



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I847980 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：108111646

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 02 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

G01N30/46 (2006.01)

(30)優先權：2018/04/02 美國

62/651,651

(71)申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：羅森 凱尼斯 LAWSON, KENNETH (US)；萊德 諾耶 RIEDER, NOEL (US)；哈普阿瑞奇 蘇明達 HAPUARACHCHI, SUMINDA (US)；瑞米瑞茲 約瑟 桂格里歐 RAMIREZ, JOSE GREGORIO (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201637667A

CN 103998469A

CN 107184976A

期刊 Elsa Wagner-Rousset et al., Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies. Journal of Chromatography A. 1498: doi: 10.1016/j.chroma.2017.02.065. 2017 May 19; Epub 2017 Feb 27. 147-154.

期刊 Renee Yang et al., High resolution separation of recombinant monoclonal antibodies by size-exclusion ultra-high performance liquid chromatography (SE-UHPLC). J Pharm Biomed Anal. 109: doi: 10.1016/j.jpba.2015.02.032. 2015 May 10; Epub 2015 Feb 21. 52-61.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：20 共 118 頁

(54)名稱

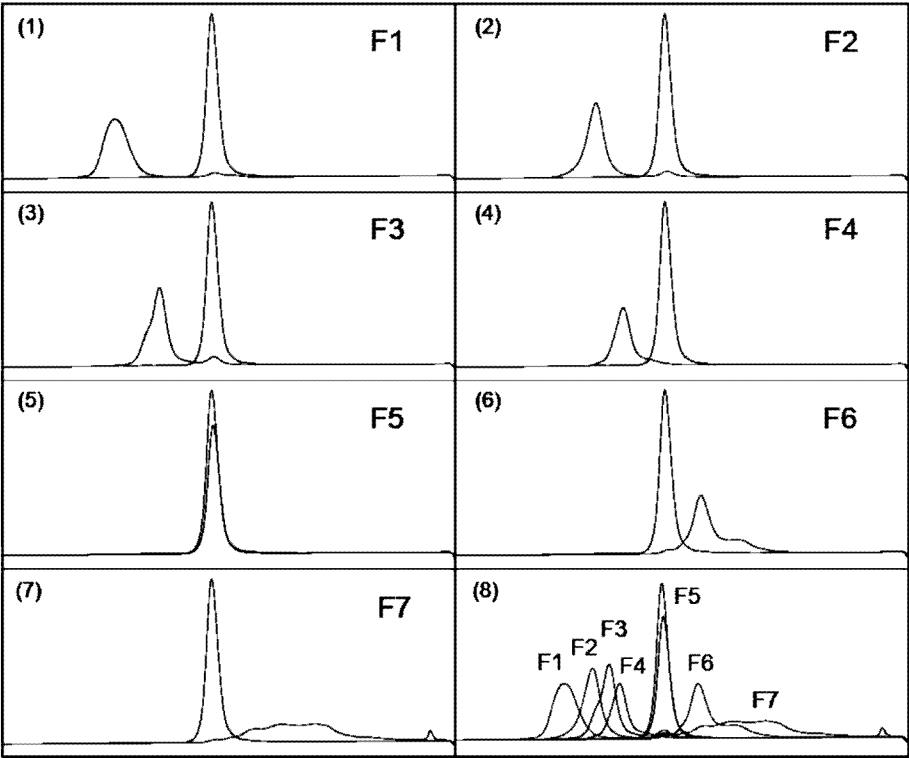
厄瑞努單抗組成物及其用途

(57)摘要

本發明涉及包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體之組成物，該一種或多種變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、和 HMW 種類。還描述了包含厄瑞努單抗組成物之藥物配製物以及使用和表徵該等組成物的方法。

The present invention relates to compositions comprising erenumab and one or more erenumab variants, including isomerization variants, deamidation variants, acidic variants, and HMW species. Pharmaceutical formulations comprising the erenumab compositions and methods of using and characterizing the compositions are also described.

指定代表圖：



【圖 3】



公告本

I847980

【發明摘要】

【中文發明名稱】 厄瑞努單抗組成物及其用途

【英文發明名稱】 ERENUMAB COMPOSITIONS AND USES THEREOF

【中文】

本發明涉及包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體之組成物，該一種或多種變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、和HMW種類。還描述了包含厄瑞努單抗組成物之藥物配製物以及使用和表徵該等組成物的方法。

【英文】

The present invention relates to compositions comprising erenumab and one or more erenumab variants, including isomerization variants, deamidation variants, acidic variants, and HMW species. Pharmaceutical formulations comprising the erenumab compositions and methods of using and characterizing the compositions are also described.

【指定代表圖】 圖3

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 厄瑞努單抗組成物及其用途

【英文發明名稱】 ERENUMAB COMPOSITIONS AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明涉及生物藥劑學領域。特別地，本發明涉及厄瑞努單抗（erenumab）的變體的鑒定及表徵，該等厄瑞努單抗的變體影響厄瑞努單抗之功能活性。本發明還涉及包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體之組成物、包含該等組成物之藥物配製物、以及使用和表徵該等組成物之方法。

【先前技術】

【0002】 厄瑞努單抗係特異性結合人降鈣素基因相關肽（CGRP）受體並防止該CGRP配位基結合且激活受體的全人單株抗體。CGRP與偏頭痛發病機制有關（Durham, New England Journal of Medicine [新英格蘭醫學雜誌], 第350卷: 1073-1075, 2004；Edvinsson等人, Neurotherapeutics [神經治療學], 第7卷: 164-175, 2010）。在2期和3期臨床試驗中，與接受安慰劑的患者相比，使用厄瑞努單抗治療的患有慢性或陣發性偏頭痛的患者每月偏頭痛天數減少（Tepper等人, Lancet Neurol. [柳葉刀 神經病學], 第16卷: 425-434, 2017；Goadsby等人, New England Journal of Medicine [新英格蘭醫學雜誌], 第377卷: 2123-2132, 2017）。

【0003】 複雜的治療性生物製劑，例如單株抗體，可以具有許多可影響生物製劑的安全性和/或效力的產品品質屬性。通常需要對分子進行全面的結構和功能評估以鑒定該等屬性並理解它們對分子特性的影響。瞭解分子的屬性對於確保生產一致的產品非常重要。

【0004】 生物製劑的變體可以在製造過程中或在儲存條件下產生。該等

產品變體可以歸類為產品相關的物質或產品相關的雜質。產品相關的物質係在產品的製造或儲存期間形成的所需產品的那些分子變體，該等變體具有與所需產品相當的性質，並且不被認為係雜質。相反，產品相關的雜質係所需產品的分子變體，其在產品效力和患者安全性方面不具有與所需產物相當的特性。因此，特別是對產品相關的雜質的鑒定和表徵可用於生物藥物產品之製造和品質控制。

【發明內容】

【0005】 本發明部分基於對厄瑞努單抗的產品相關雜質之鑒定和表徵，特別是具有降低的功能活性的厄瑞努單抗的變體。對治療性厄瑞努單抗組成物中該等變體的量的控制和監測確保了厄瑞努單抗組成物具有必需的效力以產生所需的臨床效果。因此，在一些實施方式中，本發明提供了包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、二硫化物同功型變體、高分子量（HMW）種類、或其組合，其中該組成物中厄瑞努單抗變體的量被控制在具體範圍內。

【0006】 在某些實施方式中，本發明提供了包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體之組成物，其中該一種或多種厄瑞努單抗變體包括異構化變體和脫醯胺變體。在一些實施方式中，該異構化變體在厄瑞努單抗的其中一條或兩條重鏈（SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3）中的胺基酸位置105處具有異天冬胺酸殘基或琥珀醯亞胺。在該等和其他實施方式中，該脫醯胺變體在厄瑞努單抗的其中一條或兩條重鏈（SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3）中的胺基酸位置102處具有的天冬醯胺殘基轉變為天冬胺酸殘基、琥珀醯亞胺、或異天冬胺酸殘

基。例如，如藉由疏水性相互作用層析-高效液相層析（HIC-HPLC）測定的該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量可以少於約30%、少於約15%、少於約8%、或少於約4%。

【0007】 本發明還提供了厄瑞努單抗與厄瑞努單抗的一種或多種酸性變體的組成物。該組成物中酸性變體的量可以少於約40%，例如，從約25%至約38%或從約26%至約34%。在一些實施方式中，藉由陽離子交換高效液相層析（CEX-HPLC）測定厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量。厄瑞努單抗的酸性變體包括二硫化物同功型變體、脫醯胺變體、片段化變體、非共有糖基化變體、HMW種類、及其組合。在某些實施方式中，該等酸性變體包括二硫化物同功型變體、片段化變體、或其組合。

【0008】 在一些實施方式中，本發明提供了厄瑞努單抗與厄瑞努單抗的二硫化物同功型變體的組成物。厄瑞努單抗的二硫化物同功型變體可以包括IgG2-B同功型和/或IgG2-A/B同功型。該組成物中IgG2-B同功型的量可以少於約20%，例如，少於約10%、或少於約8%，例如從約4%至約6%。該組成物中IgG2-A/B同功型的量可以是從約20%至約40%、從約26%至約38%、或從約34%至約37%。在某些實施方式中，藉由非還原反相高效液相層析（RP-HPLC）測定二硫化物同功型的量。

【0009】 本發明還包括包含厄瑞努單抗和厄瑞努單抗的一種或多種尺寸變體的組成物，例如低分子量（LMW）種類、中等分子量（MMW）種類、和高分子量（HMW）種類。在某些實施方式中，該組成物中HMW種類的量少於約3.0%，例如，約2.5%或更少、約2.1%或更少、約1.8%或更少、約1.4%或更少、或約1.2%或更少。在一個具體的實施方式中，厄瑞努單抗的HMW種類主要由共價連接的厄瑞努單抗的二聚體組成。厄瑞努單抗組成物中HMW種類的

量可以藉由尺寸排阻超高效液相層析（SE-UHPLC）測定。

【0010】 在一些實施方式中，本發明還提供了評價或評估厄瑞努單抗組成物的品質之方法。在一個實施方式中，該等方法包括獲得厄瑞努單抗組成物，該組成物包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體；測量該組成物中一種或多種厄瑞努單抗變體之量；將該一種或多種厄瑞努單抗變體的所測量與預定參考標準進行比較；並且如果該比較表明滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。該等方法可以包括以下的一個、兩個、或三個：(1) 測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量（例如，藉由HIC-HPLC中前峰的峰面積百分比），(2) 測量該組成物中酸性變體之量（例如，藉由CEX-HPLC中酸性峰的峰面積百分比），和/或 (3) 測量該組成物中HMW種類之量（例如，藉由SE-UHPLC中前峰的峰面積百分比）。在某些實施方式中，全部的三個測量對厄瑞努單抗組成物進行。

【0011】 包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物還包括在本發明中。在一些實施方式中，該等藥物配製物包含本文所述的厄瑞努單抗組成物和一種或多種藥學上可接受的賦形劑（例如，緩衝劑、糖、和表面活性劑）。可以將該等藥物配製物摻入注入裝置（例如，預填充式注射器或自動注射器）。在這樣的實施方式中，預填充式注射器或自動注射器的注射體積少於約2 mL，例如，約1 mL。

【0012】 本發明還包括使用本發明的厄瑞努單抗組成物和藥物配製物在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生的方法。在一個實施方式中，該等方法包括向患者給予包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物。頭痛可以是偏頭痛、頭痛群、或其他類型的頭痛障礙（例如，緊張型頭痛、偏癱性偏頭痛、經期偏頭痛、和視網膜性偏頭痛）。在某些實施方式中，

待根據本發明的方法和用途治療的患者具有或被診斷為偏頭痛（例如，陣發性偏頭痛或慢性偏頭痛）。

【0013】特別考慮了該等厄瑞努單抗組成物在本文揭露的任何方法中或在根據本文揭露的任何方法給予的藥物的製備中之用途。例如，本發明用於在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生的方法中使用的本文所述的厄瑞努單抗組成物或藥物配製物。本發明還涵蓋了本文所述的厄瑞努單抗組成物或藥物配製物在製備用於在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生的藥物中之用途。

【圖式簡單說明】

【0014】[圖1A和1B]示出了針對厄瑞努單抗的重鏈（圖1A；SEQ ID NO: 1）和輕鏈（圖1B；SEQ ID NO: 2）之胺基酸序列。每條鏈上的互補決定區（CDR）以加粗和加底線示出。該重鏈包含位置306處的天冬醯胺殘基上的N-聯糖基化位點。

【0015】[圖1C和1D]示出了針對厄瑞努單抗，在N-末端和C-末端處具有常見翻譯後修飾的重鏈（圖1C；SEQ ID NO: 3）和輕鏈（圖1D；SEQ ID NO: 4）之胺基酸序列。在每條鏈中CDR以加粗和加底線示出。pE代表焦麩胺酸（pyroglutamate）。

【0016】[圖1E和1F]示出了針對厄瑞努單抗的重鏈可變區（圖1E；SEQ ID NO: 5）和輕鏈可變區（圖1F；SEQ ID NO: 6）之胺基酸序列。在每個可變區中CDR以加粗和加底線示出。

【0017】[圖2A和2B]描繪了按全比例（圖2A）和擴展比例（圖2B）表示的厄瑞努單抗原料藥的代表性HIC-HPLC圖譜。藉由HIC-HPLC，使用乙酸鈉

(pH 5.5) 流動相，用硫酸銨的線性遞減梯度進行洗脫並且在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥。

【0018】 [圖3]顯示HIC-HPLC收集的級分和藉由HIC-HPLC分析的厄瑞努單抗原料藥的疊加。藉由HIC-HPLC，使用乙酸鈉 (pH 5.5) 流動相，用硫酸銨的線性遞減梯度進行洗脫並且在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥和從半製備型HIC-HPLC (F1-F7) 收集的級分。每個小圖係在280 nm處的吸光度相對按分鐘表示的洗脫時間的圖。將全部七種HIC-HPLC級分與厄瑞努單抗原料藥的疊加示出在小圖8中。

【0019】 [圖4]係針對富集的HIC-HPLC級分 (F2-F6) 和未分級的厄瑞努單抗原料藥 (DS) 的厄瑞努單抗重鏈CDR3內肽的洗脫區的還原胰蛋白酶肽圖疊加。TH12H13肽對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基99至113，並且TH13對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基101至113。

【0020】 [圖5]係暴露於熱緊迫 (thermal stress) 的厄瑞努單抗原料藥的HIC-HPLC圖譜。藉由HIC-HPLC，使用乙酸鈉 (pH 5.5) 流動相，用硫酸銨的線性梯度進行洗脫並且在280 nm處檢測吸光度來分析在50°C下孵育14天的厄瑞努單抗原料藥。頂部跡線對應於第14天時間點。

【0021】 [圖6]描繪了針對在50°C下應激14天的厄瑞努單抗原料藥以擴展比例之還原的胰蛋白酶肽圖譜。TH12H13肽對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基99至113，並且TH13對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基101至113。TH26肽對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基311至326，並且檢測的片段係由於L³¹⁵和T³¹⁶之間的非特異性切割。

【0022】 [圖7]係在pH 7.4和37°C應激的厄瑞努單抗原料藥的HIC-HPLC圖譜。將用PBS (pH 7.4) 稀釋至10 mg/mL並在37°C下孵育14天的厄瑞努單抗原

料藥藉由HIC-HPLC，使用乙酸钠（pH 5.5）流動相，用硫酸銨的線性梯度進行洗脫並且在280 nm處檢測吸光度來進行分析。將對照樣品連同生理pH應激狀態的樣品稀釋於配製物緩衝液（pH 5.2）中，並且在37°C下孵育14天。

【0023】 [圖8]係在pH 8.0和25°C應激的厄瑞努單抗原料藥之HIC-HPLC圖譜。將用Tris鹼（pH 8.0）稀釋至10 mg/mL並在25°C下孵育14天的厄瑞努單抗原料藥藉由HIC-HPLC，使用乙酸钠（pH 5.5）流動相，用硫酸銨的線性梯度進行洗脫並且在280 nm處檢測吸光度來進行分析。將對照樣品連同高pH應激狀態的樣品稀釋於配製物緩衝液（pH 5.2）中，並且在25°C下孵育14天。

【0024】 [圖9]係厄瑞努單抗批次的相對效力百分比作為在四種不同的儲存條件下相同批次的HIC-HPLC分析中前峰的峰面積百分比的函數之圖。針對每個溫度顯示來自數據線性回歸分析的擬合回歸線。對於40°C條件，回歸線的斜率在統計上不同於零，並顯示相對效力百分比如何隨著HIC-HPLC前峰面積百分比的增加而降低。

【0025】 [圖10]顯示了來自圖9中40°C儲存條件的數據之圖及擬合回歸線，其中擬合線延伸以跨70%相對效力閾值。70%相對效力閾值線跨回歸線約28.85%的HIC-HPLC前峰面積。

【0026】 [圖11]描繪了厄瑞努單抗原料藥之代表性CEX-HPLC圖譜。藉由CEX-HPLC，使用磷酸鈉（pH 6.6）流動相，用氯化鈉的線性梯度洗脫並在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥。

【0027】 [圖12]顯示CEX-HPLC收集的級分和藉由CEX-HPLC分析的厄瑞努單抗原料藥之疊加。藉由CEX-HPLC，使用磷酸鈉（pH 6.6）流動相，用氯化鈉的線性梯度進行洗脫並在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥和從半製備型CEX-HPLC（F1-F9）收集的級分。每個小圖係在280 nm處的吸光度

相對按分鐘表示的洗脫時間的圖。

【0028】 [圖13A和13B]顯示CEX-HPLC酸性和主峰級分（圖13A）以及CEX-HPLC鹼性峰級分（圖13B）之RP-HPLC圖譜。藉由RP-HPLC，使用Waters BEH300 C4柱（1.7 μ m粒度，2.1 mm x 50 mm）並且使用含有0.1% TFA的流動相和1-丙醇的梯度在75°C下進行洗脫在215 nm下檢測來分析厄瑞努單抗原料藥（DS）和CEX-HPLC級分（F1-F9）。IgG2-A、IgG2-A/B和IgG2-B對應於厄瑞努單抗的不同二硫化物同功型。不同二硫化物同功型的結構示意性地顯示在圖15A-15C中。

【0029】 [圖14]說明了非還原的（頂部跡線）和還原的（底部跡線）厄瑞努單抗之Lys-C肽圖譜。使厄瑞努單抗原料藥變性並用內切蛋白酶Lys-C消化。還原圖中經標記的峰鑒定存在於還原的Lys-C肽圖中但在非還原的Lys-C肽圖中不存在的肽。對於每種經標記的肽的描述列於表18和19中。

【0030】 [圖15A]係由非還原和還原的Lys-C肽圖譜鑒定的厄瑞努單抗二硫化物同功型IgG2-A結構之圖解。

【0031】 [圖15B]係由非還原和還原的Lys-C肽圖譜鑒定的厄瑞努單抗二硫化物同功型IgG2-A/B結構之圖解。

【0032】 [圖15C]係由非還原和還原的Lys-C肽圖譜鑒定的厄瑞努單抗二硫化物同功型IgG2-B結構之圖解。

【0033】 [圖16A]係以擴展比例的厄瑞努單抗原料藥之非還原RP-HPLC圖譜。藉由RP-HPLC，使用Waters BEH300 C4柱（1.7 μ m粒度，2.1 mm x 50 mm）並且使用含有0.1% TFA的流動相和1-丙醇的梯度在75°C下進行洗脫在215 nm下檢測來分析厄瑞努單抗原料藥。IgG2-A、IgG2-A/B和IgG2-B對應於厄瑞努單抗的不同二硫化物同功型。不同二硫化物同功型的結構示意性地顯示在圖

15A-15C中。

【0034】 [圖16B]係相對於厄瑞努單抗原料藥，富集二硫化物同功型變體的 CEX-HPLC 級分的 RP-HPLC 圖譜之疊加。藉由 RP-HPLC，使用 Waters BEH300 C4柱（1.7 μm 粒度，2.1 mm x 50 mm）並且使用含有0.1% TFA的流動相和1-丙醇的梯度在75°C下進行洗脫在215 nm下檢測來分析厄瑞努單抗原料藥和CEX-HPLC級分。

【0035】 [圖17A和17B]描繪了按全比例（圖17A）和擴展比例（圖17B）表示的厄瑞努單抗原料藥之代表性SE-UHPLC圖譜。藉由SE-UHPLC，使用100 mM磷酸鈉、250 mM氯化鈉、pH 6.8流動相並在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥。緩衝峰用星號（*）表示。

【0036】 [圖18]顯示SE-UHPLC收集的級分和藉由SE-UHPLC分析的厄瑞努單抗原料藥之疊加。藉由SE-UHPLC，使用100 mM磷酸鈉、250 mM氯化鈉、pH 6.8流動相並在280 nm處檢測吸光度來分析厄瑞努單抗原料藥和從半製備型SE-HPLC收集的級分。每個小圖係針對厄瑞努單抗原料藥在SE-UHPLC圖譜上疊加的每種級分的280 nm處的吸光度對以分鐘表示的洗脫時間的圖。將全部三種SE-UHPLC級分與厄瑞努單抗原料藥的疊加示出在小圖4中。

【0037】 [圖19]係以擴展比例表示的SE-UHPLC收集的級分和厄瑞努單抗原料藥之rCE-SDS圖譜。使厄瑞努單抗原料藥（DS）和SE-UHPLC級分（主級分、HMW1、HMW2）變性並還原，然後在25°C下電動注入用SDS膠緩衝液填充的裸熔融二氧化矽毛細管中。在220 nm處監測吸光度。系統峰用星號（*）表示。LMW = 低分子量種類；MMW = 中等分子量種類；HMW = 高分子量種類；LC = 輕鏈；HC = 重鏈；NGHC = 非糖基化的重鏈；post-HC = 後重鏈。

【0038】 [圖20]係暴露於熱緊迫的厄瑞努單抗原料藥之SE-UHPLC圖譜。

藉由SE-UHPLC，使用100 mM磷酸鈉、250 mM氯化鈉、pH 6.8流動相來分析在50°C下孵育長達14天的厄瑞努單抗原料藥，並在280 nm處檢測吸光度。頂部跡線對應於第14天時間點。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0039】 本申請要求2018年4月2日提交的美國臨時申請案號62/651,651之權益，將其通過引用以其全部內容併入本文。

電子提交的文字檔的說明

【0040】 本申請包含已經以ASCII格式電子提交之序列表，並且特此將其藉由引用以其全文結合。2019年3月1日創建的序列表之電腦可讀格式副本命名為A-2190-WO-PCT_SeqList_ST25，並且大小為15千位元組。

【0041】 本發明涉及對表現出降低的功能活性的厄瑞努單抗的變體進行鑒定和表徵。特別地，具有某些結構修飾的厄瑞努單抗的變體在阻斷由CGRP配位基引起的CGRP受體激活方面比厄瑞努單抗弱得多。在本文中詳細描述的此類變體包括異構化變體、脫醯胺變體、二硫化物同功型變體、酸性變體、和HMW種類。藉由限制厄瑞努單抗原料藥和厄瑞努單抗藥物產品中該等變體的量，厄瑞努單抗組成物的總體效力可以維持或與臨床試驗中採用的厄瑞努單抗組成物匹配，並觀察到具有臨床效力。因此，本發明提供了包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體之組成物，其中該組成物中厄瑞努單抗變體的量被控制在如本文所述的具體範圍或限制內。

【0042】 術語厄瑞努單抗係指IgG2抗體，該抗體包含SEQ ID NO: 5的重

鏈可變區序列和SEQ ID NO: 6的輕鏈可變區序列。在一個實施方式中，厄瑞努單抗包含含有SEQ ID NO: 1的序列的重鏈和含有SEQ ID NO: 2的序列的輕鏈。在這樣的實施方式中，厄瑞努單抗係包含兩條重鏈和兩條輕鏈的抗體，其中每條重鏈包含SEQ ID NO: 1的序列，並且每條輕鏈包含SEQ ID NO: 2的序列。當重組產生時，厄瑞努單抗可以在重鏈和輕鏈的末端經歷一般的翻譯後修飾，例如從重鏈去除位置456處的C-末端賴胺酸殘基並且以及輕鏈和重鏈中的N-末端麩醯胺酸殘基環化為焦麩胺酸。因此，術語厄瑞努單抗還可以指IgG2抗體，該抗體在一條或兩條重鏈中缺少C-末端賴胺酸殘基和/或在一條或兩條輕鏈和/或一條或兩條重鏈中包含焦麩胺酸殘基代替麩醯胺酸殘基作為N-末端殘基。例如，在一些實施方式中，厄瑞努單抗係包含兩條重鏈和兩條輕鏈的抗體，其中每條重鏈包含SEQ ID NO: 3的序列，並且每條輕鏈包含SEQ ID NO: 4的序列。在其他實施方式中，厄瑞努單抗係包含兩條重鏈和兩條輕鏈的抗體，其中每條重鏈包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3的序列，並且每條輕鏈包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4的序列。

【0043】 在某些實施方式中，在本發明的組成物中存在的厄瑞努單抗變體係電荷變體。電荷變體係指具有不同電荷特徵的厄瑞努單抗的變體，該電荷特徵尤其是由直接改變抗體的淨電荷，誘導構象變化或影響局部電荷分佈的翻譯後修飾引起的。此類翻譯後修飾可以包括去醯胺化（deamidation）、異構化、糖基化、氧化、和唾液酸化的糖基化。可以將電荷變體與厄瑞努單抗分離，並且使用離子交換層析、反相層析、或疏水性相互作用層析進行檢測。厄瑞努單抗的電荷變體可以包括，但不限於異構化變體、脫醯胺變體、二硫化物同功型變體、酸性變體、和糖基化變體。

【0044】 在一些實施方式中，厄瑞努單抗的電荷變體係異構化變體。厄

瑞努單抗的異構化變體係指其中在重鏈多肽或輕鏈多肽中的一個或多個天冬胺酸殘基轉變為異天冬胺酸或琥珀醯亞胺的厄瑞努單抗的變體。在一個實施方式中，厄瑞努單抗的異構化變體在厄瑞努單抗的一條或兩條重鏈（SEQ ID NO: 1 或SEQ ID NO: 3）中的胺基酸位置105處具有異天冬胺酸殘基或琥珀醯亞胺。如實例1中的描述，重鏈可變區的CDR3中位置105處的天冬胺酸殘基轉變為異天冬胺酸顯著降低厄瑞努單抗的抑制效力。

【0045】 在其他實施方式中，厄瑞努單抗的電荷變體係脫醯胺變體。厄瑞努單抗的脫醯胺變體係指其中重鏈多肽或輕鏈多肽中一個或多個天冬醯胺殘基轉變為天冬胺酸的厄瑞努單抗的變體，該天冬胺酸反過來可以轉變為琥珀醯亞胺或異天冬胺酸。在一個實施方式中，該脫醯胺變體在厄瑞努單抗的其中一條或兩條重鏈（SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3）中的胺基酸位置102處具有的天冬醯胺殘基轉變為天冬胺酸、琥珀醯亞胺、或異天冬胺酸。如實例1中的描述，重鏈可變區的CDR3中位置102處的天冬醯胺殘基的脫醯胺作用顯著降低了厄瑞努單抗的抑制效力。在另一個實施方式中，該脫醯胺變體在厄瑞努單抗的其中一條或兩條重鏈中的胺基酸位置393和/或398處具有的天冬醯胺殘基轉變為天冬胺酸、琥珀醯亞胺、或異天冬胺酸。

【0046】 測定和定量厄瑞努單抗的異構化變體和脫醯胺變體之方法包括疏水性相互作用層析，例如在實例1中描述的疏水性相互作用層析-高效液相層析（HIC-HPLC）方法；肽作圖，例如在實例1中描述的ESI-MS/MS肽作圖方法；離子交換層析，例如在實例3中描述的陽離子交換高效液相層析（CEX-HPLC）方法；反相高效液相層析（RP-HPLC），以及對於熟悉該項技術者已知的其他方法，例如在以下文獻中描述的那些：Kameoka 等人, Journal of Biochemistry [生物化學雜誌], 第134卷: 129-135, 2003；Zhang 等人, Journal of

Pharmaceutical and Biomedical Analysis [藥物與生物醫學分析雜誌], 第30卷: 1479-1490, 2003 ; Yang 等人, Electrophoresis [電泳], 第31卷: 1764-1772, 2010 ; Faseri 等人, Journal of Chromatography A [層析A雜誌], 第1498卷: 215-223, 2017 ; 和Leblanc 等人, Journal of Chromatography B [層析B雜誌], 第1048卷: 130-139, 2017中。

【0047】本發明的組成物包含受控量的厄瑞努單抗的異構化變體和脫醯胺變體，使得厄瑞努單抗組成物的總體效力維持在觀察到具有臨床效力的水平。參見實例1和2。例如，在某些實施方式中，本發明提供了包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的組成物，其中該一種或多種厄瑞努單抗變體包括異構化變體和脫醯胺變體，並且其中該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量少於約30%。該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量可以少於約25%、少於約20%、少於約17%、少於約15%、少於約12%、少於約10%、少於約8%、少於約6%、或少於約4%。在一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量少於約15%。在另一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量少於約8%。在又另一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量少於約4%。在一些實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量可以是從約0.5%至約30%、從約1%至約20%、從約1%至約17%、從約1%至約15%、從約1%至約12%、從約1%至約10%、從約0.5%至約8%、從約0.5%至約6%、從約1%至約4%、從約0.5%至約3.5%、從約1.5%至約2.5%、或從約1.7%至約2.1%。在一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約1%至約10%。在另一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約1%至約4%。在又另一個實施方式中，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約0.5%至約3.5%。

【0048】 可以藉由上述用於檢測和定量該等變體的任何方法來確定本發明的組成物中的厄瑞努單抗異構化變體和脫醯胺變體的量。在某些實施方式中，藉由HIC-HPLC測定該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量。該等異構化變體（例如，重鏈中Asp105的異構化）和脫醯胺變體（例如，重鏈中Asn102的脫醯胺）係HIC-HPLC的前峰級分中的優勢種類。參見實例1和2。因此，可以由HIC-HPLC層析圖中前峰的峰面積百分比確定厄瑞努單抗組成物中該等變體的量。HIC-HPLC層析圖中的前峰係指峰高高於檢測限的峰，該峰具有的保留時間短於主峰的保留時間，該主峰通常是層析圖中具有最大峰高的峰。參見圖2A、2B、5、7、和8。該主峰對應於厄瑞努單抗（例如，包含具有SEQ ID NO: 1或3的序列的兩條重鏈以及具有SEQ ID NO: 2或4的序列的兩條輕鏈的抗體），該厄瑞努單抗係組成物中抗體分子的主要形式。根據以下公式可以計算

前峰的峰面積百分比：
$$\% \text{前峰} = \frac{\text{前峰面積}}{\text{總積分的峰面積}} \times 100$$
，其中總積分的峰面積係層析圖中具有高於檢測限的峰高的所有峰的經合併的面積。類似地，可以根據以下公式計算主峰的峰面積百分比：

$$\% \text{主峰} = \frac{\text{主峰面積}}{\text{總積分的峰面積}} \times 100$$
，其中總積分的峰面積係層析圖中具有高於檢測限的峰高的所有峰的經合併的面積。在一些實施方式中，如實例1中所述進行HIC-HPLC方法。

【0049】 在某些實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，本發明的組成物中異構化變體（例如，重鏈中Asp105的異構化）和脫醯胺變體（例如，重鏈中Asn102的脫醯胺）的量係約15%或更少。在一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約10%或更少。在另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組

成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約8%或更少。在另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約6%或更少。在又另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約4%或更少。在仍另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約3.2%或更少。在另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約2.7%或更少。在一些實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約1%至約10%。在其他實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約1%至約4%。在仍其他的實施方式中，如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係從約0.5%至約3.5%。

【0050】 在一些實施方式中，本發明的組成物包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體，其中該等厄瑞努單抗變體包含異構化變體和脫醯胺變體，並且其中：

(i) 如藉由HIC-HPLC中主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約90%或更多、約92%或更多、約93.9%或更多、約94.4%或更多、約96.2%或更多、約96.8%或更多、或約97.3%或更多；以及

(ii) 如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約10%或更少、約8%或更少、約6.1%或更少、約5.6%或更少、約3.8%或更少、約3.2%或更少、或約2.7%或更少。

【0051】 在一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約92%或更多，並且如藉由HIC-HPLC中前峰所測量

的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約8%或更少。在另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約96.8%或更多，並且如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約3.2%或更少。在又另一個實施方式中，如藉由HIC-HPLC中主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約97.3%或更多，並且如藉由HIC-HPLC中前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約2.7%或更少。在該等和其他實施方式中，如實例1所述進行HIC-HPLC，並且由主峰和前峰的峰面積百分比確定量。

【0052】如實例2所述，在重鏈CDR3中Asp105的異構化對模擬熱緊迫條件高度敏感，並且當暴露於升高的pH（例如，pH 7.4或更高）時重鏈CDR3（Asn102）和Fc區（Asn393和Asn398）中的脫醯胺化都增加。因此，藉由限制厄瑞努單抗組成物的暴露於高於室溫的溫度和鹼性溶液（例如，pH大於7.0的溶液）的時間，可以在製造過程和儲存過程中控制厄瑞努單抗的異構化和脫醯胺變體的產生。例如，在一些實施方式中，將過程池保持或將厄瑞努單抗組成物的儲存物在室溫下保持不超過14天。在其他實施方式中，在低於15°C，例如在2°C至8°C之間的溫度下進行厄瑞努單抗組成物的長期儲存。還可以藉由純化過程，例如疏水性相互作用層析或離子交換層析，從厄瑞努單抗組成物中去除厄瑞努單抗的異構化變體和脫醯胺變體。厄瑞努單抗的異構化和脫醯胺變體兩者在HIC中比厄瑞努單抗更早洗脫，並因此可以藉由收集和丟棄該等早期洗脫的級分從厄瑞努單抗組成物中去除該等變體。厄瑞努單抗的脫醯胺變體通常比厄瑞努單抗具有更多的負電荷，並且因此，在陽離子交換層析中比厄瑞努單抗更早洗脫，或在陰離子交換層析中將比厄瑞努單抗洗脫更晚。因此，藉由適當地定時收集從陽離子交換樹脂或陰離子交換樹脂中洗脫的級分，可以從厄瑞努

單抗組成物中去除更酸性的脫醯胺變體。

【0053】 在某些實施方式中，本發明組成物中厄瑞努單抗的電荷變體係酸性變體。酸性變體係指已經獲得負電荷或失去正電荷的厄瑞努單抗的變體，或由於構象變化而具有改變的表面電荷特徵，因此相對於厄瑞努單抗具有更多的酸性特徵。與厄瑞努單抗相比，厄瑞努單抗的酸性變體展示出降低的抑制效力。參見實例3和表14。使用基於電荷特徵分離蛋白質的任何方法，例如等電點聚焦電泳、毛細管等電點聚焦電泳、陽離子交換層析（CEX）和離子交換層析（AEX）可以將酸性變體與厄瑞努單抗分離、檢測和定量。當藉由離子交換層析分析時，可以藉由酸性變體相對於主峰的保留時間來鑒定酸性變體，該主峰對應於厄瑞努單抗。例如，酸性變體比CEX的主峰更早洗脫 - 即，酸性變體的保留時間比CEX中主峰的保留時間更短。當使用AEX時，酸性變體比主峰更晚洗脫，並因此具有比AEX中主峰的保留時間更長的保留時間。

【0054】 在一些實施方式中，本發明提供了包含受控量的厄瑞努單抗酸性變體的組成物，使得該厄瑞努單抗組成物的總效力維持在觀察到具有臨床效力的水平。參見實例3。因此，在某些實施方式中，本發明提供了包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗酸性變體的組成物，其中該組成物中酸性變體的量少於約40%。該組成物中酸性變體的量可以是少於約38%、少於約37%、少於約36%、少於約35%、少於約34%、少於約33%、少於約32%、少於約31%、少於約30%、少於約29%、少於約28%、少於約27%、或少於約26%。在一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量少於約38%。在另一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量少於約35%。在又另一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量少於約32%。在又另一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量少於約30%。在一些實施方式中，該組成物中酸性變體的量可以從約20%至約40%、

從約25%至約38%、從約24%至約35%、從約28.5%至約37.5%、從約26%至約34%、從約28%至約32%、從約32.5%至約37.5%、從約28.7%至約31.3%、或從約26.5%至約33.6%。在一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量係從約25%至約38%。在另一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量係從約26%至約34%。在又另一個實施方式中，該組成物中酸性變體的量係從約28%至約32%。

【0055】 可以藉由上述用於檢測和定量該等變體的任何方法來確定本發明之組成物中厄瑞努單抗酸性變體的量。在某些實施方式中，藉由離子交換層析測定該組成物中酸性變體的量。在一個具體的實施方式中，藉由CEX-HPLC，例如實例3中所述的方法測定該組成物中酸性變體的量。當藉由CEX分離時，厄瑞努單抗的酸性變體比厄瑞努單抗（主峰）洗脫更早，並且厄瑞努單抗的鹼性變體比厄瑞努單抗（主峰）洗脫更晚。參見圖11。根據CEX-HPLC層析中酸性峰的峰面積百分比可以測定厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量。酸性峰係具有峰高高於檢測限的那些峰，該等峰具有比主峰的保留時間更短的保留時間。鹼性峰係具有峰高高於檢測限的那些峰，該等峰具有比主峰的保留時間更長的保留時間。所需組分（例如，酸性峰、主峰、或鹼性峰）的峰面積百分比可藉由將所需組分（例如，酸性峰、主峰或鹼性峰）的峰面積除以總積分峰面積並將結果乘以100來計算。在某些實施方式中，如實例3中所述進行CEX-HPLC方法。

【0056】 在一些實施方式中，本發明的組成物包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體，其中該等厄瑞努單抗變體包括酸性變體，並且如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變體的量係約40%或更少、約38%或更少、約36%或更少、約35%或更少、約34%或更少、或約32%或更少。在一個實施方式中，如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變

體的量係從約25%至約38%。在另一個實施方式中，如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約26%至約34%。在又另一個實施方式中，如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約26.5%至約33.6%。在仍另一個實施方式中，如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約28.7%至約31.3%。在另一個實施方式中，如藉由CEX-HPLC中酸性峰所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約32.5%至約37.5%。在該等和其他實施方式中，如實例3所述進行CEX-HPLC，並且由酸性峰的峰面積百分比確定酸性變體的量。

【0057】 該等酸性變體可以包括二硫化物同功型變體、脫醯胺變體、片段化變體、非共有糖基化變體、高分子量（HMW）種類、及其組合。在某些實施方式中，該等酸性變體包括二硫化物同功型變體（本文中更詳細的描述）、片段化變體、或其組合。如實例3所述，與厄瑞努單抗相比，富集片段化變體或二硫化物同功型變體（特別是IgG2-B二硫化物同功型）的酸性級分展示出降低的效力。

【0058】 在一些實施方式中，該等酸性變體包括片段化變體。片段化變體可以藉由水解肽鍵形成，導致輕鏈多肽和/或重鏈多肽的切割。因此，厄瑞努單抗的片段化變體係指由比全長鏈更少的胺基酸組成的厄瑞努單抗輕鏈（SEQ ID NO: 2或4）的片段或厄瑞努單抗重鏈（SEQ ID NO: 1或3）的片段。可以使用具有十二烷基硫酸鈉（rCE-SDS）的還原毛細管電泳，例如在實例3中所述的rCE-SDS方法測量片段化變體，該方法將該等片段化的變體解析為低分子量（LMW）和中等分子量（MMW）種類。厄瑞努單抗的LMW種類係具有分子量低於完整厄瑞努單抗輕鏈的分子量的片段，該完整厄瑞努單抗輕鏈具有約22,790 Da的分子量。厄瑞努單抗的MMW種類係具有分子量高於完整厄瑞努單

抗輕鏈的分子量但小於完整厄瑞努單抗重鏈的分子量的片段，該完整厄瑞努單抗重鏈具有約50,165 Da的分子量（去糖基化）。在用rCE-SDS分離後，厄瑞努單抗的LMW種類在厄瑞努單抗輕鏈峰之前遷移，並且厄瑞努單抗的MMW種類在厄瑞努單抗輕鏈峰和厄瑞努單抗重鏈峰之間遷移。參見，例如圖19。

【0059】 使用基於電荷特徵分離蛋白質的層析方法（例如離子交換層析、疏水性相互作用層析或混合式層析）可以降低厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量。參見，例如在美國專利案號8,946,395；9,067,990；9,249,218；和9,346,879中描述的方法。如上所述，在藉由陽離子交換層析分離後，厄瑞努單抗的酸性變體比厄瑞努單抗（主峰）更早洗脫。因此，可以在洗脫厄瑞努單抗主峰之前收集和丟棄酸性變體，或可以在洗脫酸性變體後開始收集厄瑞努單抗級分。當藉由陰離子交換層析分離時，厄瑞努單抗的酸性變體比厄瑞努單抗（主峰）洗脫更晚，並因此藉由在酸性變體洗脫之前停止收集厄瑞努單抗級分，可以減少或從厄瑞努單抗組成物中去除酸性變體。

【0060】 在某些實施方式中，該等酸性變體包括二硫化物同功型變體。基於鉸鏈區中二硫鍵的排列，IgG2抗體可展示出不同的結構同功型。在經典的二硫化物同功型（被稱為IgG2-A）中，Fab臂未藉由二硫鍵與鉸鏈區連接，並且一條重鏈中的鉸鏈區中的四個半胱胺酸殘基（例如，SEQ ID NO: 1或3的C232、C233、C236、和C239）各自與其他重鏈的鉸鏈區中對應於半胱胺酸殘基形成二硫鍵。參見圖15A。二硫化物同功型變體係指IgG2抗體的變體，該變體與經典IgG2-A同功型相比具有不同二硫鍵連線性。在一些實施方式中，該二硫化物同功型變體係IgG2-B同功型。在IgG2-B同功型結構中，兩個Fab臂藉由鉸鏈區中的一個或多個半胱胺酸殘基與重鏈恒定CH1區和/或輕鏈恒定CL區中的半胱胺酸殘基形成二硫鍵而與鉸鏈區連接。參見圖15C。例如，在一個實施

方式中，該IgG2-B同功型包含在第一重鏈（HC1）、第一輕鏈（LC1）、第二重鏈（HC2）、和第二輕鏈（LC2）之間的以下二硫鍵連線性，其中胺基酸位置相對於重鏈的SEQ ID NO: 1或3和輕鏈SEQ ID NO: 2或4：

- HC1的C232與HC2的C157
- HC1的C233與LC1的C215
- HC2的C232與HC1的C157
- HC2的C233與LC2的C215
- HC1的C236與HC2的C236
- HC1的C239與HC2的C239

【0061】 在其他實施方式中，該二硫化物同功型變體係IgG2-A/B同功型。在IgG2-A/B同功型結構中，僅一個Fab臂藉由鉸鏈區中的一個或多個半胱胺酸殘基與重鏈恒定CH1區和/或輕鏈恒定CL區中的半胱胺酸殘基形成二硫鍵而與鉸鏈區連接。參見圖15B。在一個實施方式中，該IgG2-A/B同功型包含在HC1、LC1、HC2、和LC2之間的以下二硫鍵連線性，其中胺基酸位置相對於重鏈的SEQ ID NO: 1或3和輕鏈的SEQ ID NO: 2或4：

- HC1的C232與HC2的C157
- HC2的C232與LC2的C215
- HC1的C233與HC2的C233
- HC1的C236與HC2的C236
- HC1的C239與HC2的C239

【0062】 本發明包括包含厄瑞努單抗和其一種或多種二硫化物同功型變體的組成物。該等二硫化物同功型變體可以包括IgG2-B同功型、IgG2-A/B同功型、或這兩種的組合。在一些實施方式中，該組成物包含厄瑞努單抗和其一種

或多種二硫化物同功型變體，其中該一種或多種二硫化物同功型變體包括IgG2-B同功型，並且其中該組成物中IgG2-B同功型的量少於約20%。該組成物中IgG2-B同功型的量可以是少於約18%、少於約16%、少於約14%、少於約12%、少於約10%、少於約9%、少於約8%、少於約7%、或少於約6%。在一個實施方式中，該組成物中IgG2-B同功型的量少於約10%。在另一個實施方式中，該組成物中IgG2-B同功型的量少於約8%。在某些實施方式中，該組成物中IgG2-B同功型的量可以是從約0.5%至約20%、從約1%至約16%、從約3%至約12%、從約0.5%至約8%、從約1%至約6%、從約4%至約6%、從約4.4%至約5.9%、或從約4.6%至約5.2%。在一個實施方式中，該組成物中IgG2-B同功型的量係從約0.5%至約8%。在另一個實施方式中，該組成物中IgG2-B同功型的量係從約4%至約6%。

【0063】 在某些實施方式中，本發明的該等組成物包含厄瑞努單抗和其一種或多種二硫化物同功型變體，其中該一種或多種二硫化物同功型變體包括IgG2-A/B同功型。該組成物中IgG2-A/B同功型的量可以是從約10%至約56%、從約20%至約40%、從約26%至約38%、從約27%至約32%、從約32%至約38%、從約34%至約37%、或從約34.2%至約35.5%。在一個實施方式中，該組成物中IgG2-A/B同功型的量係從約32%至約38%。在另一個實施方式中，該組成物中IgG2-A/B同功型的量係從約34%至約37%。

【0064】 在一些實施方式中，本發明的該等組成物包含厄瑞努單抗IgG2-A同功型、厄瑞努單抗IgG2-A/B同功型、和厄瑞努單抗IgG2-B同功型，其中：

(i) 該組成物中IgG2-A同功型的量係從約50%至約70%、從約52%至約66%、從約56%至約60%、或從約57.4%至約59.3%；

(ii) 該組成物中IgG2-A/B同功型的量係從約26%至約38%、從約32%至約

38%、從約34%至約37%、或從約34.2%至35.5%；以及

(iii) 該組成物中IgG2-B同功型的量係從約3%至約12%、從約1%至約10%、從約4%至約8%、或從約4.6%至約5.2%。

【0065】 檢測和定量硫化物同功型的方法包括非還原反相高效液相層析（RP-HPLC），例如在實例3和4中，和在Wypych等人, *Journal of Biological Chemistry* [生物化學雜誌], 第283卷(23):16194-16205, 2008所述的RP-HPLC方法；肽作圖，例如在實例4中所述的Lys-C肽作圖方法；和基於質譜法的方法，例如在Zhang等人, *Anal Chem.* [分析化學], 第82卷(3):1090-1099, 2010和Zhang等人, *Biochemistry* [生物化學], 第54卷: 1956-1962, 2015中描述的那些。在某些實施方式中，在本發明的組成物中二硫化物同功型（例如，IgG2-A、IgG2-A/B、和IgG2-B）的量藉由非還原RP-HPLC，視情況藉由使用RP-HPLC圖譜上針對每種同功型的峰面積百分比來確定（參見，例如圖16A）。

【0066】 使用在Dillon等人, *Journal of Biological Chemistry* [生物化學雜誌], 第283卷(23):16206-16215, 2008, PCT公開案號WO 2006/047340、或PCT公開案號WO 2006/060083（所有該等文獻藉由引用併入本文中）中描述的方法，藉由將包含不同同功型的組成物暴露於單獨的還原-氧化（氧化還原）劑或與離液劑的組合，可以改變二硫化物同功型的比例。例如，藉由將包含不同同功型的組成物暴露於氧化還原劑（例如，半胱胺酸/胱胺酸或麩胱甘肽/氧化型麩胱甘肽）和離液（chaotropic）劑（例如，鹽酸胍），可以增加IgG2-A同功型的比例。因此，在一些實施方式中，藉由將組成物暴露於氧化還原劑與離液劑的組合中，視情況根據在Dillon等人, 2008；WO 2006/047340；或WO 2006/060083中所述的方法可以從組成物中減少或消除厄瑞努單抗的IgG2-B同功型的量，該IgG2-B同功型與IgG2-A/B和IgG2-A同功型相比效力顯著更低。

【0067】在某些實施方式中，本發明的組成物中存在的厄瑞努單抗變體係尺寸變體。厄瑞努單抗的尺寸變體係指具有比厄瑞努單抗單體更低分子量或具有比厄瑞努單抗單體更高分子量的變體。如本文使用的，術語厄瑞努單抗單體係指包含兩條重鏈和兩條輕鏈的完整抗體，並且當測量沒有N-或C-末端修飾的去糖基化的重鏈和輕鏈時，該單體具有約146,194 Da的分子量。尺寸變體包括片段化變體，例如以上所述的LMW種類和MMW種類，以及高分子量（HMW）種類。厄瑞努單抗的HMW種類係指具有高於厄瑞努單抗單體的分子量的種類。HMW種類可以包括藉由共價和非共價自締合形成的厄瑞努單抗的二聚體、多聚體和其他聚集形式。在一些實施方式中，厄瑞努單抗的HMW種類包含共價連接的厄瑞努單抗的二聚體（即，兩個共價連接的厄瑞努單抗單體）。在某些實施方式中，在還原和變性條件下，共價連接的厄瑞努單抗二聚體係可還原性二聚體，其中該二聚體還原為單獨的重鏈和輕鏈。

【0068】檢測和定量厄瑞努單抗的尺寸變體的方法包括尺寸排阻層析，例如在實例5中所述的尺寸排阻超高效液相層析（SE-UHPLC）方法；在還原或非還原條件下進行的具有十二烷基硫酸鈉（CE-SDS）的毛細管電泳，例如在實例3中所述的rCE-SDS和nrCE-SDS方法；沈降速度超速離心法；和具有靜態光散射檢測的SE-HPLC來測定莫耳質量。

【0069】富集HMW種類的級分在抑制配位基誘導的CGRP受體激活方面效力更小。參見實例5和表26。因此，本發明提供了含有受控量的HMW種類的厄瑞努單抗組成物，使得厄瑞努單抗組成物的總效力維持在觀察到具有臨床效力的水平。在一些實施方式中，本發明的組成物包含厄瑞努單抗和厄瑞努單抗的HMW種類，其中該組成物中HMW種類的量少於約3.0%。該組成物中HMW種類的量可以是約2.5%或更少、約2.4%或更少、約2.3%或更少、約2.2%或更

少、約2.1%或更少、約2.0%或更少、約1.8%或更少、約1.6%或更少、約1.4%或更少、約1.2%或更少、約1.0%或更少、約0.8%或更少、約0.6%或更少、或約0.4%或更少。在一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係約1.8%或更少。在另一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係約1.4%或更少。在又另一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係約1.2%或更少。在仍另一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係約0.6%或更少。在一些實施方式中，該組成物中HMW種類的量可以是從約0.3%至約2.4%、從約0.4%至約1.2%、從約0.6%至約2.1%、從約0.3%至約1.8%、從約1.0%至約1.6%、或從約0.6%至約1.4%。在一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係從約0.4%至約1.2%。在另一個實施方式中，該組成物中HMW種類的量係從約0.6%至約2.1%。

【0070】可以藉由上述用於檢測和定量該等變體的任何方法來確定本發明的組成物中尺寸變體的量。在某些實施方式中，藉由SE-UHPLC確定尺寸變體（例如，HMW種類）的量。在SE-UHPLC中厄瑞努單抗的HMW種模擬厄瑞努單抗單體（主峰）洗脫更早，並因此對應於SE-UHPLC層析圖中的前峰，然而LMW和MMW種模擬厄瑞努單抗單體洗脫更晚，並因此對應於SE-UHPLC層析圖中的後峰。參見實例5和圖17A和17B。因此，由SE-UHPLC層析圖中前峰（HMW種類）或後峰（LMW和MMW種類）的峰面積百分比可以確定厄瑞努單抗組成物中該等尺寸變體的量。在一些實施方式中，如實例5所述進行SE-UHPLC方法。

【0071】在某些實施方式中，本發明的組成物包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗尺寸變體，其中該等厄瑞努單抗尺寸變體包含厄瑞努單抗的HMW種類，並且其中：

(i) 如藉由SE-UHPLC中的主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約97.5%或更多、約97.9%或更多、約98.2%或更多、約98.4%或更多、約98.6%或更多、約98.8%或更多、約99.2%或更多、或約99.4%或更多；以及

(ii) 如藉由SE-UHPLC的前峰所測量的，該組成物中HMW種類的量係約2.5%或更少、約2.1%或更少、約1.8%或更少、約1.6%或更少、約1.4%或更少、約1.2%或更少、約0.8%或更少、或約0.6%或更少。

【0072】 在一個實施方式中，如藉由SE-UHPLC中的主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約97.9%或更多，並且如藉由SE-UHPLC中的前峰所測量的，該組成物中HMW種類的量係約2.1%或更少。在另一個實施方式中，如藉由SE-UHPLC中的主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約98.2%或更多，並且如藉由SE-UHPLC中的前峰所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.8%或更少。在又另一個實施方式中，如藉由SE-UHPLC中的主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約98.8%或更多，並且如藉由SE-UHPLC中的前峰所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.2%或更少。在仍另一個實施方式中，如藉由SE-UHPLC中的主峰所測量的，該組成物中厄瑞努單抗的量係約98.6%或更多，並且如藉由SE-UHPLC中的前峰所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.4%或更少。在該等和其他實施方式中，如實例5所述進行SE-UHPLC，並由主峰和前峰的峰面積百分比確進行定量。

【0073】 使用基於尺寸或流體力學體積分離蛋白質的方法（例如，尺寸排阻層析和過濾步驟）可以減少厄瑞努單抗組成物中尺寸變體（例如，HMW種類）的量。另外，親和層析（例如，蛋白質A層析）、陽離子交換層析、疏水性相互作用層析、和混合式層析也可以有效減少HMW種類。參見，例如在Shukla等人, Journal of Chromatography B [層析B雜誌], 第848卷: 28-39, 2007；

Chen 等人, Journal of Chromatography A [層析A雜誌], 第1217卷: 216-224, 2010 ; 美國專利案號6,620,918 ; 9,505,803 ; 以及9,783,570中所述的方法。如上所述, 藉由尺寸排阻層析分離後, 厄瑞努單抗的HMW種模擬厄瑞努單抗(主峰)洗脫更早。因此, 可以在洗脫厄瑞努單抗主峰之前收集和丟棄HMW種類, 或可以在洗脫HMW種類後開始收集厄瑞努單抗級分。

【0074】 可以分析本發明的厄瑞努單抗組成物的本文所述的一種或多種厄瑞努單抗變體。例如, 在一些實施方式中, 本發明包括包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的組成物, 其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合, 並且其中該等組成物具有該等變體中的每一種的受控量。在一個實施方式中, 該組成物包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體, 其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合, 並且其中該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部: (a) 如藉由CEX-HPLC所測量的, 該組成物中酸性變體的量係從約25%至約38%; (b) 如藉由SE-UHPLC所測量的, 該組成物中HMW種類的量係約2.1%或更少; 並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的, 該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約8.0%或更少。在另一個實施方式中, 該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部: (a) 如藉由CEX-HPLC所測量的, 該組成物中酸性變體的量少於約38%; (b) 如藉由SE-UHPLC所測量的, 該組成物中HMW種類的量係約2.5%或更少; 並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的, 該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約10%或更少。在另一個實施方式中, 該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部: (a) 如藉由CEX-HPLC所測量的, 該組成物中酸性變體的量係從約32.5%至約37.5%; (b) 如藉由SE-UHPLC所測量的, 該組成物中HMW種類的量係約1.8%或更少; 並且

(c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約6.1%或更少。在又另一個實施方式中，該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部：(a) 如藉由CEX-HPLC所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約26.5%至約33.6%；(b) 如藉由SE-UHPLC所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.2%或更少；並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約3.2%或更少。在仍另一個實施方式中，該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部：(a) 如藉由CEX-HPLC所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約26.5%至約33.6%；(b) 如藉由SE-UHPLC所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.2%或更少；並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約2.7%或更少。在另一個實施方式中，該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部：(a) 如藉由CEX-HPLC所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約26.5%至約33.6%；(b) 如藉由SE-UHPLC所測量的，該組成物中HMW種類的量係約1.4%或更少；並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約3.2%或更少。在另一個實施方式中，該組成物具有以下特徵中的一種或多種或全部：(a) 如藉由CEX-HPLC所測量的，該組成物中酸性變體的量係從約28.7%至約31.3%；(b) 如藉由SE-UHPLC所測量的，該組成物中HMW種類的量係約0.6%或更少；並且 (c) 如藉由HIC-HPLC中的前峰所測量的，該組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量係約2.1%或更少。

【0075】 可以藉由在宿主細胞中重組表現編碼重鏈和輕鏈的核酸，部分純化或純化來自宿主細胞培養物或宿主細胞裂解物的厄瑞努單抗來製備本發明的厄瑞努單抗組成物，並根據下文詳細描述的方法，針對在本文中詳細描述的一種或多種厄瑞努單抗變體分析所得組成物。

【0076】對於厄瑞努單抗的重組產生，將編碼重鏈（例如，包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列的重鏈多肽）和輕鏈（例如，包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列的輕鏈多肽）的一個或多個核酸插入一個或多個表現載體中。可以將編碼重鏈的核酸和編碼輕鏈的核酸插入單個表現載體中或可以將它們插入分開的表現載體中。如本文使用的術語“表現載體”或“表現構建體”係指含有所需編碼序列和用於在特定宿主細胞中表現可操作連接的編碼序列所必需的適合的核酸控制序列的重組DNA分子。表現載體可包括影響或控制轉錄、翻譯以及如果存在內含子則影響與其可操作連接的編碼區的RNA剪接的序列。用於在原核生物中表現所必需的核酸序列包括啟動子，視情況操縱序列、核糖體結合位點和可能的其他序列。已知真核細胞利用啟動子、增強子、和終止子以及多腺苷酸化訊號。分泌訊息肽序列還可以視情況由表現載體編碼，與目的編碼序列可操作地連接，使得表現的多肽可以由重組宿主細胞分泌，如果需要，以便更容易地從細胞中分離目的多肽。載體還可以包括一個或多個選擇性標記基因以促進向其中引入載體的宿主細胞的選擇。將編碼厄瑞努單抗的重鏈和輕鏈的示例性核酸以及合適的訊息肽序列和用於重組表現厄瑞努單抗的表現載體的其他組分描述於PCT公開案號WO 2010/075238中，其藉由引用以其全文併入本文中。

【0077】在表現載體已經被構建並且編碼厄瑞努單抗的重鏈和輕鏈組分的一個或多個核酸分子已經被插入一個或多個載體的一個或多個合適的位點後，可以將完成的一個或多個載體插入適合的宿主細胞中以進行擴增和/或多肽表現。可以藉由以下熟知的方法完成將厄瑞努單抗的表現載體轉化到所選的宿主細胞中，該等方法包括：轉染、感染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、顯微注射、脂質轉染、DEAE-葡聚糖介導的轉染或其他已知的技術。所選擇的方法將與待使用的宿主細胞類型的部分有關。該等方法和其他適合的方法對於熟練的技術

人員係熟知的，並列出，例如，在Sambrook, Fritsch和Maniatis (編), *Molecular Cloning ; A Laboratory Manual* [分子選殖：實驗室手冊], 第二版, 冷泉港，紐約 (Cold Spring Harbor, N.Y.) , (1989), Ausubel 等人 (編) *Current Protocols in Molecular Biology* [分子生物學現代方法], 格林出版聯合公司 (Greene Publishing Associates) (1989)中。

【0078】當在適當條件下培養時，宿主細胞合成厄瑞努單抗，該厄瑞努單抗隨後可從培養基（如果宿主細胞將其分泌到培養基中）中收集或直接從產生它的宿主細胞中收集（如果是未分泌的）。合適的宿主細胞的選擇將取決於各種因素，例如所需的表現水平、活性所需或必需的多肽修飾（例如糖基化或磷酸化）以及易於折疊成生物活性分子。

【0079】示例性宿主細胞包括原核生物細胞、酵母或高等真核細胞。原核宿主細胞包括真細菌，例如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物，例如腸桿菌科 (*Enterobacteriaceae*) 像埃希氏桿菌屬 (*Escherichia*)，例如大腸桿菌 (*E. coli*)、腸桿菌屬 (*Enterobacter*)、歐文氏菌屬 (*Erwinia*)、克雷白氏桿菌屬 (*Klebsiella*)、變形桿菌屬 (*Proteus*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌屬 (*Serratia*)，例如如黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志賀氏桿菌 (*Shigella*)、還有芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)，例如枯草桿菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*)、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)、和鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)。真核微生物（如絲狀真菌或酵母）係用於重組多肽的合適的選殖或表現宿主。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通麵包酵母係低等真核宿主微生物中最常用的。然而，許多其他屬、種和菌株在本文中通常可獲得且是有用的，例如畢赤酵母屬 (*Pichia*)（例如，畢赤酵母 (*P. pastoris*)）、粟酒裂殖酵母

(*Schizosaccharomyces pombe*) ; 克魯維酵母菌屬 (*Kluyveromyces*) 、亞羅酵母屬 (*Yarrowia*) ; 假絲酵母屬 (*Candida*) ; 裡氏木黴 (*Trichoderma reesia*) ; 粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*) ; 許旺酵母屬 (*Schwanniomyces*) , 例如許旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ; 和絲狀真菌, 例如像脈孢菌屬 (*Neurospora*) 、青黴屬 (*Penicillium*) 、彎頸黴屬 (*Tolypocladium*) 以及麴黴屬 (*Aspergillus*) 宿主 (例如, 構巢麴黴 (*A. nidulans*) 和黑麴黴 (*A. niger*)) 。

【0080】用於表現糖基化抗體的宿主細胞可以來源於多細胞生物。無脊椎動物細胞的實例包括植物和昆蟲細胞。已經鑒定了許多桿狀病毒株和變體以及來自以下宿主的相應的許可性昆蟲宿主細胞, 例如草地貪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛蟲), 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子), 白紋伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子), 黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) (果蠅) 和家蠶 (*Bombyx mori*) 。用於轉染此類細胞的多種病毒株係公開可獲得的, 例如, 苜蓿銀紋夜蛾 (*Autographa californica*) NPV的L-1變體和家蠶NPV的Bm-5株。

【0081】脊椎動物宿主細胞也可以是合適的宿主, 並且來自該等細胞的抗體的重組產生已成為常規程序。可用作表現的宿主的哺乳動物細胞系係本領域熟知的, 並且包括但不限於可從美國種質保存中心 (ATCC) 獲得的永生化細胞系, 包括但不限於中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞, 包括CHOK1細胞 (ATCC CCL61) 、DXB-11、DG-44和中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR (CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊]77: 4216, 1980) ; 由SV40轉化的猴腎CV1系 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; 人胚胎腎系 (293細胞或亞選殖用於在懸浮培養中生長) 的293細胞 (Graham等人, J. Gen Virol.[普通病毒學雜誌]36: 59, 1977) ; 幼倉鼠腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10) ; 小鼠塞托利細胞 (TM4,

Mather, Biol. Reprod.[生殖生物學]23: 243-251, 1980)；猴腎細胞(CV1、ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人肝癌細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人, Annals N.Y Acad. Sci. [紐約科學院年報]383: 44-68, 1982)；MRC 5細胞或FS4細胞；哺乳動物骨髓瘤細胞，以及許多其他的細胞系。在一些實施方式中，CHO細胞係用於表現厄瑞努單抗的較佳的宿主細胞。

【0082】用上述表現載體轉化或轉染宿主細胞以產生厄瑞努單抗，並在適當改進用於誘導啟動子、選擇轉化子、或擴增編碼所需序列的基因的常規營養培養基中培養。用於產生厄瑞努單抗的宿主細胞可以在多種培養基中培養。以下可商購的培養基適用於培養宿主細胞：Ham's F10（西格瑪公司（Sigma））、極限必需培養基（MEM，西格瑪公司）、RPMI-1640（西格瑪公司）和達爾伯克改良伊格爾培養基（DMEM，西格瑪公司）。另外，在Ham等人, Meth. Enz. [酶學方法]58: 44, 1979；Barnes等人, Anal. Biochem. [分析生物化學]102: 255, 1980；美國專利案號4,767,704；4,657,866；4,927,762；4,560,655；或5,122,469；WO 90/03430；或WO 87/00195中描述的任何培養基可以用作宿主細胞的培養基。任何該等培養基都可以根據需要補充激素和/或其他生長因子（如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子）；鹽（如氯化鈉、鈣、鎂和磷酸鹽）；緩衝液（如HEPES）；核苷酸（如腺苷和胸苷）；抗生素（如GentamycinTM藥物）；微量元素（被定義為通常以微莫耳範圍內的最終濃度存在的無機化合物），以及葡萄糖或等效能源。還可以按熟悉該項技術者已知的

適當濃度包含任何其他必需的補充劑。培養條件（例如溫度，pH等）係先前與選擇用於表現的宿主細胞一起使用的那些條件，並且對於普通技術人員將是顯而易見的。

【0083】 在培養宿主細胞後，抗體可以在細胞內、周質間隙中產生，或直接分泌到培養基中。如果抗體在細胞內產生，作為第一步，裂解宿主細胞（例如，藉由機械剪切、滲透性休克、或酶促方法），並且例如藉由離心、微濾或超濾去除例如顆粒碎片（例如，宿主細胞和裂解的片段）。如果抗體分泌到培養基中，可以藉由離心或微濾，並視情況隨後藉由超濾將抗體與宿主細胞分離。可以使用例如，一個或多個層析步驟，例如親和層析（例如，蛋白質A或蛋白質G親和層析）、陽離子交換層析、陰離子交換層析、羧基磷灰石層析、疏水性相互作用層析、或混合式層析將厄瑞努單抗進一步純化或部分純化。

【0084】 一旦產生或獲得厄瑞努單抗組成物，可以評估組成物中本文所述的一種或多種厄瑞努單抗變體（包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、和尺寸變體（例如，HMW種類））的存在和量。因此，本發明包括用於評估厄瑞努單抗組成物品質之方法，該方法包括獲得包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物；測量該組成物中一種或多種厄瑞努單抗變體之量；將該一種或多種厄瑞努單抗變體的所測量與預定參考標準進行比較；並且如果該比較表明滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。在一些實施方式中，該等方法包括以下中的一個、兩個、三個：(1) 測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量，(2) 測量該組成物中酸性變體之量，和/或 (3) 測量該組成物中HMW種類之量。在某些實施方式中，全部的三個測量對厄瑞努單抗組成物進行。

【0085】 每種厄瑞努單抗變體的預定參考標準可以是變體的閾值量或量

的範圍，該變體不顯著影響厄瑞努單抗組成物抑制配位基誘導的CGRP受體激活的效力。例如，每種厄瑞努單抗變體的預定參考標準可以是本文公開的針對每種變體的任何限制或範圍，因為具有變體的該等限制/範圍的厄瑞努單抗組成物具有與在臨床試驗中評估的厄瑞努單抗組成物相當的效力並顯示具有臨床效力。

【0086】 在該等方法的某些實施方式中，如果組成物中所測量的厄瑞努單抗變體的量滿足預定參考標準，則可以將該厄瑞努單抗組成物分類為可接受的並且進行到製造或分配過程中的下一步驟，例如像，藉由製備組成物的藥物配製物（例如，藉由與一種或多種賦形劑或稀釋劑組合）；藉由製備組成物的藥物產品（例如，藉由填充到小瓶、注射器、自動注射器、或其他容器或遞送裝置中）；將組成物與使用說明、稀釋劑和/或遞送裝置一起包裝；或商業銷售組成物或運送組成物給經銷商。在該等方法的一些實施方式中，如果組成物中厄瑞努單抗變體的所測量滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物。在該等方法的其他實施方式中，如果組成物中厄瑞努單抗變體的所測量滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物產品。下文更詳細地描述了製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物和藥物產品的方法。如果組成物中厄瑞努單抗變體的所測量不滿足預定參考標準，那麼，在該等方法的一些實施方式中，該厄瑞努單抗組成物可以被分類為不可接受並丟棄、破壞或經歷另外的製造步驟，例如，另外的純化以去除或減少組成物中的厄瑞努單抗變體的量，使得該量滿足預定參考標準。

【0087】 在一個實施方式中，用於評估厄瑞努單抗組成物品質之方法包括獲得包含厄瑞努單抗和厄瑞努單抗異構化變體和脫醯胺變體的厄瑞努單抗組成物；測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量；將異構化變體和脫醯胺

變體的所測量與預定參考標準進行比較；並且如果該比較表明滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準可以少於約30%，例如約25%或更少、約20%或更少、約17%或更少、約15%或更少、約12%或更少、約10%或更少、約8%或更少、約6%或更少、或約4%或更少。在一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約15%或更少。在另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約10%或更少。在另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約8%或更少。在又另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約6%或更少。在仍另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約4%或更少。在某些實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約3.2%或更少。在其他實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準係約2.7%或更少。在一些實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量的預定參考標準可以在例如，厄瑞努單抗組成物的從約1%至約10%、厄瑞努單抗組成物的從約1%至約4%、或厄瑞努單抗組成物的從約0.5%至約3.5%的量範圍內。在某些實施方式中，藉由HIC-HPLC，例如藉由HIC-HPLC中前峰的峰面積百分比測量厄瑞努單抗組成物中異構化變體和脫醯胺變體的量。在這樣的實施方式中，如實例1所述可以進行HIC-HPLC方法。

【0088】 在另一個實施方式中，用於評估厄瑞努單抗組成物品質之方法包括獲得包含厄瑞努單抗和厄瑞努單抗酸性變體的厄瑞努單抗組成物；測量組

成物中酸性變體的量；將酸性變體的所測量與預定參考標準進行比較；並且如果該比較表明滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準可以是少於約40%，例如約38%或更少、約37%或更少、約36%或更少、約35%或更少、約34%或更少、約33%或更少、約32%或更少、約31%或更少、約30%或更少、約29%或更少、約28%或更少、約27%或更少、或約26%或更少。在一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約38%或更少。在另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約35%或更少。在又另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約32%或更少。在仍另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約30%或更少。在一些實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係在例如厄瑞努單抗組成物的約25%至約38%、厄瑞努單抗組成物的約32.5%至約37.5%、厄瑞努單抗組成物的約26%至約34%、或厄瑞努單抗組成物的約26.5%至約33.6%的量的範圍內。在一個具體的實施方式，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約25%至約38%。在另一個具體的實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量的預定參考標準係約26.5%至約33.6%。在某些實施方式中，藉由CEX-HPLC（例如，藉由CEX-HPLC中酸性峰的峰面積百分比）測量厄瑞努單抗組成物中酸性變體的量。在這樣的實施方式中，可以如實例3所述進行CEX-HPLC方法。

【0089】 在另一個實施方式中，用於評估厄瑞努單抗組合種類量的方法包括獲得包含厄瑞努單抗和厄瑞努單抗的HMW種類的厄瑞努單抗組成物；測量該組成物中HMW種類之量；將HMW種類的所測量與預定參考標準進行比

較；並且如果該比較表明滿足預定參考標準，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準可以少於約3.0%，例如約2.5%或更少、約2.4%或更少、約2.3%或更少、約2.2%或更少、約2.1%或更少、約2.0%或更少、約1.8%或更少、約1.6%或更少、約1.4%或更少、約1.2%或更少、約1.0%或更少、約0.8%或更少、約0.6%或更少、或約0.4%或更少。在一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準係約2.5%或更少。在另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準係約1.8%或更少。在另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準係約1.4%或更少。在又另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準係約1.2%或更少。在仍另一個實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準係約0.6%或更少。在一些實施方式中，針對厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量的預定參考標準可以在例如厄瑞努單抗組成物的從約0.3%至約2.4%、厄瑞努單抗組成物的從約0.6%至約2.1%、厄瑞努單抗組成物的從約0.4%至約1.2%、或厄瑞努單抗組成物的從約0.6%至約1.4%的量的範圍內。在某些實施方式中，藉由SE-UHPLC（例如，藉由SE-UHPLC中前峰的峰面積百分比）測量厄瑞努單抗組成物中HMW種類的量。在此類實施方式中，可以如實例5所述進行SE-UHPLC方法。

【0090】 在本發明的方法的某些實施方式中，該等方法包括：

(a) 獲得包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合；

(b) 藉由進行以下的一個、兩個、或全部三個來評價厄瑞努單抗組成物：

(i) 藉由HIC-HPLC中的前峰測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量，並將所測量與約10%或更少的預定參考標準進行比較；

(ii) 藉由CEX-HPLC中的酸性峰測量該組成物中酸性變體之量，並且將所測量與約25%至約38%的預定參考標準進行比較；和/或

(iii) 藉由SE-UHPLC中的前峰測量該組成物中HMW種類之量，並且將所測量與約2.5%或更少的預定參考標準進行比較；以及

(c) 如果在步驟 (b) 中的一個或多個比較表明預定參考標準/標準被滿足，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。在一些實施方式中，進行全部的三個步驟 (b) (i)、(b) (ii)、和 (b) (iii)。在其他實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (ii)。在仍其他的實施方式中，僅進行步驟 (b) (ii) 和 (b) (iii)。在某些實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (iii)。

【0091】 在本發明方法的某些其他的實施方式中，該等方法包括：

(a) 獲得包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合；

(b) 藉由進行以下的一個、兩個、或全部三個來評價厄瑞努單抗組成物：

(i) 藉由HIC-HPLC中的前峰測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量，並將所測量與約3.2%或更少的預定參考標準進行比較；

(ii) 藉由CEX-HPLC中的酸性峰測量該組成物中酸性變體之量，並且將所測量與約26.5%至約33.6%的預定參考標準進行比較；和/或

(iii) 藉由SE-UHPLC中的前峰測量該組成物中HMW種類之量，並且將所測量與約1.2%或更少的預定參考標準進行比較；以及

(c) 如果在步驟 (b) 中的一個或多個比較表明預定參考標準/標準被滿足，

則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。在一些實施方式中，進行全部的三個步驟 (b) (i)、(b) (ii)、和 (b) (iii)。在其他實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (ii)。在仍其他的實施方式中，僅進行步驟 (b) (ii) 和 (b) (iii)。在某些實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (iii)。

【0092】 在本發明的方法的一些實施方式中，該等方法包括：

(a) 獲得包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合；

(b) 藉由進行以下的一個、兩個、或全部三個來評價厄瑞努單抗組成物：

(i) 藉由HIC-HPLC中的前峰測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量，並將所測量與約2.7%或更少的預定參考標準進行比較；

(ii) 藉由CEX-HPLC中的酸性峰測量該組成物中酸性變體之量，並且將所測量與約26.5%至約33.6%的預定參考標準進行比較；和/或

(iii) 藉由SE-UHPLC中的前峰測量該組成物中HMW種類之量，並且將所測量與約1.2%或更少的預定參考標準進行比較；以及

(c) 如果在步驟 (b) 中的一個或多個比較表明預定參考標準/標準被滿足，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。在一些實施方式中，進行全部的三個步驟 (b) (i)、(b) (ii)、和 (b) (iii)。在其他實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (ii)。在仍其他的實施方式中，僅進行步驟 (b) (ii) 和 (b) (iii)。在某些實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (iii)。

【0093】 在本發明的方法的其他實施方式中，該等方法包括：

(a) 獲得包含厄瑞努單抗和一種或多種厄瑞努單抗變體的厄瑞努單抗組成物，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、

HMW種類、或其組合；

(b) 藉由進行以下的一個、兩個、或全部三個來評價厄瑞努單抗組成物：

(i) 藉由HIC-HPLC中的前峰測量該組成物中異構化變體和脫醯胺變體之量，並將所測量與約3.2%或更少的預定參考標準進行比較；

(ii) 藉由CEX-HPLC中的酸性峰測量該組成物中酸性變體之量，並且將所測量與約26.5%至約33.6%的預定參考標準進行比較；和/或

(iii) 藉由SE-UHPLC中的前峰測量該組成物中HMW種類之量，並且將所測量與約1.4%或更少的預定參考標準進行比較；以及

(c) 如果在步驟 (b) 中的一個或多個比較表明預定參考標準/標準被滿足，則製備厄瑞努單抗組成物的藥物配製物或藥物產品。在一些實施方式中，進行全部的三個步驟 (b) (i)、(b) (ii)、和 (b) (iii)。在其他實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (ii)。在仍其他的實施方式中，僅進行步驟 (b) (ii) 和 (b) (iii)。在某些實施方式中，僅進行步驟 (b) (i) 和 (b) (iii)。

【0094】 可以將用於評估品質或評價上述厄瑞努單抗組成物的本發明方法用於各種上下文。例如，該等方法可以用作針對厄瑞努單抗的製造過程的不同步驟中的品質控制方法（例如，作為過程中的控制方法）。在一些實施方式中，該等方法可以在大多數或所有製造過程完成時使用，例如，作為針對厄瑞努單抗原料藥（例如，活性藥物成分或API）或厄瑞努單抗藥物產品（例如，用一種或多種人用賦形劑配製的API）的批次釋放方法。該等方法還可用於評估已經儲存不同時間段的厄瑞努單抗組成物，以便於確定藥物有效期。該等方法還可用於重新評估厄瑞努單抗組成物，對於該組成物，最初未滿足預定參考標準並已經被再處理（例如，進行另外的純化操作）。

【0095】 因此，該等方法中使用的厄瑞努單抗組成物可以是包含厄瑞努

單抗和可能的一種或多種厄瑞努單抗變體的任何組成物。在一些實施方式中，該厄瑞努單抗組成物獲得自中國倉鼠卵巢（CHO）細胞系，該細胞系表現編碼SEQ ID NO: 1的重鏈的核酸和編碼SEQ ID NO: 2的輕鏈的核酸。在此類實施方式中，該厄瑞努單抗組成物係細胞培養物收穫物（例如，澄清的細胞培養物上清液或澄清的細胞裂解物）。在其他此類實施方式中，該厄瑞努單抗組成物係厄瑞努單抗的經部分純化的製劑，該製劑已經歷一種或多種純化操作（例如，來自一個或多個層析或過濾步驟的池或級分）。在一個實施方式中，該厄瑞努單抗組成物係來自陽離子交換層析材料的洗脫池。在另一個實施方式中，該厄瑞努單抗組成物係厄瑞努單抗原料藥（例如，活性藥物成分或API）。在又另一個實施方式中，該厄瑞努單抗組成物係厄瑞努單抗藥物產品（例如，厄瑞努單抗原料藥或用一種或多種人用賦形劑配製的API）。

【0096】作為上述品質評估方法的一部分，可以評估厄瑞努單抗組成物的生物活性。在一些實施方式中，該等方法包括評估所述厄瑞努單抗組成物抑制CGRP配位基誘導的人CGRP受體激活的能力。用於評估CGRP受體激活的各種測定法係本領域已知的並且包括測量CGRP配位基誘導的鈣動員和cAMP產生的基於細胞的測定法。示例性基於細胞的cAMP測定描述於實例1中。其他適合的CGRP受體激活測定描述於Aiyar等人, *Molecular and Cellular Biochemistry* [分子與細胞生物化學], 第197卷:179-185, 1999；Pin等人, *European Journal of Pharmacology* [歐洲藥理學雜誌], 第577卷: 7-16, 2007；美國專利案號8,168,592、和WO 2010/075238中，其全部均藉由引用以其全部內容併入本文。

【0097】本發明包括藥物配製物，該等藥物配製物包含本文所述的厄瑞努單抗組成物中的任何一種和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。“藥學上可接受的”係指在給予人時採用的劑量和濃度下對人類接受者無毒和/或在給予人時

不產生過敏或不良反應的分子、化合物和組成物。在某些實施方式中，藥物配製物可含有用於改變、維持或保存厄瑞努單抗組成物的以下特性的材料：例如 pH、滲量、黏度、透明度、顏色、等滲性、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸附或滲透。在這樣的實施方式中，適合的材料包括但不限於胺基酸（如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或賴胺酸）；抗微生物劑；抗氧化劑（如抗壞血酸、亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉）；緩衝液（如乙酸鹽、碳酸氫鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸）；膨脹劑（如甘露醇或甘胺酸）；螯合劑（如乙二胺四乙酸（EDTA））；絡合劑（如咖啡因、聚乙烯吡咯啶酮、 β -環糊精或 γ -環糊精）；填充劑；單糖；二糖；和其他糖類（如葡萄糖、甘露糖或糊精）；蛋白質（如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白）；著色劑；乳化劑；親水聚合物（如聚乙烯吡咯啶酮）；低分子量多肽；成鹽抗衡離子（如鈉）；防腐劑（如氯化苄烷銨、苯甲酸、水楊酸、硫柳汞、苯乙醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、洛赫西定、山梨酸或過氧化氫）；溶劑（如甘油、丙二醇或聚乙二醇）；糖醇（如甘露醇或山梨糖醇）；表面活性劑或潤濕劑（如普朗尼克類（pluronic）、PEG、脫水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯（如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80）、曲通（triton）、胺丁三醇、卵磷脂、膽固醇、泰洛沙泊（tyloxapal））；穩定性增強劑（如蔗糖或山梨糖醇）；張力增強劑（如鹼金屬鹵化物、較佳的是氯化鈉或氯化鉀、甘露醇山梨糖醇）；稀釋劑；賦形劑和/或藥用佐劑。用於配製用於治療用途的分子的方法和適合的材料在製藥領域中是已知的，並進行了描述，例如，在 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES [雷明頓的藥物科學], 第18版, (A.R. Genrmo, 編輯), 1990, 馬克出版公司（Mack Publishing Company）。

【0098】 在一些實施方式中，本發明的該等藥物配製物包含本文所述的

厄瑞努單抗組成物、使溶液的pH維持在約4.5至約6.5的範圍內的緩衝液、穩定劑、和視情況表面活性劑。適合的緩衝液包括，但不限於麩胺酸鹽、乙酸鹽、Tris、檸檬酸鹽、組胺酸、琥珀酸鹽、和磷酸鹽緩衝液。在某些實施方式中，該藥物配製物包含乙酸鹽緩衝液。該乙酸鹽緩衝液可以由乙酸或乙酸鹽（例如，乙酸钠）製得。可以使用其他鹽，例如像乙酸鹽的鉀鹽、銨鹽、鈣鹽或鎂鹽。包含乙酸鹽緩衝液的藥物配製物典型地具有約4.5至約5.5的pH或約4.8至約5.2的pH，包括約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4、和約5.5的pH。

【0099】 穩定劑係指穩定抗體的天然構象和/或防止或減少抗體的物理或化學降解的賦形劑。適合的穩定劑包括但不限於多元醇（例如，山梨糖醇、甘油、甘露醇、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、赤蘚糖醇和蘇糖醇），糖（例如，果糖、葡萄糖、甘油醛、乳、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、核糖、鼠李糖，半乳糖麥芽糖、蔗糖、海藻糖、山梨糖、三氯蔗糖、松三糖和棉子糖）和胺基酸（例如，甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、賴氨酸、精氨酸、組氨酸或麩氨酸）。在一些實施方式中，該藥物配製物包含糖作為穩定劑。在該等和其他實施方式中，該糖係蔗糖。

【0100】 在某些實施方式中，該藥物配製物包含表面活性劑。表面活性劑係用於降低溶解在其中的液體的表面張力的物質。出於各種目的（包括例如防止或控制液體配製物中的聚集、顆粒形成和/或表面吸附，或在凍乾配製物的凍乾和/或重構過程中防止或控制該等現象）可以將表面活性劑包括在藥物配製物中。表面活性劑包括，例如，在有機溶劑和水溶液中均顯示出部分溶解性的兩親性有機化合物。表面活性劑的一般特徵包括它們降低水的表面張力、降低油和水之間的介面張力以及形成膠團的能力。可以被摻入本發明的藥物配製物的

表面活性劑包括非離子和離子表面活性劑。適合的非離子表面活性劑包括但不限於烷基聚(環氧乙烷)、烷基多葡萄糖苷(例如,辛基葡萄糖苷和癸基麥芽糖苷)、脂肪醇(例如,鯨蠟醇和油醇)、椰油醯胺MEA、椰油醯胺DEA和椰油醯胺TEA。非離子表面活性劑的具體的實例包括聚山梨醇酯,包括例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯28、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85等;泊洛沙姆包括例如泊洛沙姆188(也稱為泊洛沙姆或聚(環氧乙烷)-聚(環氧丙烷))、泊洛沙姆407或聚乙烯-聚丙二醇等,以及聚乙二醇(PEG)。適合的離子表面活性劑包括例如陰離子、陽離子和兩性離子表面活性劑。陰離子表面活性劑包括但不限於磺酸鹽基或羧酸鹽基表面活性劑,例如肥皂、脂肪酸鹽、十二烷基硫酸鈉(SDS)、月桂基硫酸銨和其他烷基硫酸鹽。陽離子表面活性劑包括但不限於基於季銨基表面活性劑,例如十六烷基三甲基溴化銨(CTAB)、其他烷基三甲基銨鹽、十六烷基吡啶氯化物、聚乙氧基化牛脂胺(POEA)和氯化苄烷銨。兩性離子或兩性表面活性劑包括,例如,十二烷基甜菜鹼、十二烷基二甲基氧化胺、椰油醯胺丙基甜菜鹼、和椰油兩性甘胺酸鹽。在某些實施方式中,該藥物配製物包含非離子表面活性劑。在一個實施方式中,該非離子表面活性劑係聚山梨醇酯20。在另一個實施方式中,該非離子表面活性劑係聚山梨醇酯80。

【0101】 在某些實施方式中,該等藥物配製物包含本文所述的厄瑞努單抗組成物中的任一種(例如,約70 mg/mL至約140 mg/mL厄瑞努單抗組成物)、約20 mM至約40 mM乙酸鹽、約6%至約9%(w/v)蔗糖、和約0.008%至約0.012%(w/v)聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。該等配製物的pH係在約4.9至約5.5的範圍中(例如,pH為約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、或約5.4)。在一個具體的實施方式中,該藥物配製物包含70 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗

組成物、約25 mM乙酸鹽、約7.3% (w/v) 蔗糖、和約0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80，其中該藥物配製物具有pH為約 5.2 ± 0.2 。在另一個具體的實施方式中，該藥物配製物包含140 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約34 mM乙酸鹽、約6.5% (w/v) 蔗糖、和約0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80，其中該藥物配製物具有pH為約 5.2 ± 0.2 。

【0102】 藥物配製物較佳的是適用於腸胃外注射（例如靜脈內或皮下注射）。適合於腸胃外注射的說明性藥物形式包括無菌水溶液或分散液和用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。較佳的是，藥物配製物係無菌的並且具有足夠的流動性以允許通過注射器或其他注入裝置遞送（即，配製物不過分黏稠而有礙通過注射器或其他注入裝置）。可以通過無菌過濾膜過濾來完成滅菌。當凍乾組成物時，可以在凍乾和重構之前或之後使用該過濾方法進行滅菌。用於腸胃外給予的藥物配製物可以按凍乾形式或溶液形式儲存。可以將腸胃外配製物置於具有無菌進入口的容器中，例如，具有可由皮下注射針刺穿的塞子的靜脈內溶液袋或小瓶。腸胃外配製物還可以儲存在注射器、自動注射器裝置或筆型注入裝置或適於與這種注入裝置一起使用的藥筒中。

【0103】 可以將上述藥物配製物填充到小瓶、注射器、自動注射器、或其他容器或遞送裝置中，並且視情況與使用說明一起包裝（例如，包含用於使用藥物配製物治療、預防頭痛、或減少頭痛發生如偏頭痛的說明的處方資訊）製備藥物產品。在某些實施方式中，將本文所述的該等藥物配製物摻入自我給藥注入裝置。此類裝置係可商購並且包括，但不限於自動注射器、劑量給藥筆、微量灌流泵、和預填充式注射器。其中可以摻入本發明的藥物配製物的示例性裝置包括自動注射器（例如，SureClick®、EverGentle®、Avanti®、DosePro®、Molly®、和Leva®）；筆型注入裝置（例如，Madie®筆型注射器、

DCP™ 筆型注射器、BD Vystra™ 一次性筆、BD™ 重複使用筆），和預填充式注射器（BD Sterifill™、BD Hypak™、來自Baxter的預填充式注射器）。在一些實施方式中，將藥物配製物摻入並儲存在注射器中以產生預填充式注射器。在其他實施方式中，將藥物配製物摻入自動注射器中。預填充式注射器或自動注射器的注射體積可以是約2 mL或更少、約1.5 mL或更少、或約1 mL或更少。在某些實施方式中，將本文所述的該等藥物配製物摻入注射器或自動注射器，其中注射體積為約1 mL。

【0104】 因此，在一些實施方式中，本發明提供了包含以下的預填充式注射器：約70 mg/mL至約140 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約20 mM至約40 mM乙酸鹽、約6%至約9%（w/v）蔗糖、和約0.008%至約0.012%（w/v）聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20，pH為約4.5至約5.5。在一個實施方式中，該預填充式注射器包含70 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約25 mM乙酸鹽、約7.3%（w/v）蔗糖、和約0.010%（w/v）聚山梨醇酯80，pH為約5.2 ± 0.2。在另一個實施方式中，該預填充式注射器包含140 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約34 mM乙酸鹽、約6.5%（w/v）蔗糖、和約0.010%（w/v）聚山梨醇酯80，pH為約5.2 ± 0.2。在該等實施方式中的任一個中，該預填充式注射器的注射體積可以是約1 mL。

【0105】 在其他實施方式中，本發明提供了包含以下的自動注射器：約70 mg/mL至約140 mg/mL的本文所述的厄瑞努單抗組成物、約20 mM至約40 mM乙酸鹽、約6%至約9%（w/v）蔗糖、和約0.008%至約0.012%（w/v）聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20，pH為約4.5至約5.5。在一個實施方式中，該自動注射器包含70 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約25 mM乙酸鹽、約7.3%（w/v）蔗糖、和約0.010%（w/v）聚山梨醇酯80，pH為約5.2 ± 0.2。在另一個

實施方式中，該自動注射器包含140 mg/mL本文所述的厄瑞努單抗組成物、約34 mM乙酸鹽、約6.5% (w/v) 蔗糖、和約0.010% (w/v) 聚山梨醇酯80，pH為約 5.2 ± 0.2 。在該等實施方式中的任一個中，該自動注射器的注射體積可以是約1 mL。

【0106】 可以將本文所述的厄瑞努單抗組成物和包含此類組成物的藥物配製物用於治療、預防頭痛、或減少頭痛發生。因此，本發明包括用於在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生之方法，該等方法包括向患者給予包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的任何厄瑞努單抗組成物或藥物配製物。在某些實施方式中，本發明提供了用於在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生中使用的厄瑞努單抗組成物或包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物。在其他實施方式中，本發明包括厄瑞努單抗組成物或包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物在製備用於在對其有需要的患者中治療、預防頭痛、或減少頭痛發生的藥物的用途。“預防頭痛或減少頭痛的發生”係指與在給予組成物/配製物之前的頭痛的頻率、持續時間或嚴重程度相比，或與未被給予組成物/配製物的患者（即，對照受試者）中頭痛的頻率、持續時間、或嚴重程度相比，頭痛的頻率、持續時間或嚴重程度的降低。

【0107】 在某些實施方式中，藉由向患者給予任何厄瑞努單抗組成物或包含本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物，本發明的方法和用途在對其有需要的患者中治療、預防偏頭痛、或減少偏頭痛的發生。“偏頭痛”係與噁心或嘔吐、或對光或聲音的敏感、和/或由如下至少兩種疼痛特徵表徵的頭痛相關聯的頭痛：單側疼痛、搏動性疼痛、中度至重度疼痛強度，或因身體活動而加劇的疼痛。根據一些實施方式，向患者每月一次給予包含70 mg或140 mg本文所述的厄瑞努單抗組成物的藥物配製物從而在患者中治療、預防偏頭痛、或

減少偏頭痛的發生。在此類實施方式中，藥物配製物可以藉由皮下注射遞送，例如，使用上述注入裝置之一（例如，預填充式注射器或自動注射器）。

【0108】 在一些實施方式中，根據本發明的方法待治療的患者具有、患有、或被診斷患有陣發性偏頭痛。當具有偏頭痛病史（例如，生命期至少五次偏頭痛的發作）的患者每月有14個或更少個偏頭痛日時，診斷出陣發性偏頭痛。“偏頭痛日”包括患者經歷有或沒有先兆的持續超過30分鐘的“偏頭痛”的發作、持續或復發的任何日曆天數。在一些實施方式中，具有、患有或被診斷患有陣發性偏頭痛的患者每月有至少4個，但少於15個偏頭痛日。在相關的實施方式中，具有、患有或被診斷患有陣發性偏頭痛的患者平均每月有少於15個頭痛日。如本文使用的，“頭痛日”係患者經歷偏頭痛或任何持續超過30分鐘或需要急性頭痛治療的頭痛的任何日曆天數。在某些實施方式中，可以將患者分類為具有或患有高頻陣發性偏頭痛。高頻陣發性偏頭痛患者係每個月有8至14個偏頭痛日的患者。在其他實施方式中，可以將患者分類為具有或患有低頻陣發性偏頭痛。低頻陣發性偏頭痛患者係每個月有少於8個偏頭痛日的患者。

【0109】 在一些實施方式中，根據本發明的方法待治療的患者具有、患有、或被診斷患有慢性偏頭痛。當偏頭痛患者（即生命期至少五次發作偏頭痛的患者）每月有15個或更多個頭痛日且至少有8個頭痛日係偏頭痛日時，就診斷出慢性偏頭痛。在一些實施方式中，具有、患有或被診斷患有慢性偏頭痛的患者平均每月有15個或更多個偏頭痛日。

【0110】 在某些實施方式中，根據本發明的方法待治療的偏頭痛患者先前未接受任何預防性偏頭痛治療。在其他實施方式中，根據本發明的方法待治療的偏頭痛患者未能接受或對一種或多種預防性偏頭痛療法不耐受。在一個這樣

的實施方式中，患者未能對使用至少一種偏頭痛預防劑的先前治療作出響應。

“未能響應”或“治療失敗”係指預防劑在遵循藥劑的標準治療方案後在患者中減少偏頭痛的頻率、持續時間和/或嚴重程度方面缺乏效力。例如，在一個實施方式中，先前用偏頭痛預防劑治療失敗的患者係如下患者：在用藥劑治療之前與每月偏頭痛日的數目相比，在被給予偏頭痛預防劑之後經歷相同或更多月度偏頭痛日。對用偏頭痛預防劑的先前治療未能響應還可能包括不能耐受偏頭痛預防劑。例如，在一些實施方式中，先前用偏頭痛預防劑治療已經失敗的患者係不能對與該藥劑相關聯的副作用耐受的患者。在這樣的實施方式中，與藥劑相關聯的副作用可能加劇或可能與患者具有的另一種醫學病症不相容。在某些實施方式中，患者用一種或多種藥劑的治療失敗或對該治療不耐受，該一種或多種藥劑選自： β -阻滯劑（例如，普萘洛爾（propranolol）、噻嗎洛爾（timolol）、阿替洛爾（atenolol）、美托洛爾（metoprolol）和納多洛爾（nadolol））；抗癲癇藥（例如，雙丙戊酸鈉、丙戊酸鈉、丙戊酸、托吡酯（topiramate）和加巴噴丁（gabapentin））；三環類抗抑鬱藥（如阿米替林（amitriptyline）、去甲替林（nortriptyline）、多慮平（doxepin）和氟西汀（fluoxetine））和奧娜博特蘭毒西納（onabotulinumtoxinA）。

【0111】還可以將本文所述的厄瑞努單抗組成物和包含此類組成物的藥物配製物用於治療、預防其他類型的頭痛障礙（例如，緊張型頭痛、頭痛群、偏癱性偏頭痛、經期偏頭痛、和視網膜性偏頭痛）或減少該等頭痛障礙的發生。與CGRP/CGRP受體訊號傳導相關聯的其他疾病或病症也可以用厄瑞努單抗組成物和包含本文所述的此類組成物的藥物配製物治療或改善。與CGRP/CGRP受體訊號傳導相關聯的疾病或病症包括但不限於慢性疼痛（例如，傷害性疼痛、神經性疼痛、炎性疼痛、纖維肌痛、關節炎疼痛）；異常性疼痛；炎症

（例如，神經性炎症、牛皮癬、骨關節炎）；II型糖尿病；膀胱過度活動症；和氣喘。

【0112】 本發明的藥物配製物較佳的是腸胃外給予患者。腸胃外給予包括腹膜內、肌肉內、靜脈內、動脈內、皮內、皮下、腦內、腦室內和鞘內給予。在某些實施方式中，藥物配製物靜脈內給予患者。在其他實施方式中，將藥物配製物皮下給予患者，例如藉由皮下注射。可以使用本文所述的一個或多個裝置（例如，預填充式注射器和自動注射器）將注射液遞送給患者。

【0113】 以下實例，包括進行的實驗和實現的結果，僅提供解釋說明目的的，並且不應被解釋為限制所附申請專利範圍的範圍。

實例

實例1.藉由HIC-HPLC鑒定和表徵厄瑞努單抗電荷變體

【0114】 厄瑞努單抗係IgG2亞類的全人單株抗體。在中國倉鼠卵巢（CHO）細胞中重組產生抗體，並且該抗體由 λ 亞類的兩條重鏈和兩條輕鏈組成。每條重鏈包含具有四個鏈內二硫鍵的456個胺基酸。每條輕鏈包含具有兩個鏈內二硫鍵的216個胺基酸。厄瑞努單抗包含六個鏈間二硫化物，總共18個鏈內和鏈間二硫鍵。厄瑞努單抗的重鏈和輕鏈的胺基酸序列分別顯示在圖1A和1B中。每條重鏈包含SEQ ID NO: 1的位置306處的天冬醯胺殘基上共有糖基化位點處的N-聯糖聚糖。如對哺乳動物細胞產生的抗體經常觀察到的，重鏈中位置456處的C-末端賴胺酸殘基大部分被細胞培養生產過程中存在的羧肽酶去除。此外，重鏈和輕鏈上的N-末端麩醯胺酸殘基通常在生產過程中轉化為焦麩胺酸。具有該等N-和C-末端修飾的厄瑞努單抗的重鏈和輕鏈的胺基酸序列分別顯示在圖1C和1D中。從兩條重鏈去除C-末端賴胺酸並且具有完整的重鏈和輕鏈

N-末端焦麩胺酸形成的去糖基化的厄瑞努單抗的經計算的質量為145,872道耳頓。

【0115】厄瑞努單抗特異性結合降鈣素基因相關肽（CGRP）受體的細胞外結構域，並阻止CGRP結合並激活受體。CGRP係一種調節傷害性訊號傳導的神經肽，並且是一種與偏頭痛病理生理學相關聯的血管擴張劑。厄瑞努單抗有效且特異地與CGRP競爭結合CGRP受體，並抑制CGRP誘導的細胞內環腺苷一磷酸（cAMP）訊號級聯放大的激活。厄瑞努單抗在腎上腺髓質素、降鈣素、或糊精受體上沒有表現出任何顯著的藥理活性，並且在CGRP受體上缺乏激動劑活性。

【0116】對藉由商業規模製造製程生產的厄瑞努單抗原料藥進行生物化學、生物物理和生物表徵從而闡明該原料藥的結構和功能特性。該實例描述了表現出降低的CGRP受體抑制功能的厄瑞努單抗的電荷變體的鑒定和表徵。藉由疏水性相互作用層析-高效液相層析（HIC-HPLC）評估該實例中厄瑞努單抗的電荷異質性。

【0117】HIC-HPLC主要基於分子的表面疏水性分離蛋白質，並且還可能受結構異質性和影響與柱基質的分子相互作用的其他修飾的影響。HIC-HPLC中的峰洗脫係淨表面疏水性的函數，其中具有較高表面疏水性的分子比具有較低表面疏水性的分子洗脫更晚。

【0118】將厄瑞努單抗原料藥的樣品載入到疏水性相互作用層析柱（ProPac HIC-10，5 μm 粒度，4.6 mm × 250 mm，賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））上。流動相A包含10 mM乙酸鈉，1 M硫酸銨（在pH 5.5）並且流動相B由10 mM乙酸鈉（pH 5.5）組成。用從0 min至52 min的25%至100%流動相B，和在55.5 min至75 min返回至25%流動相B產生的遞減鹽

梯度中分離蛋白質。藉由在280 nm處的UV吸光度監測洗脫液。在35°C下操作柱，並以0.5 mL/min的流速將流動相施加到柱上。

【0119】 該HIC-HPLC圖譜包含三個不同的區（包括前峰、主峰和後峰）（圖2A和2B）。分離跨前峰、主峰和後峰區的七種級分。將收集的級分藉由HIC-HPLC再次分析從而表明級分用於表徵係足夠純的。將經分離的級分的HIC-HPLC圖譜和純度分別顯示在圖3和表1中。

[表1].富集的級分的HIC-HPLC峰面積百分比¹

樣品描述	前峰				主峰	後峰	
	% F1	% F2	% F3	% F4	% F5	% F6	% F7
原料藥	0.7	0.5	0.3	0.4	94.0	1.5	2.4
前峰級分 F1	94.3	—	—	—	5.7	—	—
前峰級分 F2	—	93.5	—	—	6.5	—	—
前峰級分 F3	—	17.8	72.9	—	9.3	—	—
前峰級分 F4	—	—	—	88.1	11.9	—	—
主級分 F5	—	—	—	—	100.0	—	—
後峰級分 F6	—	—	—	—	9.8	69.8	20.4
後峰級分 F7	—	—	—	—	5.6	15.3	79.1

¹從相同的原料藥批次中收集所有的HIC-HPLC級分。目的級分基於收集時間窗，並且將相對純度加粗並加底線。將未檢測的峰用破折號表示。

【0120】 藉由各種分析技術（包括尺寸排阻超高效液相層析（SE-UHPLC）、還原的胰蛋白酶肽作圖與LC-MS/MS、和基於細胞的生物測定）表徵圖3和表1中的前峰、主峰和後峰級分。

【0121】 藉由SE-UHPLC，使用BEH200分析型UHPLC柱（1.7 μm粒度，4.6 mm × 150 mm，沃特斯公司（Waters Corporation））和包含100 mM磷酸鈉、250 mM氯化鈉、pH 6.8的流動相對未分級的原料藥和七種HIC-HPLC級分進行分析。相對於未分級的原料藥，SE-UHPLC分析表明所有的前峰和在後峰級分富集高分子量（HMW）種類，然而僅最早的前峰級分（F1）和最晚的後

峰級分（F7）富集低分子量（LMW）種類（表2）。

[表2].富集的HIC-HPLC級分的SE-UHPLC峰面積百分比

樣品描述	% HMW	% 主	% LMW
原料藥	0.4	99.4	<0.3 ¹
前峰級分F1	5.1	93.3	1.6
前峰級分F2	2.8	96.7	0.5
前峰級分F3	2.8	96.7	0.5
前峰級分F4	5.0	94.7	0.3
主級分F5	0.6	99.3	<0.3 ¹
後峰級分F6	12.7	87.0	0.3
後峰級分F7	16.8	80.8	2.4

¹定量限 = 0.3%

【0122】藉由還原的胰蛋白酶肽作圖（其中藉由電灑電離串聯質譜法（ESI-MS/MS）檢測）評估在富集的前峰、主峰、和後峰級分以及未分級的原料藥中存在的厄瑞努單抗的生物化學修飾。將原料藥和七種HIC-HPLC級分在7.5 M鹽酸胍溶液中變性，並用0.5 M的還原劑二硫蘇糖醇（DTT）處理，並且藉由添加0.5 M碘乙酸鈉（IAA）將所有的半胱胺酸殘基烷基化。藉由凝膠過濾使被還原和烷基化的樣品脫鹽，然後在37°C下用胰蛋白酶消化35分鐘。藉由反相高效液相層析（RP-HPLC），使用C18柱（1.8 μm粒度，2.1 mm × 150 mm）和具有乙腈梯度的0.1% TFA流動相以流速0.3 mL/min分離消化的樣品。藉由在215 nm處的紫外（UV）光吸光度與線上ESI-MS/MS的峰鑒定檢測肽。然後針對其預期的MS/MS譜檢查每種肽離子的片段化模式。

【0123】原料藥和富集的級分的疊加呈現在圖4中，顯示在重鏈CDR3內兩種肽：TH12H13（SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基99至113）和TH13（SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基101至113）的洗脫區。前峰級分F2、F3和F4和後峰級分F6均顯示相對於原料藥在CDR3肽（TH13）中的變異。對於級分F1和F7，在TH13肽中未觀察到差異。前峰級分F2、F3、和F4和後峰級分F6富集重鏈CDR3肽

TH13內的脫醯胺和異構化變體（異天冬胺酸（IsoAsp）和琥珀醯亞胺中間體）中。觀察到位置102處天冬醯胺殘基的脫醯胺和位置105處天冬胺酸殘基的異構化（兩個位置相對於SEQ ID NO: 1）。觀察到鑒定為IsoAsp105的兩種單獨的肽在不同的保留時間洗脫。該等肽可能是天冬胺酸異構化過程中產生的結構鏡像異構物。還觀察到天然肽後洗脫的另外的TH13肽變體，該變體對應於位置105處的琥珀醯亞胺中間體。藉由將經修飾的肽的提取離子層析圖（EIC）峰面積與未經修飾的肽產生的峰面積比較來估計修飾水平。質量分析證實了在前峰和後峰區內升高的脫醯胺和IsoAsp變體的存在（表3）。

[表3].藉由還原的胰蛋白酶肽圖觀察到的富集的HIC-HPLC級分的修飾的匯總

樣品描述	% Asp ¹⁰⁵ 異構化 ¹	% Asp ¹⁰⁵ 琥珀醯亞胺	% Asn ¹⁰² 脫醯胺	% Leu ¹⁹⁵ /Ser ¹⁹⁶ 切割
原料藥	ND	0.2	ND	0.4
前峰級分F1	0.6	0.2	ND	10.9
前峰級分F2	26.4	1.4	0.1	1.0
前峰級分F3	19.6	12.6	1.2	0.5
前峰級分F4	5.5	4.3	11.6	0.4
主級分F5	ND	0.1	ND	0.3
後峰級分F6	13.2	0.1	ND	0.6
後峰級分F7	2.4	0.1	ND	1.1

ND = 未檢測到

¹圖4中在大約70.5 min和71.5 min處洗脫的兩種IsoAsp¹⁰⁵ TH13變體的匯總。

【0124】 還原前峰級分F1並藉由ESI-TOF質譜法進行分析，因為藉由rCE-SDS對該級分的分析先前已經顯示了顯著水平的LMW和中等分子量（MMW）種類。在前峰級分F1中鑒定出總共六個切割片段，其中四個切割位點（Leu³¹⁵/Thr³¹⁶；Ser¹⁹⁷/Val¹⁹⁸；Leu¹⁹⁵/Ser¹⁹⁶；和Leu¹⁹²/Tyr¹⁹³）係在重鏈CH1和CH2結構域中。在重鏈的CDR3中還鑒定出兩個切割位點（Gly¹⁰⁸/Tyr¹⁰⁹和

Asp¹⁰⁵/Ser¹⁰⁶)。對於所有種類，僅檢測出C-末端片段。相對於原料藥，在前峰級分F1內觀察到Leu¹⁹⁵/Ser¹⁹⁶切割片段的升高的水平(表3)。

【0125】與厄瑞努單抗原料藥相比，藉由基於細胞的生物測定評估富集的HIC-HPLC級分的生物學活性。基於細胞的生物測定藉由測量厄瑞努單抗抑制配位基誘導的人CGRP受體激活的能力來評估厄瑞努單抗的效力。CGRP受體係G蛋白偶聯受體，並且已經顯示該受體家族在細胞內產生cAMP作為其訊號轉導機制的一部分。將表現人CGRP受體(CHO-K1 huCGRP)的穩定中國倉鼠卵巢K1(CHO-K1)細胞系與CGRP配位基和不同濃度的厄瑞努單抗參考標準品和測試樣品一起孵育。使用競爭性同源時間分辨螢光能量轉移(TR-FRET)測定，在存在或不存在厄瑞努單抗參考標準品和測試樣品的情況下，用CGRP孵育之後，測量由細胞產生的cAMP的量，其中當標記的測定組分(用Alexa Fluor[®] 647染料標記的cAMP和抗cAMP單株抗體-穴狀化合物)相互結合時產生可檢測的訊號。當藉由CGRP激活CGRP受體在細胞內產生cAMP時，由細胞產生的天然cAMP與Alexa Fluor[®] 647染料標記的cAMP競爭結合穴狀化合物標記的抗cAMP單株抗體，並且可檢測訊號減少。因此，由於TR-FRET cAMP測定的競爭性質，產生的訊號與細胞中cAMP的濃度成反比。藉由酶標儀測量TR-FRET訊號。藉由將用測試樣品產生的訊號與用厄瑞努單抗參考標準品產生的訊號進行比較來確定測試樣品的活性，並報告為相對效力。

【0126】如下表4中所示，所有前峰級分顯示出效力的顯著降低。該等降低係由於高水平的片段化(對於F1級分)或脫醯胺和重鏈CDR3區中的異構化(對於級分F2-F4)，該等係如上所述的前峰級分中的主要變體。後峰級分也顯示效力降低，可能是由於升高的HMW種類和低水平的重鏈CDR3天冬胺酸(Asp¹⁰⁵)異構化，該等係如上所述的後峰級分中的主要變體。

[表4].富集的HIC-HPLC級分的效力

樣品描述	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
原料藥	100	6
前峰級分F1	33	8
前峰級分F2	24	4
前峰級分F3	35	1
前峰級分F4	34	3
主級分F5	107	2
後峰級分F6	77	4
後峰級分F7	68	3

¹3次重複的平均值

【0127】 在該實例中描述的分析的結果表明厄瑞努單抗原料藥的HIC-HPLC圖譜包含三個不同的區（包括前峰、主峰和後峰）。藉由HIC-HPLC檢測的主要厄瑞努單抗變體包括在前峰和後峰區中的重鏈CDR3天冬胺酸異構化（例如，SEQ ID NO: 1的Asp¹⁰⁵的異構化）變體和脫醯胺（例如，SEQ ID NO: 1的Asn¹⁰²的脫醯胺）變體。在前峰組中觀察到片段化的種類，並且在後峰組中觀察到升高水平的HMW種類。如藉由基於細胞的生物測定評估，所有厄瑞努單抗HIC-HPLC前峰和後峰級分的效力均低於原料藥。由於重鏈CDR3區中的天冬胺酸異構化和脫醯胺以及高水平的片段化變體，前峰顯示效力顯著降低。由於HMW種類和重鏈CDR3異構化變體的水平升高，後峰也顯示效力降低。

【0128】 由於厄瑞努單抗的重鏈CDR3天冬胺酸異構化變體和天冬醯胺脫醯胺變體的存在影響了組成物的抑制效力，因此藉由HIC-HPLC分析按商業規模製造的若干批次的厄瑞努單抗原料藥（140 mg/mL）以評估如藉由HIC-HPLC層析圖中前峰的峰面積百分比所測量的異構化變體和脫醯胺變體的存在和質量。還藉由上述基於細胞的效力測定評估原料藥批次的效力，並與批號78137的效力進行比較，該批號78137代表用於II期/III期臨床試驗的厄瑞努單抗原料藥。下表5中提供了數據的匯總。

[表5].針對厄瑞努單抗原料藥批次的HIC-HPLC和效力數據

批號	HIC-HPLC		基於細胞的生物測定
	%主峰	%前峰	%相對效力
78137（臨床試驗材料）	—	—	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

【0129】 如表5中的數據所示，按商業規模製造的厄瑞努單抗原料藥含有如藉由HIC-HPLC前峰所測量的從1.7%至2.1%範圍內的一致水平的異構化變體和脫醯胺變體。含有在該範圍內的脫醯胺/異構化變體水平的原料藥表現出與臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥的效力相當的效力。

實例2.對不同儲存條件下厄瑞努單抗異構化變體和脫醯胺變體的評價

【0130】 在製造原料藥期間，在厄瑞努單抗重鏈的CDR3中觀察到Asn¹⁰²的脫醯胺和Asp¹⁰⁵向異天冬胺酸的轉變（實例1）。與厄瑞努單抗未經修飾的形式相比，具有該等修飾的厄瑞努單抗變體表現出降低的效力（實例1）。為進一步評估Asn¹⁰²脫醯胺變體和Asp¹⁰⁵異構化變體對厄瑞努單抗原料藥效力的影響，使厄瑞努單抗原料藥經受應激條件以增加脫醯胺變體和異構化變體的形成，並評估經應激的原料藥的效力。具體地，厄瑞努單抗原料藥經受以下三種應激條件以促進脫醯胺變體和異構化變體的產生：

- 熱暴露（50°C持續14天）
- 生理pH和溫度（pH 7.4，在37°C下，持續14天）
- 高pH暴露（pH 8.0，在25°C下，持續14天）

【0131】 藉由HIC-HPLC和實例1中所述的還原的胰蛋白酶肽作圖方法監

測由每種應激條件隨時間誘導的脫醯胺變體和異構化變體的形成。對於每種應激條件，在研究持續期間的不同時間點取出樣品並冷凍。在最後的時間點後，將所有樣品並行分析以最小化分析變異性。

熱暴露

【0132】 在50°C下應激的厄瑞努單抗原料藥的HIC-HPLC分析結果顯示前峰顯著增加（圖5和表6）。前峰的這種增加主要是由於暴露於熱緊迫14天後天冬胺酸異構化的增加，如藉由下文詳細解釋的減少的胰蛋白酶肽圖分析所揭示的。還觀察到後峰的增加，可能是由於HMW種類的水平增加，因為它們作為後洗脫後峰的一部分洗脫，如實例1中的表2所示。

[表6].在50°C下應激的厄瑞努單抗的HIC-HPLC峰面積%

時間點（天）	%前峰	%主峰	%後峰
0	1.9	98.1	0.0
14	16.8	79.1	4.2

【0133】 評估肽圖層析圖在暴露時間內新峰的存在或存在峰的峰面積的顯著變化。第0天和第14天樣品的擴展比例疊加突顯了如圖6所示的觀察到差異的區域。在重鏈CDR3（肽TH12H13和TH13）中Asp¹⁰⁵處的天冬胺酸異構化變體係在肽圖疊加中觀察到的主要降解物。在第14天樣品層析圖中還觀察到Fc區中Leu³¹⁵和Thr³¹⁶之間肽TH26（對應於SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基311至326）的水解片段。

【0134】 藉由實例1中描述的基於細胞的生物測定評估暴露於熱緊迫條件下的厄瑞努單抗原料藥的生物學活性。如表7所示，在50°C下暴露14天後熱緊迫對於厄瑞努單抗原料藥的相對效力具有負面影響。熱緊迫後效力的降低係由於Asp¹⁰⁵異構化變體和高分子量種類的增加，這兩種種類已經顯示出影響效力（參見實例1和實例5）。

[表7].暴露於熱緊迫的厄瑞努單抗的相對效力

時間點（天）	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
0	93	4
14	71	7

¹3次重複的平均值

生理pH和溫度

【0135】藉由用磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）溶液（pH 7.4）稀釋至大約10 mg/mL將厄瑞努單抗原料藥暴露於生理pH中，並在37°C下孵育（生理溫度）14天。將pH對照在37°C下孵育超過14天，該pH對照係稀釋於配製物緩衝液（15 mM乙酸鈉、8.2%（w/v）蔗糖、0.010%（w/v）聚山梨醇酯80），pH 5.2的原料藥。因此，將“生理pH應激樣品”暴露於pH和熱緊迫，而“pH對照樣品”僅暴露於熱緊迫。

【0136】對第14天生理pH應激樣品與第0天樣品的HIC-HPLC圖譜的比較顯示前峰和後峰都增加（圖7和表8）。第14天來自生理pH應激樣品和pH對照樣品在大約30分鐘處顯示相似水平的前峰洗脫，這對應於Asp¹⁰⁵異構化變體，表明該異天冬胺酸變體主要由熱緊迫而不是pH驅動。對應於Asn¹⁰²脫醯胺變體的在大約34分鐘處洗脫的前峰在第14天生理pH應激樣品中增加而不在pH對照中增加，表明Asn¹⁰²的脫醯胺主要由pH應激而非熱緊迫驅動。相對於第0天樣品和第14天pH對照樣品，在第14天生理pH應激樣品中還觀察到後峰增加，表明該變化主要由pH應激驅動。

[表8].在pH 7.4和37°C應激的厄瑞努單抗的HIC-HPLC峰面積%

時間點（天）	%前峰	%主峰	%後峰
0	1.6	98.4	0.0
14	6.0	89.7	4.3
14（對照）	5.3	94.7	0.0

【0137】藉由在胰蛋白酶消化後用質譜法（MS）進行的還原肽作圖對在

生理pH和溫度下應激的厄瑞努單抗原料藥的生化修飾進行監測。MS數據的分析顯示重鏈CDR3（Asn¹⁰²）和Fc區（Asn³⁹³和Asn³⁹⁸）中脫醯胺的增加以及重鏈CDR3 Asp¹⁰⁵異構化的量增加（數據未顯示）。重鏈CDR3 Asp¹⁰⁵異構化和Asn¹⁰²脫醯胺增加的水平與在藉由圖7和表8中所示的HIC-HPLC觀察到的前峰和後峰的增加一致。

【0138】 藉由基於細胞的生物測定評估在生理pH和溫度下應激的厄瑞努單抗原料藥的生物學活性。如表9所示，在暴露14天後，生理pH和溫度應激導致了厄瑞努單抗原料藥效力降低。儘管在該等應激條件下觀察到Asn¹⁰²脫醯胺變體和Asp¹⁰⁵異構化變體水平的增加，但僅觀察到適度的效力降低。該結果可能是由於該等脫醯胺變體和異構化變體的總體水平（其占原料藥的約6%）太低而不能顯著影響如藉由基於細胞的生物測定所測量的效力。

[表9].在pH 7.4和37°C下應激的厄瑞努單抗的相對效力

時間點（天）	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
0	94	3
14	86	1

¹3次重複的平均值

高pH暴露

【0139】 藉由用Tris鹼溶液（pH 8.0）稀釋至大約10 mg/mL將厄瑞努單抗原料藥暴露於高pH，並在25°C下孵育14天。將pH對照在25°C下孵育超過14天，該pH對照係稀釋於配製物緩衝液（15 mM乙酸鈉、8.2%（w/v）蔗糖、0.010%（w/v）聚山梨醇酯80），pH 5.2的原料藥。

【0140】 HIC-HPLC分析的結果顯示，相對於第0天樣品和pH對照樣品，由於Asn¹⁰²脫醯胺作用導致的前峰增加以及第14天高pH應激樣品的後峰增加（圖8和表10）。

[表10].在pH 8.0和25°C應激的厄瑞努單抗的HIC-HPLC峰面積%

時間點（天）	%前峰	%主峰	%後峰
0	2.1	97.9	0.0
14	3.6	89.8	6.5
14（對照）	2.6	97.4	0.0

【0141】藉由在胰蛋白酶消化後用MS進行的還原肽作圖對在高pH下應激的厄瑞努單抗原料藥的生化修飾進行監測。與生理pH應激條件一樣，相對於第0天和pH對照樣品，在第14天應激樣品中觀察到在重鏈CDR3中Asn¹⁰²處的以及在Fc區內Asn³⁹³和Asn³⁹⁸處的脫醯胺的增加。藉由基於細胞的生物測定評估在高pH下應激的厄瑞努單抗原料藥的生物學活性。如表11所示，高pH應激對暴露14天後的厄瑞努單抗原料藥的效力具有適度影響。與用生理pH和溫度應激條件獲得的結果類似，存在於應激原料藥中的Asn¹⁰²脫醯胺變體的總水平太低而不能如藉由基於細胞的生物測定所測量的對效力的顯著影響。

[表11].在pH 8.0和25°C下應激的厄瑞努單抗的相對效力

時間點（天）	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
0	89	5
14	79	3

¹3次重複的平均值

【0142】為更好地確定顯著降低厄瑞努單抗原料藥效力所需的Asn¹⁰²脫醯胺變體和Asp¹⁰⁵異構化變體的水平，用獲得自在不同溫度下儲存的不同厄瑞努單抗批次的數據進行模擬效力與HIC-HPLC前峰面積百分比之間關係的統計分析。將厄瑞努單抗批次按5°C（13個批次）、25°C（4個批次）、30°C（4個批次）、或40°C（5個批次）儲存。對於來自5°C儲存條件下的數據，存在6個批次僅一個時間點，和9個批次僅兩個時間點。所有其他儲存條件具有來自至少三個不同時間點的數據。

【0143】將如藉由基於細胞的生物測定法所測量的%相對效力作為四種不

同儲存條件下HIC-HPLC層析圖中前峰的%峰面積的函數作圖，並進行回歸分析（圖9）。確定每個溫度的擬合回歸線的斜率估計值以及針對測試的經調整的p值（以確定斜率是否與零不同）（表12）。對於來自40°C儲存條件的數據的

回歸線的斜率在0.05顯著性水平上與零具有統計學顯著性。基於來自40°C儲存條件的數據的回歸分析，HIC-HPLC前峰面積增加1%導致相對效力降低1.14%。

[表12].相對效力與HIC-HPLC前峰面積百分比的線性回歸參數估計

溫度	斜率	標準誤差	DF	t值	Pr > t	調整的P值
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

【0144】 如藉由基於細胞的生物測定所測量的，在臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥的相對效力大於70%。為估計Asn¹⁰²脫醯胺變體和Asp¹⁰⁵異構化變體（由HIC-HPLC前峰表示）使得厄瑞努單抗原料藥的效力降低到低於臨床試驗可接受水平（70%）的水平，將圖9中所示的40°C儲存條件擬合的回歸線外推以顯示70%相對效力的HIC-HPLC前峰的%面積。如圖10所示，基於擬合的回歸線，針對70%相對效力的% HIC-HPLC前峰面積的預測值為約28.85%。

【0145】 該實例中描述的實驗結果表明，在厄瑞努單抗原料藥中Asn¹⁰²脫醯胺變體水平和/或Asp¹⁰⁵異構化變體水平的增加導致厄瑞努單抗抑制CGRP誘導的CGRP受體激活的效力的喪失。應監測脫醯胺變體和異構化變體的水平並將其控制在原料藥中低於約30%，以保持原料藥的效力達到與臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥相似的水平。在一些實施方式中，原料藥中Asn¹⁰²脫醯胺變體和/或Asp¹⁰⁵異構化變體的較低水平（例如，低於約15%）係所希望的，因

為原料藥中約17%的該等變體導致厄瑞努單抗原料藥的效力顯著降低（參見表6和表7）。

實例3.藉由CEX-HPLC鑒定和表徵厄瑞努單抗電荷變體

【0146】 該實例描述了表現出降低的CGRP受體抑制功能的厄瑞努單抗的另外電荷變體的鑒定和表徵。藉由陽離子交換高效液相層析（CEX-HPLC）評估該實例中厄瑞努單抗的電荷異質性。

【0147】 CEX-HPLC主要基於表面電荷的異質性分離蛋白質；然而，它還可能受到結構異質性和影響與離子交換樹脂的分子相互作用的其他修飾的影響。該方法中的峰洗脫係淨表面電荷的函數，其中帶負電荷的種類早些洗脫，並且帶正電荷的種類晚些洗脫。

【0148】 將厄瑞努單抗原料藥的樣品載入到分析型CEX-HPLC柱（BioPro SP-F，5 μm 粒度，4.6 mm $\times$ 100 mm，YMC美國公司（YMC America, Inc.））上。流動相A包含20 mM磷酸鈉（pH 6.6），並且流動相B由20 mM磷酸鈉、500 mM氯化鈉（pH 6.6）組成。用從0 min至4 min的5%至12%流動相B，在18 min至23%流動相B，在18.5 min至20.5 min至100%流動相B，和在21 min至25 min返回至5%流動相B產生的線性鹽梯度來分離蛋白質。藉由在280 nm處的UV吸光度監測洗脫液。在28°C下操作柱，並以0.6 mL/min的流速將流動相施加到柱上。

【0149】 CEX-HPLC圖譜包含三個不同的區（包括酸性峰、主峰和鹼性峰）（圖11）。分離跨酸性峰、主峰、和鹼性峰區的九種級分。將收集的級分藉由CEX-HPLC再次分析從而表明級分用於表徵係足夠純的。將經分離的級分的CEX-HPLC圖譜和純度分別顯示在圖12和表13中。

[表13].富集的級分的CEX-HPLC峰面積百分比¹

樣品描述	酸性峰				主峰		鹼性峰		
	% F1	% F2	% F3	% F4	% F5	% F6	% F7	% F8	% F9
原料藥	0.7	6.2	10.7	13.4	52.1	5.3	4.8	4.7	2.0
酸性級分 F1	90.7	9.3	—	—	—	—	—	—	—
酸性級分 F2	3.7	80.0	16.4	—	—	—	—	—	—
酸性級分 F3	—	7.5	84.0	8.6	—	—	—	—	—
酸性級分 F4	—	—	17.7	67.6	14.7	—	—	—	—
主級分 F5	—	—	—	7.3	92.7	—	—	—	—
主級分 F6	—	—	—	—	14.5	65.2	20.3	—	—
鹼性級分 F7	—	—	—	—	11.1	27.4	57.3	4.2	—
鹼性級分 F8	—	—	—	—	—	4.6	13.0	77.8	4.6
鹼性級分 F9	—	—	—	—	10.2	2.6	6.4	36.6	44.1

¹從相同的原料藥批次中收集所有的CEX-HPLC級分。目的級分基於收集時間窗，並且將相對純度加粗並加底線。將未檢測的峰用破折號表示。

【0150】 與厄瑞努單抗原料藥相比，藉由實例1中所述基於細胞的生物測定評估每種富集的CEX-HPLC級分的生物學活性。如表14所示，酸性峰級分F1和F2二者顯示出相對於原料藥降低的效力，然而剩餘的酸性峰、主峰、和鹼性峰級分顯示無顯著差異。

[表14].富集的CEX-HPLC級分的效力

樣品描述	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
原料藥	91	13
酸性級分F1	28 ²	3
酸性級分F2	58	14
酸性級分F3	71	20
酸性級分F4	82	18
主級分F5	101	16
主級分F6	92	16
鹼性級分F7	96	7
鹼性級分F8	102	8
鹼性級分F9	98	4

¹3次重複的平均值

²3個重複的其中一個不滿足測定平行標準

【0151】 為了更全面地理解酸性級分中的哪些變體對效力有影響，藉由各種分析技術表徵富集的CEX-HPLC級分，該等技術包括非還原十二烷基硫酸鈉毛細管電泳（nrCE-SDS）、還原十二烷基硫酸鈉毛細管電泳（rCE-SDS）、和非還原反相高效液相層析（RP-HPLC）。

【0152】 藉由nrCE-SDS分析未分級的原料藥和九種CEX-HPLC級分。在十二烷基硫酸鈉（SDS）和N-乙基馬來醯亞胺（pH 6.5）的存在下，藉由加熱使樣品變性，然後在25°C下電動注入填充有SDS凝膠緩衝液的裸熔融二氧化矽毛細管中。在220 nm處監測吸光度。如下表15中所示，相對於原料藥，酸性級分F1在前峰和後峰種類中富集。前峰種類包括分子量低於完整厄瑞努單抗（主峰）的種類，該種類由肽水解或部分分子組裝產生，然而後峰種類相對於主峰尺寸更大。總體而言，前峰種類的相對量在剩餘酸性峰、主峰和鹼性峰級分（即，F2至F9）和原料藥中是一致的，儘管在前峰組內的分佈中觀察到微小差異。

[表15]. 富集的CEX-HPLC級分的nrCE-SDS峰面積百分比

樣品描述	%前峰	%主峰	%後峰
原料藥	2.9	97.1	0.0
酸性級分F1	78.3	20.3	1.4
酸性級分F2	3.5	96.5	0.0
酸性級分F3	3.7	96.3	0.0
酸性級分F4	3.4	96.6	0.0
主級分F5	1.4	98.6	0.0
主級分F6	4.1	95.9	0.0
鹼性級分F7	3.3	96.7	0.0
鹼性級分F8	1.7	98.3	0.0
鹼性級分F9	2.6	96.7	0.7

【0153】 藉由rCE-SDS還分析了厄瑞努單抗原料藥和九種CEX-HPLC級分。rCE-SDS的方法類似於nrCE-SDS的方法，除了在注入毛細管之前在SDS和β-巯基乙醇的存在下藉由加熱使樣品還原和變性。rCE-SDS分析的結果顯示除酸

性峰級分F1之外的所有級分與未分級的原料藥對照相似。酸性峰級分F1顯著富集最可能對應於肽水解片段的LMW和MMW種類（數據未顯示）。酸性峰級分F1和級分F2（較少量）富集對應於非共有糖基化變體的後重鏈。

【0154】 接下來，藉由RP-HPLC，使用Waters BEH300 C4柱（1.7 μm粒
度，2.1 mm × 50 mm）來分析原料藥和CEX-HPLC級分，並且使用含有0.1%
TFA的流動相和1-丙醇的梯度在75°C下進行洗脫。檢測在215 nm處的吸光度。
在CEX-HPLC譜中，觀察到二硫化物同功型富集的趨勢，其中IgG2-B和IgG2-
A/B同功型富集在酸性級分中，而IgG2-A二硫化物同功型富集在主峰和鹼性峰
級分中（圖13和表16）。如實例4中更詳細描述的，IgG2-B二硫化物同功型的
效力顯著低於厄瑞努單抗原料藥或IgG2-A和IgG2-A/B二硫化物同功型。如上所
述，酸性峰級分F1的RP-HPLC圖譜與原料藥層析圖不一致，這很可能是由rCE-
SDS和nrCE-SDS分別觀察到的顯著水平的可還原和共價片段化的結果。

[表16].富集的CEX-HPLC級分的RP-HPLC峰面積百分比

樣品描述	%前峰	% IgG2-B	% IgG2-A/B	% IgG2-A
原料藥	1.5	5.9	36.6	56.0
酸性級分F1	69.1	8.1	11.3	11.5
酸性級分F2	2.3	21.4	40.4	35.8
酸性級分F3	1.2	11.2	55.1	32.4
酸性級分F4	1.1	7.0	52.5	39.4
主級分F5	0.8	2.9	33.9	62.4
主級分F6	2.8	3.9	27.8	65.5
鹼性級分F7	2.1	3.9	28.6	65.4
鹼性級分F8	1.4	2.0	23.3	73.3
鹼性級分F9	1.8	11.0	31.3	55.9

【0155】 該實例中描述的分析結果表明，對應於CEX-HPLC層析圖中的酸
性峰的厄瑞努單抗的某些酸性變體（例如，片段化變體和二硫化物同功型變
體）效力低於厄瑞努單抗原料藥。具體地，酸性級分F1顯示出效力的顯著降

低，這係藉由rCE-SDS和nrCE-SDS檢測的高水平片段化的結果。酸性級分F2也顯示效力降低，這係由於相對於未分級的原料藥，在該級分中富集的IgG2-B二硫化物同功型的水平升高。總之，藉由CEX-HPLC檢測的主要厄瑞努單抗變體包括二硫化物同功型變體，其中IgG2-B和IgG2-A/B同功型在酸性峰中富集。在酸性峰級分中還檢測到脫醯胺、片段化（LMW和MMW）、HMW種類和非共有糖基化變體。

【0156】 藉由CEX-HPLC分析按商業規模製造的厄瑞努單抗原料藥的若干批次（140 mg/mL）來評估如藉由CEX-HPLC層析圖中酸性峰的峰面積百分比所測量的酸性變體（例如，IgG2-B二硫化物同功型）的存在和質量。還藉由基於細胞的效力測定評估原料藥批次的效力，並與批號78137的效力進行比較，該批號78137代表用於II期/III期臨床試驗的厄瑞努單抗原料藥。下表17中提供了數據的匯總。

[表17].針對厄瑞努單抗原料藥批次的CEX-HPLC和效力數據

批號	CEX-HPLC			基於細胞的生物測定
	%主峰	%酸性峰	%鹼性峰	%相對效力
78137（臨床試驗材料）	—	—	—	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

【0157】 如表17中的數據所示，按商業規模製造的厄瑞努單抗原料藥含有如藉由CEX-HPLC酸性峰所測量的從28.7%至31.3%範圍內一致水平的酸性變體。含有在該範圍內的酸性變體水平的原料藥表現出與臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥的效力相當的效力。

實例4.厄瑞努單抗的二硫化物同功型變體

【0158】厄瑞努單抗係IgG2亞類的抗體，並因此可以展示出已經針對IgG2分子描述的二硫化物同功型變體（Dillon 等人, J Chromatogr A.[層析A雜誌], 第1120卷(1-2):112-120, 2006；Wypych 等人, Journal of Biological Chemistry [生物化學雜誌], 第283卷(23):16194-16205, 2008；Dillon 等人, Journal of Biological Chemistry [生物化學雜誌], 第283卷(23):16206-16215, 2008）。使用用於鑒定的與電灑電離串聯質譜法（ESI-MS/MS）偶聯的非還原和還原的Lys-C肽圖闡明在厄瑞努單抗中檢測的二硫鍵的連線性。藉由該方法，闡明了經典IgG2-A結構的預期二硫鍵，以及對應於IgG2-A/B和IgG2-B結構的二硫鍵。

【0159】在非還原和還原條件下使用內切蛋白酶Lys-C藉由肽作圖在原料藥中鑒定二硫鍵連接的肽，如圖14所示。除了吸光度檢測，將反相高效液相層析（RP-HPLC）分離的出口與電灑電離串聯質譜法（ESI-MS/MS）偶聯用於正交質量分析。用還原劑三(2-羧乙基)磷化氫鹽酸鹽（TCEP）處理非還原消化物的一部分，並使用相同的RP-HPLC條件進行分析。

【0160】非還原的Lys-C圖（圖14，頂部跡線）標記有峰“A”至“G”和“a”至“i”，該等在還原條件下消失。還原後該等肽的消失表明它們參與天然蛋白質中的二硫鍵。在非還原Lys-C消化物中包含二硫鍵的肽和在還原的Lys-C消化物中相應的還原肽藉由它們在吸光度層析圖中的存在或不存在來確定，並藉由完整肽質量準確度和診斷型MS/MS產物離子的存在來確認。用於驗證二硫鍵連接的肽的針對所有肽離子的理論和觀察質量分別針對非還原和還原肽圖顯示在表18和表19中。經鑒定的非還原和還原肽解釋了預期的IgG2-A二硫鍵同功型結構，其示意性地顯示在圖15A中。

[表18].在厄瑞努單抗的非還原Lys-C肽圖中鑒定的含有IgG2二硫鍵的肽

峰ID	二硫鍵結合的肽	Cys-Cys連接	元素	理論質量 ^a (Da)	觀察質量 ^a (Da)	質量準確度 (ppm)
A	LH24/LH28	C ³⁷⁶ (H)-C ⁴³⁴ (H)	C _{H3}	4087.9567	4087.9621	1.3
B	LL8/LL14	C ¹³⁸ (L)-C ¹⁹⁷ (L)	C _L	4185.0300	4185.0394	2.3
C	LH14/LH18	C ²⁷⁰ (H)-C ³³⁰ (H)	C _{H2}	4803.2619	4803.2853	4.9
D	LL2/LL5	C ²² (L)-C ⁸⁹ (L)	V _L	7026.2876	7026.3205	4.7
E	LH12/LH12	C ²³² (H)-C ²³² (H [^])	IgG2-A的鉸鏈	4900.2590	4900.2585	0.1
E'	LH12/LH12LH13	C ²³³ (H)-C ²³³ (H [^])	IgG2-A的鉸鏈	5125.4068	5125.4065	0.1
E''	LH12LH13/LH12LH13	C ²³⁶ (H)-C ²³⁶ (H [^]) C ²³⁹ (H)-C ²³⁹ (H [^])	IgG2-A的鉸鏈	5350.5545	5350.5741	3.7
F	LH7/LH8LH9/LL15	C ¹⁴⁴ (H)-C ²¹⁵ (L) C ¹⁵⁷ (H)-C ²¹³ (H)	HC-LC之間和C _{H1}	10084.8384	10084.8556	1.7
G	LH1/LH5 (pE)	C ²² (H)-C ⁹⁶ (H)	V _H	9002.3068	9002.3306	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 /L15	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 [^])	IgG2-A/B	14995.0 ^b	14995.1 ^b	10.2

峰ID	二硫鍵結合的肽	Cys-Cys連接	元素	理論質量 ^a (Da)	觀察質量 ^a (Da)	質量準確度 (ppm)
		C ²³⁹ (H)- C ²³⁹ (H [^])				
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

^a除非另有說明，質量係單一同位素的。

^b平均質量

H = 重鏈；L = 輕鏈；^ = 其他重鏈或輕鏈；/ = 單一二硫鍵；LL = Lys-C消化的輕鏈肽；LH = Lys-C消化的重鏈肽；pE = LH1上N-末端Gln殘基的焦麩胺酸；Cys殘基編號相對於SEQ ID NO: 1（對於重鏈）和SEQ ID NO: 2（對於輕鏈）

[表19].在厄瑞努單抗的還原Lys-C肽圖中鑒定的含有半胱胺酸的肽

Lys-C 肽	胺基酸殘基 ^a	半胱胺酸位置 ^a	理論質量 ^b (Da)	觀察質量 ^b (Da)	質量準確度 (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
LH12H	C ²³² -K ²⁵⁷		2679.3086	2679.3132	1.8

Lys-C 肽	胺基酸殘基 ^a	半胱胺酸位置 ^a	理論質量 ^b (Da)	觀察質量 ^b (Da)	質量準確 度 (ppm)
13					
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胺基酸殘基編號相對於SEQ ID NO: 1（對於重鏈肽）和SEQ ID NO: 2（對於輕鏈肽）

^b質量係單一同位素的

— 不適用；LL = Lys-C消化的輕鏈肽；LH = Lys-C消化的重鏈肽；ND = 未檢測到；pE = LH1上N-末端Gln殘基的焦麩胺酸

【0161】 Lys-C肽作圖揭示了次要的二硫鍵連接的肽峰，該等肽峰對應於鉸鏈肽與分子的其他區之間的二硫鍵對的異質性。除了圖14中標記的主要的二硫鍵連接的肽峰之外，在非還原圖中存在次要的晚洗脫峰（“a”至“i”），該等洗脫峰在還原圖中是不存在的，表明它們涉及天然蛋白質中的二硫鍵。該等晚洗脫的肽藉由質譜法鑒定為針對已知的IgG2的結構同功型的鏈間二硫鍵結合的肽（Wypych等人, Journal of Biological Chemistry [生物化學雜誌], 第283卷(23):16194-16205, 2008；Dillon等人, Journal of Biological Chemistry [生物化學雜誌], 第283卷(23):16206-16215, 2008；和Zhang等人., Anal Chem. [分析化學], 第82卷(3):1090-1099, 2010）。肽“a,” “b,” “d,” 和“e”對應於結構同功型IgG2-B，然而肽“c,” “f,” 和“i”對應於結構同功型IgG2-A/B。IgG2-A/B和IgG2-B二硫化物同功型結構的示意圖分別描繪於圖15B和15C中。用於驗證

IgG2-A/B和IgG2-B二硫鍵連接的肽的所有肽離子的理論質量和觀察質量顯示在表18中。分析表明，厄瑞努單抗的二硫鍵與先前觀察到的IgG2抗體的二硫鍵相一致（Wypych等人, 2008；Dillon等人, 2008；和Zhang等人, 2010）。

【0162】如上所述，肽作圖顯示存在二硫鍵連接的肽（對於主要的IgG2-A結構），以及具有與另外的IgG2-A/B和IgG2-B二硫鍵結構同功型相關聯的連線性的肽。如圖15所示，在IgG2-B同功型中，兩個Fab臂都與鉸鏈區連接，而在IgG2-A同功型中，Fab臂都不與鉸鏈連接。IgG2-A/B同功型係這兩種形式之間的雜合體，其中僅一個Fab臂與鉸鏈二硫鍵連接。先前已經報導了藉由非還原反相高效液相層析（RP-HPLC）分離IgG2二硫化物同功型（Wypych等人, 2008和Dillon等人, 2008）。在該等研究中，在RP-HPLC峰級分中鑒定出對應於二硫鍵同功型A、A/B和B的肽（Wypych等人, 2008和Dillon等人, 2008）。藉由非還原RP-HPLC分析的厄瑞努單抗原料藥的代表性圖譜顯示在圖16A中，其中標記的二硫化物同功型峰與由Wypych等人, 2008報導的洗脫順序一致。晚洗脫峰被鑒定為IgG2-A同功型，並針對報告相對百分比與IgG2-A峰歸組。在厄瑞努單抗原料藥中二硫化物同功型的相對水平係大約59.5% IgG2-A、34.7% IgG2-A/B、和4.4% IgG2-B，其中大約1.5%係早期洗脫前峰種類。

【0163】儘管非還原RP-HPLC係用於測定二硫化物同功型變體相對量的有效方法，但流動相和分離條件與用於測定厄瑞努單抗抑制效力的基於細胞的生物測定不相容。因此，如實例3所述從半製備型CEX-HPLC中收集富集二硫化物同功型的級分，並使用實例1所述的基於細胞的生物測定測試效力。相對於原料藥，如以下詳細的描述，分析富集二硫化物同功型IgG2-A、IgG2-A/B、和IgG2-B的三種CEX-HPLC級分（表16和圖13A）的效力。藉由非還原RP-HPLC，分析富集的IgG2-A、IgG2-B、和IgG2-A/B二硫化物同功型CEX-HPLC

級分以在效力評估之前確認足夠的純度。相對於未分級的原料藥，三種CEX-HPLC收集的級分的RP-HPLC疊加顯示在圖16B中，並且將RP-HPLC二硫化物同功型分佈數據提供在表20中。

[表20].CEX-HPLC純化的級分的非還原RP-HPLC相對面積%¹

富集 IgG2 同功型的樣品 (CEX-HPLC 級分)	%相對面積		
	IgG2-B	IgG2-A/B	IgG2-A
IgG2-A (F5)	2.9	33.9	<u>62.4</u>
IgG2-A/B (F4)	7.0	<u>52.5</u>	39.4
IgG2-B (F2)	<u>21.4</u>	40.4	35.8
原料藥	5.9	36.6	56.0

¹從相同的原料藥批次中收集所有的CEX-HPLC級分。將來自每種收集的CEX-HPLC級分的目的同功型的純度加粗並加底線。

【0164】 如表21所示，富集IgG2-A和IgG2-A/B的同功型級分的相對效力類似於厄瑞努單抗原料藥的相對效力。然而，相對於原料藥和富集的IgG2-A/B和IgG2-A同功型級分，富集IgG2-B二硫化物同功型的級分顯示出顯著降低的效力。

[表21].厄瑞努單抗二硫化物同功型的效力

樣品描述	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
原料藥 ²	91	13
富集IgG2-B的級分	58	14
富集IgG2-A/B的級分	82	18
富集IgG2-A的級分	101	16

¹3次重複的平均值

²原料藥批次，從其純化富集二硫化物同功型的級分

【0165】 該等數據表明，厄瑞努單抗鉸鏈區中二硫鍵的結構構象對於抗體的生物活性係重要的。特別是，原料藥中IgG2-B二硫化物同功型水平的升高顯著影響抑制效力。對按商業規模製造的若干批次的厄瑞努單抗原料藥的分析表明原料藥中IgG2-B二硫化物同功型的水平一致，如藉由非還原RP-HPLC所測

量的該水平在從4.6%至5.2%的範圍內。在該等厄瑞努單抗原料藥批次中IgG2-A/B和IgG2-A二硫化物同功型的水平也與在從34.2%至35.5%範圍內的IgG2-A/B水平和從57.4%至59.3%範圍內的IgG2-A水平相一致。

實例5.厄瑞努單抗尺寸變體的鑒定和表徵

【0166】 該實例描述了表現出降低的CGRP受體抑制功能的厄瑞努單抗的尺寸變體的鑒定和表徵。厄瑞努單抗的尺寸變體可以包括高分子量（HMW）種類和低分子量（LMW）種類。HMW種類係比單體更大的種類（例如，二聚體和更高級的低聚種類）可以藉由非共價締合、可還原性共價締合、和/或非可還原性共價締合形成。LMW種類可以藉由多肽主鏈的片段化和/或亞基成分（例如輕鏈和重鏈）的不完整組裝而產生。

【0167】 在該實施方式中，藉由SE-UHPLC評估了厄瑞努單抗的尺寸異質性。SE-UHPLC主要基於流體力學體積的差異來分離蛋白質。SE-UHPLC方法在非還原性、非變性條件下進行，以評估在天然條件下厄瑞努單抗的尺寸分佈。將厄瑞努單抗原料藥的樣品載入到分析型SE-UHPLC柱（BEH200柱，1.7 μm 粒度，4.6 mm $\times$ 150 mm，沃特斯公司（Waters Corporation））上，並且使用包含100 mM磷酸鈉、250 mM氯化鈉（pH 6.8）的流動相等度分離蛋白質。藉由在280 nm處的UV吸光度監測洗脫液。在環境溫度下操作柱，並以0.4 mL/min的流速將流動相施加到柱上。

【0168】 在厄瑞努單抗原料藥的SE-UHPLC圖譜中存在明顯的三個不同的區，如在圖17A和17B中所示包括主要的單體（主峰）峰和低水平的HMW（前峰）以及LMW（後峰）。收集來自前峰、主峰和後峰區的級分，並對級分中分離的變體進行表徵。SE-UHPLC的HMW峰（圖17B）由兩個未完全解析的種類構成，並因此被收集為分別代表HMW峰的前緣和尾緣的兩個獨立級分。使

用半製備型SE-HPLC分離兩個HMW峰和主峰，然後藉由分析型SE-HPLC進一步富集。在表徵分析之前，使用分子量截止過濾器對經收集的HMW和主峰級分進行濃縮，並將緩衝液交換到15 mM乙酸鈉（pH 5.2）中。由SE-UHPLC進行的LMW峰組（圖17B）由兩個小峰構成，該等小峰的總和低於原料藥中0.3%的測定定量限。如下文更詳細描述的，使用分析型SE-UHPLC分離和富集LMW峰組，並進行有限的表徵測試。

SE-UHPLC HMW級分的表徵

【0169】 分別在圖 18和表 22中顯示的分離的HMW和主峰級分的SE-UHPLC圖譜和純度表明該等級分具有足夠的純度用於表徵。

[表22].富集的級分的SE-UHPLC峰面積百分比¹

樣品描述	% HMW	%主峰	% LMW
原料藥	0.5	99.2	< 0.3 ²
SE-UHPLC級分HMW 1	93.9	6.1	< 0.3 ²
SE-UHPLC級分HMW 2	53.9	45.9	< 0.3 ²
SE-UHPLC主級分	< 0.3 ²	99.7	< 0.3 ²

¹從相同的原料藥批次中收集所有的SE-UHPLC級分。

²LOQ = 0.3%

【0170】 藉由各種分析技術表徵圖18和表22中富集的HMW和主峰級分，該等技術包括具有靜態光散射檢測的SE-UHPLC、還原十二烷基硫酸鈉毛細管電泳（rCE-SDS）、非還原十二烷基硫酸鈉毛細管電泳（nrCE-SDS）、和基於細胞的生物測定。

【0171】 藉由具有靜態光散射檢測的SE-HPLC（SE-HPLC-SLS）分析HMW和主峰級分連同未分級的原料藥以確定每個層析圖中主要峰的莫耳質量。使用Agilent 1100 HPLC系統進行SE-HPLC-SLS分析。該柱係TSK-GEL G3000SWx1，5 μm粒度，7.8 mm ID x 300 mm長柱（Tosoh Biosep）。使用的檢

測器係Wyatt Heleos II光散射檢測器、Wyatt Optilab rEX RI檢測器、和Agilent UV檢測器，其中波長設定在280 nm處。SE-HPLC運行在室溫下進行，其中將100 mM磷酸鉀、250 mM氯化鉀、pH 6.8緩衝液用作流動相，且流速為0.5 mL/min。注射體積為4.3 µL以注射300 µg的蛋白質。對於分子量（MW）計算，使用LS（光散射）和RI（折射率）訊號以及0.185的樣品折射增量（dn/dc）值。

【0172】 來自主峰級分的單體（包含2條重鏈和2條輕鏈的完整抗體）的所測量的質量係149 kDa，並且來自原料藥對照的單體質量係143 kDa，這兩者與厄瑞努單抗單體的理論質量（148.8 kDa）相一致（表23）。兩種HMW富集級分（HMW1和HMW2）的HMW峰的所測量的質量分別為292 kDa和279 kDa，兩者均與厄瑞努單抗二聚體的分子量（297.6 kDa）一致（表23）。該等數據表明富集HMW1和HMW2二者的級分主要由厄瑞努單抗二聚體構成。

[表23].富集的HMW和主峰級分的SE-HPLC-SLS測量的莫耳質量

樣品描述	% HMW	HMW的 MW (kDa)	%主峰	主峰的MW (kDa)
原料藥	0.6	297	97.4	143
SE-UHPLC級分HMW 1	93.1	292	6.9	210
SE-UHPLC級分HMW 2	76.2	279	23.8	178
SE-UHPLC主級分	0.4	ND	99.6	149

【0173】 根據實例3所述的方法，藉由nrCE-SDS對富集的級分和未分級的原料藥的分析表明兩種HMW級分在後峰係富集的，對應於比單體（主峰）更大的共價高分子量種類，並且具有與對照相當的前峰面積（表24）。

[表24].富集的SE-UHPLC級分的nrCE-SDS峰面積百分比¹

樣品描述	%前峰	%主峰	%後峰
原料藥	2.7	97.3	0.0
SE-UHPLC級分HMW 1	4.3	31.4	64.3
SE-UHPLC級分HMW 2	5.1	39.9	54.9
SE-UHPLC主級分	2.7	97.3	0.0

¹從相同的原料藥批次中收集所有的SE-UHPLC級分。

【0174】 非共價和共價二聚體的比例可藉由比較在天然條件下富集的級分的純度與變性條件下富集級分的純度來估計。在比較天然條件下的二聚體水平（在表22中SE-UHPLC: % HMW）與變性條件下的共價二聚體水平（在表24中nrCE-SDS: %後峰）中，可以在天然原料藥中估計共價二聚體的水平。基於該比較，厄瑞努單抗原料藥中大多數天然二聚體種類與約68%的HMW 1二聚體種類共價，並且幾乎所有的HMW 2二聚體在變性測試條件下保留。

【0175】 根據實例3所述的方法藉由rCE-SDS還分析了厄瑞努單抗原料藥和富集的HMW種類和主峰級分。如圖19所示，rCE-SDS分析的結果顯示相對於原料藥，HMW 1和HMW 2級分均富集中等分子量（MMW）和高分子量（HMW）種類。類似於共價和非共價二聚體種類水平的評估，可以將rCE-SDS用於估計原料藥中可還原和非可還原二聚體種類的水平。在對天然條件下的二聚體水平（SE-UHPLC: % HMW）與還原和變性條件下的非可還原性二聚體水平（rCE-SDS: % HMW）的比較中，可以在天然原料藥中估計非可還原性二聚體的水平。基於表25中所示的比較，厄瑞努單抗原料藥中大多數天然二聚體種類可被還原，其中大約87%的HMW 1二聚體種類和約93%的HMW 2二聚體種類在還原和變性條件下還原成單組分。

[表25].對厄瑞努單抗原料藥（DS）中可還原性和非可還原性二聚體的估計

樣品描述	藉由SE-UHPLC 的% HMW	藉由rCE- SDS的% HMW	在起始DS 中的%可還 原性二聚體	在起始DS 中的%非可 還原性二 聚體
SE-UHPLC級分HMW 1	93.9	12.5	87	13
SE-UHPLC級分HMW 2	53.9	3.8	93	7

【0176】 與厄瑞努單抗原料藥相比，藉由實例1中所述的基於細胞的生物測定評估富集的SE-UHPLC級分的生物學活性。如表26所述，HMW 1和HMW 2富集的級分二者顯示出相對於原料藥和相對於富集的主峰降低的效力。如上所述，該等級分中HMW種類的顯著部分係共價連接的且不可解離的。自締合施加空間限制，這可能導致構象變化，該構象變化反過來可能影響分子與CGRP受體靶的結合，從而解釋觀察到的效力降低。

[表26].富集的SE-UHPLC級分的效力

樣品描述	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹	% CV
原料藥	96	2
SE-UHPLC級分HMW 1	42	7
SE-UHPLC級分HMW 2	62	6
SE-UHPLC主級分	97	4

¹3次重複的平均值

SE-UHPLC LMW級分的表徵

【0177】 藉由SE-UHPLC在單一級分中收集LMW峰（圖17B），並使用分子量截止過濾器進行濃縮，然後表徵分析。在SE-UHPLC上重新注入LMW級分顯示LMW種類富集至約34.4%（數據未顯示）。藉由在非還原條件下的全質量分析來對經收集的富集LMW級分進行分析，以表徵LMW種類的性質。

【0178】 使用與電灑離子化飛行時間質譜法偶聯的RP-HPLC，在天然、非還原條件下，藉由質譜法分析來確定富集的LMW級分的質量。分析結果表明，相對於未分級的原料藥，經收集的LMW級分富集共價連接的輕鏈二聚體

(LC-LC)。

【0179】 該實例描述的分析結果表明，厄瑞努單抗在非變性條件下藉由SE-UHPLC主要作為包含2條重鏈和2條輕鏈（約99.2%的原料藥）的完整抗體以其預期的單體形式存在。剩餘部分由HMW種類（0.5%的原料藥）組成，主要由二聚體以及痕量水平的LMW種類組成。沒有觀察到更高級的低聚物。相對於厄瑞努單抗的單體形式，富集HMW種類的厄瑞努單抗原料藥的SE-UHPLC級分表現出降低的抑制效力。

【0180】 厄瑞努單抗二聚體主要由共價連接的單體亞基構成，並且在變性條件下不會解離。大多數二聚體係可還原性的，在還原和變性條件下轉變為重鏈和輕鏈組分，並且因此藉由二硫鍵結合。非可還原性種類作為共價二聚體的次要組分存在，藉由rCE-SDS在重鏈峰之後遷移。SE-UHPLC LMW峰的表徵顯示待富集輕鏈二聚體的峰。

【0181】 藉由SE-UHPLC分析按商業規模製造的若干批次的厄瑞努單抗原料藥（140 mg/mL）來評估如藉由SE-UHPLC層析圖中HMW和LMW峰的峰面積百分比所測量的尺寸變體（例如，HMW和LMW種類）的存在和質量。還藉由基於細胞的效力測定評估原料藥批次的效力，並與批號78137的效力進行比較，該批號78137代表用於II期/III期臨床試驗的厄瑞努單抗原料藥。以下表27提供了數據的匯總。

[表27].針對厄瑞努單抗原料藥批次的SE-UHPLC和效力數據

批號	SE-UHPLC			基於細胞的生物測定
	%主峰	% HMW	% LMW	%相對效力
78137（臨床試驗材料）	—	—	—	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

	SE-UHPLC			基於細胞的生物測定
批號	%主峰	% HMW	% LMW	%相對效力
63133	99.3	0.6	< 0.3	96
63134	99.2	0.6	< 0.3	101

【0182】 如表27中的數據所顯示，按商業規模製造的厄瑞努單抗原料藥包含如藉由SE-UHPLC測量的一致水平的約0.6% HMW種類。含有該水平的HMW種類的原料藥表現出與臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥的效力相當的效力。

【0183】 將表27中三個批次的原料藥（63131、63132、和63133）在25°C下儲存三個月，並且使該等樣品經歷SE-UHPLC分析和效力測試以評估由於尺寸變體隨著時間的變化水平對原料藥效力的任何影響。該穩定性研究的結果如表28所示。

[表28].在25°C下儲存的厄瑞努單抗原料藥批次的SE-UHPLC和效力數據

	3個月的SE-UHPLC			3個月的基於細胞的生物測定
批號	%主峰	% HMW	% LMW	%相對效力
63131	98.3	1.4	0.3	90
63132	98.2	1.5	0.3	94
63133	98.1	1.6	0.3	86

【0184】 含有高達1.6%的HMW種類水平的原料藥具有與臨床試驗中使用的厄瑞努單抗原料藥相當的效力。

【0185】 為了評估厄瑞努單抗在熱緊迫條件下形成尺寸變體的敏感性，將厄瑞努單抗原料藥在50°C下孵育14天。在研究持續期間的不同時間點取出樣品並冷凍。在最後的時間點後，將所有樣品並行分析以最小化分析變異性。藉由根據上述方法的SE-UHPLC和藉由實例1所述基於細胞的生物測定評估樣品。

【0186】 圖20顯示了在50°C下應激的厄瑞努單抗原料藥在第0天和第14天樣品的天然SE-UHPLC圖譜。圖20中顯示的峰的相對峰面積%連同藉由基於細

胞的生物測定法評估的樣品的%相對效力示於表29中。HMW種類係顯示出超過14天的增加、在主峰中相應減少的主要降解物。產生的HMW種類主要由高級聚集體（高於二聚體的HMW種類）構成。在第14天也觀察到LMW種類的增加。厄瑞努單抗原料藥的熱緊迫樣品顯示出顯著降低的效力。降低的效力主要是由於HMW種類的增加以及Asp¹⁰⁵異構化變體的增加，該異構化變體在厄瑞努單抗原料藥的熱緊迫樣品中也增加（參見實例2）。

[表29].在50°C下應激的厄瑞努單抗的SE-UHPLC峰面積%和相對效力

時間點（天）	% HMW	%主峰	% LMW	藉由基於細胞的生物測定的%相對效力 ¹ （%CV）
0	0.5	99.1	0.4	93 (4)
14	9.6	88.2	2.2	71 (7)

¹3次重複的平均值

【0187】 對按商業規模製造的另外的厄瑞努單抗原料藥批次進行另外的熱緊迫研究。將表27中三個批次的原料藥（63131、63132、和63133）在40°C下儲存長達30天，並且使該等樣品經歷SE-UHPLC分析和基於細胞的效力測試以進一步評估由於尺寸變體隨著時間的變化水平對原料藥效力的任何影響。將該熱緊迫研究的結果示出在表30中。

[表30].在40°C下儲存的厄瑞努單抗原料藥批次的SE-UHPLC和效力數據

批號	在40°C的天數	SE-UHPLC			基於細胞的生物測定
		%主峰	% HMW	% LMW	%相對效力
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

【0188】 該研究的結果顯示了隨著HMW和LMW種類的增加，效力降低

的一般趨勢。特別是，原料藥中高於約2.5%的HMW種類的水平與原料藥效力的降低相關聯。值得注意的是，63132批次的30天樣品未顯示效力降低，然而，這可能是由於基於細胞的生物測定的可變性。

【0189】 本文討論和引用的所有出版物、專利案和專利申請案均藉由引用以其全部內容併入本文。應理解，揭露的發明不限於所描述的特定方法、方案和材料，因為該等可以變化。還應理解，本文使用的術語僅用於描述特定實施方式的目的，並且不意圖限制所附申請專利範圍的範圍。

【0190】 熟悉該項技術者只使用常規實驗就將認識到或能夠確定本文描述發明的具體實施方式的許多等效形式。此類等效物旨在由以下申請專利範圍所涵蓋。

【符號說明】

【0191】 無

【生物材料寄存】

【0192】 無

【序列表】

<110> 美商安進公司(AMGEN INC.)

<120> 厄瑞努單抗組成物及其用途

<130> A-2190-WO-PCT

<140> TW 108111646

<141> 2019-04-02

<150> US 62/651,651

<151> 2018-04-02

<160> 6

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

95

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

- <210> 2
- <211> 216
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 2

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Thr Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
 85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180					185					190					
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys
195					200					205					
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								
210					215										
<210> 3															
<211> 455															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成多肽															
<220>															
<221> 經修飾的殘基															
<222> (1)..(1)															
<223> 焦麩胺酸殘基															
<400> 3															
Xaa	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1	5				10					15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
20				25					30						
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35				40					45						
Ala	Val	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ser	Val	Asp	Ser	Val
50				55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65	70				75					80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90					95						

Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	His	Tyr	
			100					105						110		
Lys	Tyr	Tyr	Gly	Met	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	
			115					120					125			
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	
			130				135					140				
Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	
145					150					155					160	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
				165					170					175		
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
			180					185						190		
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	
		195					200					205				
Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	
		210				215					220					
Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
225					230					235				240		
Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
				245					250					255		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
			260				265						270			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
		275					280				285					
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	

290	295	300
Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln		
305	310	315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
	325	330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro		
	340	345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
	355	360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	370	375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	385 390	395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	405	410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
	420	425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	435	440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	450	455

<210> 4
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> 經修飾的殘基
<222> (1)..(1)
<223> 焦麩胺酸殘基

<400> 4

Xaa Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Thr Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165

170

175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180185190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195200205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210215

<210> 5

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

202530

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val

505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65707580

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr

100					105					110					
Lys	Tyr	Tyr	Gly	Met	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
115					120					125					
Ser	Ser														
130															
<210> 6															
<211> 110															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成多肽															
<400> 6															
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn
			20						25					30	
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
			35					40				45			
Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln
65					70					75				80	
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Ser	Arg	Leu
				85						90				95	
Ser	Ala	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
		100						105				110			

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種組成物，其包含：

(i) 厄瑞努單抗(erenumab)，其中厄瑞努單抗包含兩條重鏈及兩條輕鏈，各該重鏈具有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之序列且各該輕鏈具有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之序列；

(ii) 厄瑞努單抗異構化變體，其中該異構化變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置105處具有異天冬胺酸殘基或琥珀醯亞胺；及

(iii) 厄瑞努單抗脫醯胺變體，其中該脫醯胺變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置102處具有天冬胺酸殘基、琥珀醯亞胺或異天冬胺酸殘基，並且其中該組成物中該異構化變體及脫醯胺變體的量藉由疏水性相互作用層析-高效液相層析（HIC-HPLC）確定為1%至15%。

【第2項】

如請求項1之組成物，其中該組成物中該異構化變體及脫醯胺變體的量係從1%至10%。

【第3項】

如請求項1之組成物，其中該組成物中該異構化變體及脫醯胺變體的量係從1%至4%。

【第4項】

一種組成物，其包含厄瑞努單抗及一種或多種厄瑞努單抗變體，其中厄瑞努單抗包含兩條重鏈及兩條輕鏈，各該重鏈具有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之序列且各該輕鏈具有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之序

列，其中該等厄瑞努單抗變體包括異構化變體、脫醯胺變體、酸性變體、HMW種類、或其組合，其中該組成物具有以下全部特徵：

(a) 藉由CEX-HPLC所測量，該組成物中酸性變體的量係從25%至38%；

(b) 藉由SE-UHPLC所測量，該組成物中HMW種類的量係2.1%或更少；以及

(c) 藉由HIC-HPLC中的前峰所測量，該組成物中異構化變體及脫醯胺變體的量係8%或更少，其中該異構化變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置105處具有異天冬胺酸殘基或琥珀醯亞胺，且該脫醯胺變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置102處具有天冬胺酸殘基、琥珀醯亞胺或異天冬胺酸殘基。

【第5項】

如請求項4之組成物，其中該組成物具有以下全部特徵：

(a) 藉由CEX-HPLC所測量，該組成物中酸性變體的量係從26.5%至33.6%；

(b) 藉由SE-UHPLC所測量，該組成物中HMW種類的量係1.2%或更少；以及

(c) 藉由HIC-HPLC中的前峰所測量，該組成物中異構化變體及脫醯胺變體的量係3.2%或更少。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之組成物，其中厄瑞努單抗之各重鏈具有SEQ ID NO: 1之序列，且厄瑞努單抗之各輕鏈具有SEQ ID NO: 2之序列。

【第7項】

如請求項1至5中任一項之組成物，其中厄瑞努單抗之各重鏈具有SEQ ID NO: 3之序列，且厄瑞努單抗之各輕鏈具有SEQ ID NO: 4之序列。

【第8項】

一種藥物配製物，該藥物配製物包含如請求項1至7中任一項之組成物，及一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

【第9項】

如請求項8之藥物配製物，其中該配製物包含70 mg/mL之厄瑞努單抗組成物、25 mM乙酸鹽、7.3% (w/v) 蔗糖、及0.010% (w/v) 聚山梨醇酯，其中該配製物具有pH為 5.2 ± 0.2 。

【第10項】

如請求項8之藥物配製物，其中該配製物包含140 mg/mL之厄瑞努單抗組成物、34 mM乙酸鹽、6.5% (w/v) 蔗糖、及0.010% (w/v) 聚山梨醇酯，其中該藥物配製物具有pH為 5.2 ± 0.2 。

【第11項】

一種預填充式注射器或自動注射器，其包含如請求項8至10中任一項之藥物配製物。

【第12項】

如請求項11之預填充式注射器或自動注射器，其中該注射器或自動注射器的注射體積為1 mL。

【第13項】

一種如請求項1至7中任一項之厄瑞努單抗組成物或如請求項8至10中

任一項之藥物配製物之用途，其係用於製備在有需要的患者中治療、預防或減少偏頭痛發生的藥物。

【第14項】

如請求項13之用途，其中該偏頭痛係陣發性偏頭痛或慢性偏頭痛。

【第15項】

一種製備包含厄瑞努單抗組成物之藥物配製物之方法，該方法包括：

(i) 獲得包含厄瑞努單抗及厄瑞努單抗異構化及脫醯胺變體的經部分純化之組成物，其中厄瑞努單抗包含兩條重鏈及兩條輕鏈，各該重鏈具有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之序列且各該輕鏈具有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之序列；

(ii)藉由HIC-HPLC測量該經部分純化之組成物中該異構化及脫醯胺變體之量，其中該異構化變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置105處具有異天冬胺酸殘基或琥珀醯亞胺，且該脫醯胺變體於厄瑞努單抗的任一條重鏈或兩條重鏈之胺基酸位置102處具有天冬胺酸殘基、琥珀醯亞胺或異天冬胺酸殘基；

(iii) 將該異構化及脫醯胺變體的測定量與預定參考標準比較，其中該預定參考標準的範圍係從1%至10%；以及

(iv) 如果該比較顯示符合該預定參考標準，則將該厄瑞努單抗組成物與一種或多種賦形劑組合以製備該藥物配製物。

【第16項】

如請求項15之方法，其中如果該步驟(iii)中的比較指出該預定參考標準未被滿足，則該方法進一步包括使該厄瑞努單抗組成物進行疏水性相互作用層析以減少該異構化及脫醯胺變體的量以滿足該預定參考標準，以產

生經再處理之厄瑞努單抗組成物並且隨後將該經再處理之厄瑞努單抗組成物與一種或多種賦形劑組合以製備該藥物配製物。

【第17項】

如請求項15或16之方法，其中該預定參考標準的範圍係從1%至4%。

【第18項】

如請求項15或16之方法，其中經部分純化之組成物係來自陽離子交換層析材料的洗脫池。

【第19項】

如請求項15或16之方法，其中該經部分純化之組成物係來自中國倉鼠卵巢（CHO）細胞系的細胞培養物收穫物，該細胞系表現編碼SEQ ID NO: 1之重鏈的核酸及編碼SEQ ID NO: 2之輕鏈的核酸。

【第20項】

如請求項15或16之方法，其中厄瑞努單抗之各重鏈具有SEQ ID NO: 3之序列，且厄瑞努單抗之各輕鏈具有SEQ ID NO: 4之序列。

【第21項】

如請求項15或16之方法，其中該與厄瑞努單抗組成物組合的一種或多種賦形劑包括乙酸鹽、蔗糖及聚山梨醇酯。

【發明圖式】

厄瑞努單抗重鏈的胺基酸序列

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51 ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 LNYYDSSGYY HYKYYGMAVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
151 STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 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)

【圖 1A】

厄瑞努單抗輕鏈的胺基酸序列

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY
51 DNNKRPSGIP DRFSGSKSGT STTLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSRLSAVV
101 FGGGTKLTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV
151 AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT
201 HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO: 2)

【圖 1B】

具有翻譯後修飾的厄瑞努單抗重鏈序列

1 pEVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51 ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDR
101 LNYYDSSGYY HYKYYGMAVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
151 STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
201 VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECPCP 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)

【圖 1C】

具有翻譯後修飾的厄瑞努單抗輕鏈序列

1 pESVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY
51 DNNKRPSGIP DRFSGSKSGT STTLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSRLSAVV
101 FGGGTKLTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV
151 AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT
201 HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO: 4)

【圖 1D】

厄瑞努單抗重鏈可變區的胺基酸序列

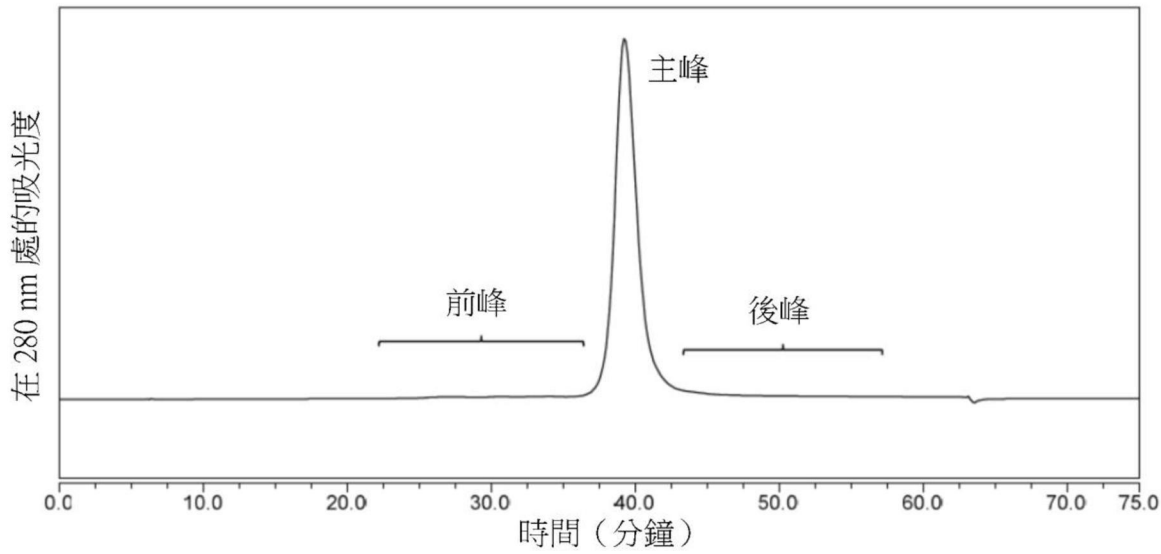
1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
51 ISFDGSIKYS VDSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDDR
101 LNYYDSSGYY HYKYYGMAVW GQGTITVTSS (SEQ ID NO: 5)

【圖 1E】

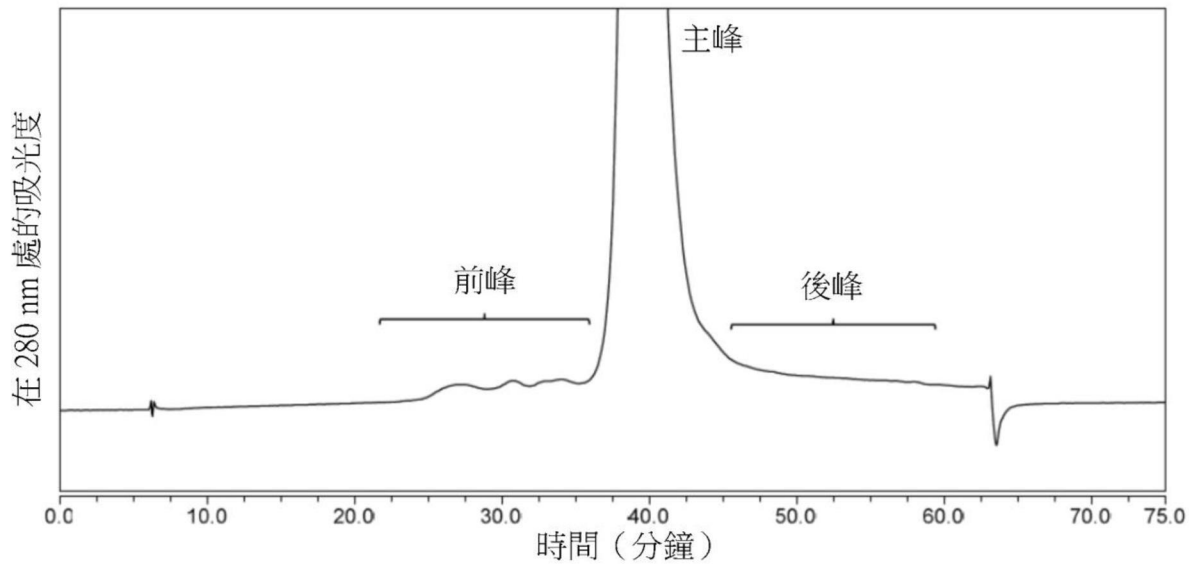
厄瑞努單抗輕鏈可變區的胺基酸序列

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

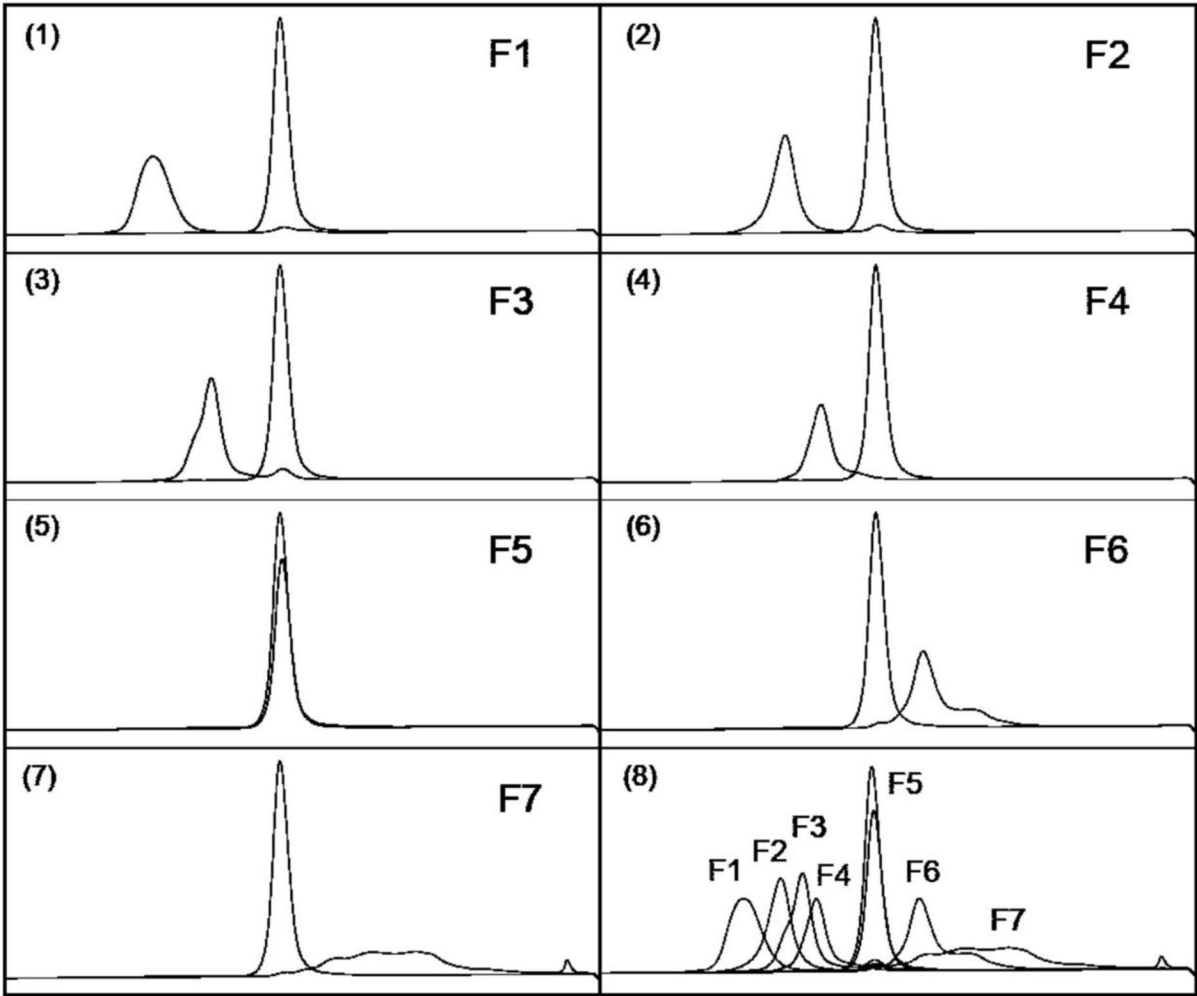
【圖 1F】



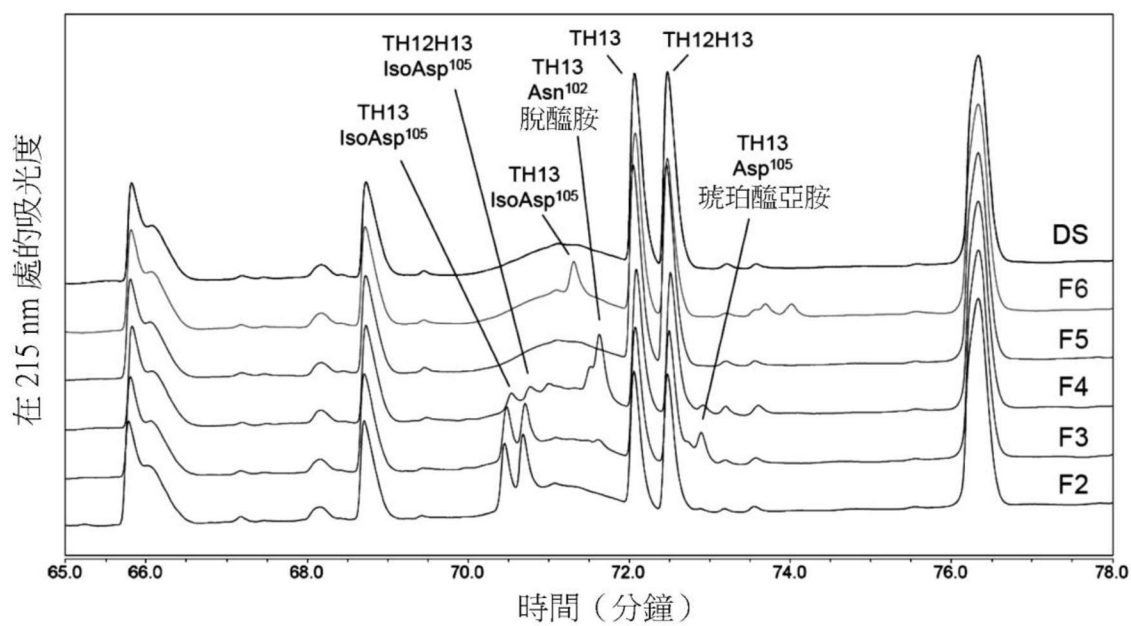
【圖 2A】



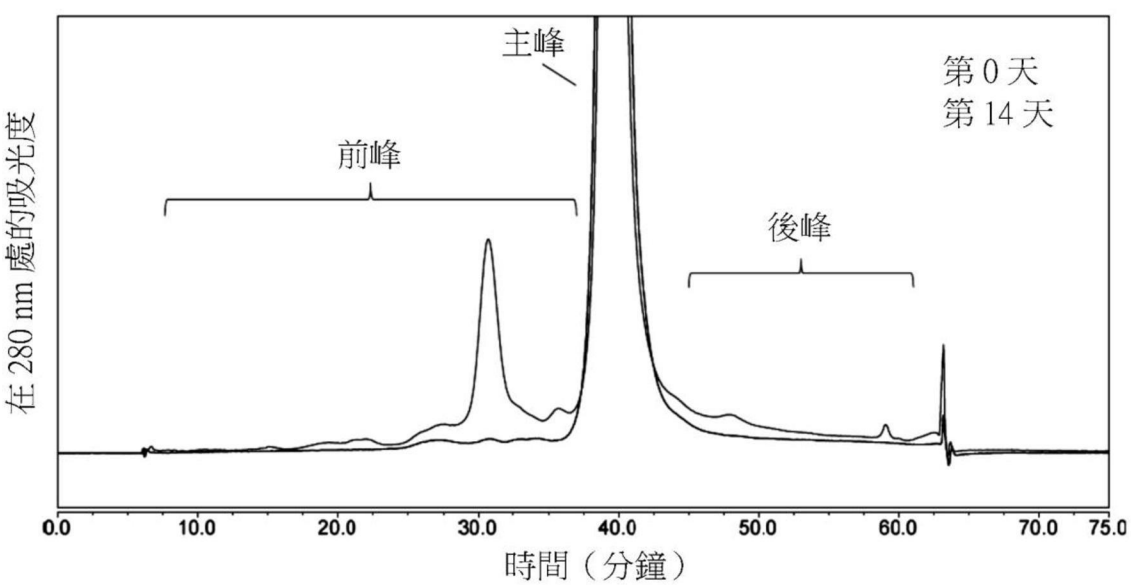
【圖 2B】



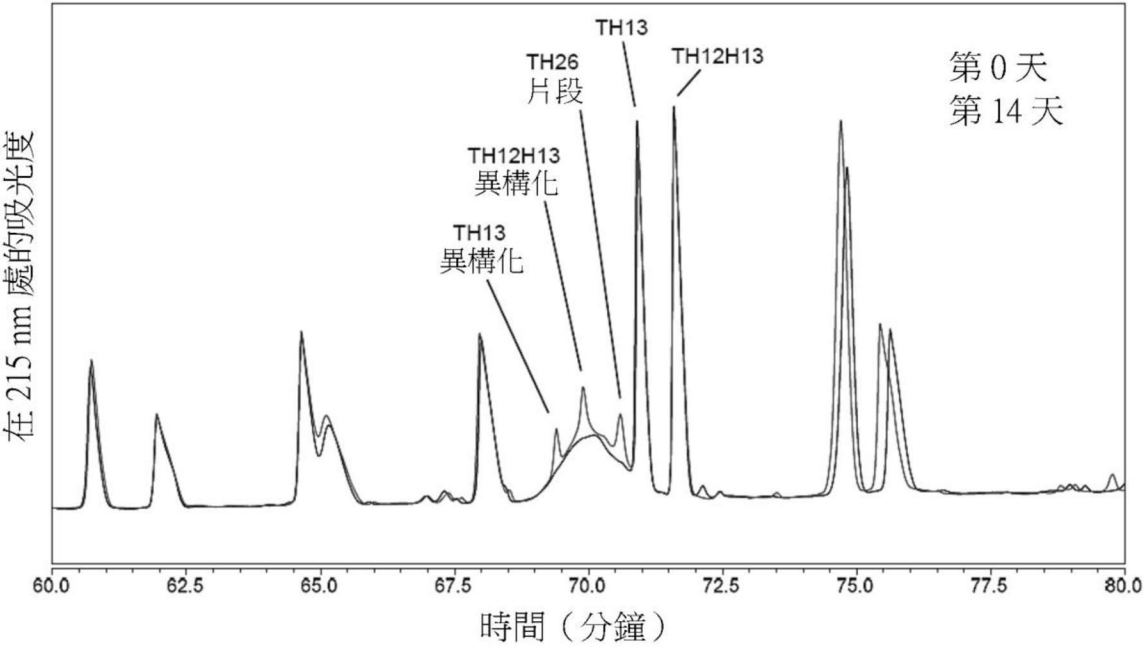
【圖 3】



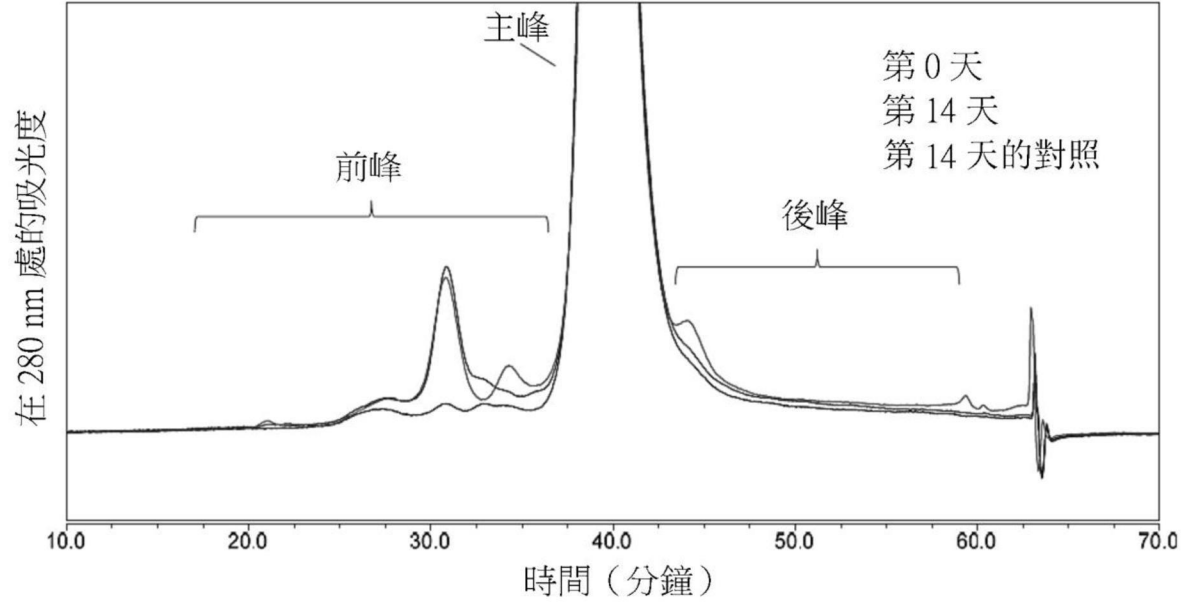
【圖 4】



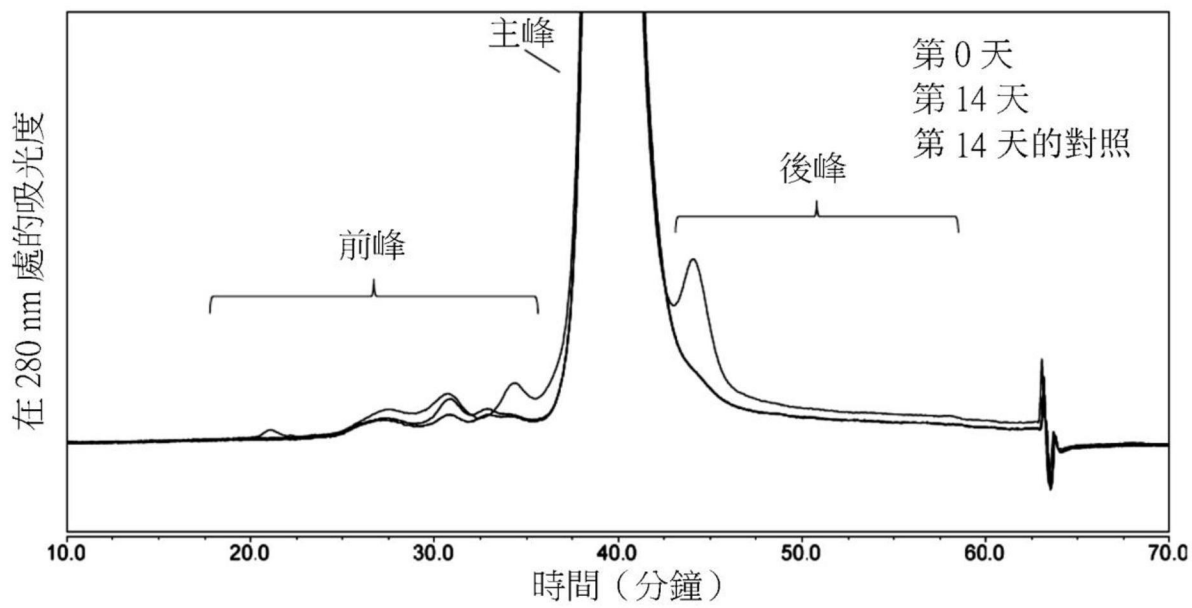
【圖 5】



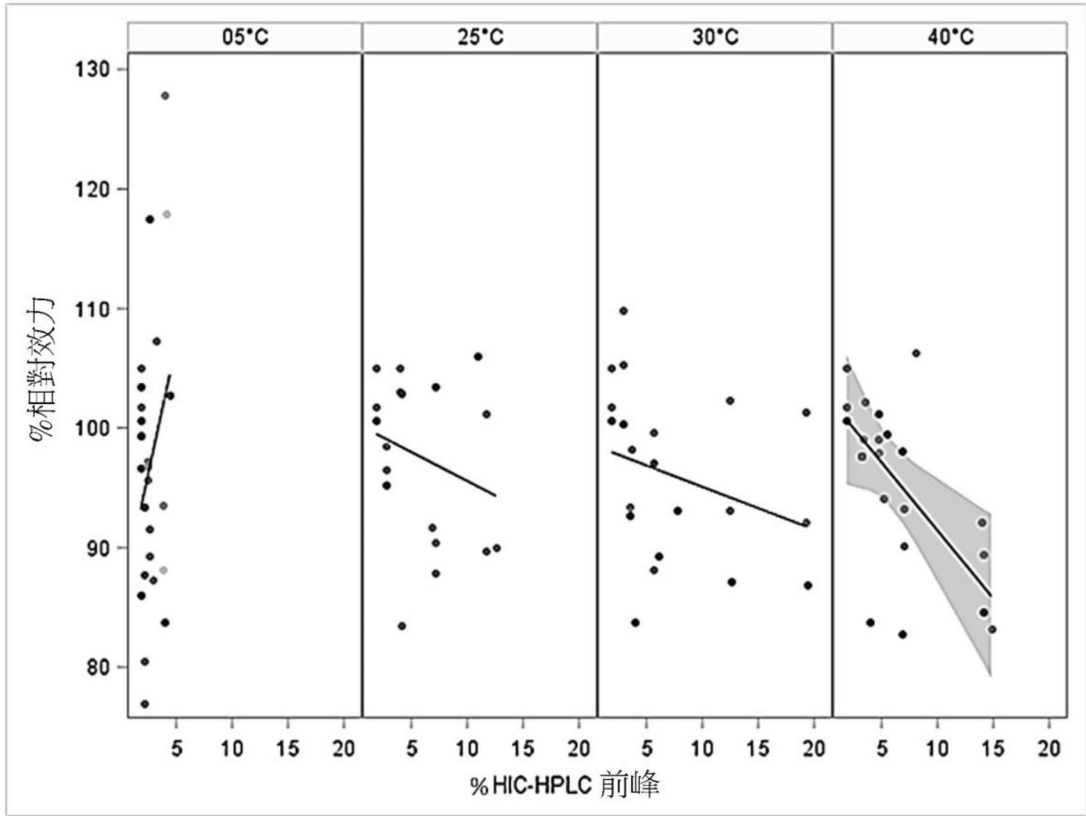
【圖 6】



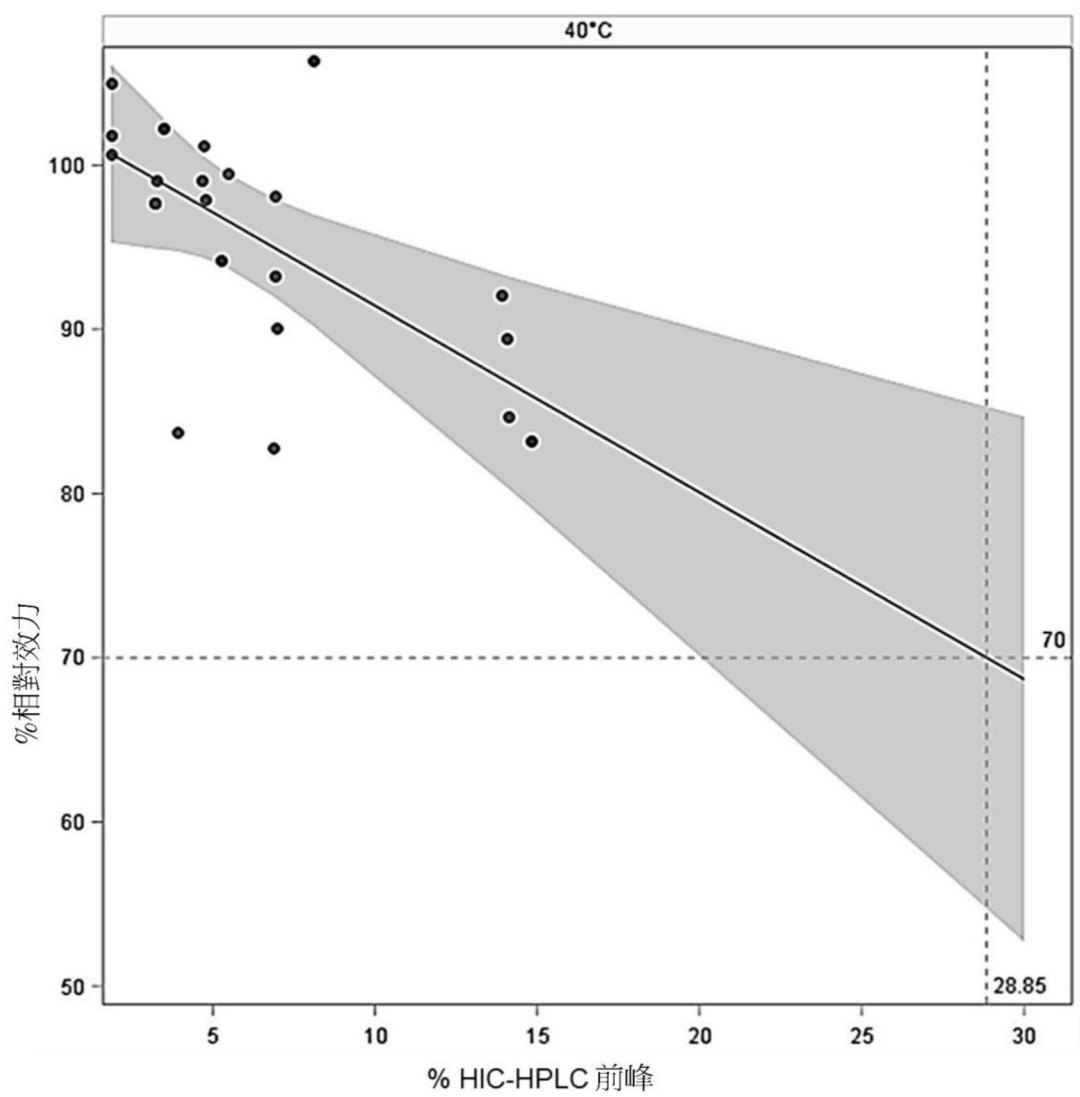
【圖 7】



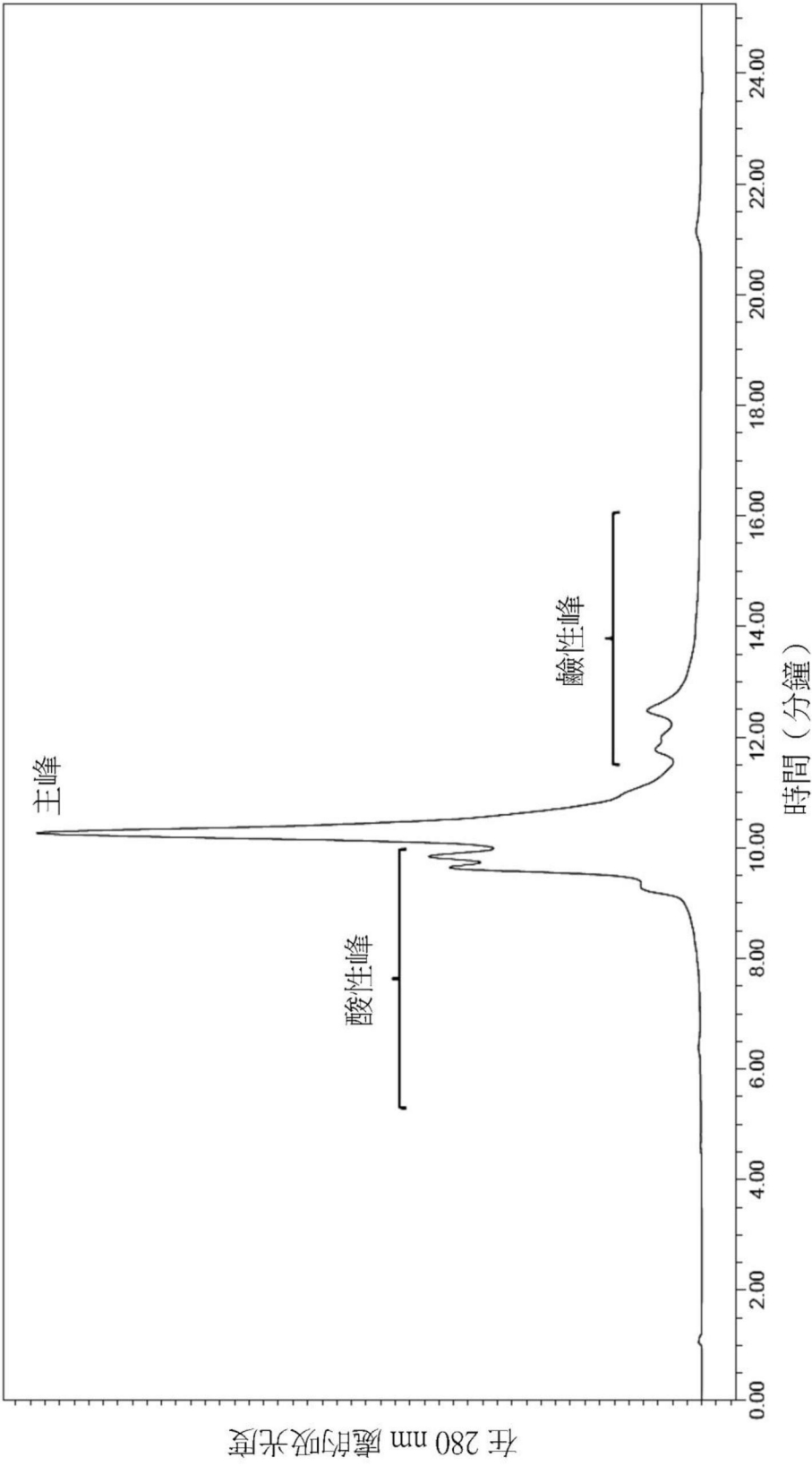
【圖 8】



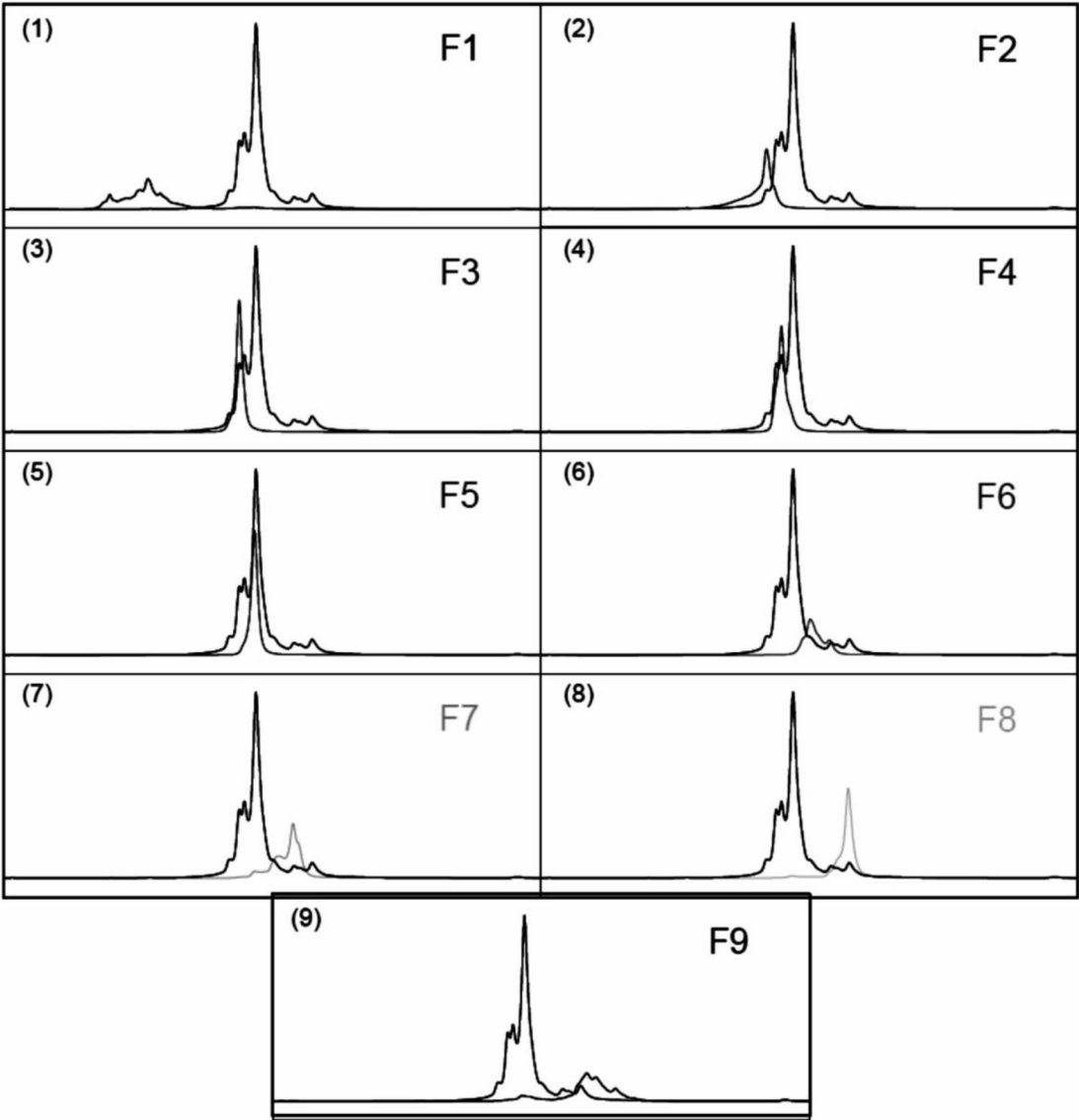
【圖 9】



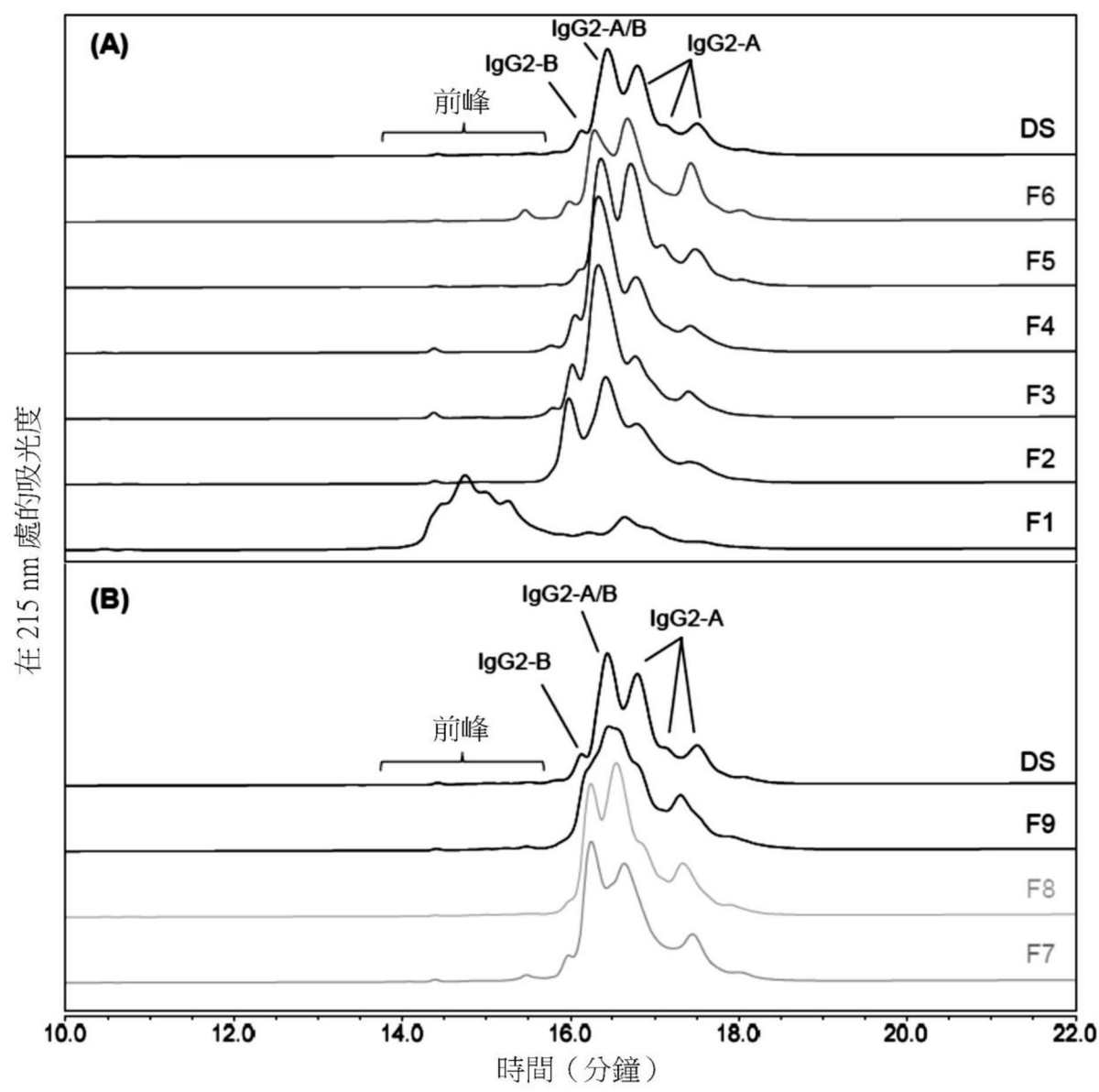
【圖 10】



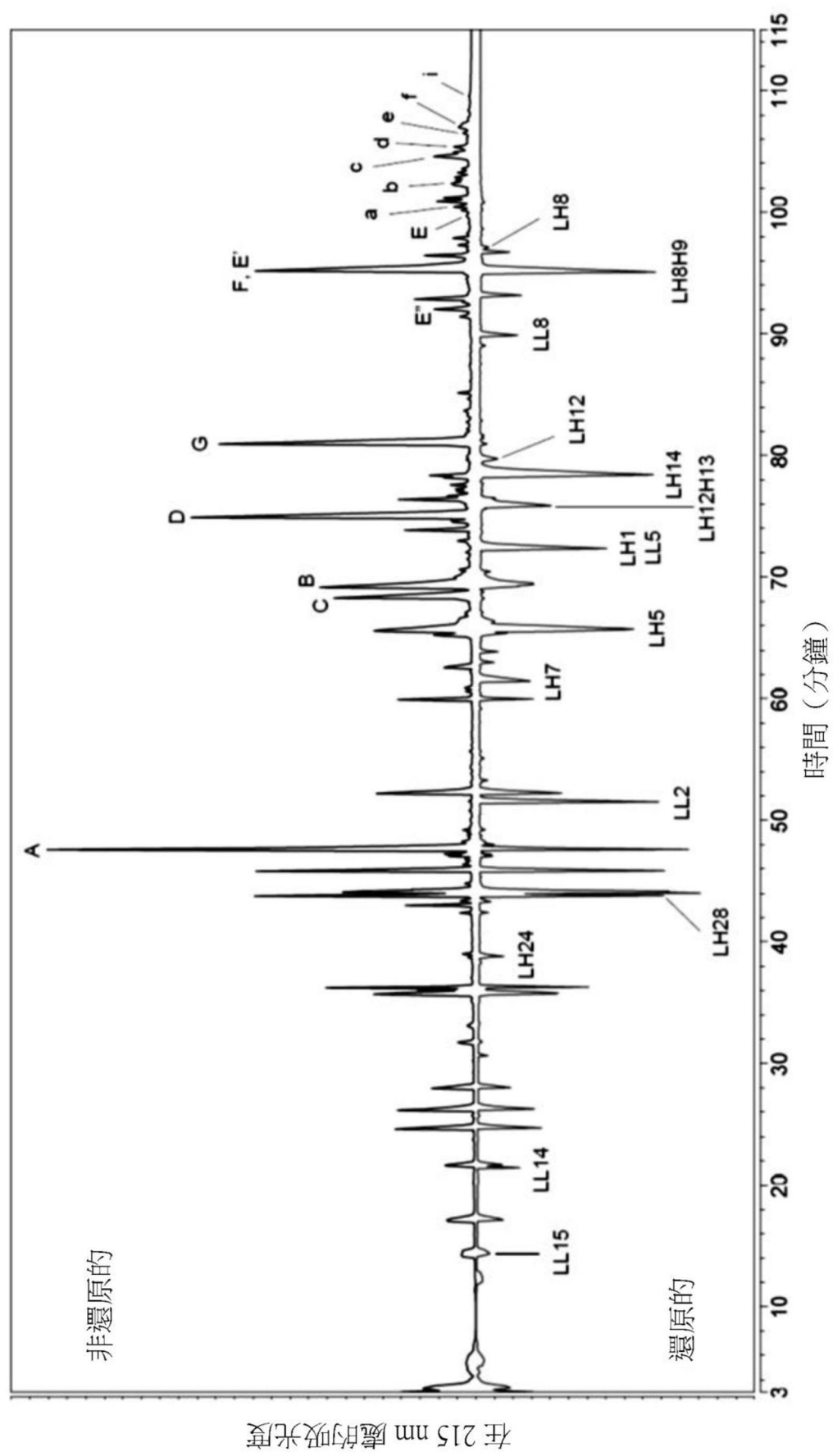
【圖 11】



【圖 12】

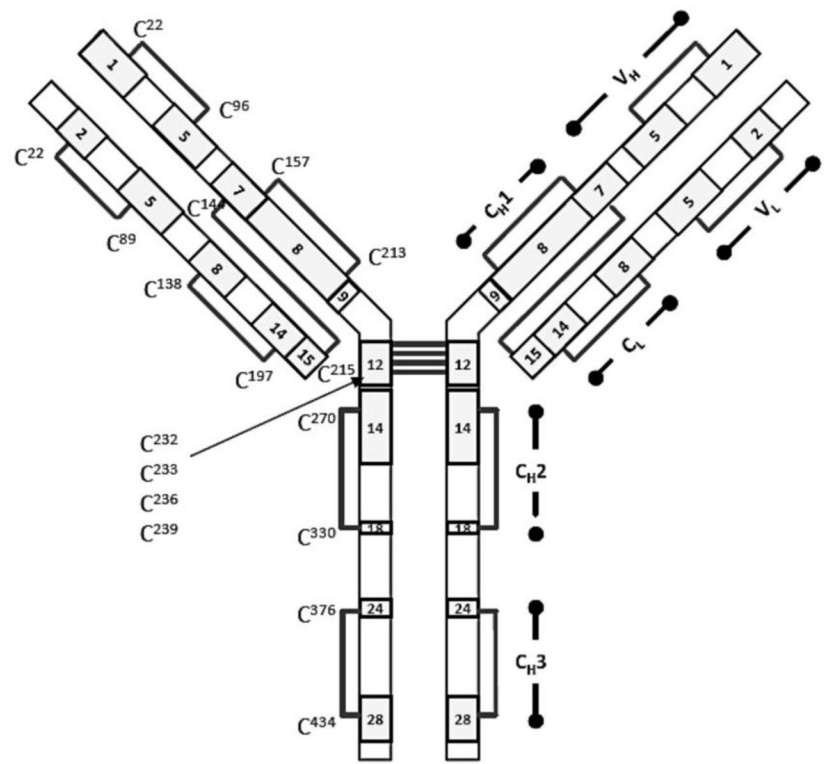


【圖 13】



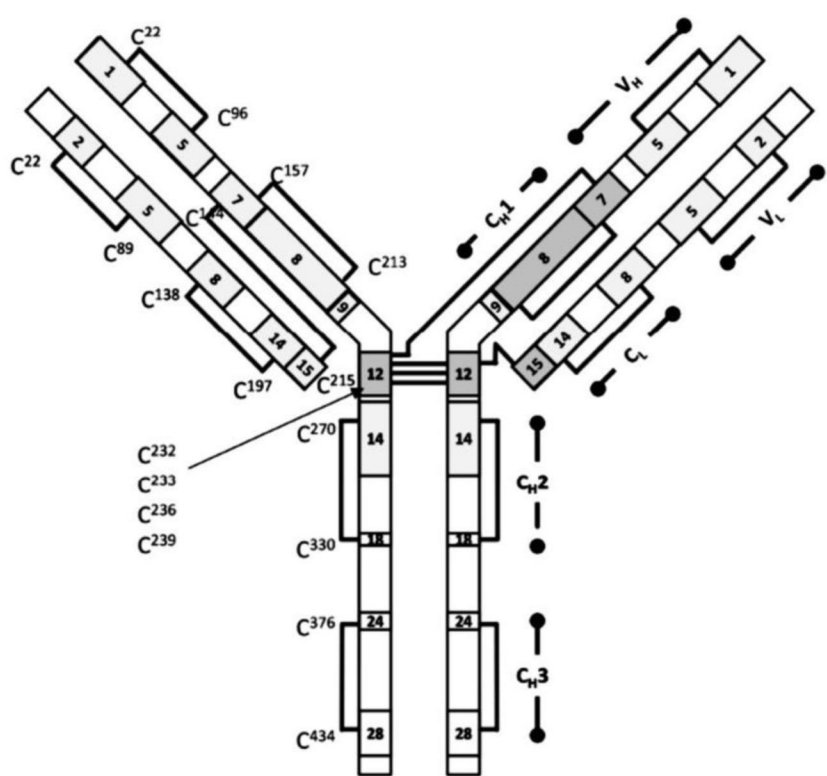
【圖 14】

IgG2-A



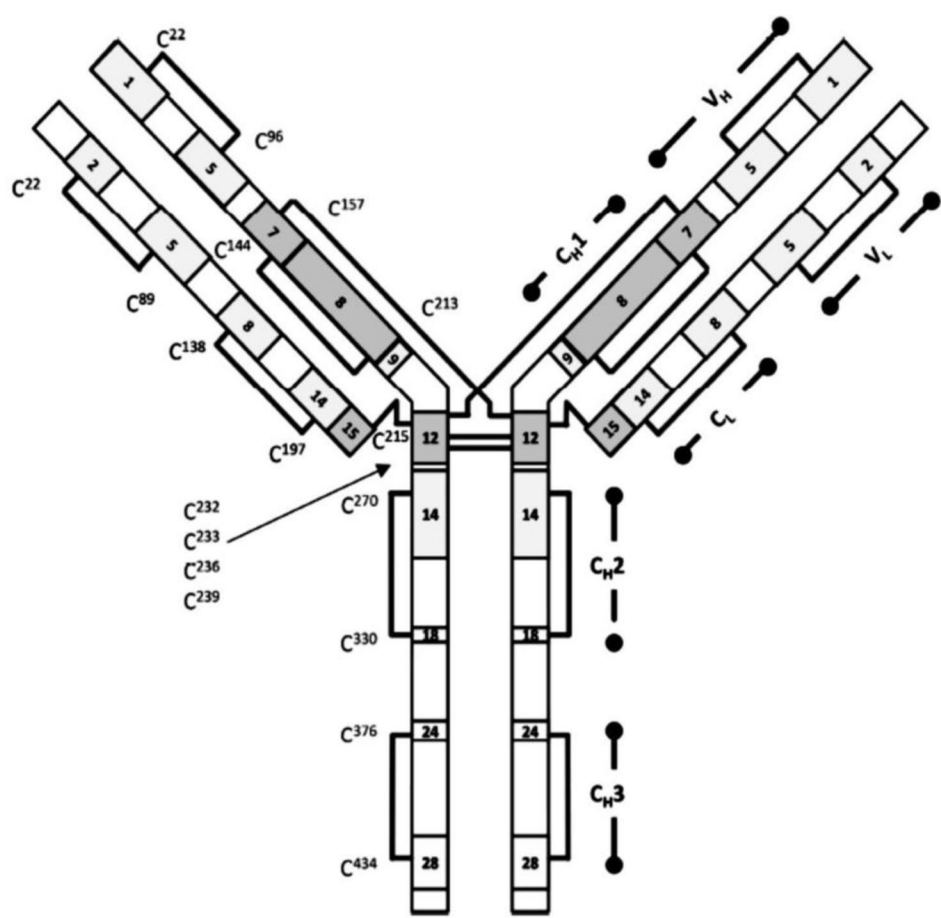
【圖 15A】

IgG2-A/B

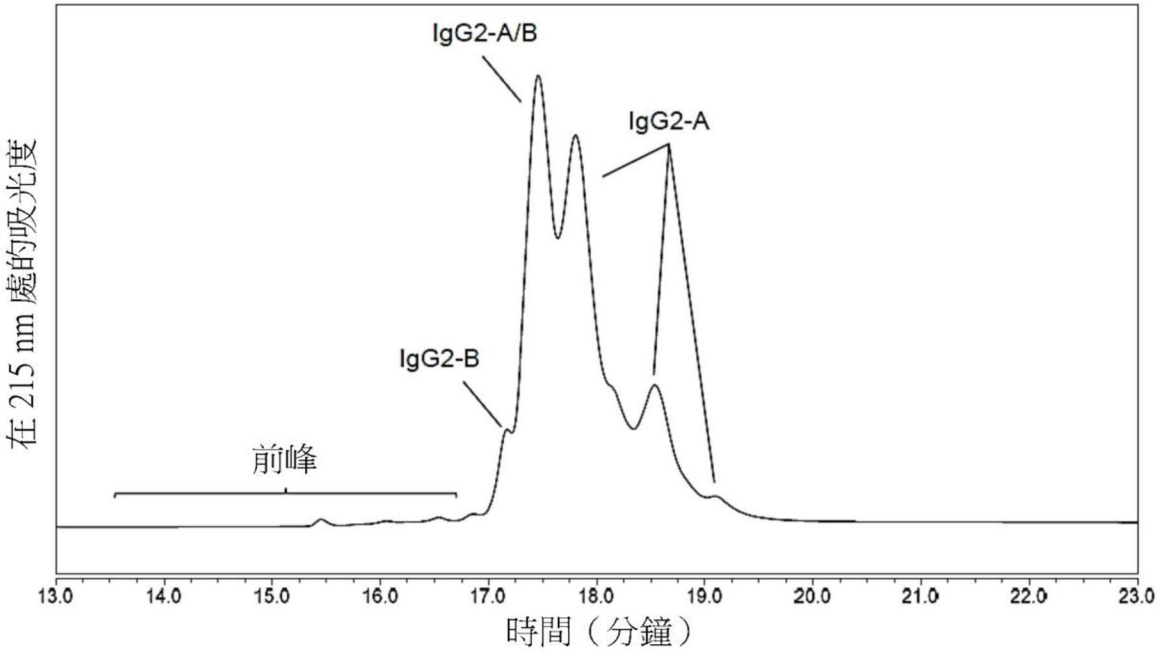


【圖 15B】

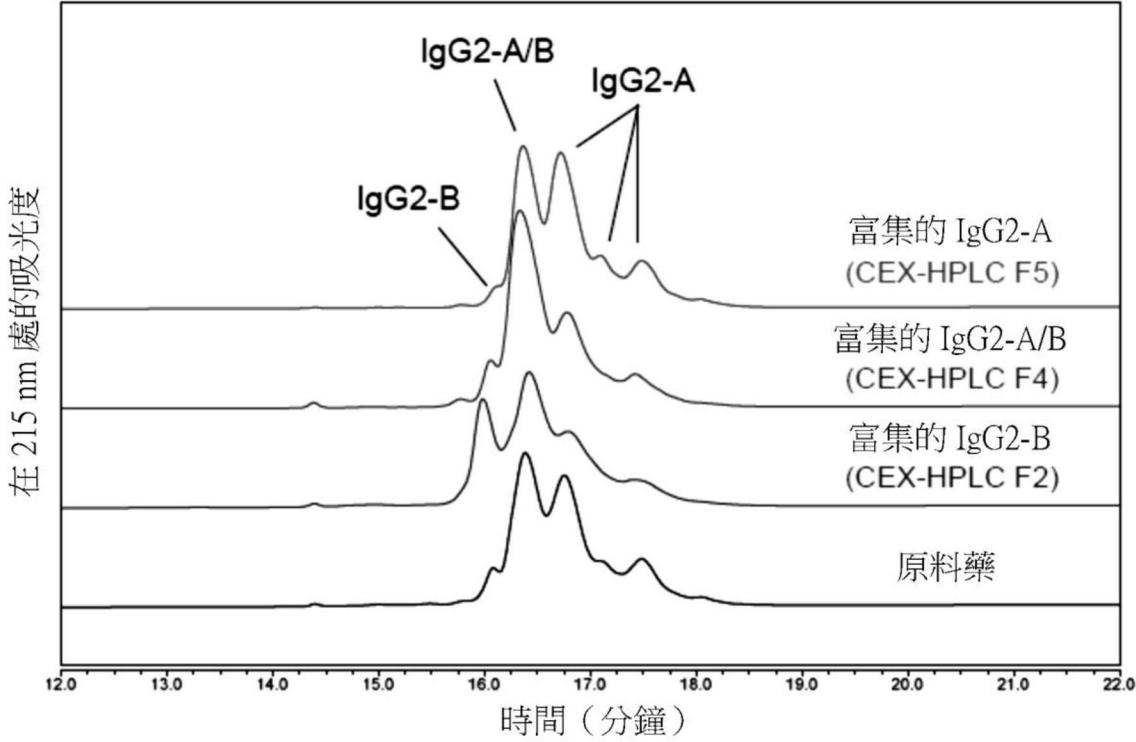
IgG2-B



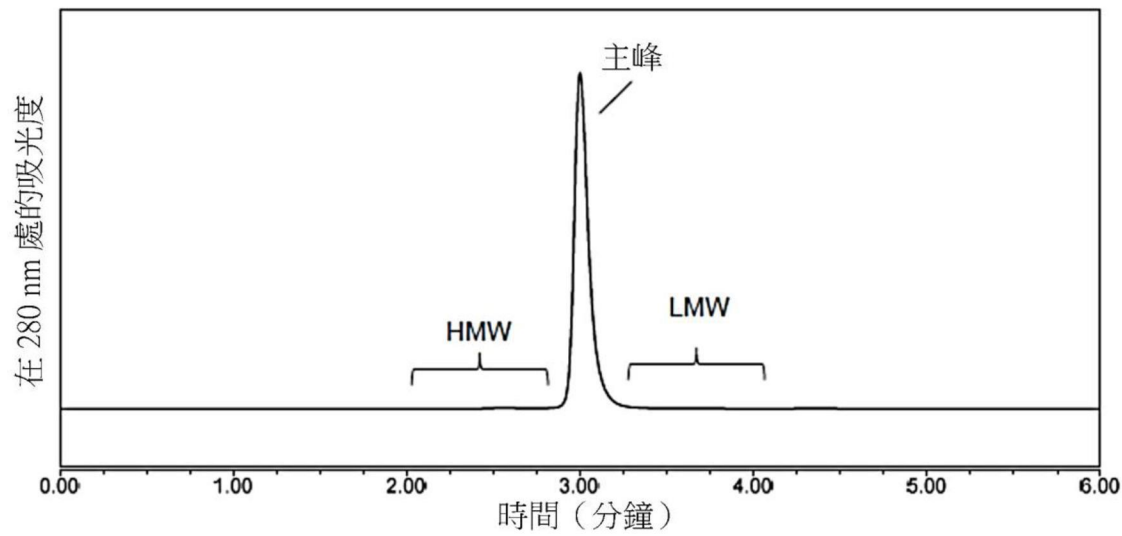
【圖 15C】



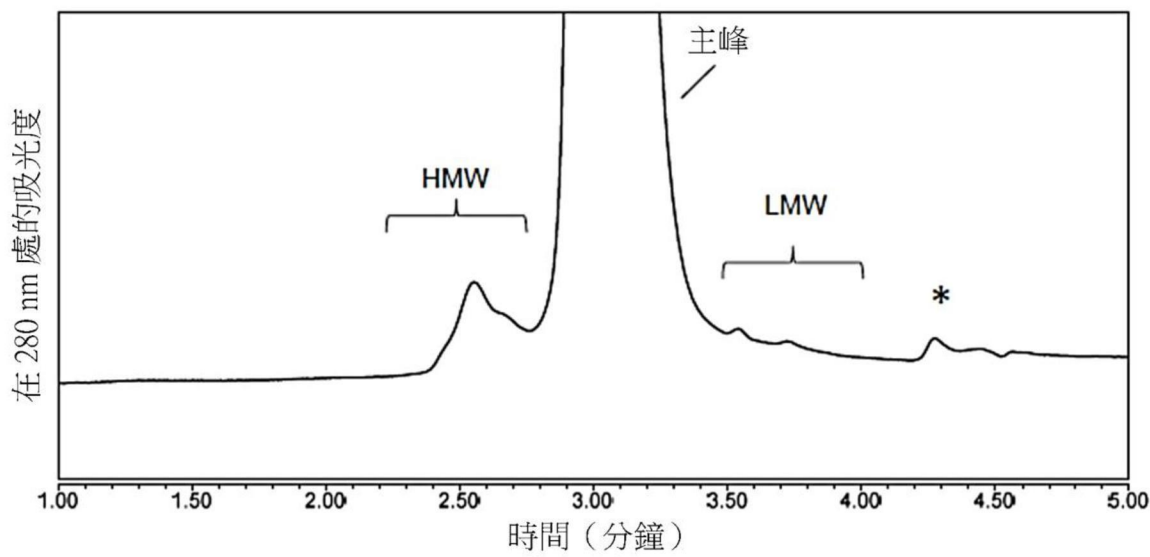
【圖 16A】



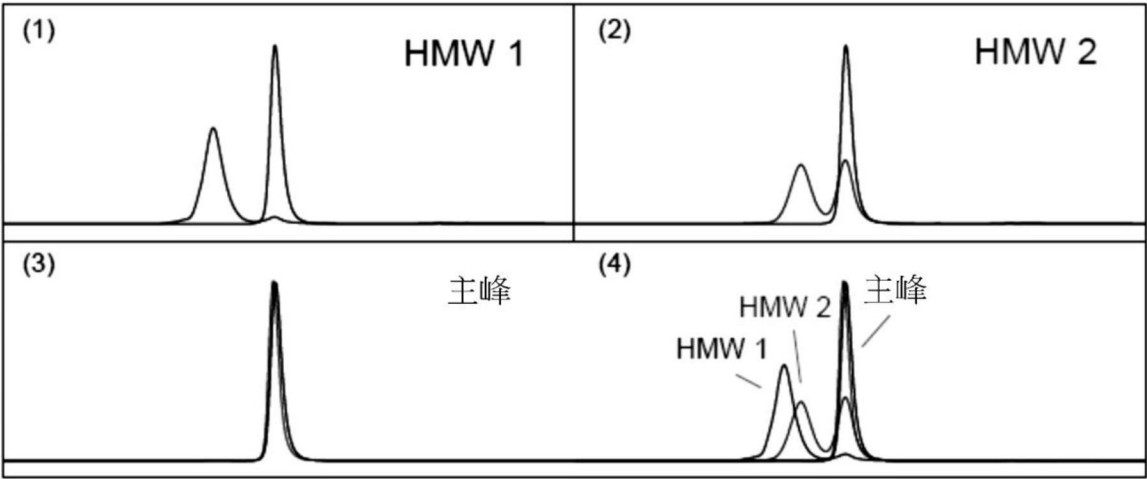
【圖 16B】



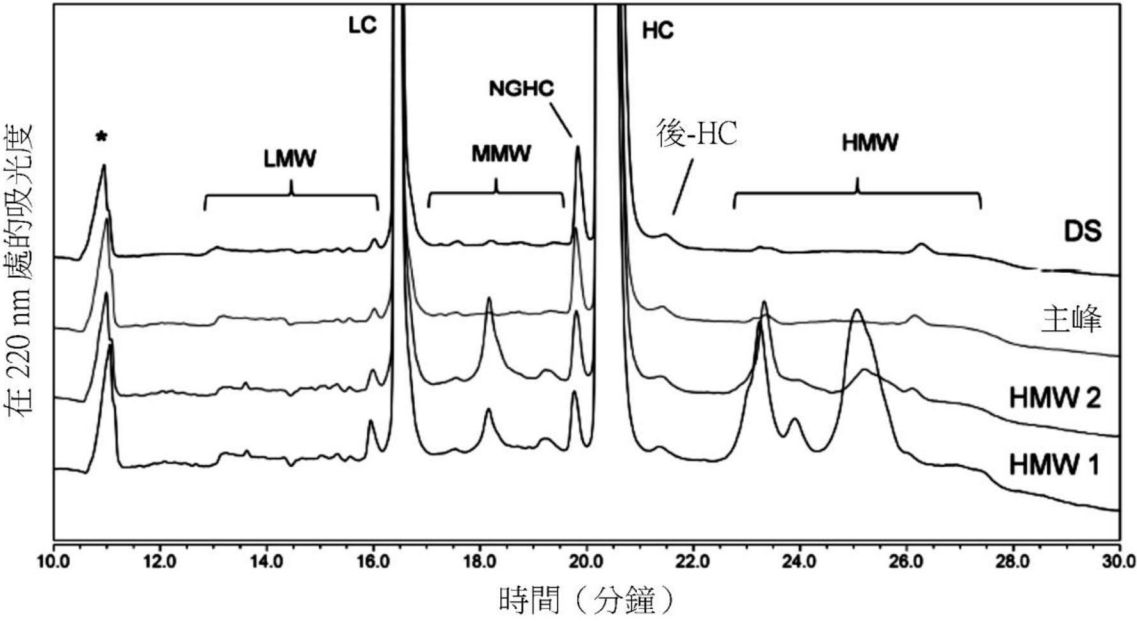
【圖 17A】



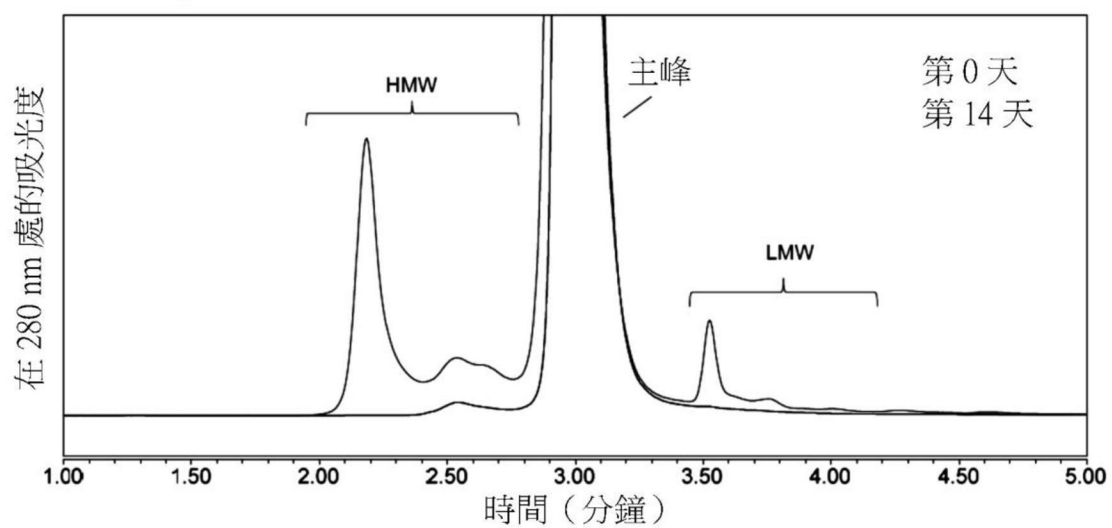
【圖 17B】



【圖 18】



【圖 19】



【圖 20】