp¹⁰⁵, элюируемых примерно через 70,5 и 71,5 мин, показана на фиг. 4.

Фракцию пре-пика F1 восстанавливали и анализировали с помощью масс-спектрометрии ESI-TOF, поскольку анализ этой фракции с помощью rCE-SDS ранее продемонстрировал значительные уровни LMW и среднемолекулярных (MMW) разновидностей. Во фракции пре-пика F1 идентифицировали всего шесть фрагментов, полученных в результате расщепления, из которых четыре сайта расщепления (Leu³¹⁵/Thr³¹⁶, Ser¹⁹⁷/Val¹⁹⁸, Leu¹⁹⁵/Ser¹⁹⁶, и Leu¹⁹²/Tyr¹⁹³) находились в пределах доменов CH1 и CH2 тяжелой цепи. Два сайта расщепления (Gly¹⁰⁸/Tyr¹⁰⁹ и Asp¹⁰⁵/Ser¹⁰⁶) также было идентифицировано в CDR3 тяжелой цепи. Для всех разновидностей выявили только С-концевой фрагмент. Повышенные уровни фрагмента Leu¹⁹⁵/Ser¹⁹⁶, полученного в результате расщепления, наблюдали в пределах фракции пре-пика F1 относительно действующего вещества (табл. 3).

Биологическую активность обогащенных фракций HIC-FIPLC по сравнению с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток. Биоанализ на основе клеток позволяет оценить активность эренумаба посредством измерения способности эренумаба ингибировать лиганд-индуцированную активацию рецептора CGRP человека. Рецептор CGRP представляет собой рецептор, связанный с G-белком, и было показано, что это семейство рецепторов внутриклеточно продуцирует cAMP как часть своего механизма передачи сигнала. Стабильную линию клеток яичника китайского хомячка K1 (CHO-K1), экспрессирующую рецептор CGRP человека (CHO-K1 huCGRP), инкубировали с лигандом CGRP и различными концентрациями эталонного стандарта эренумаба и тестируемых образцов. Количество cAMP, образованного клетками после инкубации с CGRP в присутствии или в отсутствие эталонного стандарта эренумаба и тестируемых образцов, измеряли с применением конкурентного гомогенного анализа переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET), при котором выявляемый сигнал генерируется, когда меченые компоненты анализа (cAMP, меченый красителем Alexa Fluor® 647, и моноклональное антитело-криптит к cAMP,) связываются друг с другом. Когда cAMP продуцируется внутриклеточно посредством активации рецептора CGRP с помощью CGRP, нативный cAMP, продуцируемый клетками, конкурирует с cAMP, меченым красителем Alexa Fluor® 647, за связывание с меченым криптином моноклональным антителом к cAMP, и интенсивность выявляемого сигнала снижается. Таким образом, в связи с конкурентным характером анализа cAMP TR-FRET, генерируемый сигнал обратно пропорционален концентрации cAMP в клетках. Сигнал TR-FRET измеряли с помощью планшет-ридера. Активность тестируемых образцов оценивали посредством сравнения сигнала, генерируемого тестируемыми образцами, с сигналом, генерируемым эталонным стандартом эренумаба, и определяли в виде относительной активности.

Как показано в табл. 4 ниже, все фракции пре-пиков продемонстрировали значительное снижение активности. Это снижение обусловлено либо высокими уровнями фрагментации (в случае фракции F1), либо дезамидированием и изомеризацией в участке CDR3 тяжелой цепи (в случае фракций F2-F4), которые являются преобладающими вариантами во фракциях пре-пиков, как описано выше. Фракции пост-пиков также продемонстрировали снижение активности, вероятно, вследствие повышения уровня HMW-разновидностей и низких уровней изомеризации аспарагиновой кислоты (Asp¹⁰⁵) в CDR3 тяжелой цепи, которые являются преобладающими вариантами во фракциях постпиков, как описано выше.

Таблица 4

Активность обогащенных фракций НИС-HPLC

Описание образца	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на	
	основе клеток	% CV
Действующее вещество	100	6
Фракция пре-пика F1	33	8
Фракция пре-пика F2	24	4
Фракция пре-пика F3	35	1
Фракция пре-пика F4	34	3
Главная фракция F5	107	2
Фракция пост-пика F6	77	4
Фракция пост-пика F7	68	3

¹ Среднее 3-х повторностей.

Результаты анализов, описанные в данном примере, продемонстрировали, что профиль НИС-FIPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, содержал три отдельных участка, включая пре-пики, главный пик и пост-пики. Первичные варианты эренумаба, выявленные с помощью НИС-FIPLC, включают изомеризованные варианты аспарагиновой кислоты в CDR3 тяжелой цепи (например, изомеризации Asp¹⁰⁵ в SEQ ID NO: 1) и дезамидирования (например, дезамидирования Asn¹⁰² в SEQ ID NO: 1) как в участках пре-пиков, так и в участках пост-пиков. В группе пре-пиков наблюдали фрагментированные разновидности, а в группе пост-пиков наблюдали повышенные уровни HMW-разновидностей. Активности всех фракций пре-пиков и пост-пиков НИС-HPLC эренумаба были ниже, чем у действующего вещества, по оценке с помощью биоанализа на основе клеток. Пре-пики продемонстрировали значительное снижение активности вследствие изомеризации аспарагиновой кислоты и дезамидирования в участке CDR3 тяжелой цепи, а также высокие уровни фрагментированных вариантов. Пост-пики также продемонстрировали снижение активности вследствие повышенных уровней HMW-разновидностей и изомеризованных вариантов в CDR3 тяжелой цепи.

Поскольку присутствие изомеризованных вариантов аспарагиновой кислоты в CDR3 тяжелой цепи и дезамидированных вариантов аспарагина в эренумабе оказывало влияние на ингибирующую активность композиции, несколько партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб (140 мг/мл), изготовленного в промышленном масштабе, анализировали с помощью НИС-HPLC для оценки присутствия и количества изомеризованных и дезамидированных вариантов, измеренных по проценту площади пиков пре-пиков на хроматограмме НИС-HPLC. Активность партий действующего вещества также оценивали с помощью анализа активности на основе клеток, описанного выше, и сравнивали с активностью партии № 78137, которая является репрезентативной для действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клинических испытаниях фазы II/фазы III. Краткое описание данных представлено в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Данные НИС-HPLC и активности для партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб

Номер партии	НИС-HPLC		Биоанализ на
	% главного пика	% пре-пиков	основе клеток
			% относительной активности
78137 (материал клинических испытаний)	-	-	101
63130	98,3	1,7	98
63131	98,2	1,8	124
63132	98,0	2,0	92
63133	98,2	1,8	96
63134	97,9	2,1	101

Как продемонстрировано с помощью данных в табл. 5, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, изготовленное в промышленном масштабе, содержало постоянный уровень изомеризованных и дезамидированных вариантов в диапазоне 1,7-2,1%, как измерено по пре-пикам НИС-HPLC.

Действующее вещество, которое содержало уровни дезамидированных/изомеризованных вариантов в этом диапазоне, проявляло активность, сопоставимую с активностью действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клинических испытаниях.

Пример 2. Оценка изомеризованных и дезамидированных вариантов эренумаба в различных условиях хранения.

В ходе изготовления действующего вещества наблюдали дезамидирование Asn¹⁰² и превращение Asp¹⁰⁵ в изоаспарат в CDR3 тяжелой цепи эренумаба (пример 1). Варианты эренумаба с этими модификациями демонстрировали снижение активности по сравнению с немодифицированными формами эренумаба (пример 1). Для дальнейшей оценки влияния дезамидированных вариантов Asn¹⁰² и изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵ на активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, подвергали воздействию стрессовых условий для повышения образования дезамидированных и изомеризованных вариантов, а также оценивали активность действующего вещества в стрессовых условиях. В частности, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, подвергали воздействию следующим образом: три стрессовых условия для облегчения образования дезамидированных и изомеризованных вариантов:

- термическое воздействие (50°C в течение 14 дней);
- физиологические pH и температура (pH 7,4 при 37°C в течение 14 дней);
- воздействие высокого pH (pH 8,0 при 25°C в течение 14 дней).

Образование дезамидированных и изомеризованных вариантов, индуцированное каждым стрессовым условием, с течением времени мониторили с помощью способов HIC-HPLC и триптического пептидного картирования в восстанавливающих условиях, описанных в примере 1. Для каждого стрессового условия образцы удаляли в различные моменты времени в течение исследования и замораживали. После конечного момента времени все образцы анализировали параллельно для минимизации аналитической вариабельности.

Термическое воздействие.

Результаты анализа HIC-HPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при 50°C, продемонстрировали значительное увеличение пре-пиков (фиг. 5 и табл. 6). Это увеличение пре-пиков связано, в первую очередь, с повышением уровня изомеризации аспарагиновой кислоты через 14 дней воздействия термического стресса, что обнаружено с помощью анализа посредством триптического пептидного картирования в восстанавливающих условиях, подробно рассмотренного ниже. Увеличение пост-пиков также наблюдалось, вероятно, в связи с повышением уровней НМВ-разновидностей, поскольку они элюируются как часть элюируемых позже пост-пиков, как показано в табл. 2 в примере 1.

Таблица 6

% Площади пиков HIC-HPLC эренумаба, подвергнутого стрессу при 50°C			
Момент времени (дни)	% пре-пиков	% главного пика	% пост-пиков
0	1,9	98,1	0,0
14	16,8	79,1	4,2

Хроматограммы пептидной карты оценивали на наличие новых пиков или значительных изменений площадей пиков существующих пиков в течение времени воздействия. Перекрытие образцов в день 0 и день 14 в увеличенном масштабе с выделением участков, где наблюдались различия, показано на фиг. 6. Изомеризация аспарагиновой кислоты в положении Asp¹⁰⁵ в CDR3 тяжелой цепи (пептиды TH12H13 и TH13) была преобладающим деградантом, наблюдаемым на перекрытиях пептидных карт. Фрагмент пептида TH26, полученный в результате гидролиза (соответствующий аминокислотным остаткам 311-326 в SEQ ID NO: 1) между Leu³¹⁵ и Thr³¹⁶ в Fc-участке, также наблюдали на хроматограмме образца в день 14.

Биологическую активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого условиям термического стресса, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток, описанного в примере 1. Как показано в табл. 7, термический стресс оказал негативное влияние на относительную активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, после воздействия 50°C в течение 14 дней. Снижение активности после термического стресса происходит вследствие повышения уровня изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵ и высокомолекулярных разновидностей, оба из которых, как было показано, оказывают влияние на активность (см. примеры 1 и 5).

Таблица 7

Относительная активность эренумаба, подвергнутого термическому стрессу		
Момент времени (дни)	% относительной активности,	
	определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
0	93	4
14	71	7

¹ Среднее 3-х повторностей.

Физиологические pH и температура.

Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, подвергали воздействию физиологического pH посредством разбавления до примерно 10 мг/мл фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) при pH 7,4 и инкубировали при 37°C (физиологическая температура) в течение 14 дней. Контроль pH, представлявший собой действующее вещество, разбавленное в буфере для составления (15 мМ ацетата натрия, 8,2% (вес/объем) сахарозы, 0,010% (вес/объем) полисорбата 80), pH 5,2, инкубировали при 37°C в течение 14 дней. Таким образом, "образец, подвергнутый стрессу при физиологическом pH," подвергали воздействию как pH-стресса, так и термического стресса, тогда как "образец с контролем pH" подвергали воздействию только термического стресса.

Сравнение профилей HIC-HPLC образца, подвергнутого стрессу при физиологическом pH в день 14, с образцом в день 0, продемонстрировало увеличение как пре-пиков, так и пост-пиков (фиг. 7 и табл. 8). Следы образца, подвергнутого стрессу при физиологическом pH в день 14, и образца с контролем pH продемонстрировали схожие уровни пре-пика, элюируемого примерно через 30 мин, что соответствует изомеризованному варианту Asp¹⁰⁵, что свидетельствует о том, что этот вариант изоаспартата в основном обусловлен термическим стрессом, а не pH-стрессом. Пре-пик, элюируемый примерно через 34 мин, что соответствует варианту дезамидированного Asn¹⁰², увеличился в образце, подвергнутом стрессу при физиологическом pH в день 14, но не в случае контроля pH, указывая на то, что дезамидирование Asn¹⁰² преимущественно обусловлено pH-стрессом, а не термическим стрессом. Увеличение пост-пиков также наблюдали в образце, подвергнутом стрессу при физиологическом pH в день 14, по сравнению как с образцом в день 0, так и с образцом с контролем pH в день 14, что указывает на то, что изменение преимущественно обусловлено pH-стрессом.

Таблица 8

% Площади пиков HIC-HPLC эренумаба, подвергнутого стрессу при pH 7,4 и 37°C

Момент времени (дни)	% пре-пиков	% главного пика	% пост-пиков
0	1,6	98,4	0,0
14	6,0	89,7	4,3
14 (контроль)	5,3	94,7	0,0

Биохимические модификации действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при физиологическом pH и температуре, мониторили с помощью пептидного картирования в восстанавливающих условиях с масс-спектрометрией (MS) после расщепления трипсином. Анализ данных MS продемонстрировал повышение уровня дезамидирования как в CDR3 тяжелой цепи (Asn¹⁰²), так и в Fc-участке (Asn³⁹³ и Asn³⁹⁸), а также увеличение количеств изомеризованного Asp¹⁰⁵ в CDR3 тяжелой цепи (данные не показаны). Повышение уровня изомеризации Asp¹⁰⁵ в CDR3 тяжелой цепи и дезамидирования Asn¹⁰² согласуется с наблюдаемым увеличением пре-пиков и пост-пиков HIC-HPLC, показанных на фиг. 7 и в табл. 8.

Биологическую активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при физиологическом pH и температуре, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток. Как показано в табл. 9, стресс при физиологическом pH и температуре вызывал снижение активности действующего вещества, представляющего собой эренумаб, через 14 дней воздействия. Хотя в этих стрессовых условиях наблюдалось повышение уровней дезамидированных вариантов Asn¹⁰² и изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵, наблюдалось лишь умеренное снижение активности. Такой результат, вероятно, обусловлен слишком низкими, чтобы существенно повлиять на активность, измеренную с помощью биоанализа на основе клеток, общими уровнями этих дезамидированных и изомеризованных вариантов, которые составляли приблизительно 6% действующего вещества.

Таблица 9

Относительная активность эренумаба, подвергнутого стрессу при pH 7,4 и 37°C

Момент времени (дни)	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
0	94	3
14	86	1

¹ Среднее 3-х повторностей.

Воздействие высокого pH.

Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, подвергали воздействию высокого pH посредством разбавления до примерно 10 мг/мл раствором основания Tris, pH 8,0 и инкубировали при 25°C в течение 14 дней. Контроль pH, представлявший собой действующее вещество, разбавленное в буфере для составления (15 mM ацетата натрия, 8,2% (вес/объем) сахарозы, 0,010% (вес/объем) полисорбата 80), pH 5,2, инкубировали при 25°C в течение 14 дней.

Результаты анализа HIC-HPLC продемонстрировали увеличение пре-пиков за счет дезамидирования Asp¹⁰², а также увеличение пост-пиков в образце, подвергнутом стрессу при высоком pH, в день 14, по сравнению с образцом в день 0 и образцом с контролем pH (фиг. 8 и табл. 10).

Таблица 10

% Площади пиков HIC-HPLC эренумаба, подвергнутого стрессу при pH 8,0 и 25°C

Момент времени (дни)	% пре-пиков	% главного пика	% пост-пиков
0	2,1	97,9	0,0
14	3,6	89,8	6,5
14 (контроль)	2,6	97,4	0,0

Биохимические модификации действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при высоком pH, мониторили с помощью пептидного картирования в восстанавливающих условиях с MS после расщепления трипсином. Как и в стрессовых условиях с физиологическим pH, повышение уровня дезамидирования в CDR3 тяжелой цепи в положении Asp¹⁰², а также в пределах Fc-участка в положениях Asp³⁹³ и Asp³⁹⁸ наблюдали в случае образца, подвергнутого стрессу, в день 14, по сравнению с образцами в день 0 и с контролем pH. Биологическую активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутого стрессу при высоком pH, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток. Как показано в табл. 11, стресс при высоком pH оказал умеренное влияние на активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, через 14 дней воздействия. Подобно результатам, полученным в стрессовых условиях при физиологических pH и температуре, общий уровень дезамидированного варианта Asp¹⁰², присутствующий в действующем веществе, подвергнутом стрессу, был слишком низким для оказания значительного влияния на активность, измеренную с помощью биоанализа на основе клеток.

Таблица 11

Относительная активность эренумаба, подвергнутого стрессу при pH 8,0 и 25°C

Момент времени (дни)	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
0	89	5
14	79	3

¹ Среднее 3-х повторностей.

Для более точного определения уровней дезамидированных вариантов Asp¹⁰² и изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵, необходимых для значительного снижения активности действующего вещества, представляющего собой эренумаб, проводили статистический анализ, моделирующий взаимосвязь между активностью и процентом площади пре-пика HIC-HPLC, с данными, доступными из различных партий эренумаба, которые хранили при различных температурах. Партии эренумаба хранили при 5°C (13 партий), 25°C (4 партии), 30°C (4 партии) или 40°C (5 партий). Для получения данных при условиях хранения 5°C применяли 6 партий с только одним моментом времени и 9 партий с только двумя моментами времени. При всех других условиях хранения данные получали по меньшей мере в три различных момента времени.

% Относительной активности, измеренный с помощью биоанализа на основе клеток, наносили на график в виде зависимости от % площади пиков пре-пиков на хроматограмме HIC-HPLC для четырех различных условий хранения и проводили регрессионный анализ (фиг. 9). Для каждой температуры оп-

ределяли оценки наклона соответствующих линий регрессии наряду со скорректированными р-значениями для тестов, чтобы определить, отличаются ли наклоны от нуля (табл. 12). Наклон линии регрессии для данных при условиях хранения при 40°C был статистически значимым с нуля при уровне значимости 0,05. На основании регрессионного анализа данных при условиях хранения при 40°C увеличение площади пре-пика HIC-HPLC на 1% привело к снижению относительной активности на 1,14%.

Таблица 12

Оценки параметров линейной регрессии для относительной активности по сравнению с процентом площади пре-пиков HIC-HPLC

Температура	Наклон	Стандартная ошибка	DF	Значение t	Pr > t	Корр. R
5°C	4,3275	2,3278	45,45	1,86	0,0695	0,2804
25°C	-0,4828	0,431	25,42	-1,12	0,2731	1
30°C	-0,3574	0,2657	17,54	-1,35	0,1957	0,7436
40°C	-1,1373	0,3032	20,93	-3,75	0,0012	0,0022

Относительная активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, используемого в клинических испытаниях, превышала 70%, как измерено с помощью биоанализа на основе клеток. Для оценки уровней дезамидированных вариантов Asn¹⁰² и изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵ (представленных пре-пиками HIC-HPLC), которые снижали бы активность действующего вещества, представляющего собой эренумаб, ниже уровня, допустимого для клинических испытаний (70%), соответствующую линию регрессии для условий хранения при 40°C, показанную на фиг. 9, экстраполировали с целью демонстрации % площади пре-пиков HIC-HPLC для относительной активности, составляющей 70%. Как показано на фиг. 10, прогнозируемое значение % площади пре-пиков HIC-HPLC для 70% относительной активности на основании соответствующей линии регрессии, составляет приблизительно 28,85%.

Результаты экспериментов, которые описаны в данном примере, демонстрируют, что повышение уровней дезамидированного варианта Asn¹⁰² и/или уровней изомеризованного варианта Asp¹⁰⁵ в действующем веществе, представляющем собой эренумаб, приводит к потере эффективности эренумаба в отношении ингибирования CGRP-индуцированной активации рецептора CGRP. Уровни дезамидированных и изомеризованных вариантов следует мониторить и контролировать на уровне ниже приблизительно 30% в лекарственном средстве для поддержания активности действующего вещества на уровне, аналогичном действующему веществу, представляющему собой эренумаб, используемому в клинических испытаниях. В некоторых вариантах осуществления требуются более низкие уровни (например, ниже приблизительно 15%) дезамидированных вариантов Asn¹⁰² и/или изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵ в действующем веществе, поскольку приблизительно 17% этих вариантов в действующем веществе приводили к значительному снижению активности действующего вещества, представляющего собой эренумаб (см. табл. 6 и 7).

Пример 3. Идентификация и определение характеристик вариантов эренумаба, различающихся по заряду, с помощью CEX-HPLC

В данном примере описываются идентификация и определение характеристик дополнительных вариантов эренумаба, различающихся по заряду, которые демонстрировали снижение функции ингибирования рецептора CGRP. Гетерогенность заряда эренумаба в данном примере оценивали с помощью катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (CEX-HPLC).

CEX-HPLC позволяет разделять белки главным образом на основе гетерогенности поверхностного заряда; на него также могут оказывать влияние структурная гетерогенность и другие модификации, которые оказывают влияние на молекулярные взаимодействия с ионообменной смолой. Пик элюирования в данном способе зависит от суммарного поверхностного заряда, при этом отрицательно заряженные разновидности элюируются раньше, а положительно заряженные разновидности элюируются позже.

Образцы действующего вещества, представляющего собой эренумаб, загружали в аналитическую колонку CEX-HPLC (BioPro SP-F, размер частиц 5 мкм, 4,6×100 мм, YMC America, Inc.). Подвижная фаза А содержала 20 мМ фосфата натрия при pH 6,6, а подвижная фаза В состояла из 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия при pH 6,6. Белки разделяли с применением линейного градиента концентрации солей, создаваемого с помощью 5-12% подвижной фазы В от 0 до 4 мин к 23% подвижной фазы В через 18 мин, к 100% подвижной фазы В от 18,5 до 20,5 мин и обратно до 5% подвижной фазы В от 21 мин до 25 мин. Элюент контролировали по поглощению UV при 280 нм. Колонка работала при 28°C, и подвижную фазу подавали на колонку со скоростью потока, составляющей 0,6 мл/мин.

Профиль CEX-HPLC содержал три отдельных участка, включая кислотные пики, главный пик и основные пики (фиг. 11). Было выделено девять фракций в участках кислотных пиков, главного пика и основных пиков. Собранные фракции повторно анализировали с помощью CEX-HPLC, чтобы продемонстрировать, что фракции обладали достаточной чистотой для определения характеристик. Профили CEX-HPLC и чистота выделенных фракций показаны на фиг. 12 и в табл. 13 соответственно.

Таблица 13

Процент площади пиков СЕХ-НPLC обогащенных фракций

Описание образца	Кислотные пики				Главный пик		Основные пики		
	% F1	% F2	% F3	% F4	% F5	% F6	% F7	% F8	% F9
Действующее вещество	0,7	6,2	10,7	13,4	52,1	5,3	4,8	4,7	2,0
Кислая фракция F1	90,7	9,3	-	-	-	-	-	-	-
Кислая фракция F2	3,7	80,0	16,4	-	-	-	-	-	-
Кислая фракция F3	-	7,5	84,0	8,6	-	-	-	-	-
Кислая фракция F4	-	-	17,7	67,6	14,7	-	-	-	-
Главная фракция F5	-	-	-	7,3	92,7	-	-	-	-
Главная фракция F6	-	-	-	-	14,5	65,2	20,3	-	-
Основная фракция F7	-	-	-	-	11,1	27,4	57,3	4,2	-
Основная фракция F8	-	-	-	-	-	4,6	13,0	77,8	4,6
Основная фракция F9	-	-	-	-	10,2	2,6	6,4	36,6	44,1

¹ Все фракции СЕХ-НPLC собирали из одной партии действующего вещества. Фракция, представляющая интерес на основании временного окна сбора и относительной чистоты, выделена и подчеркнута. Невыявленные пики обозначены с помощью тире.

Биологическую активность каждой из обогащенных фракций СЕХ-НPLC по сравнению с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток, описанного в примере 1. Как показано в табл. 14, обе фракции кислотных пиков F1 и F2 продемонстрировали пониженную активность по сравнению с действующим веществом, тогда как остальные фракции кислотных пиков, главного пика и основных пиков не продемонстрировали значительных различий.

Таблица 14

Активность обогащенных фракций СЕХ-НPLC

Описание образца	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
Действующее вещество	91	13
Кислая фракция F1	28 ²	3
Кислая фракция F2	58	14
Кислая фракция F3	71	20
Кислая фракция F4	82	18
Главная фракция F5	101	16
Главная фракция F6	92	16
Основная фракция F7	96	7
Основная фракция F8	102	8
Основная фракция F9	98	4

¹ Среднее 3-х повторностей.

² Одна из 3-х повторностей не соответствовала критерию параллелизма анализа.

Для более полного понимания того, какие варианты в кислых фракциях оказывали влияние на активность, обогащенные фракции СЕХ-НPLC характеризовали с помощью различных аналитических ме-

тодик, включая капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия в невосстанавливающих условиях (nrCE-SDS), капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS) и обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию в невосстанавливающих условиях (RP-HPLC).

Нефракционированное действующее вещество и девять фракций CEX-HPLC анализировали с помощью nrCE-SDS. Образцы денатурировали посредством нагревания в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и N-этилmaleимида при pH 6,5 перед электрокинетическим вводом в капилляр из плавленного кварца без покрытия, заполненный буфером для геля с SDS, при 25°C. Поглощение мониторили при 220 нм. Как показано в табл. 15 ниже, кислая фракция F1 была обогащена разновидностями как пре-пиков, так и пост-пиков по сравнению с действующим веществом. Разновидности пре-пиков включают разновидности с более низким молекулярным весом, чем интактный эренумаб (главный пик), образующиеся либо в результате гидролиза пептидов, либо частичной сборки молекул, тогда как разновидности пост-пиков характеризуются большим размером по сравнению с главным пиком. В целом, относительные количества разновидностей пре-пиков были постоянными среди остальных фракций кислых пиков, главного пика и основных пиков (т.е. F2-F9), а также действующего вещества, несмотря на наблюдавшиеся небольшие различия в распределении в пределах группы пре-пиков.

Таблица 15

Процент площади пиков nrCE-SDS обогащенных фракций CEX-HPLC

Описание образца	% пре-пиков	% главного пика	% пост-пиков
Действующее вещество	2,9	97,1	0,0
Кислая фракция F1	78,3	20,3	1,4
Кислая фракция F2	3,5	96,5	0,0
Кислая фракция F3	3,7	96,3	0,0
Кислая фракция F4	3,4	96,6	0,0
Главная фракция F5	1,4	98,6	0,0
Главная фракция F6	4,1	95,9	0,0
Основная фракция F7	3,3	96,7	0,0
Основная фракция F8	1,7	98,3	0,0
Основная фракция F9	2,6	96,7	0,7

Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и девять фракций CEX-HPLC также анализировали с помощью rCE-SDS. Способ rCE-SDS был аналогичен способу nrCE-SDS, за исключением того, что образцы восстанавливали и денатурировали посредством нагревания в присутствии SDS и β-меркаптоэтанола перед вводом в капилляр. Результаты анализа rCE-SDS продемонстрировали, что все фракции, за исключением фракции кислотного пика F1, подобны контролю с нефракционированным действующим веществом. Фракция кислотного пика F1 была в значительной степени обогащена LMW- и MMW-разновидностями, что, вероятно, соответствует фрагментам пептидов, полученным в результате гидролиза (данные не показаны). Фракция кислотного пика F1 и в меньшем количестве фракция F2 были обогащены посттяжелой цепью, что соответствует вариантам с неконсенсусным гликозилированием.

Затем действующее вещество и фракции CEX-HPLC анализировали с помощью RP-HPLC с применением колонки Waters VEN300 C4 (размер частиц 1,7 мкм, 2,1×50 мм) и элюировали с применением подвижной фазы, содержащей 0,1% TFA, в градиенте 1-пропанола при 75°C. Поглощение мониторили при 215 нм. В профиле CEX-HPLC наблюдалась тенденция к обогащению дисульфидными изоформами, при этом обогащение изоформами IgG2-B и IgG2-A/B наблюдалось в кислых фракциях, тогда как обогащение дисульфидными изоформами IgG2-A наблюдалось во фракциях главного пика и основных пиков (фиг. 13 и табл. 16). Как более подробно описано в примере 4, дисульфидная изоформа IgG2-B была значительно менее активной, чем действующее вещество, представляющее собой эренумаб, или дисульфидные изоформы IgG2-A и IgG2-A/B. Профиль RP-HPLC фракции кислотного пика F1 не соответствовал хроматограмме действующего вещества, что, вероятно, было результатом значительных уровней восстанавливаемой и ковалентной фрагментации, наблюдаемых с помощью rCE-SDS и nrCE-SDS, соответственно, как описано выше.

Таблица 16

Процент площади пиков RP-HPLC обогащенных фракций СЕХ-НРLС

Описание образца	% пре-пиков	% IgG2-B	% IgG2-A/B	% IgG2-A
Действующее вещество	1,5	5,9	36,6	56,0
Кислая фракция F1	69,1	8,1	11,3	11,5
Кислая фракция F2	2,3	21,4	40,4	35,8
Кислая фракция F3	1,2	11,2	55,1	32,4
Кислая фракция F4	1,1	7,0	52,5	39,4
Главная фракция F5	0,8	2,9	33,9	62,4
Главная фракция F6	2,8	3,9	27,8	65,5
Основная фракция F7	2,1	3,9	28,6	65,4
Основная фракция F8	1,4	2,0	23,3	73,3
Основная фракция F9	1,8	11,0	31,3	55,9

Результаты анализов, описанные в данном примере, демонстрируют, что определенные кислые варианты эренумаба, такие как фрагментированные варианты и варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, соответствующие кислотным пикам на хроматограмме СЕХ-НРLС, менее эффективны, чем действующее вещество, представляющее собой эренумаб. В частности, кислая фракция F1 демонстрировала значительное снижение активности из-за высоких уровней фрагментации, выявленных с помощью rCE-SDS и nrCE-SDS. Кислая фракция F2 также демонстрировала снижение активности из-за повышенных уровней дисульфидной изоформы IgG2-B, которой обогащена эта фракция по сравнению с нефракционированным действующим веществом. В целом, первичные варианты эренумаба, выявленные с помощью СЕХ-НРLС, включают варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, при этом кислотные пики обогащены изоформами IgG2-B и IgG2-A/B. Дезамидированные варианты, фрагментированные варианты (LMW и MMW), HMW-разновидности и варианты с неконсенсусным гликозилированием также выявляли во фракциях кислотных пиков.

Несколько партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб (140 мг/мл), изготовленного в промышленном масштабе, анализировали с помощью СЕХ-НРLС для оценки присутствия и количества кислых вариантов (например, дисульфидной изоформы IgG2-B), как измерено по проценту площади пиков кислотных пиков на хроматограмме СЕХ-НРLС. Активность партий действующего вещества также оценивали с помощью анализа активности на основе клеток и сравнивали с активностью партии № 78137, которая является репрезентативной для действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клинических испытаниях фазы II/фазы III. Краткое описание данных представлено в табл. 17 ниже.

Таблица 17

Данные СЕХ-НРLС и активности для партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб

Номер партии	СЕХ-НРLС			Биоанализ на основе клеток
	% главного пика	% кислотных пиков	% основных пиков	% относительной активности
78137 (материал клинических испытаний)	-	-	-	101
63130	57,8	31,3	10,9	98
63131	58,6	29,7	11,7	124
63132	58,2	28,7	13,1	92
63133	58,1	30,1	11,8	96
63134	57,6	30,5	11,9	101

Как продемонстрировано с помощью данных в табл. 17, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, изготовленное в промышленном масштабе, содержало постоянный уровень кислых вариантов в диапазоне 28,7-31,3%, как измерено по кислотным пикам СЕХ-НРLС. Действующее вещество, которое содержало уровни кислых вариантов в этом диапазоне, проявляло активность, сопоставимую с активностью действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клиниче-

ских испытаниях.

Пример 4. Варианты эренумаба, представляющие собой дисульфидные изоформы.

Эренумаб представляет собой антитело подкласса IgG2 и, следовательно, может демонстрировать варианты, представляющие собой дисульфидные изоформы, которые были описаны для молекул IgG2 (Dillon et al., J. Chromatogr. A, vol. 1120(1-2):112-120, 2006; Wypych et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 283(23):16194-16205, 2008; Dillon et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 283(23):16206-16215, 2008). Соединение дисульфидных связей, выявленное в эренумабе, выявляли с применением пептидных карт Lys-C в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ESI-MS/MS) для идентификации. С помощью этого подхода выявляли ожидаемые дисульфидные связи в классической структуре IgG2-A, а также дисульфидные связи, соответствующие структурам IgG2-A/B и IgG2-B.

Пептиды, соединенные дисульфидными связями, идентифицировали в действующем веществе посредством пептидного картирования с применением эндопротеазы Lys-C в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, как показано на фиг. 14. Выход разделения с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) сочетали с тандемным масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением (ESI-MS/MS) для ортогонального масс-анализа в дополнение к выявлению поглощения. Часть невосстановленных продуктов расщепления обрабатывали восстанавливающим агентом, представляющим собой гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) и анализировали с применением тех же условий RP-HPLC.

Карта Lys-C, полученная в невосстанавливающих условиях (фиг. 14, верхний график), помечена пиками от "A" до "G" и от "a" до "i", которые исчезают в восстанавливающих условиях. Исчезновение этих пептидов после восстановления указывает на их участие в образовании дисульфидных связей в нативном белке. Пептиды, которые содержат дисульфидные связи в невосстановленных продуктах расщепления Lys-C, и соответствующие восстановленные пептиды в восстановленных продуктах расщепления Lys-C определяли по их присутствию или отсутствию на хроматограммах поглощения и подтверждали точностью массы интактного пептида и присутствием диагностических ионов-продуктов MS/MS. Теоретические и наблюдаемые массы всех пептидных ионов, применяемых для проверки пептидов с дисульфидными связями, показаны в табл. 18 и 19 для пептидных карт, полученных в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях соответственно. Идентифицированные невосстановленные и восстановленные пептиды составляют ожидаемую структуру дисульфидной изоформы IgG2-A, которая схематически показана на фиг. 15A.

Таблица 18

Пептиды, содержащие дисульфидные связи IgG2, идентифицированные на пептидной карте Lys-C эренумаба в невосстанавливающих условиях

ID пика	Пептид с дисульфидными связями	Соединение Cys-Cys	Элемент	Теоретическая масса ^a (Да)	Наблюдаемая масса ^a (Да)	Точность массы (ppm)
A	LH24/LH28	C ³⁷⁶ (H)- C ⁴³⁴ (H)	C ₁₁₃	4087,9567	4087,962 1	1,3
B	LL8/LL14	C ¹³⁸ (L)- C ¹⁹⁷ (L)	C _L	4185,0300	4185,039 4	2,3
C	LH14/LH18	C ²⁷⁰ (H)- C ³³⁰ (H)	C _{H2}	4803,2619	4803,285 3	4,9
D	LL2/LL5	C ²² (L)-C ⁸⁹ (L)	V _L	7026,2876	7026,320 5	4,7
E	LH12/LH12	C ²³² (H)- C ²³² (H [^])	Шарнирный участок IgG2-A	4900,2590	4900,258 5	0,1
E'	LH12/LH12LH13	C ²³³ (H)- C ²³³ (H [^])	Шарнирный участок IgG2-A	5125,4068	5125,406 5	0,1

E''	LH12LH13/ LH12LH13	C ²³⁶ (H)- C ²³⁶ (H [^]) C ²³⁹ (H)- C ²³⁹ (H [^])	Шарнирн ый участок IgG2-A	5350,5545	5350,574 1	3,7
F	LH7/LH8LH9/ LL15	C ¹⁴⁴ (H)- C ²¹⁵ (L) C ¹⁵⁷ (H)- C ²¹³ (H)	Соединен ие HC-LC и C _{H1}	10084,838 4	10084,85 56	1,7
G	LH1/LH5 (pE)	C ²² (H)-C ⁹⁶ (H)	V _H	9002,3068	9002,330 6	2,6
a	LH7/LH8LH9/ LH12LH13/LL15	C ¹⁴⁴ (H)- C ²³³ (H [^]) C ¹⁵⁷ (H)- C ²¹³ (H)	IgG2-B	12768,3 ^b	12768,2 ^b	13,0
b	H7/H8H9/ H11H12H13/ H12H13/L15	C ²³² (H [^])- C ²¹⁵ (L [^]) C ²³⁶ (H [^])- C ²³⁹ (H [^])	IgG2-B	16061,3 ^b	16060,8 ^b	28,1
c	LH7/LH8LH9/ (LH12LH13) ₂ /LL1 5	C ¹⁴⁴ (H)- C ²³² (H [^]) C ¹⁵⁷ (H)- C ²¹³ (H)	IgG2-A/B	15445,6 ^b	15445,5 ^b	6,8
f	LH7/LH8H9/LH12 / LH12H13/LL15	C ²³² (H)- C ²¹⁵ (L) C ²³³ (H)- C ²³³ (H [^])	IgG2-A/B	15220,3 ^b	15220,3 ^b	1,9
i	LH7/LH8H9/ (LH12) ₂ /LL15	C ²³⁶ (H)- C ²³⁶ (H [^]) C ²³⁹ (H)- C ²³⁹ (H [^])	IgG2-A/B	14995,0 ^b	14995,1 ^b	10,2
d	(LH7) ₂ /(LH8H9) ₂ / (LH11H12H13) ₂ / (LL15) ₂	C ¹⁴⁴ (H)- C ²³³ (H [^]) C ¹⁵⁷ (H)- C ²¹³ (H) C ²³² (H)- C ²¹⁵ (L) C ²³⁶ (H)- C ²³⁶ (H [^])	IgG2-B	26764,1 ^b	26764,4 ^b	11,5
e	(LH7) ₂ /(LH8H9) ₂ / LH11H12H13/ LH12H13/(LL15) ₂	C ²³⁹ (H)- C ²³⁹ (H [^]) C ¹⁵⁷ (H [^])- C ²¹³ (H [^]) C ¹⁴⁴ (H [^])- C ²³³ (H) C ²³² (H [^])- C ²¹⁵ (L [^])	IgG2-B	26150,4 ^b	26150,9 ^b	18,7
		C ²¹⁵ (L [^])				

^a Массы являются моноизотопными, если не указано иное.

^b Средняя масса.

H=тяжелая цепь; L=легкая цепь; ^=другая тяжелая или легкая цепь;

/=одинарная дисульфидная связь; LL=пептид легкой цепи, расщепленный с помощью Lys-C; LH=пептид тяжелой цепи, расщепленный с помощью Lys-C; pE=пироглутамат N-концевого остатка Gln на LH1; нумерация остатков Cys относительно SEQ ID NO: 1 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 2 для легкой цепи.

Таблица 19

Пептиды, содержащие цистеины, идентифицированные на пептидной карте Lys-C эренумаба в восстанавливающих условиях

Пептид Lys-C	Аминокислотные остатки ^a	Положение цистеина ^a	Теоретическая масса ^b (Да)	Наблюдаемая масса ^b (Да)	Точность массы (ppm)
LH1	pE ¹ -K ⁴³	C ²²	4501,2536	4501,2679	3,2
LH5	N ⁷⁷ -K ¹¹³	C ⁹⁶	4503,0689	4503,0763	1,6
LH7	G ¹³⁵ -K ¹⁶⁰	C ¹⁴⁴ , C ¹⁵⁷	2577,2931	2577,2976	1,8
LH8	D ¹⁶¹ -K ²¹⁸	C ²¹³	6177,9582	6177,9606	0,4
LH8H9	D ¹⁶¹ -K ²²³		6705,2286	6705,2571	4,3
LH12	C ²³² -K ²⁵⁵	C ²³² , C ²³³ , C ²³⁶ , C ²³⁹	2454,1608	2454,1696	3,6
LH12H13	C ²³² -K ²⁵⁷		2679,3086	2679,3132	1,8
LH14	D ²⁵⁸ -K ²⁹⁷	C ²⁷⁰	4556,1628	4556,1625	0,1
LH18	C ³³⁰ -K ³³¹	C ³³⁰	249,1147	ND	-
LH24	N ³⁷⁰ -K ³⁷⁹	C ³⁷⁶	1103,6009	1103,6013	0,4
LH28	S ⁴²⁴ -K ⁴⁴⁸	C ⁴³⁴	2986,3715	2986,3764	1,7
LL2	V ¹⁸ -K ⁴⁶	C ²²	3057,4502	3057,4568	2,2
LL5	S ⁶⁸ -K ¹⁰⁶	C ⁸⁹	3970,8531	3970,8529	0,0
LL8	A ¹³⁴ -K ¹⁵³	C ¹³⁸	2153,1231	2153,1324	4,3
LL14	S ¹⁹¹ -K ²⁰⁸	C ¹⁹⁷	2033,9225	2033,9266	2,0
LL15	T ²⁰⁹ -S ²¹⁶	C ²¹⁵	806,3480	806,3484	0,5

^a Нумерация аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 1 для пептидов тяжелой цепи и SEQ ID NO: 2 для пептидов легкой цепи.

^b Массы являются моноизотопными.

- непригодный; LL=пептид легкой цепи, расщепленный с помощью Lys-C; LH=пептид тяжелой цепи, расщепленный с помощью Lys-C; ND=не выявлено; pE=пироглутамат N-концевого остатка Gln на LH1.

Пептидное картирование Lys-C позволило выявить незначительные пики пептидов, соединенных дисульфидными связями, соответствующие гетерогенности дисульфидных пар между шарнирными пептидами и другими участками молекулы. В дополнение к значительным пикам пептидов, соединенных дисульфидными связями, обозначенным на фиг. 14, на карте, полученной в невосстанавливающих условиях, присутствуют незначительные поздно элюирующиеся пики (от "a" до "i"), которые отсутствуют на карте, полученной в восстанавливающих условиях, что указывает на их участие в образовании дисульфидных связей в нативном белке. Эти поздно элюирующиеся пептиды идентифицировали с помощью масс-спектрометрии как пептиды с межпочечными дисульфидными связями для известных структурных изоформ IgG2 (Wyruch et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 283(23):16194-16205, 2008; Dillon et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 283(23):16206-16215, 2008; и Zhang et al., Anal Chem., vol. 82(3):1090-1099, 2010). Пептиды "a", "b", "d" и "e" соответствуют структурной изоформе IgG2-B, тогда как пептиды "c", "f" и "i" соответствуют структурной изоформе IgG2-A/B. Схематические изображения структур дисульфидных изоформ IgG2-A/B и IgG2-B показаны на фиг. 15B и 15C соответственно. Теоретические и наблюдаемые массы всех пептидных ионов, примененных для проверки пептидов IgG2-A/B и IgG2-B, соединенных дисульфидными связями, показаны в табл. 18. Анализ свидетельствует о том, что дисульфидные связи эренумаба соответствуют дисульфидным связям, которые наблюдались ранее в случае антител IgG2 (Wyruch et al., 2008; Dillon et al., 2008; и Zhang et al., 2010).

Как подробно описано выше, пептидное картирование позволило выявить присутствие пептидов, соединенных дисульфидными связями, для преобладающей структуры IgG2-A, а также пептидов, несущих соединение, связанное с дополнительными дисульфидными структурными изоформами IgG2-A/B и IgG2-B. Как показано на фиг. 15, в изоформах IgG2-B оба Fab-плеча соединены с шарнирным участком, тогда как в изоформах IgG2-A ни одно из Fab-плеч не соединено с шарнирным участком. Изоформа

IgG2-A/B представляет собой гибрид между этими двумя формами, при этом только одно Fab-плечо соединено с шарнирным участком дисульфидной связью. Ранее сообщалось о разделении дисульфидных изоформ IgG2 с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях (Wuruch et al., 2008 и Dillon et al., 2008). В этих исследованиях пептиды, соответствующие дисульфидным изоформам А, А/В и В, идентифицировали во фракциях пиков RP-HPLC (Wuruch et al., 2008 и Dillon et al., 2008). Репрезентативный профиль действующего вещества, представляющего собой эренумаб, проанализированный с помощью RP-HPLC в невосстанавливающих условиях, показан на фиг. 16А с пиками дисульфидных изоформ, помеченными в соответствии с порядком элюирования, сообщенным Wuruch et al., 2008. Поздно элюирующиеся пики идентифицированы как изоформы IgG2-А и объединены в группу с пиком IgG2-А для представления относительного процента. Относительный уровень дисульфидных изоформ в действующем веществе, представляющем собой эренумаб, составляет примерно 59,5% IgG2-А, 34,7% IgG2-А/В и 4,4% IgG2-В с примерно 1,5% разновидностей рано-элюирующихся пре-пиков.

Хотя RP-HPLC в невосстанавливающих условиях является эффективным способом определения относительных количеств вариантов, представляющих собой дисульфидные изоформы, подвижная фаза и условия разделения несовместимы с биоанализом на основе клеток, применяемым для определения ингибирующей активности эренумаба. Следовательно, фракции, обогащенные дисульфидными изоформами, собирали с помощью полупрепаративной СЕХ-HPLC, как описано в примере 3, и тестировали в отношении активности с применением биоанализа на основе клеток, описанного в примере 1. Три фракции СЕХ-HPLC, обогащенные дисульфидными изоформами IgG2-А, IgG2-А/В и IgG2-В по сравнению с действующим веществом (табл. 16 и фиг. 13А), анализировали в отношении активности, как более подробно описано ниже. Фракции СЕХ-HPLC, обогащенные дисульфидными изоформами IgG2-А, IgG2-В и IgG2-А/В, анализировали с помощью RP-HPLC в невосстанавливающих условиях для подтверждения достаточной чистоты перед оценкой активности. Перекрытие RP-HPLC трех фракций, собранных с помощью СЕХ-HPLC, по сравнению с нефракционированным действующим веществом показано на фиг. 16В, а данные RP-HPLC по распределению дисульфидных изоформ представлены в табл. 20.

Таблица 20

Образец, обогащенный изоформой IgG2 (фракция СЕХ- HPLC)	% относительной площади		
	IgG2-В	IgG2-А/В	IgG2-А
IgG2-А (F5)	2,9	33,9	62,4
IgG2-А/В (F4)	7,0	52,5	39,4
IgG2-В (F2)	21,4	40,4	35,8
Действующее вещество	5,9	36,6	56,0

¹ Все фракции СЕХ-HPLC собирали из одной партии действующего вещества. Чистота представляющей интерес изоформы из каждой собранной фракции СЕХ-HPLC выделена и подчеркнута.

Как показано в табл. 21, относительная активность фракций, обогащенных изоформами IgG2-А и IgG2-А/В, подобна относительной активности действующего вещества, представляющего собой эренумаб. Однако фракция, обогащенная дисульфидной изоформой IgG2-В, демонстрировала значительно пониженную активность по сравнению с действующим веществом и фракциями, обогащенными изоформами IgG2-А/В и IgG2-А.

Таблица 21

Описание образца	Активность дисульфидных изоформ эренумаба	
	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
Действующее вещество ²	91	13
Фракция, обогащенная IgG2-В	58	14
Фракция, обогащенная IgG2-А/В	82	18
Фракция, обогащенная IgG2-А	101	16

¹ Среднее 3-х повторностей.

² Партия действующего вещества, из которой очищали фракции, обогащенные дисульфидными изоформами.

Эти данные свидетельствуют о том, что структурная конформация дисульфидных связей в шарнирном участке эренумаба важна для биологической активности антитела. В частности, повышенные уровни дисульфидной изоформы IgG2-B в действующем веществе оказывают значительное влияние на ингибирующую активность. Анализ нескольких партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб, изготовленного в промышленном масштабе, позволил выявить постоянные уровни дисульфидной изоформы IgG2-B в действующем веществе, находящиеся в диапазоне 4,6-5,2%, как измерено с помощью RP-HPLC в невосстанавливающих условиях. Уровни дисульфидных изоформ IgG2-A/B и IgG2-A в этих партиях действующего вещества, представляющего собой эренумаб, также соответствовали уровням IgG2-A/B, находящимся в диапазоне 34,2-35,5%, и уровням IgG2-A, находящимся в диапазоне 57,4-59,3%.

Пример 5. Идентификация и определение характеристик вариантов эренумаба, различающихся по размеру.

В данном примере описываются идентификация и определение характеристик вариантов эренумаба, различающихся по размеру, которые демонстрировали снижение функции ингибирования рецептора CGRP. Варианты эренумаба, различающиеся по размеру, могут включать высокомолекулярные (HMW) разновидности и низкомолекулярные (LMW) разновидности. HMW-разновидности, которые представляют собой разновидности крупнее мономера (например, димер и олигомерные разновидности более высокого порядка), могут образовываться посредством нековалентной ассоциации, восстанавливаемой ковалентной ассоциации и/или невосстанавливаемой ковалентной ассоциации. LMW-разновидности могут возникать вследствие фрагментации полипептидного остова и/или неполной сборки составляющих субъединиц, таких как легкая цепь и тяжелая цепь.

В данном примере гетерогенность эренумаба по размеру оценивали с помощью SE-UHPLC. SE-UHPLC позволяет разделять белки главным образом на основании различий в гидродинамическом объеме. Способ SE-UHPLC осуществляли в невосстанавливающих неденатурирующих условиях для оценки распределения эренумаба по размеру в нативных условиях. Образцы действующего вещества, представляющего собой эренумаб, загружали в аналитическую колонку SE-UHPLC (колонка BEH200, размер частиц 1,7 мкм, 4,6×150 мм, Waters Corporation) и белки разделяли изократически с применением подвижной фазы, содержащей 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия при pH 6,8. Элюент мониторили по поглощению UV при 280 нм. Колонка работала при комнатной температуре, и подвижную фазу подавали на колонку со скоростью потока, составляющей 0,4 мл/мин.

В профиле SE-UHPLC действующего вещества, представляющего собой эренумаб, было обнаружено три отдельных участка, включая преобладающий пик мономера (главный) и низкие уровни HMW (пре-пик) и LMW (пост-пик), как показано на фиг. 17A и 17B. Фракции из участков пре-пиков, главного пика и пост-пиков собирали и характеризовали варианты, разделенные на фракции. HMW-пик при SE-UHPLC (фиг. 17B) состоит из двух не полностью разделенных разновидностей, и поэтому его собирали в виде двух отдельных фракций, представляющих собой передний и задний края HMW-пика соответственно. Два HMW-пика и главный пик выделяли с помощью полупрепаративной SE-HPLC с последующим обогащением с помощью аналитической SE-HPLC. Собранные фракции HMW и главного пика концентрировали с применением фильтра с осечкой по молекулярному весу и буфера, замененного на 15 мМ ацетат натрия, pH 5,2, перед анализами для определения характеристик. Группу LMW-пиков, полученная с помощью SE-UHPLC (фиг. 17B), состоит из двух небольших пиков, сумма которых ниже предела количественного анализа действующего вещества, составляющего 0,3%. Группу LMW-пиков выделяли и обогащали с помощью аналитической SE-UHPLC, а также подвергали ограниченному тестированию характеристик, как более подробно описано ниже.

Определение характеристик HMW-фракций SE-UHPLC.

Профили SE-UHPLC и чистота выделенных HMW-фракций и фракций главного пика, показанные на фиг. 18 и в табл. 22 соответственно, демонстрируют, что фракции характеризовались достаточной чистотой для определения характеристик.

Таблица 22

Процент площади пиков SE-UHPLC обогащенных фракций

Описание образца	% HMW	% главного пика	% LMW
Действующее вещество	0,5	99,2	<0,3 ²
Фракция HMW 1 SE-UHPLC	93,9	6,1	<0,3 ²
Фракция HMW 2 SE-UHPLC	53,9	45,9	<0,3 ²
Главная фракция SE-UHPLC	<0,3 ²	99,7	<0,3 ²

¹ Все фракции SE-UHPLC собирали из одной партии действующего вещества.

² LOQ=0,3%.

Обогащенные HMW фракции и фракции главного пика на фиг. 18 и в табл. 22 характеризовали с помощью различных аналитических методик, включая SE-UHPLC с выявлением статического светорас-

сеяния, капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS), капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия в невосстанавливающих условиях (nrCE-SDS) и биоанализ на основе клеток.

НМВ-фракции и фракции главного пика наряду с нефракционированным действующим веществом анализировали с помощью SE-HPLC с выявлением статического светорассеяния (SE-HPLC-SLS) для определения молярной массы доминирующих пиков на каждой хроматограмме. Анализ с помощью SE-HPLC-SLS выполняли с применением системы HPLC Agilent 1100. Колонка представляла собой TSK-GEL G3000SWxl, размер частиц 5 мкм, ID 7,8 мм×длина колонки 300 мм (Tosoh Biosep). В качестве детекторов применяли светорассеивающий детектор Wyatt Heleos II, детектор Wyatt Optilab rEX RI и детектор Agilent UV с длиной волны, установленной на 280 нм. Анализы SE-HPLC проводили при комнатной температуре с применением 100 мМ фосфата калия, 250 мМ хлорида калия, буфера с pH 6,8 в качестве подвижной фазы и скорости потока 0,5 мл/мин. Объемы введения составляли 4,3 мкл для введения 300 мкг белка. Для расчета молекулярного веса (MW) применяли сигналы LS (светорассеяние) и RI (показатель преломления), а также значение инкремента преломления образца (dn/dc), составляющее 0,185.

Измеренная масса мономера (интактного антитела, содержащего 2 тяжелые цепи и 2 легкие цепи) из фракции главного пика составила 149 кДа, а из контроля с действующим веществом - 143 кДа, причем обе массы соответствуют теоретической молекулярной массе мономера эренумаба (148,8 кДа) (табл. 23). Измеренные массы НМВ-пика для обеих фракций, обогащенных НМВ-разновидностями (НМВ 1 и НМВ 2), составляли 292 и 279 кДа соответственно, что соответствует молекулярной массе димера эренумаба (297,6 кДа) (табл. 23). Эти данные демонстрируют, что фракции, обогащенные как НМВ 1, так и НМВ 2, преимущественно состоят из димера эренумаба.

Таблица 23

Измеренная с помощью SE-HPLC-SLS молярная масса фракций, обогащенных НМВ, и фракций главного пика

Описание образца	% НМВ	MW НМВ (кДа)	% главного пика	MW главного пика (кДа)
Действующее вещество	0,6	297	97,4	143
Фракция НМВ 1 SE-UHPLC	93,1	292	6,9	210
Фракция НМВ 2 SE-UHPLC	76,2	279	23,8	178
Главная фракция SE-UHPLC	0,4	ND	99,6	149

Анализ обогащенных фракций и нефракционированного действующего вещества с помощью nrCE-SDS в соответствии со способом, описанным в примере 3, продемонстрировал, что обе НМВ-фракции обогащены пост-пиками, что соответствует ковалентным высокомолекулярным разновидностям, превышающим по размеру мономер (главный пик), а их площади пре-пиков сопоставимы с контролем (табл. 24).

Таблица 24

Процент площади пиков nrCE-SDS обогащенных фракций SE-UHPLC¹

Описание образца	% пре-пиков	% главного пика	% пост-пиков
Действующее вещество	2,7	97,3	0,0
Фракция НМВ 1 SE-UHPLC	4,3	31,4	64,3
Фракция НМВ 2 SE-UHPLC	5,1	39,9	54,9
Главная фракция SE-UHPLC	2,7	97,3	0,0

¹ Все фракции SE-UHPLC собирали из одной партии действующего вещества.

Доли нековалентных и ковалентных димеров можно примерно определять посредством сравнения чистоты обогащенных фракций в нативных условиях с чистотой в денатурирующих условиях. При сравнении уровня димера в нативных условиях (SE-UHPLC: % НМВ в табл. 22) с уровнем ковалентного димера в денатурирующих условиях (nrCE-SDS: % пост-пиков в табл. 24) уровень ковалентного димера можно оценивать в нативном действующем веществе. На основании данного сравнения большинство нативных димерных разновидностей действующего вещества, представляющего собой эренумаб, являются ковалентными, причем примерно 68% димерных разновидностей НМВ 1 и почти все димеры НМВ 2 сохраняются в денатурирующих условиях тестирования.

Действующее вещество, представляющее собой эренумаб, и фракции, обогащенные НМВ-раз-

новидностями, а также фракции главного пика также анализировали с помощью гСЕ-SDS в соответствии со способом, описанным в примере 3. Как продемонстрировано на фиг. 19, результаты анализа с помощью гСЕ-SDS продемонстрировали, что обе фракции HMW 1 и HMW 2 обогащены среднемoleкулярными (MMW) и высокомолекулярными (HMW) разновидностями по сравнению с действующим веществом. Подобно оценке уровня ковалентных и нековалентных димерных разновидностей гСЕ-SDS можно применять для примерного определения уровня восстанавливаемых и невосстанавливаемых димерных разновидностей в действующем веществе. При сравнении уровня димера в нативных условиях (SE-UHPLC: % HMW) с уровнем невосстанавливаемого димера в восстанавливающих и денатурирующих условиях (гСЕ-SDS: % HMW) можно оценивать уровень невосстанавливаемого димера в нативном действующем веществе. На основании сравнения, показанного в табл. 25, большинство нативных димерных разновидностей в действующем веществе, представляющем собой эренумаб, являются восстанавливаемыми, причем примерно 87% димерных разновидностей HMW 1 и примерно 93% димерных разновидностей HMW 2 восстанавливаются до отдельных компонентов в восстанавливающих и денатурирующих условиях.

Таблица 25

Оценка уровней восстанавливаемого и невосстанавливаемого димера в действующем веществе, представляющем собой эренумаб (DS)

Описание образца	% HMW по SE-UHPLC	% HMW по гСЕ-SDS	% восстанавливаемого димера в исходном DS	% невосстанавливаемого димера в исходном DS
Фракция HMW 1 SE-UHPLC	93,9	12,5	87	13
Фракция HMW 2 SE-UHPLC	53,9	3,8	93	7

Биологическую активность обогащенных фракций SE-UHPLC по сравнению с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, оценивали с помощью биоанализа на основе клеток, описанного в примере 1. Как показано в табл. 26, обе обогащенные фракции HMW 1 и HMW 2 проявляли пониженную активность по сравнению с действующим веществом и обогащенным главным пиком. Значительная часть HMW-разновидностей в этих фракциях является ковалентно соединенной и недиссоциируемой, как описано выше. Самоассоциация накладывает стерические ограничения, которые могут приводить к конформационным изменениям, которые, в свою очередь, могут оказывать влияние на связывание молекулы с мишенью рецептора CGRP, что объясняет наблюдаемое снижение активности.

Таблица 26

Активность обогащенных фракций SE-UHPLC

Описание образца	% относительной активности,	
	определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток	% CV
Действующее вещество	96	2
Фракция HMW 1 SE-UHPLC	42	7
Фракция HMW 2 SE-UHPLC	62	6
Главная фракция SE-UHPLC	97	4

¹ Среднее 3-х повторностей.

Определение характеристик LMW-фракции SE-UHPLC.

LMW-пики (фиг. 17B) собирали с помощью SE-UHPLC в одной фракции и концентрировали с применением фильтра с отсежкой по молекулярному весу перед анализами для определения характеристик. Повторное введение LMW-фракции в SE-UHPLC продемонстрировало обогащение LMW-разновидностями до примерно 34,4% (данные не показаны). Собранную обогащенную LMW фракцию анализировали с помощью полного масс-анализа в восстанавливающих условиях для характеристики природы LMW-разновидностей.

Массу обогащенной LMW фракции определяли с помощью масс-спектрометрического анализа в нативных восстанавливающих условиях с применением RP-HPLC в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением. Результаты анализа указывают на то, что собранная LMW-фракция обогащена ковалентно связанным димером легких цепей (LC-LC) по сравнению с нефракционированным действующим веществом.

Результаты анализов, описанные в данном примере, демонстрируют, что эренумаб существует преимущественно в своей ожидаемой мономерной форме в виде интактного антитела, содержащего 2 тяже-

лые цепи и 2 легкие цепи (примерно 99,2% действующего вещества), что продемонстрировано с помощью SE-UHPLC в неденатурирующих условиях. Оставшаяся часть состоит из HMW-разновидностей (0,5% действующего вещества), состоящих преимущественно из димеров, а также из следовых уровней LMW-разновидностей. Олигомеров более высокого порядка не наблюдалось. Фракции SE-UHPLC действующего вещества эренумаба, обогащенные HMW-разновидностями, проявляли пониженную ингибирующую активность по сравнению с мономерной формой эренумаба.

Димер эренумаба состоит преимущественно из ковалентно связанных мономерных субъединиц и не диссоциирует в денатурирующих условиях. Большая часть димеров восстанавливается, превращаясь в компоненты тяжелой и легкой цепей в восстанавливающих и денатурирующих условиях и, следовательно, связывается посредством дисульфидных связей. Невосстанавливаемые разновидности присутствуют в качестве второстепенного компонента ковалентного димера, мигрируя после пиков тяжелой цепи при rCE-SDS. Определение характеристик LMW-пика SE-UHPLC продемонстрировало, что пик обогащен димером легких цепей.

Несколько партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб (140 мг/мл), изготовленного в промышленном масштабе, анализировали с помощью SE-UHPLC для оценки присутствия и количества вариантов, различающихся по размеру (например, HMW- и LMW-разновидностей), как измерено по проценту площади пиков HMW- и LMW-пиков на хроматограмме SE-UHPLC. Активность партий действующего вещества также оценивали с помощью анализа активности на основе клеток и сравнивали с активностью партии № 78137, которая является репрезентативной для действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клинических испытаниях фазы II/фазы III. Краткое описание данных представлено в табл. 27 ниже.

Таблица 27

Данные SE-UHPLC и активности для партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб

Номер партии	SE-UHPLC			Биоанализ на основе клеток
	% главного пика	% HMW	% LMW	% относительной активности
78137 (материал клинических испытаний)	-	-	-	101
63130	99,2	0,6	<0,3	98
63131	99,2	0,6	<0,3	124
63132	99,3	0,6	<0,3	92
63133	99,3	0,6	<0,3	96
63134	99,2	0,6	<0,3	101

Как продемонстрировано с помощью данных в табл. 27, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, изготовленное в промышленном масштабе, содержало постоянный уровень HMW-разновидностей, составляющий приблизительно 0,6%, как измерено с помощью SE-UHPLC. Действующее вещество, которое содержало этот уровень HMW-разновидностей, проявляло активность, сопоставимую с активностью действующего вещества, представляющего собой эренумаб, использованного в клинических испытаниях.

Три партии действующего вещества из табл. 27 (63131, 63132 и 63133) хранили в течение трех месяцев при 25°C и образцы подвергали анализу с помощью SE-UHPLC, а также тестированию активности для оценки любого влияния на активность действующего вещества, связанного с изменением уровней вариантов, различающихся по размеру, с течением времени. Результаты этого исследования стабильности показаны в табл. 28.

Таблица 28

Данные SE-UHPLC и активности для партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб, хранившихся при 25°C

Номер партии	SE-UHPLC через 3 месяца			Биоанализ на основе клеток через 3 месяца
	% главного пика	% HMW	% LMW	% относительной активности
63131	98,3	1,4	0,3	90
63132	98,2	1,5	0,3	94
63133	98,1	1,6	0,3	86

Действующее вещество, которое содержало уровни HMW-разновидностей до 1,6%, обладало активностью, сопоставимой с действующим веществом, представляющим собой эренумаб, использованным в клинических испытаниях.

Для оценки предрасположенности эренумаба к образованию вариантов, различающихся по размеру, в условиях термического стресса, действующее вещество, представляющее собой эренумаб, инкубировали при 50°C в течение 14 дней. Образцы удаляли в различные моменты времени в течение исследования и замораживали. После конечного момента времени все образцы анализировали параллельно для минимизации аналитической вариабельности. Образцы оценивали с помощью SE-UHPLC в соответствии со способом, описанным выше, и с помощью биоанализа на основе клеток, описанного в примере 1.

Нативные профили SE-UHPLC образцов действующего вещества, представляющего собой эренумаб, в день 0 и день 14, которые подвергали стрессу при 50°C, показаны на фиг. 20. Относительный % площади пиков для пиков, показанных на фиг. 20, представлен в табл. 29 наряду с % относительной активности образцов, как оценено с помощью биоанализа на основе клеток. HMW-разновидности были преобладающим деградантом, демонстрирующим повышение уровня в течение 14 дней с соответствующим уменьшением главного пика. Полученные HMW-разновидности преимущественно состояли из агрегатов более высокого порядка (HMW-разновидностей, превышающих по размеру димер). Также наблюдалось повышение уровня LMW-разновидностей в день 14. Образец действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутый термическому стрессу, продемонстрировал значительное снижение активности. Снижение активности преимущественно обусловлено повышением уровня HMW-разновидностей, а также повышением уровня изомеризованных вариантов Asp¹⁰⁵, уровень которых также был повышен в образцах действующего вещества, представляющего собой эренумаб, подвергнутых термическому стрессу (см. пример 2).

Таблица 29

% Площади пика SE-UHPLC и относительная активность эренумаба, подвергнутого стрессу при 50°C

Момент времени (дни)	% HMW	% главного пика	% LMW	% относительной активности, определенный с помощью биоанализа ¹ на основе клеток (%CV)
0	0,5	99,1	0,4	93 (4)
14	9,6	88,2	2,2	71 (7)

¹ Среднее 3-х повторностей.

Дополнительные исследования с термическим стрессом проводили на дополнительных партиях действующего вещества, представляющего собой эренумаб, изготовленного в промышленном масштабе. Три партии действующего вещества из табл. 27 (63131, 63132 и 63133) хранили до 30 дней при 40°C и образцы подвергали анализу с помощью SE-UHPLC, а также тестированию активности на основе клеток для дополнительной оценки любого влияния на активность действующего вещества, связанного с изменением уровней вариантов, различающихся по размеру, с течением времени. Результаты этого исследования с термическим стрессом показаны в табл. 30.

Таблица 30

Данные SE-UHPLC и активности для партий действующего вещества, представляющего собой эренумаб, хранившихся при 40°C

Номер партии	Количество дней при 40°C	SE-UHPLC			Биоанализ на основе клеток
		% главного пика	% HMW	% LMW	% относительной активности
63131	14	97,0	2,3	0,7	91
63131	30	95,6	3,4	1,0	83
63132	14	97,0	2,3	0,7	96
63132	30	94,7	4,2	1,1	96
63133	14	96,9	2,4	0,7	91
63133	30	95,1	3,8	1,1	76

Результаты данного исследования демонстрируют общую тенденцию к снижению активности с повышением уровня HMW- и LMW-разновидностей. В частности, уровни HMW-разновидностей в действующем веществе, превышающие приблизительно 2,5%, были связаны со снижением активности действующего вещества. Отмечается, что образец из партии 63132 в день 30 не демонстрировал снижения активности, что, вероятно, связано с вариабельностью биоанализа на основе клеток.

Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Необходимо понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретной описанной методологией, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, необходимо понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента, содержащая

(i) эренумаб, где эренумаб содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая из тяжелых цепей имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и каждая из легких цепей имеет последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4;

(ii) изомеризованный вариант эренумаба, где изомеризованный вариант имеет остаток изоаспарагиновой кислоты или сукцинимид в аминокислотном положении 105 в любой или в обеих тяжелых цепях эренумаба; и

(iii) дезамидированный вариант эренумаба, где дезамидированный вариант имеет остаток аспарагиновой кислоты, сукцинимид или остаток изоаспарагиновой кислоты в аминокислотном положении 102 в любой или в обеих тяжелых цепях эренумаба,

где количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от 1 до 15%.

2. Композиция по п.1, где количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от 1 до 10%.

3. Композиция по п.1, где количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от 1 до 4%.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где количество изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, представляющей собой хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC).

5. Композиция по любому из пп.1-4, где каждая тяжелая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 1 и каждая легкая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

6. Композиция по любому из пп.1-4, где каждая тяжелая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 3 и каждая легкая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 4.

7. Композиция по п.1, где каждая тяжелая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 3 и каждая легкая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 4 и где количество эренумаба в композиции составляет 90% или более, как измерено по главным пикам при HIC-HPLC, и количество

изомеризованного варианта и дезамидированного варианта в композиции составляет от 1 до 10%, как измерено по пре-пикам при HIC-HPLC.

8. Фармацевтический состав, содержащий композицию по любому из пп.1-7 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

9. Фармацевтический состав по п.8, где фармацевтический состав содержит 70 мг/мл композиции на основе эренумаба, 25 мМ ацетата, 7,3% (вес/объем) сахарозы и 0,010% (вес/объем) полисорбата 80, где фармацевтический состав имеет pH 5,2±0,2.

10. Фармацевтический состав по п.8, где фармацевтический состав содержит 140 мг/мл композиции на основе эренумаба, 34 мМ ацетата, 6,5% (вес/объем) сахарозы и 0,010% (вес/объем) полисорбата 80, где фармацевтический состав имеет pH 5,2±0,2.

11. Предварительно заполненный шприц или автоинъектор, содержащий фармацевтический состав по п.9 или 10.

12. Предварительно заполненный шприц или автоинъектор по п.11, где объем инъекции шприца или автоинъектора составляет 1 мл.

13. Способ лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту фармацевтического состава по любому из пп.8-10.

14. Способ по п.13, где головная боль представляет собой мигрень.

15. Способ по п.14, где мигрень представляет собой эпизодическую мигрень или хроническую мигрень.

16. Применение композиции на основе эренумаба по любому из пп.1-7 в способе лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента.

17. Применение композиции на основе эренумаба по п.16, где головная боль представляет собой мигрень.

18. Применение композиции на основе эренумаба по п.17, где мигрень представляет собой эпизодическую мигрень или хроническую мигрень.

19. Применение композиции на основе эренумаба по любому из пп.1-7 для получения лекарственного препарата для лечения, предупреждения или снижения частоты возникновения головной боли у нуждающегося в этом пациента.

20. Применение по п.19, где головная боль представляет собой мигрень.

21. Применение по п.20, где мигрень представляет собой эпизодическую мигрень или хроническую мигрень.

22. Способ получения фармацевтического состава, содержащего композицию на основе эренумаба, где способ включает

(i) получение частично очищенной композиции, содержащей эренумаб и изомеризованные и дезамидированные варианты эренумаба, где эренумаб содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая из тяжелых цепей имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и каждая из легких цепей имеет последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4;

(ii) измерение количества изомеризованных и дезамидированных вариантов эренумаба в частично очищенной композиции с использованием HIC-HPLC, где изомеризованный вариант имеет остаток изоаспарагиновой кислоты или сукцинимид в аминокислотном положении 105 в любой или в обеих тяжелых цепях эренумаба и дезамидированный вариант имеет остаток аспарагиновой кислоты, сукцинимид или остаток изоаспарагиновой кислоты в аминокислотном положении 102 в любой или в обеих тяжелых цепях эренумаба;

(iii) сравнение измеренного количества изомеризованных и дезамидированных вариантов с предварительно определенным эталонным критерием, где предварительно определенный эталонный критерий представляет собой диапазон от 1 до 10%; и

(iv) объединение композиции на основе эренумаба с одним или более вспомогательными веществами с получением фармацевтического состава, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий соблюдается.

23. Способ по п.22, где, если сравнение на стадии (iii) указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий не соблюдается, способ дополнительно включает осуществление хроматографии гидрофобных взаимодействий композиции на основе эренумаба для снижения количества изомеризованных и дезамидированных вариантов с целью соблюдения предварительно определенного эталонного критерия с получением повторно обработанной композиции на основе эренумаба и последующее объединение повторно обработанной композиции на основе эренумаба с одним или более вспомогательными веществами с получением фармацевтического состава.

24. Способ по п.22 или 23, где предварительно определенный эталонный критерий представляет собой диапазон от 1-4%.

25. Способ по любому из пп.22-24, где частично очищенная композиция представляет собой пул элюирования из материала катионообменной хроматографии.

26. Способ по любому из пп.22-24, где частично очищенная композиция представляет собой сбор культуры клеток из линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), которая рекомбинантно экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь под SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь под SEQ ID NO: 2.

27. Способ по любому из пп.22-26, где каждая тяжелая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 3 и каждая легкая цепь эренумаба имеет последовательность SEQ ID NO: 4.

28. Способ по любому из пп.22-27, где одно или более вспомогательных веществ, объединенных с композицией на основе эренумаба, включают ацетат, сахарозу и полисорбат.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи эренумаба

```

1   QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51  ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 LNYYDSSGYY HYKYGMAVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
151 STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
201 VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAGPSVF
251 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP
301 REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG
351 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
401 KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
451 SLSPGK (SEQ ID NO: 1)

```

Фиг. 1А

Аминокислотная последовательность легкой цепи эренумаба

```

1   QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQ L PGTAPKLLIY
51  DNNKRPSGIP DRFSGSKSGT STTLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSRLSAV
101 FGGGKTLTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV
151 AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT
201 HEGSTVEKTV APTPCS (SEQ ID NO: 2)

```

Фиг. 1В

Последовательность тяжелой цепи эренумаба с посттрансляционными модификациями

```

1   pEVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51  ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 LNYYDSSGYY HYKYGMAVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
151 STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
201 VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAGPSVF
251 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP
301 REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG
351 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
401 KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
451 SLSPG (SEQ ID NO: 3)

```

Фиг. 1С

Последовательность легкой цепи эренумаба с посттрансляционными модификациями

```

1   pESVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQ L PGTAPKLLIY
51  DNNKRPSGIP DRFSGSKSGT STTLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSRLSAV
101 FGGGKTLTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV
151 AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT
201 HEGSTVEKTV APTPCS (SEQ ID NO: 4)

```

Фиг. 1D

Аминокислотная последовательность переменного участка тяжелой цепи
эренумаба

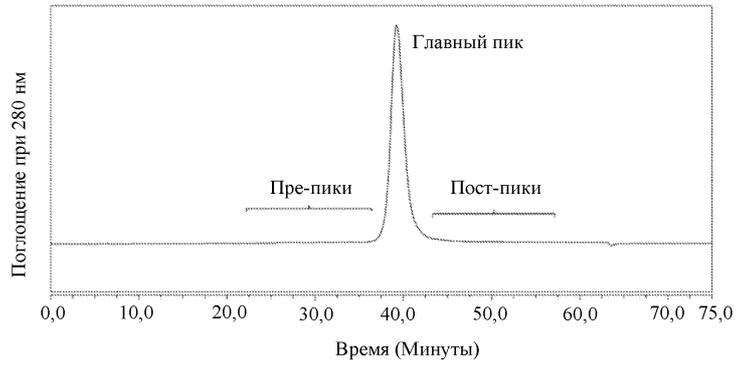
1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51 ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 LNYYDSSGY HYKYYGMAVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5)

Фиг. 1E

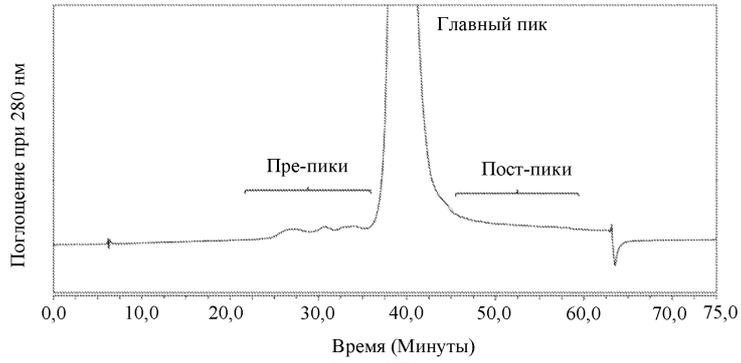
Аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи
эренумаба

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQI PGTAPKLLIY
51 DNNKRPSGIP DRFSGSKSGT STTLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSRLSAVV
101 FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 6)

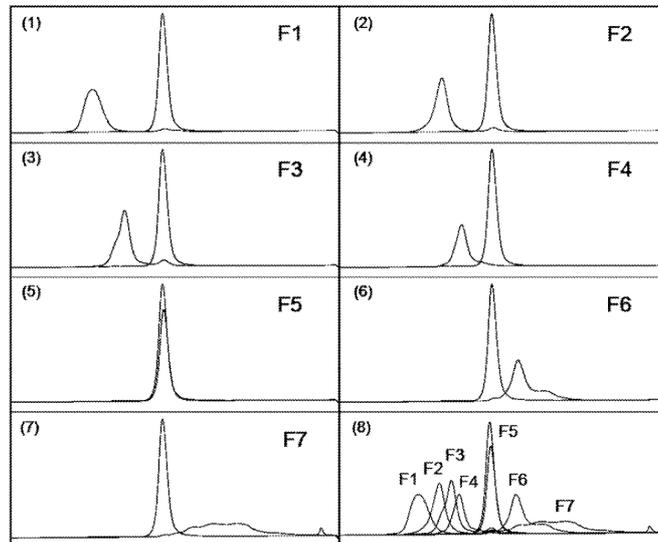
Фиг. 1F



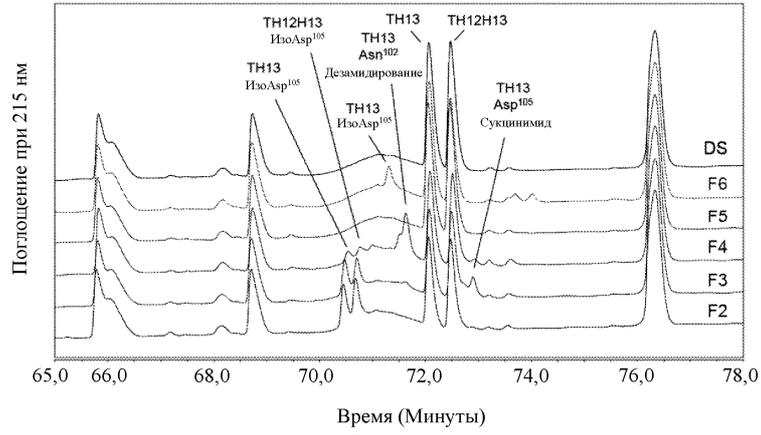
Фиг. 2A



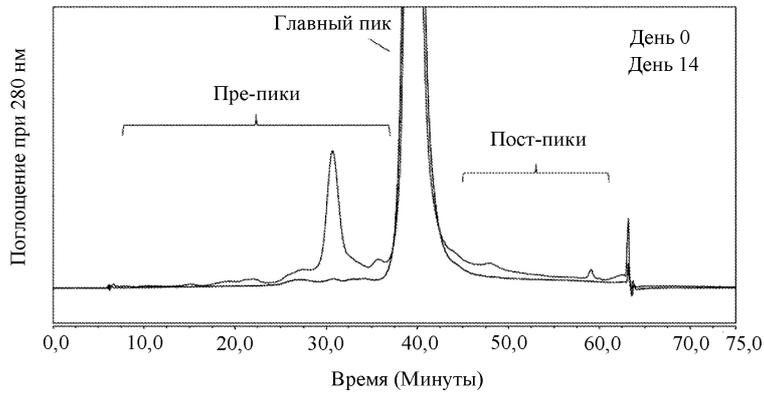
Фиг. 2B



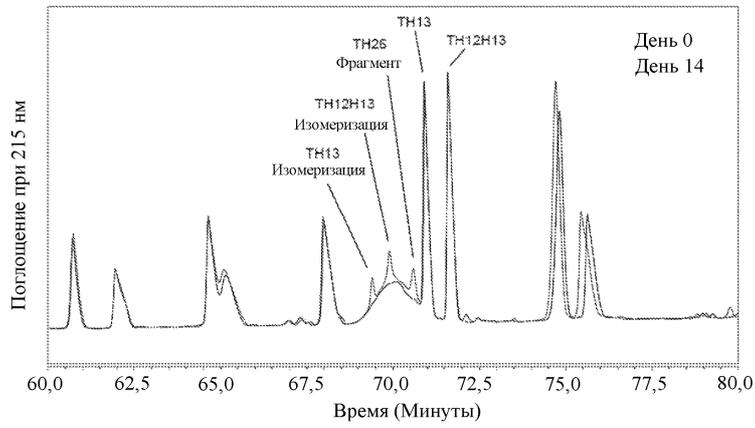
Фиг. 3



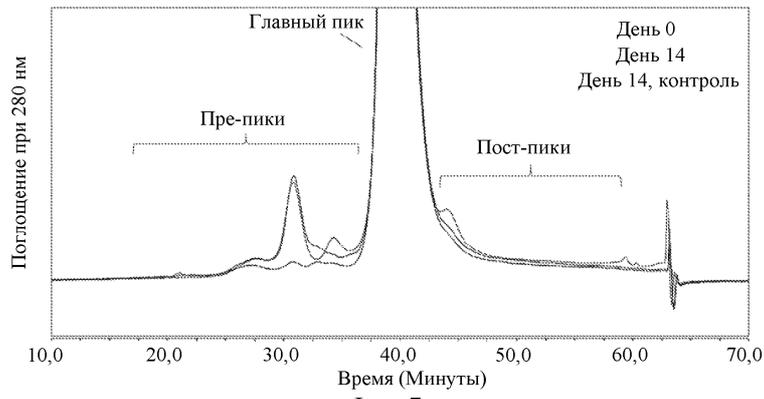
Фиг. 4



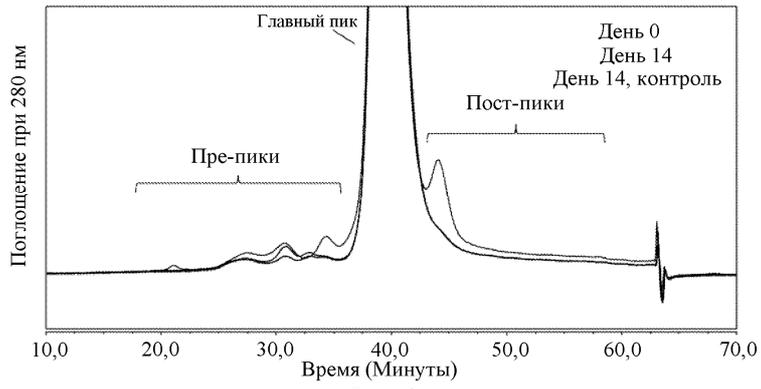
Фиг. 5



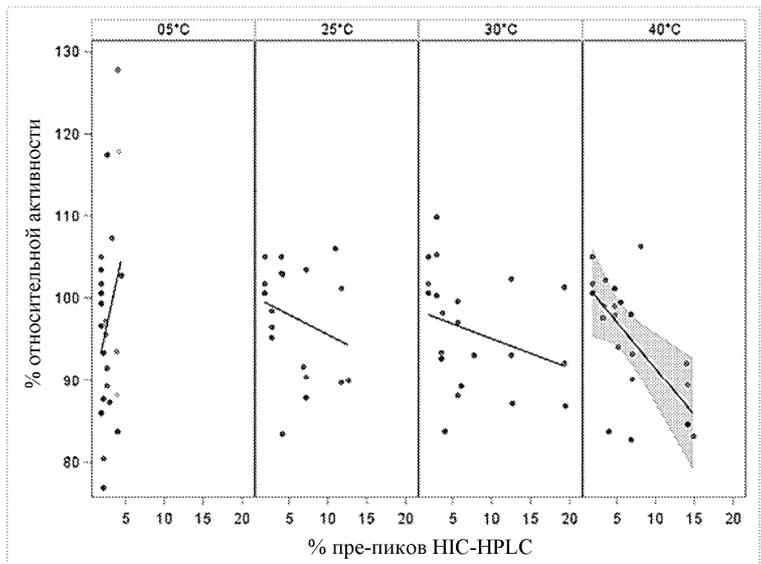
Фиг. 6



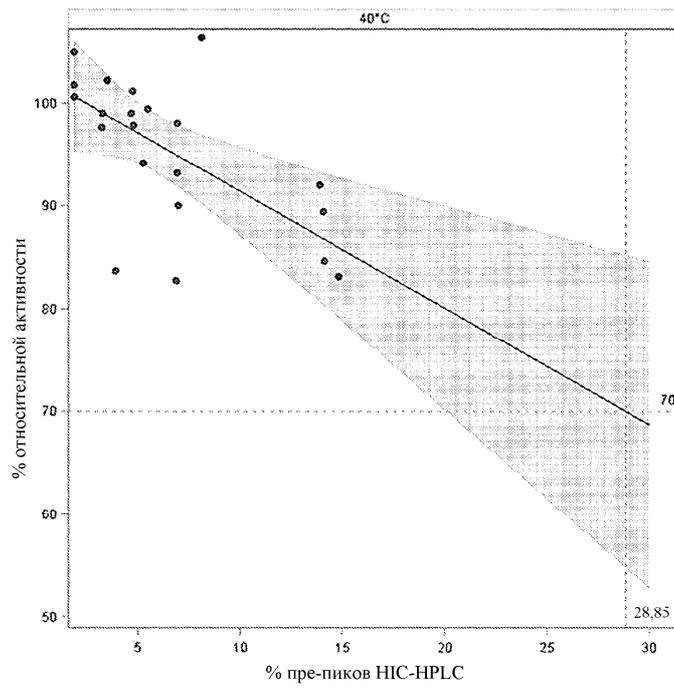
Фиг. 7



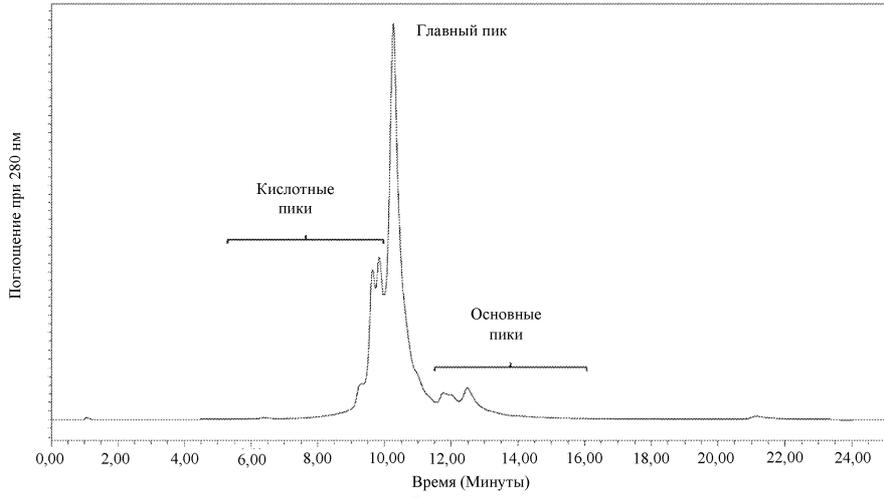
Фиг. 8



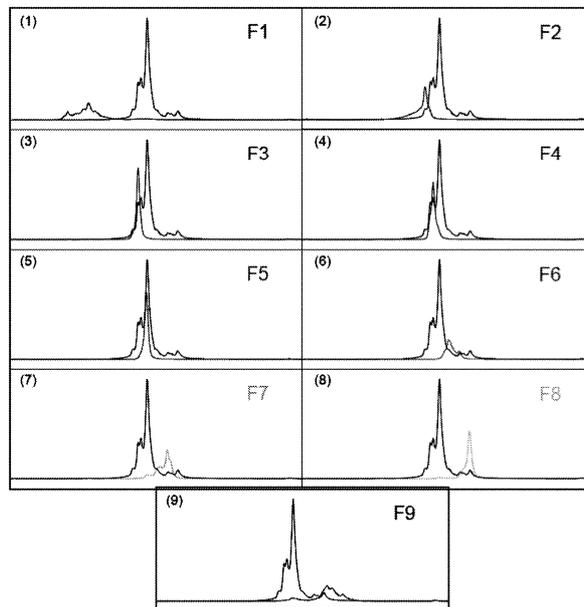
Фиг. 9



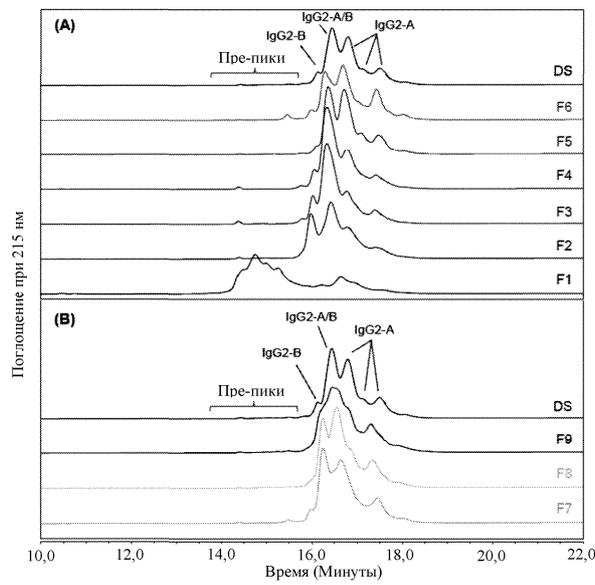
Фиг. 10



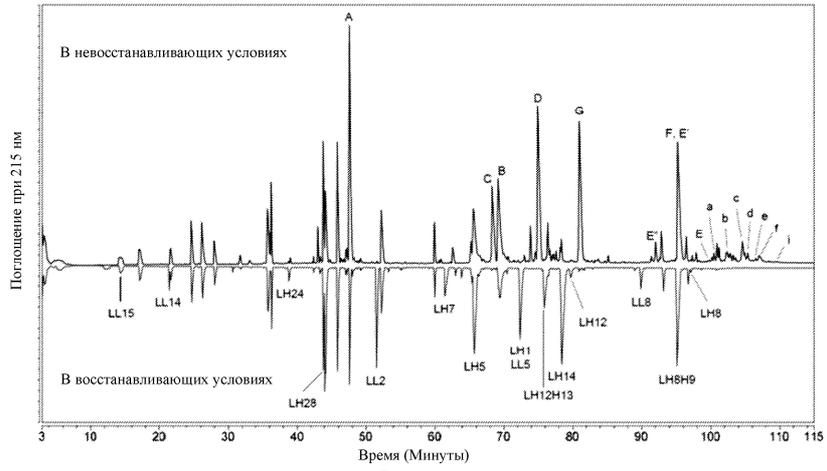
Фиг. 11



Фиг. 12

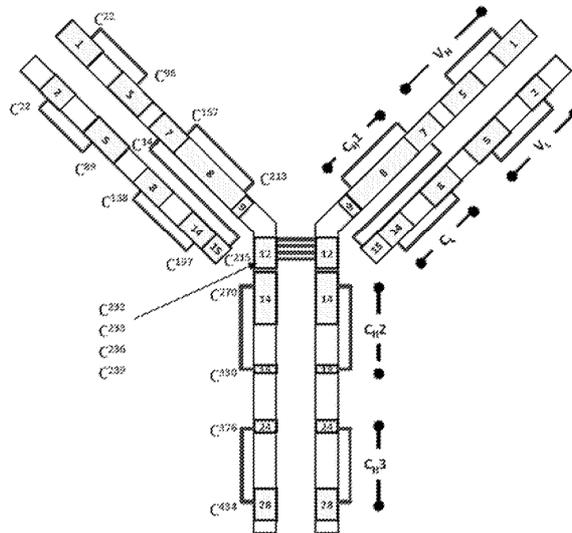


Фиг. 13



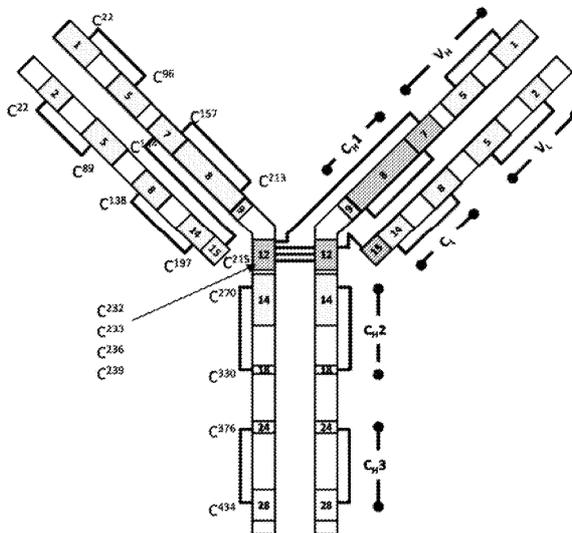
Фиг. 14

IgG2-A



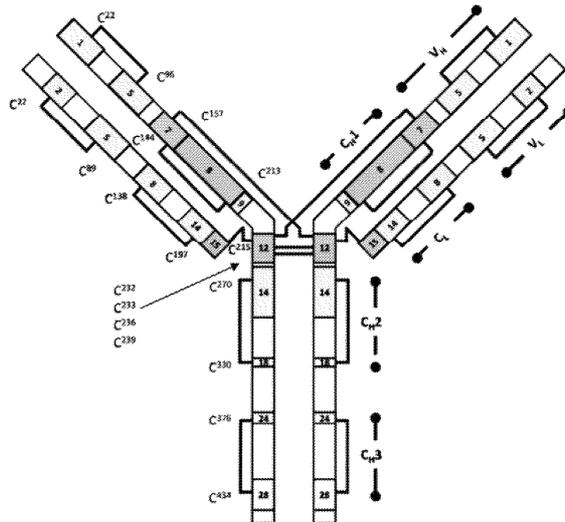
Фиг. 15А

IgG2-A/B

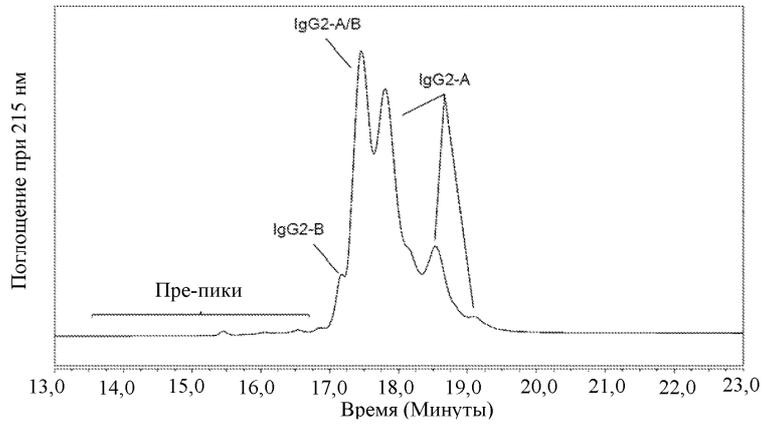


Фиг. 15В

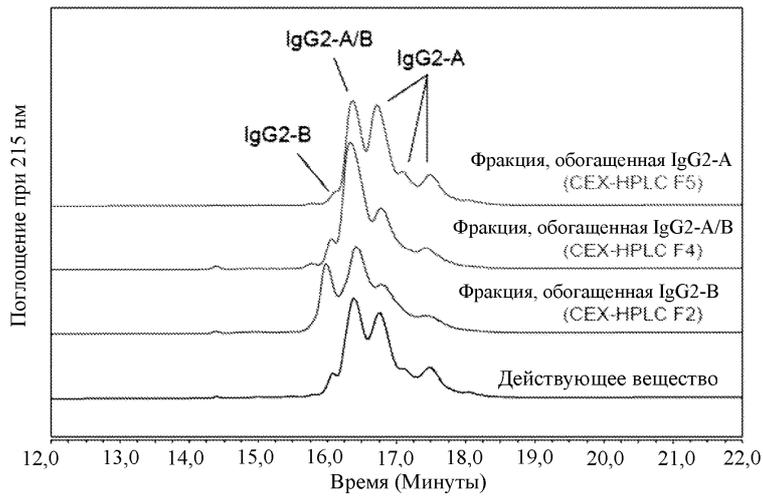
IgG2-B



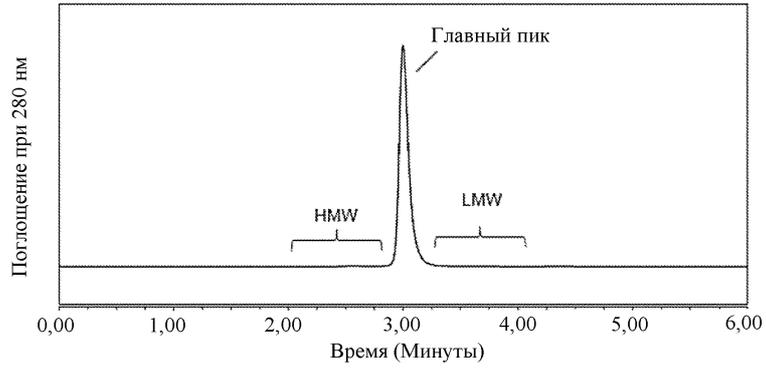
Фиг. 15С



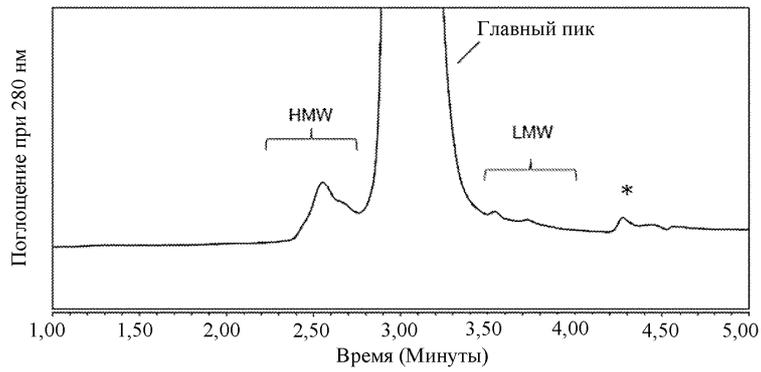
Фиг. 16А



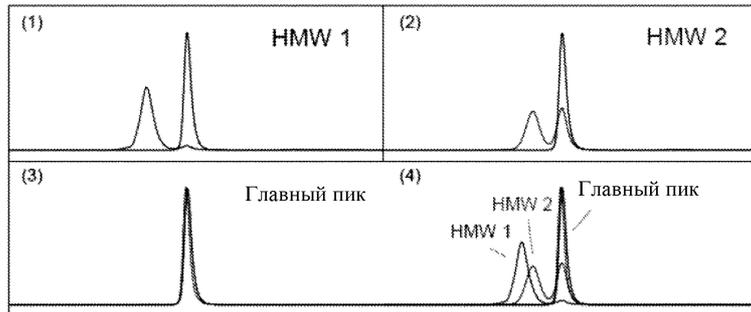
Фиг. 16В



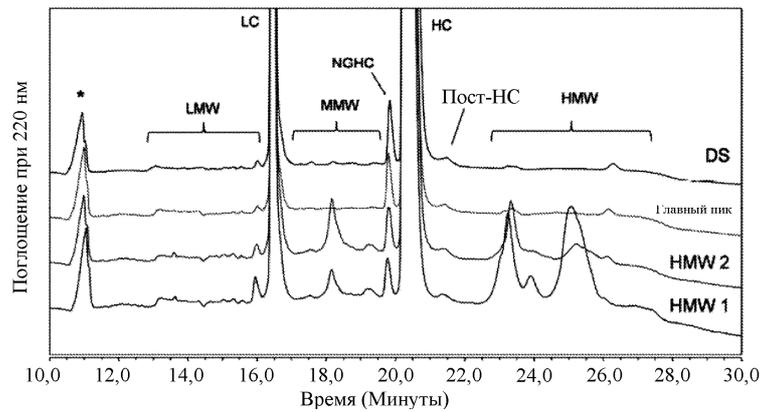
Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 18



Фиг. 19

