

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-522176

(P2016-522176A)

(43) 公表日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	4 B 06 3
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K 16/28	4 B 06 4
C 12 Q 1/02	(2006.01)	C 12 Q 1/02	4 C 08 5
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	4 H 04 5
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-509031 (P2016-509031)	(71) 出願人	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成26年4月15日 (2014. 4. 15)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月7日 (2015. 12. 7)	(72) 発明者	ジェンナーロ, リン エー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー／オージェネンテック インコーポレイテッド
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/034200		
(87) 國際公開番号	W02014/172371		
(87) 國際公開日	平成26年10月23日 (2014. 10. 23)		
(31) 優先権主張番号	61/812,603		
(32) 優先日	平成25年4月16日 (2013. 4. 16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペルツズマブ変異体及びその評価

(57) 【要約】

本出願は、ペルツズマブの変異体を開示するものである。本出願は、特に、ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システィンを含む不対システィン変異体、ペルツズマブのアフコシル化変異体、ペルツズマブの低分子量種 (L M W S)、及びペルツズマブの高分子量種 (H M W S)を開示する。本出願は、更に、単離された変異体、組成物、薬学的組成物、及び変異体を含む製造品、並びに変異体及びその組成物を作製して特徴付ける方法を開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ペルツズマブ及びその不対システイン変異体を含む組成物であって、不対システイン変異体がペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含む、組成物。

【請求項 2】

不対システイン変異体が、ペルツズマブの一方の可変軽ドメインにのみ C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含むヘテロダイマー変異体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

不対システイン変異体が、ペルツズマブの両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含むホモダイマー変異体である、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 4】

ペルツズマブ及び不対システイン変異体の各々が、それぞれ配列番号 7 及び 8 の可変軽アミノ酸配列及び可変重アミノ酸配列を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

ペルツズマブ及び不対システイン変異体の各々が、配列番号 1 1 又は 1 5 の軽鎖アミノ酸配列と、配列番号 1 2 又は 1 6 の重鎖アミノ酸配列とを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

ペルツズマブの一又は複数の追加の変異体を更に含み、追加の変異体が、アフコシル化変異体、低分子量種 (L M W S) 、高分子量種 (H M W S) 、糖化変異体、ジスルフィド還元型変異体、非還元性変異体、脱アミド化変異体、シアル酸付加変異体、V H S - 変異体、C 末端リジン変異体、メチオニン酸化変異体、G 1 グリコシル化変異体、G 2 グリコシル化変異体、及び非グリコシル化重鎖変異体からなる群より選択される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 7】

組成物中の不対システイン変異体の量が、F a b の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) により決定した場合に 約 2 5 % である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 8】

組成物中のホモダイマー変異体の量が、インタクトな抗体の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) により決定した場合に 4 . 9 % である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 9】

組成物中のヘテロダイマー変異体の量が、インタクトな抗体の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) により決定した場合に約 1 3 % ~ 約 1 8 % である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 10】

分析アッセイを受けて、組成物中の不対システイン変異体の量が、F a b の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) により決定した場合に 約 2 5 % であることが確認されている、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 11】

ペルツズマブ及びペルツズマブのアフコシル化変異体を含む組成物であって、アフコシル化変異体の量が組成物の 0 . 9 ~ 4 . 1 % である、組成物。

【請求項 12】

アフコシル化変異体の量が組成物の 2 % より多い、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

ペルツズマブ、ペルツズマブの低分子量種 (L M W S) 、及びペルツズマブの高分子量種 (H M W S) の混合物を含む組成物であって、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (S E - H P L C) により決定した場合に L M W S の量が 1 . 6 % であり H M W S の量 50

が 1.7 % である、組成物。

【請求項 14】

ペルツズマブ、ピーク 1、及びピーク 2 の混合物を含む組成物であって、還元型キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (R-C E-S D S) アッセイによって測定した場合にピーク 1 の量が 0.5 % でありピーク 2 の量が 1.0 % である、組成物。

【請求項 15】

請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物と、一又は複数の薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の薬学的組成物を中心に含む容器と、がん患者を治療するために薬学的組成物を使用することをその使用者に指示する処方情報を含む添付文書とを含む、製品。 10

【請求項 17】

請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物又は請求項 15 に記載の薬学的組成物をがん患者に投与することを含む、がん患者の治療法。

【請求項 18】

がんが乳がん、胃がん、卵巣がん、H E R 2 陽性がん、又は低 H E R 3 がんである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ペルツズマブ組成物を評価するための方法であって：(1)組成物中の、ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含む不対システイン変異体の量を測定すること；(2)組成物中のアフコシル化ペルツズマブの量を測定すること；又は(3)組成物中の、ペルツズマブの低分子量種 (L M W S) 又は高分子量種 (H M W S) の量を測定することを含む方法。 20

【請求項 20】

(1)、(2)、及び(3)のうちの二つ又は三つを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ペルツズマブ組成物の生物活性を評価するための方法であって、組成物中のアフコシル化ペルツズマブ変異体の量を測定して、組成物の抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) 活性を決定すること、及びアフコシル化ペルツズマブの量が、約 0.9 % ~ 約 4.1 % の範囲であることを確認することを含む方法。 30

【請求項 22】

キャピラリー電気泳動 - レーザー誘起蛍光 (C E-L I F) を用いてアフコシル化ペルツズマブの量を測定することを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

組成物を作製するための方法であって：(1)ペルツズマブ及びその一又は複数の変異体を含む組成物を製造すること、及び(2)そのように製造された組成物の分析アッセイを行って、含まれる変異体の量を評価することを含み、ここで変異体が：(i)ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含む不対システイン変異体；(ii)ペルツズマブのアフコシル化変異体；(iii)ペルツズマブの高分子量種 (H M W S)；又は(iv)ペルツズマブの低分子量種 (L M W S) を含む、方法。 40

【請求項 24】

(1)が、組換えチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 由来のペルツズマブ及び変異体を、製造規模で発現すること、及び組成物を精製することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

ペルツズマブの単離された変異体であって、(a)ペルツズマブの一方の可変軽ドメインにのみ C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含むヘテロダイマー変異体である、ペルツズマブの不対システイン変異体；(b)ペルツズマブの両方の可変軽ドメインに C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含むホモダイマー変異体である、ペルツズマブの不 50

対システイン変異体；(c)ペルツズマブのアフコシル化変異体；(d)ペルツズマブの高分子量種(HMW S)；又は(e)ペルツズマブの低分子量種(LMW S)を含む、単離された変異体。

【請求項 2 6】

ペルツズマブ組成物の断片化を評価するための方法であって、還元型キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(R-C E-S D S)アッセイにより組成物中のピーク1及びピーク2の量を測定すること、及びピーク1の量が5%でありピーク2の量が1.0%であることを確認することを含む方法。

【請求項 2 7】

組成物を作製するための方法であって：(1)ペルツズマブ及びその一又は複数の断片を含む組成物を製造すること、及び(2)そのように製造された組成物の分析アッセイを行って、組成物中のピーク1及びピーク2の量を評価することを含む方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

37 C F R 1 . 5 3 (b)の下に出願された本非仮特許出願は、2013年4月16日出願の米国仮出願第61 / 812603号の米国特許法119(e)に基づく利益を主張し、この仮出願の全体は引用により本明細書に包含される。 20

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、E F S - W e b により提出された配列表を含み、その全体は引用により本明細書に包含される。前記A S C I Iコピーは、2014年4月8日に作成され、P 5 5 8 4 R 1 - W O _ S e q L i s t . t x t と命名され、大きさは31363バイトである。 20

【0 0 0 3】

本発明はペルツズマブの変異体に関するものである。本発明は、特に、ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインにC y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含む不対システィン変異体、ペルツズマブのアフコシル化変異体、ペルツズマブの低分子量種(LMW S)、及び高分子量種(HMW S)に関する。本発明は、更に、単離された変異体、組成物、薬学的組成物、及び変異体を含む製造品、並びに変異体及びその組成物を作製及び特徴付ける方法に関する。 30

【背景技術】

【0 0 0 4】

ペルツズマブ(P E R J E T A(登録商標))(r h u M A b 2 C 4とも呼ばれる)は、「H E R二量体化阻害剤」と呼ばれる薬剤シリーズの分類の一番目であるモノクローナル抗体(M A b)である。H E R 2に結合することにより、この抗体は、H E R 2の他のH E R受容体との二量体化を阻害し、したがって腫瘍増殖を阻害する。2012年6月8日、ペルツズマブは、H E R 2陽性転移性乳がんの治療について米国食品医薬品局(U S F D A)の承認を受けた。 30

【0 0 0 5】

米国特許第7862817号(Adamsら)は、ヒト化2 C 4バージョン574又は組み換えヒト化モノクローナル抗体2 C 4(r h u M A b 2 C 4)と呼ばれる2 C 4抗体のヒト化変異体について記載している。この抗体は、ヒト上皮増殖因子受容体2(H E R 2)細胞外ドメイン(E C D)のサブドメインI Iに結合した。r h u M A b 2 C 4抗体は、実験室規模で生産され、H E R 2に結合してM D A - 175細胞(H E R 2を1+レベルで発現する)及びマウスに移植されたM C F 7異種移植片の増殖を阻害することが示された。Adams et al. Cancer Immunol. Immunother. 55(6):717-727 (2006)も参照されたい。 40

【0 0 0 6】

米国特許第6339142号(B l a n k 及びB a s e y)は、抗H E R 2抗体と一又は複数のその酸性変異体の混合物とを含むH E R 2抗体組成物を記載しており、ここで、 50

その酸性変異体の量は約25%未満である。ヒト化モノクローナル抗体4D5変異体8(humMAb 4D5-8又はトラスツズマブ)は、例示されるHER2抗体である。

【0007】

米国特許第7560111号、米国特許第7879325号、及び米国特許第8241630号(Ka oら)には、抗体の一方又は両方の軽鎖上にアミノ末端リーダー伸長(VHS-)を含むペルツズマブの変異体(rhumAb 2C4)、いわゆる「VHS-変異体」が記載されている。参照試料(第I相)、Lot S9802A(第II相)、及び400Lスケールプロセス開発素材を、自然条件でエルマン分析を用いて遊離チオールについて試験したところ、遊離チオールのレベルは試験したすべての試料において検出限界を下回った。キャピラリー電気泳動(CE)による決定した場合、試験した組成物中1~2%のペルツズマブがアフコシル化された(GO-F)。米国特許第7560111(Ka oら)の表5を参照されたい。

10

【0008】

国際公開第2009/099829号(Harrisら)には、脱アミド変異体、糖化変異体、ジスルフィド還元型変異体、非還元性変異体、及びシアル酸付加変異体を含む、ペルツズマブの酸性変異体が記載されている。これら変異体の特徴を、以下に開示するよう明瞭化した。

【0009】

表1：国際公開第2009/099829号(Harrisら)の酸性変異体

20

酸性変異体の特徴付けのための方法		
方法	検出された変異体	変異体の名称
CEX+/-シリカゲル処置	6%シアル酸付加	シアル酸付加変異体
還元型CE-SDS	1.5%の不完全な還元	非還元性変異体
非還元型CE-SDS	6%還元型ジスルフィド	ジスルフィド還元型変異体
ボン酸クロマトグラフィー	3.5%糖化(高次)	糖化変異体
ペプチドマップ	脱アミド化	脱アミド化変異体

30

CEX=陽イオン交換。CE-SDS=ドデシル硫酸ナトリウムを用いたキャピラリー電気泳動。

国際公開第2009/099829号(Harrisら)のジスルフィド還元型変異体、インタクトな抗体の非還元型CE-SDSの特徴を明瞭化するために使用された実験的方法は、鎖内ジスルフィド結合ではなく、還元型鎖間ジスルフィド結合を評価した。

40

【0010】

Zhang et al. Anal. Chem. 84(16):7112-7123 (2012)には、その可変重(VHドメイン)に不対システイン(Cys22及びCys96)を有する組換え抗体(mAb A)が報告されている。不対システインは、CD20に対する抗体の結合に有意な影響を持たないことが判明し、不対システインを有するmAb Aは、効力検定(補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイ)において完全に活性であった。

【0011】

国際公開第2009/009523号(Ka oら)には、CD20に結合するオクレクリツマブ(ocrelizumab)(rhumAb 2H7)抗体の組換え生産の間の鎖間ジスルフィド結合還元の防止が開示されている。

50

【0012】

Harris, R. Dev. Biol. (Basel, Switzerland) 122: 117-127 (2005) には、オマリズマブの可変重(VH)ドメイン内の不対システイン(Cys22及びCys96)、ヒト化抗IgE抗体が開示されている。不対システイン形態の力価は有意に低下していた。

【発明の概要】

【0013】

本明細書における実験データは、不対システイン変異体、アフコシル化変異体、低分子量種(LMWS)、及び高分子量種(HMWS)を含む、ペルツズマブの変異体形態に関する。これら変異体の同定、特徴付け、及び定量化のための手段は、ペルツズマブ薬組成物のための製造及び品質管理方法において有益である。

【0014】

したがって、第1の態様では、本発明は、ペルツズマブ及びその不対システイン変異体を含む組成物に関し、ここで不対システイン変異体は、ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインにCys23/Cys88不対システインを含む。不対システイン変異体は、ヘテロダイマー変異体(ペルツズマブの一方の可変軽ドメインにのみCys23/Cys88不対システインを含む)及び/又はホモダイマー変異体(ペルツズマブの両方の可変軽ドメインにCys23/Cys88不対システインを含む)を含む。

【0015】

組成物は、任意選択的に、ペルツズマブの一又は複数の別の変異体、例えばアフコシル化変異体、低分子量種(LMWS)変異体、高分子量種(HMWS)変異体、糖化変異体、ジスルフィド還元型変異体、非還元性変異体、脱アミド化変異体、シアル酸付加変異体，VHS-変異体、C末端リジン変異体、メチオニン酸化変異体、G1グリコシル化変異体、G2グリコシル化変異体、及び非グリコシル化重鎖変異体を更に含む。

【0016】

本発明は、ペルツズマブ及びペルツズマブのアフコシル化変異体を含む組成物に関し、ここでアフコシル化変異体の量は組成物の0.9~4.1%である。一実施態様では、本発明は、ペルツズマブ及びペルツズマブのアフコシル化変異体を含む組成物にも関し、ここでアフコシル化変異体の量は組成物の2%を上回る。この実施態様によれば、アフコシル化変異体の量は、米国特許第7560111号、米国特許第7879325号、及び米国特許第8241630(Kaora)において報告されているものを上回っている。

【0017】

更なる態様では、本発明は、ペルツズマブ、ペルツズマブの低分子量種(LMWS)、及びペルツズマブの高分子量種(HMWS)の混合物を含む組成物に関し、ここでLMWSの量は1.6%であり、HMWSの量は1.7%である。

【0018】

本発明は、ペルツズマブ、ピーク1、及びピーク2の混合物を含む組成物にも関し、ここで還元型キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(R-CE-SDS)アッセイによって測定した場合のピーク1の量は0.5%であり、ピーク2の量は1.0%である。

【0019】

本発明の更なる態様は、本明細書の組成物を使用するか又は含む薬学的組成物、製造品、及びがん患者の治療方法に関する。

【0020】

別の一態様では、本発明は、ペルツズマブ組成物を評価するための方法に関し、この方法は：(1)組成物中の不対システイン変異体の量を測定することであって、不対システイン変異体がCys23/Cys88不対システインをペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに含む、測定すること；及び/又は(2)組成物中のアフコシル化ペルツズマブの量を測定すること；及び/又は(3)組成物中のペルツズマブの低分子量種(LMWS)又は高分子量種(HMWS)の量を測定することを含む。

【0021】

また別の一態様では、本発明は、ペルツズマブ組成物の生物活性を評価するための方法

10

20

30

40

50

に関し、この方法は、組成物中のアフコシル化ペルツズマブ変異体の量を測定して、組成物の抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C）活性を決定すること、及びアフコシル化ペルツズマブが約0.9～約4.1%の範囲内であることを確認することを含む。

【0022】

別の態様では、本発明は、組成物を作製するための方法に関し、この方法は：(1)ペルツズマブ及びその一又は複数の変異体を含む組成物を製造すること、及び(2)そのように製造された組成物の分析アッセイを行って、含まれる変異体の量を評価することを含み、ここで変異体が：(i)ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインにCys23/Cys88不対システインを含む不対システイン変異体；及び/又は(iii)ペルツズマブのアフコシル化変異体；及び/又は(iii)ペルツズマブの高分子量種(HMWS)；及び/又は(iv)ペルツズマブの低分子量種(LMWS)、及び/又は(v)ペルツズマブ；のピーク1断片(s)、及び/又は(vi)ペルツズマブのピーク2断片を含む、評価することを含む。

10

【0023】

別の態様では、本発明はペルツズマブの単離された変異体に関し、ここで単離された変異体は：(A)Cys23/Cys88不対システインをペルツズマブの一方の可変軽ドメインにのみ含むヘテロダイマー変異体である、ペルツズマブ不対システイン変異体；及び/又は(b)Cys23/Cys88不対システインをペルツズマブの両方の可変軽ドメインに含むホモダイマー変異体である、ペルツズマブの不対システイン変異体；及び/又は(c)ペルツズマブのアフコシル化変異体；及び/又は(d)ペルツズマブの高分子量種(HMWS)；及び/又は(e)ペルツズマブの低分子量種(LMWS)；及び/又は(f)ペルツズマブのピーク1断片(s)、及び/又は(g)ペルツズマブのピーク2断片を含む。

20

【0024】

別の一態様では、本発明は、ペルツズマブ組成物の断片化を評価するための方法に関し、この方法は、組成物中のピーク1及びピーク2の量を、還元型キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(R-CE-SDS)アッセイによって測定すること、及びピーク1の量が5%であり、ピーク2の量が1.0%であることを確認することを含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】HER2タンパク質構造の模式図、及びその細胞外ドメインのサブドメインI-I'V(それぞれ配列番号1-4)の各アミノ酸配列を提供する。

【図2】A及びBは、マウスモノクローナル抗体2C4の可変軽(VL)(図2A)ドメイン及び可変重(VH)(図2B)ドメイン(それぞれ配列番号5及び6)；変異体5'7'4'/ペルツズマブのVLドメイン及びVHドメイン(それぞれ配列番号7及び8)；並びにヒトVL及びVHコンセンサスフレームワーク(ヒト1、カッパ軽鎖サブグループI；ヒトII'I'、重鎖サブグループII'I') (それぞれ配列番号9及び10)のアミノ酸配列の配列比較を示す。アステリスクは、ペルツズマブとマウスモノクローナル抗体2C4間の、又はペルツズマブとヒトフレーウーク間の、可変ドメインの差異を識別する。括弧内は、相補性決定領域(CDR)である。

40

【図3】A及びBは、ペルツズマブの軽鎖(図3A；配列番号11)及び重鎖(図3B；配列番号12)のアミノ酸配列を示す。太字はCDRである。計算された軽鎖及び重鎖の分子量は、それぞれ23,526.22ダルトン及び49,216.56ダルトン(システインは還元状態)である。炭化水素部分は、重鎖のAsn299に結合される。

【図4A】トラスツズマブ軽鎖のアミノ酸配列(配列番号13)を示す。矢印は、可変軽ドメインと可変重ドメインの境界線である。

【図4B】トラスツズマブ軽鎖のアミノ酸配列(配列番号14)を示す。矢印は、可変軽ドメインと可変重ドメインの境界線である。

【図5A】変異ペルツズマブ軽鎖配列(配列番号15)を示している。

【図5B】変異ペルツズマブ重鎖配列(配列番号16)を示している。

50

【図6】4つの鎖間ジスルフィド結合及び12の鎖内ジスルフィド結合を含む（主要種）ペルツズマブの構造を示しており、可変軽（VL）ドメインの各々にCys23/Cys88鎖内ジスルフィド結合が含まれている。図示されているドメインは下記の通り：VL=可変軽ドメイン；VH=可変重ドメイン；CL=軽鎖定常ドメイン；CH1=重鎖定常ドメイン1；CH2=重鎖定常ドメイン2；CH3=重鎖定常ドメイン3。

【図7】ペルツズマブの非還元型（天然）トリプシンペプチドマップを示している。

【図8】還元型及び非還元型のペルツズマブのトリプシンペプチドマップを示している（フルスケール）。

【図9】還元型及び非還元型のペルツズマブのトリプシンペプチドマップを示している（0～120分）。

【図10】還元型及び非還元型のペルツズマブのトリプシンペプチドマップを示している（120～204分）。

【図11】パパイン消化ペルツズマブの疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）分析を示している。

【図12】パパイン消化ペルツズマブのHIC分析を示している（拡大図）。

【図13】インタクトなペルツズマブのHIC分析を示している。濃縮遊離チオールホモダイマー（両方の軽鎖上に遊離チオール）、遊離チオールヘテロダイマー（一方の軽鎖上に遊離チオール）、及び野生型ホモダイマー（主要種抗体）を含む複数のピークが示されている。

【図14】抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）アッセイにおけるペルツズマブ（バッチ抗2C4907-2）の活性を示している。

【図15】ADCC活性に対するG0-Fレベルの影響を示している。試験した試料は、第I相ペルツズマブ（G0-F=2.2%）及び第I相ペルツズマブ（G0-F=0.8%）であった。

【図16】ペルツズマブから放出されたN-結合型オリゴ糖のキャピラリー電気泳動分析を示している。

【図17】ペルツズマブから放出されたN-結合型オリゴ糖のキャピラリー電気泳動分析を示している（拡大図）。注：G1オリゴ糖は、末端のガラクトース残基が1-6分枝又は1-3分枝に結合している二つの異性体（標識されたG1及びG1'）を有している。

【図18】限定LyS-C消化ペルツズマブ、及び限定LyS-C消化ペルツズマブであって次いでN-エチルマレイミド（NEM）で処理されたものが示されている。限定されたLyS-C消化ペルツズマブ、及び次いでN-エチルマレイミド（NEM）で処理された限定されたLyS-C消化ペルツズマブが示されている。

【図19】ペルツズマブの遊離チオールFabが遊離Cys23及びCys88をその軽鎖に含むことを確認するペプチドマッピングを示す。遊離チオールを含むFab由来のL2ペプチドをNEMによって標識すると、ペプチドマップ分析においてこのようにシフトした。

【図20A】主要種又は野生型IgG1の概略図である。

【図20B】Cys23/Cys88ヘテロダイマー変異体の概略図である。

【図20C】Cys23/Cys88ホモダイマー変異体の概略図である。

【図21】本明細書の実施例4のアッセイを用いたペルツズマブバッチの%G0-F対ADCC活性を示す。

【図22】ペルツズマブがHER2のヘテロダイマー結合部位に結合し、それにより活性化EGFR又はHER3とのヘテロダイマー化を防ぐ様子を概略的に示す。

【図23】トラスツズマブ（HER2 ECDの膜近傍ドメインの近くのサブドメインIVに結合）とペルツズマブ（HER2 ECDのサブドメインIIに結合）の活性の比較である。

【図24A】IgG抗体に結合したオリゴ糖構造を示す。

【図24B】IgG抗体に結合したオリゴ糖構造を示す。

10

20

30

40

50

【図25】ペルツズマブのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析を示す(フルスケール)。

【図26】ペルツズマブのSEC分析を示す(拡大図)。ピークは、主要ピーク(主要種抗体)、高分子量種(HMWS)、及び低分子量種(LMWS)を含む。

【図27】ペルツズマブ試料のサイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)分析を示す。試料Aは、代表的なペルツズマブ製剤バッチである。試料Bは、1.2mルクス時間光曝露したペルツズマブバッチである。試料Cは、3.6mルクス時間光曝露したペルツズマブバッチである。試料Dは、pH3.2で酸処理したペルツズマブバッチである。試料Eは、イオン交換-HPLC(IE-HPLC)からの精製された基本的な変異体である。

【図28】分析超遠心(AUC)沈降速度及びSE-HPLC分析の一一致図を示す。エラーバーは、n=3の決定に基づく二つの標準偏差を表している。他のすべてのデータ点は、単一の決定を示している。円は、AUCの検出レベルを下回るHMWSレベルを有する試料を示している。

【図29】非還元型ペルツズマブのレーザー誘起蛍光(LIF)検出によるキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム分析(CE-SDS)を示す。

【図30】非還元型(NR)ペルツズマブのCE-SDS-LIFを示す(拡大図)。

【図31A】実施例6のSE-HPLCクロマトグラフィーを示す(フルスケール)。

【図31B】実施例6のSE-HPLCクロマトグラフィーを示す(拡大図)。

【図32A】実施例6の非還元型CE-SDS(NR-CE-SDS)電気泳動図を示す(フルスケール)。

【図32B】実施例6の非還元型CE-SDS(NR-CE-SDS)電気泳動図を示す(拡大図)。

【図33A】実施例6の還元型CE-SDS(R-CE-SDS)電気泳動図を示す(フルスケール)。

【図33B】実施例6の還元型CE-SDS(R-CE-SDS)電気泳動図を示す(拡大図)。

【図34】酸処理した試料のNR-CE-SDSとR-CE-SDSの電気泳動図の比較である(拡大図)。

【図35】NR-CE-SDS及びSE-HPLC間のFab定量化的相關を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

I. 定義

本明細書の「対システイン」は、抗体といったタンパク質中においてジスルフィド結合を形成する二つのシステイン残基を指す。このようなジスルフィド結合は、鎖間ジスルフィド結合(例えば抗体の重鎖と軽鎖の間のジスルフィド結合、又は抗体の二つの重鎖間のジスルフィド結合)、又は鎖内(例えば抗体の軽鎖内又は抗体の重鎖内)ジスルフィド結合でありうる。大部分のIgG1抗体は、四つの鎖間ジスルフィド結合と十二の鎖内ジスルフィド結合を含む。図6参照。

【0027】

「不対システイン変異体」は、一又は複数の対システインがジスルフィド結合状態にない、タンパク質(例えばペルツズマブのような抗体)の変異体である。このような不対システインは、対してジスルフィド結合を形成していない可能性(例えばタンパク質はじめからその三次構造に折り畳まれているとき)、又はジスルフィド結合を形成したが後に壊れた可能性(例えば製造中又は貯蔵時に)がある。不対システインは、しばしば遊離チオール又は遊離スルフヒドリルと呼ばれる。一実施態様では、不対システインは鎖内ジスルフィド結合に由来している。一実施態様では、不対システインは、抗体の軽鎖、例えば可変軽ドメイン中にある。一実施態様では、不対システイン変異体はCys23/Cys88変異体である。

【0028】

10

20

30

40

50

「Cys23/Cys88」不対システイン変異体は、抗体の一方又は両方の可変軽ドメインのシステイン残基23及び88に分子内ジスルフィド結合を欠く。本出願の図20(b)及び(c)を参照。

【0029】

「ホモダイマー変異体」は、抗体の両方の可変軽ドメインにCys23/Cys88ジスルフィド結合を欠く。本出願の図20(c)を参照。

【0030】

「ヘテロダイマー変異体」は、抗体の一の可変軽ドメインにのみCys23/Cys88ジスルフィド結合を欠く。本出願の図20(b)を参照。

【0031】

「アフコシル化変異体」は、一方又は両方の重鎖の残基Asn299に結合したオリゴ糖構造の一方又は両方が、コアのオリゴ糖構造にフコースを欠く、例えばFuc(1->6)を欠く、抗体のグリコシル化変異体である。

【0032】

ペルツズマブの「低分子量種」即ち「LMWS」は、主要種即ちインタクトなペルツズマブの分子量より小さな分子量を有するペルツズマブの断片を含む(例えば、インタクトなペルツズマブが、そのペプチド鎖のみを測定したとき約145197Daの分子量を有する場合)。LMWSは、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)及び/又はドデシル硫酸ナトリウムを用いた非還元型キャピラリー電気泳動(CE-SDS)により、例えば実施例5におけるように、検出することができる。一実施態様では、LMWSは、CE-SDSによって得られる「ピーク6」を含む又は「ピーク6」からなる(例えば、実施例5参照)。

【0033】

「高分子量種」即ち「HMWS」は、主要種即ちインタクトなペルツズマブの分子量より大きな分子量を有するペルツズマブの調製物を含む(例えば、インタクトなペルツズマブが、そのペプチド鎖のみを測定したとき約145197Daの分子量を有する場合)。HMWSは、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)及び/又はドデシル硫酸ナトリウムアッセイを用いた非還元型キャピラリー電気泳動(CE-SDS)により、例えば実施例5におけるように、検出することができる。

【0034】

本明細書において「ピーク1」は、ペルツズマブ軽鎖(LC)より小さいペルツズマブ断片を指す。ピーク1断片は、主要種ペルツズマブから、CE-SDSアッセイによって、好ましくは還元型CE-SDS(R-CE-SDS)アッセイによって、分離することができる。例えば、本出願の図33B、表16、及び表18を参照。好ましくは、ペルツズマブ組成物中のピーク1の量は0.5%である。任意選択的に、R-CE-SDSアッセイが、実施例6に記載のように実行され、補正されたピーク面積(CPA)により組成物中の%ピーク1が得られる。

【0035】

本明細書において「ピーク2」は、ペルツズマブ軽鎖(LC)より大きく、ペルツズマブ非グリコシル化重鎖(NGHC)より小さいペルツズマブ断片を指す。ピーク2は、主要種ペルツズマブから、CE-SDSによって、好ましくは還元型(R-CE-SDS)アッセイによって分離することができる。ピーク2は、本明細書の実施例6で説明されるように、R-CE-SDSアッセイの間に現れるピーク3を除外する。例えば、本出願の図33B、表16、及び表18を参照。好ましくは、ペルツズマブ組成物中のピーク2の量は1.0%である。任意選択的に、R-CE-SDSアッセイが、実施例6に記載のように実行され、補正されたピーク面積(CPA)により組成物中の%ピーク2が得られる。

【0036】

「断片化」は、ポリペプチド鎖切斷、例えばペルツズマブ軽鎖及び/又は重鎖の切斷を指す。断片化は、例えばNR-CE-SDS分析の間の、非共有的に結合したポリペプチ

10

20

30

40

50

ド鎖の解離を含まない。

【0037】

「抗体アッセイ」は、組成物中の被分析物（例えば抗体変異体）の存在又は量を、定性的に評価する及び／又は定量的に測定するアッセイでありうる。アッセイを行った組成物は、薬学的組成物を含む、精製された組成物である。

【0038】

「F a b 疎水性相互作用クロマトグラフィーアッセイ」即ち「F a b H I C アッセイ」は、組成物中において抗体の断片（例えばF a b 断片）を生成すること（パパイン酵素を用いて）、及びそのように生成された抗体断片に対してH I Cを行い、不対システイン変異体を主要種ペルツズマブから分離することを含む。このような例示的アッセイを、本明細書の実施例1に開示する。

【0039】

「H E R 受容体」は、H E R 受容体ファミリーに属し、E G F R 、H E R 2 、H E R 3 及びH E R 4 受容体を含む受容体タンパク質チロシンキナーゼである。H E R 受容体は通常、H E R リガンドに結合しうる及び／又は別のH E R 受容体分子と二量体化しうる細胞外ドメイン；脂溶性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；及びリン酸化されうる複数のチロシン残基を担持するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含む。

【0040】

「H E R 2」という表現は、例えば、Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) 及びYamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (Genebank accession number X03363) に記載のヒトH E R 2 タンパク質を指す。

【0041】

本明細書において、「H E R 2 細胞外ドメイン」又は「H E R 2 E C D」は、その断片を含め、細胞の外側にあって、細胞膜に係留されているか、又は循環しているH E R 2 のドメインを指す。H E R 2 のアミノ酸配列を図1に示す。一実施態様では、H E R 2 の細胞外ドメインは、四つのドメイン、即ち：「サブドメインI」（約1～195のアミノ酸残基；配列番号1）、「サブドメインII」（約196～319のアミノ酸残基；配列番号2）、「サブドメインIII」（約320～488のアミノ酸残基；配列番号3）及び「サブドメインIV」（約489～630のアミノ酸残基；配列番号4）（シグナルペプチドなしの残基番号付け）を含む。Garrett et al. Mol. Cell. 11:495-505 (2003), Cho et al. Nature 421: 756-760 (2003), Franklin et al. がん Cell 5:317-328 (2004), 及びPlowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993)、並びに本出願の図1参照。

【0042】

本明細書において「H E R ダイマー」は、少なくとも二つのH E R 受容体を含む、非共有的に結合したダイマーである。このような複合体は、例えば、Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994) に記載のように、二つ以上のH E R 受容体を発現する細胞がH E R リガンドに暴露されるとき形成され、免疫沈降によって単離し、SDS-PAGE によって分析することができる。サイトカイン受容体サブユニットのような他のタンパク質（例えばg p 130）をダイマーに結合させてもよい。好ましくは、H E R ダイマーはH E R 2 を含む。

【0043】

本明細書において、「H E R ヘテロダイマー」は、E G F R - H E R 2 、H E R 2 - H E R 3 又はH E R 2 - H E R 4 ヘテロダイマーといった少なくとも二つの異なるH E R 受容体を含む、非共有結合したヘテロダイマーである。

【0044】

「H E R 活性化」は、いずれか一つ又は複数のH E R 受容体の活性化又はリン酸化を指す。一般に、H E R 活性化はシグナル伝達を引き起こす（例えば、H E R 受容体又は基質ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化するH E R 受容体の細胞内キナーゼドメインに

10

20

30

40

50

よって引き起こされるもの)。HER活性化は、対象のHER受容体を含むHERダイマーに結合するHERリガンドによって媒介される場合もある。HERダイマーに結合するHERリガンドは、ダイマー中のHER受容体のうちの一又は複数のキナーゼドメインを活性化し、それによりHER受容体のうちの一又は複数中のチロシン残基のリン酸化及び/又はAkt又はMAPK細胞内キナーゼといった追加の基質ポリペプチド中のチロシン残基リン酸化を引き起こすことができる。

【0045】

非ヒト(例えばげっ歯類)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、非ヒト種、例えば、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト靈長動物の超可変領域(ドナー抗体)由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)の残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体において見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に洗練させるためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインのすべてを実質的に含み、超可変ループのすべて又は実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべて又は実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン、典型的にはヒト免疫グロブリンの、定常領域Fcの少なくとも一部を含む。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化HER2抗体は、具体的には、トラスツズマブ及びヒト化2C4抗体、例えば本明細書に記載及び定義されるペルツズマブを含む。

10

20

30

40

【0046】

本明細書において「インタクトな抗体」は、二つの抗原結合領域、及びFc領域を含むものである。好ましくは、インタクトな抗体は、機能的Fc領域を有する。一実施態様では、「インタクトなペルツズマブ」は、そのペプチド鎖のみを測定した場合に約145197Daの分子量を有する。

【0047】

「超可変領域」なる用語は、本明細書において使用される場合、抗原結合性を生じる抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」即ち「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24~34(L1)、50~56(L2)及び89~97(L3)、並びに重鎖可変ドメインの31~35(H1)、50~65(H2)及び95~102(H3)(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. (1991))、及び/又は「超可変ループ」(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26~32(L1)、50~52(L2)及び91~96(L3)、並びに重鎖可変ドメインの26~32(H1)、53~55(H2)及び96~101(H3)(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク領域」即ち「FR」残基は、本明細書で定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0048】

本明細書において用語「Fc領域」は、天然配列Fc領域及び異変Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化しうるが、通常ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226の位置又はPro230のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによる残基449)は、例えば、抗体の製造若しくは精製の間に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換えにより改変することによって、除去することができる。したがって、インタクトな抗体の組成には、すべてのK449

50

残基が除去された抗体集団、K449残基がまったく除去されていない抗体集団、及びK449残基を有する抗体と有さない抗体とを混合して有する抗体集団が含まれうる。

【0049】

別途示さない限り、本明細書において、免疫グロブリン重鎖中の残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のEUIインデックスのものであり、これを参照により本明細書に包含する。「KabatのEUIインデックス」はヒトIgG1 EUI抗体の残基番号付けを指す。

【0050】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有している。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)；食作用；細胞表面受容体(例えばB細胞受容体；BCR)の下方制御などが含まれる。このようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域に結合ドメインが混合していることを必要とし(例えば抗体可変ドメイン)、様々なアッセイを用いて評価することができる。

【0051】

「天然配列Fc領域」は、天然にみられるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域は、天然配列ヒトIgG1 Fc領域(非A及びAアロタイプ)；天然配列ヒトIgG2 Fc領域；天然配列ヒトIgG3 Fc領域；及び天然配列ヒトIgG4 Fc領域と、天然に存在するその変異体とを含む。

【0052】

「ネイキッド抗体」は、細胞傷害性部分又は放射性標識などの異種分子とコンジュゲートしていない抗体である。

【0053】

本明細書において、用語「主要種抗体」又は「野生型抗体」は、組成物中で量的に優性な抗体分子である、組成物中の抗体アミノ酸配列構造を指す。好ましくは、主要種抗体は、HER2のサブドメインIIに結合する抗体、トラスツズマブより効率的にHER二量体化を阻害する、及び/又はHER2のヘテロダイマー結合部位に結合する抗体といったHER2抗体である。一実施態様では、主要種抗体は、CDR-H1(配列番号17又は23)、CDR-H2(配列番号18)、及びCDR-H3(配列番号19)、CDR-L1(配列番号20)、CDR-L2(配列番号21又は24)及びCDR-L3(配列番号22)、それぞれ配列番号7及び8のVL及びVHアミノ酸配列(図2A-2B参照)と、任意選択的に、配列番号11又は15の軽鎖アミノ酸配列、及び列配列番号12又は16の重鎖アミノ酸配(図3A-3B及び5A-5B参照)を含むものである。一実施態様では、主要種抗体はペルツズマブである。

【0054】

「HER二量体化を阻害する」抗体は、HERダイマー又はヘテロダイマーの形成を阻害する又は妨げる抗体である。一実施態様では、このような抗体は、HER2のヘテロダイマー結合部位に結合する。本明細書において最も好ましい二量体化阻害抗体は、ペルツズマブである。

【0055】

HER2の「ヘテロダイマー結合部位」は、EGFR、HER3又はHER4の細胞外ドメインとのダイマーの形成時に、それに接觸する、又はそれとの境界をなすHER2の細胞外ドメインの一領域である。この領域は、HER2(配列番号2)のサブドメインIIに見られる。Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)。

【0056】

HER2の「ヘテロダイマー結合部位に結合する」HER2抗体は、サブドメインII(配列番号2)内の残基に結合し、任意選択的にHER2細胞外ドメインの他のドメイン内の残基、例えば、サブドメインI及びIII(配列番号1及び3)にも結合し、少なくともある程度は、HER2-EGFR、HER2-HER3、又はHER2-HER4へ

10

20

30

40

50

テロダイマーの形成を、立体的に妨害することができる。Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)は、R C S B タンパク質データバンクに寄託された (IDコード I S 7 8) HER2 - ペルツズマブ結晶構造の特徴を明らかにして、HER2 のヘテロダイマー結合部位に結合する例示的抗体を例示している。

【0057】

HER2 の「サブドメインIIに結合する」抗体は、サブドメインII (配列番号2) 内の残基に結合し、任意選択的にHER2 の他のサブドメイン、例えばサブドメインI 及びIII (それぞれ配列番号1及び3) 内の残基に結合する。

【0058】

本明細書の目的のために、「トラスツズマブ」及び「2C4」(これらは互換的に使用される)は、配列番号13及び14内部にそれぞれ由来する可変軽(VL)及び可変重(VH)アミノ酸配列を含む抗体を指す(図4A-4B参照)。ペルツズマブは、インタクトな抗体である場合、配列番号11又は15に軽鎖アミノ酸配列を、及び配列番号12又は16に重鎖アミノ酸配列を含む一実施態様において、好ましくはIgG1抗体を含む。この抗体は、場合によっては、組換えチャイニーズハムスター卵巣(CHC)細胞により生成されてもよい。本明細書の用語「ペルズマム」及び「rhuma b 2C4」は、米国一般名(USAN)又は国際一般名(INN)でペルズマムである薬物のバイオシミラー又は目的のコピーを包含する。

【0059】

本明細書の目的のために、「トラスツズマブ」及び「rhuma b 4D5」(これらは互換的に使用される)は、配列番号13及び14内部にそれぞれ由来する可変軽(VL)及び可変重(VH)アミノ酸配列を含む抗体を指す(図4A-4B参照)。トラスツズマブは、インタクトな抗体である場合、配列番号13の軽鎖アミノ酸配列及び配列番号14の重鎖アミノ酸配列を含む一実施態様において、好ましくはIgG1抗体を含む。この抗体は、場合によっては、チャイニーズハムスター卵巣(CHC)細胞により生成されてもよい。本明細書において、用語「トラスツズマブ」及び「rhuma b 4D5」は、米国一般名(USAN)又は国際一般名(INN)でトラスツズマブである薬物のバイオシミラー又は目的のコピーを包含する。

【0060】

本明細書において、「アミノ酸配列変異抗体」は、主要種抗体と異なるアミノ酸配列を有する抗体である。通常、アミノ酸配列変異体は、主要種抗体と少なくとも約70%の同一性を有し、好ましくは、少なくとも約80%、更に好ましくは少なくとも約90%の同一性を有する。アミノ酸配列変異体は、主要種抗体のアミノ酸配列内部の又はそれに隣接する特定の位置に、置換、欠失、及び/又は付加を有する。本明細書のアミノ酸配列変異体の例には、脱アミド化抗体変異体、その一つ又は二つの軽鎖上にアミノ末端リーダー伸長(例えばVHS-)を有する抗体、その一つ又は二つの重鎖上にC末端リジン残基を有する抗体などが含まれ、重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列に対する変異の組合せが含まれる。

【0061】

「酸性変異体」は、主要種抗体より酸性度が高い主要種抗体の変異体である。酸性変異体は、主要種抗体と比較して、負電荷を獲得しているか、又は正電荷を失っている。このような酸性変異体は、イオン交換クロマトグラフィーのような、電荷に従ってタンパク質を分離する分離方法を用いて分解することができる。主要種抗体の酸性変異体は、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離時に、主要ピークより早く溶出する。

【0062】

「ジスルフィド還元型変異体」は、化学的に遊離チオール形態に還元された、一又は複数の鎖間ジスルフィド結合したシステインを有する。この変異体は、例えば国際公開第2009/099829号(Harrisら)に記載の、ドデシル硫酸ナトリウムを用いた非還元型キャピラリー電気泳動(CE-SDS)によってモニターすることができる。

【0063】

10

20

30

40

50

本明細書において、「非還元性変異体」又は「不完全に還元された変異体」は、ジチオスレイトールなどの還元剤による処理によって重鎖及び軽鎖に化学的に還元することのできない主要種抗体の変異体である。このような変異体は、還元剤によって組成物を処理し、結果として得られた組成物を、例えば国際公開第2009/099829号(Harrisら)に記載の技術を用いた、ドデシル硫酸ナトリウムによるキャピラリー電気泳動(CE-SDS)のようなタンパク質の大きさを評価する方法を用いて調べることにより、評価することができる。

【0064】

本明細書の「グリコシリ化変異体」抗体は、主要種抗体に結合する一又は複数の炭化水素部分とは異なる、一又は複数の炭化水素部分の結合した抗体である。一実施態様では、グリコシリ化変異体は、抗体の一方又は両方の重鎖、例えば重鎖の残基229に結合するオリゴ糖構造を有している。一実施態様では、主要種抗体(例えばペルツズマブ)は、そのFc領域に結合した主要なオリゴ糖としてG0オリゴ糖を含む。IgG1に結合した例示的オリゴ糖構造を、図24A~24Bに示す。本明細書のグリコシリ化変異体の例には、アフコシリ化変異体、そのFc領域に結合したG1又はG2オリゴ糖構造(G0オリゴ糖構造の代わりに)を有する抗体(「G1グリコシリ化変異体」又は「G2グリコシリ化変異体」)、抗体の一つ又は二つの重鎖に結合した炭化水素がなにもない抗体(「非グリコシリ化重鎖変異体」)、シアル酸付加変異体など、並びにこのようなグリコシリ化変異体の組合せが含まれる。例えば、米国特許第7560111号(Kaοら)を参照されたい。

10

20

【0065】

抗体がFc領域を有する場合、オリゴ糖構造が、抗体の一つ又は二つの重鎖の、例えば残基299に結合していいよい。一実施態様では、G0が主要なオリゴ糖構造であり、G0-F、G-1、Man5、Man6、G1-1、G1(1-6)、G1(1-3)及びG2といった他のオリゴ糖構造は、組成物中にもっと小さな量でみられる。

【0066】

別途示さない限り、「本明細書のG1オリゴ糖構造」には、G1(1-6)及びG1(1-3)構造が含まれる。

【0067】

本明細書の目的のために、「シアル酸付加変異体」は、その一つ又は二つの重鎖に結合した一又は複数のシアル酸付加炭化水素部分を含む主要種抗体の変異体である。シアル酸付加変異体は、シリダーゼ処理した又はしていない組成物を、例えば国際公開第2009/099829号に記載のようにして、(例えばイオン交換クロマトグラフィーによって)評価することにより同定することができる。

30

【0068】

「糖化変異体」は、グルコースなどの糖が、例えばその一方又は両方の軽鎖に、共有結合している抗体である。このような付加は、(例えば細胞培地中における)タンパク質上のリジン残基との、グルコースの反応によって起こりうる。糖化変異体は、重鎖又は軽鎖の質量の増加を評価する還元型抗体の質量分析によって同定することができる。また、糖化変異体は、国際公開第国際公開第2009/099829(Harrisら)に説明されているボロネートクロマトグラフィーにより定量化することができる。

40

【0069】

「脱アミド化」抗体は、その一又は複数のアスパラギン残基が、例えばアスパラギン酸、スクシンイミド、又はイソ-アスパラギン酸に誘導体化されている抗体である。脱アミド化抗体の一例は、ペルツズマブ変異体であり、ペルツズマブの一又は複数の重鎖上のAsn-386及び/又はAsn-391が脱アミド化されている。例えば、国際公開第2009/099829号(Harrisら)を参照されたい。

【0070】

本明細書の「アミノ末端リーダー伸長変異体」は、主要種抗体のいずれか一つ又は複数の重鎖又は軽鎖のアミノ末端に、アミノ末端リーダー配列の一又は複数のアミノ酸残基を

50

有する主要種抗体を指す。例示的なアミノ末端リーダー伸長は、抗体変異体の一方又は両方の軽鎖上に存在する、本明細書で「VHS-変異体」と呼ぶ三つのアミノ酸残基、VHS-を含むか、又はそれらかかる。米国特許第7560111(Kaora)を参照されたい。

【0071】

「C末端リジン変異体」は、その重鎖のC末端にリジン(K)残基を含む変異体を指す。米国特許第7560111(Kaora)を参照されたい。

【0072】

「メチオニン酸化変異体」は、その中に一又は複数の酸化メチオニン残基、例えば酸化Met-254を含む変異体を指す。米国特許第7560111(Kaora)を参照されたい。
10

【0073】

用語「がん」とは、制御されない細胞増殖によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態を指す。本明細書のがんの例には、乳がん(例えば転移性乳がん)、胃(gastric又はstomach)がん、卵巣がん、原発性腹膜がん、及び卵管がんが含まれる。本明細書のがんの例には、HER2陽性がん及び低HER3がんが含まれる。

【0074】

「HER発現、増幅、又は活性化を呈する」がん又は生物学的試料は、診断試験において、HER受容体を(過剰発現を含めて)発現し、増幅されたHER遺伝子を有し、及び/又はそうでなければHER受容体の活性化又はリン酸化を呈するものである。
20

【0075】

「HER2陽性」がんは、HER2のレベルが通常よりも高いがん細胞を含む。HER2陽性がんの例には、HER2陽性乳がん及びHER2陽性胃がんが含まれる。HER2陽性がんを同定するための方法には、HER2タンパク質を測定するアッセイ、例えば免疫組織化学アッセイ(IHC)、HER2-コード化核酸を測定するアッセイ、例えば蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH; 1998年10月公開の国際公開第98/45479号参照)及びクロモジェニックin situハイブリダイゼーション(CISH; 例えばTanner et al., Am. J. Pathol. 157 (5) 1467-1472 (2000); Bell et al., J. Clin. Oncol. 26 (May 20 suppl; abstr 22147) (2008)参照)を含む、in situハイブリダイゼーション(IISH)、サザンプロット法、又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術、例えば定量的実時間PCR(qRT-PCR); shed抗原(例えばHER2 ECD)アッセイ(例えば、1990年6月12日発行の米国特許第4933294号; 及び1995年3月28日発行の米国特許第5401638号参照)、及びインビボアッセイが含まれる。任意選択的に、HER2陽性がんは、2+又は3+の免疫組織化学(IHC)スコア及び/又は2.0のin situハイブリダイゼーション(IISH)増幅比を有する。
30

【0076】

「低HER3」がんは、HER3のレベルが通常よりも低いがん細胞を含む。低HER3がんの例には、卵巣癌、原発性腹膜癌、及び卵管癌が含まれる。例えば、米国特許第7981418号(Amllerら)を参照されたい。一実施態様では、低HER3は、HER3 mRNA発現レベルに基づいて決定される(COBAS z480(登録商標)器具でのqRT-PCRによる評価で濃度比が2.81以下)。
40

【0077】

「エピトープ2C4」は、抗体2C4が結合するHER2の細胞外ドメイン内の領域である。本質的に2C4エピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような常套的なクロスブロッキングアッセイを実行することができる。好ましくは、抗体は、HER2に対する2C4の結合を、約50%以上ブロックする。代替的に、エピトープマッピングを、抗体がHER2の2C4エピトープに
50

本質的に結合するかどうかを評価するために実行することができる。エピトープ 2 C 4 は、H E R 2 の細胞外ドメインのサブドメイン I I (配列番号 2) 由来の残基を含む。 2 C 4 及びペルツズマブは、H E R 2 の細胞外ドメインに、サブドメイン I 、 I I 及び I I I (それぞれ配列番号 1 、 2 、及び 3) の接合点で結合する。 Franklin et al. Cancer Cell 15:317-328 (2004)。

【 0 0 7 8 】

「処置」は、治療的処置及び予防的 (p r o p h y l a c t i c 又は p r e v e n t a t i v e) 手段の両方を指す。処置を必要とするものには、既にがんを有するものと、がんが予防されるべきものが含まれる。したがって、本明細書において処置される患者は、がんを有すると診断されているか、又はがんにかかり易い若しくはがんの影響を受けやすいと思われる。

10

【 0 0 7 9 】

用語「有効量」は、患者のがんの処置に有効な薬物の量を指す。有効量の薬物は、がん細胞数を減少させ；腫瘍の大きさを縮小させ；末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害し（即ち、ある程度遅らせ、好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害し（即ち、ある程度遅らせ、好ましくは停止させる）；腫瘍増殖をある程度阻害し；及び／又はがんに関連する一又は複数の症状をある程度緩和することができる。薬剤は、増殖を防ぎ、及び／又は既存のがん細胞を死滅させ得る範囲で、細胞増殖抑制性及び／又は細胞毒性でありうる。有効量は、無憎惡生存期間を延長し（例えば固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（R E C I S T ）、又はC A - 1 2 5 の変化によって測定して）、他覚的反応を引き起こし（部分寛解（P R ）、又は完全寛解（C R ））、全生存期間を延長し、及び／又はがんの一又は複数の症状を改善する（例えば、F O S I による評価で）。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書において治療剤の「固定の」又は「フラットな」用量は、患者の重量（W T ）又は対表面積（B S A ）には関係なく、ヒト患者に投与される用量を指す。したがって、固定の又はフラットな用量は、m g / k g 用量又はm g / m ² 用量としてではなく、代わりに治療剤の絶対量として提供される。

30

【 0 0 8 1 】

「容器」は、薬学的組成物又は組成物を保持又は収用するために使用することができるオブジェクトを指す。本明細書の容器の例には、バイアル、シリソジ、輸液バッグなどが含まれる。

【 0 0 8 2 】

「輸液バッグ」又は「I V バッグ」は、患者の静脈を介して投与できる溶液を保持することが可能なバッグである。一実施態様では、溶液は、生理食塩水（例えば、約 0 . 9 % 又は約 0 . 4 5 % のN a C l ）である。任意選択的に、I V バッグは、ポリオレフィン又は塩化ポリビニルから形成される。

40

【 0 0 8 3 】

「バイアル」は、液体又は凍結乾燥調製物を保持するために適した容器である。一実施態様では、バイアルは、単回使用バイアルであり、例えば 2 0 c c のストッパーのない単回使用バイアルである。

【 0 0 8 4 】

「添付文書」は、食品医薬品局（F D A ）又は他の行政権限の命令により、すべての処方薬のパッケージ内に配されなければならないリーフレットである。リーフレットは、一般に、薬物の商標、その一般名、及びその作用のメカニズムを含み；その効能、禁忌、警告、注意、副作用、及び投与形態を述べ、投与の推奨される用量、時間、及び経路の指示を含む。

【 0 0 8 5 】

「薬学的組成物」は、ヒト患者に安全に投与できる、薬学的に活性の薬物（例えばペルツズマブ及び本明細書に記載されるもののような変異体形態）と、一又は複数の「薬学的に活性の賦形剤」（例えばバッファー、安定剤、等張化修飾剤、保存料、界面活性剤など

50

)とを含む組成物である。このような組成物は、例えば、液体であるか又は凍結乾燥されている。

【0086】

「組換え」タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)宿主細胞のような遺伝的に修飾された宿主細胞により生成されたものである。

【0087】

「製造規模」は、FDA又は他の行政権威により承認された商業的プロセスを用いた、商業的規模、例えば12000リットル(L)以上の規模でのタンパク質薬(例えば抗体)の製造を指す。

【0088】

「精製」は、プロテインAクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの、一又は複数の精製工程を指す。

【0089】

「単離された」変異体は、主要種又は野生型抗体から、一又は複数の精製又は分析手順によって分離された変異体を指す。このような、単離された変異体は、その生物活性及び/又は力価について評価することができる。

【0090】

I I . 抗体組成物

(i) 主要種抗体

本明細書において抗体組成物は、HER2に結合する抗体(HER2抗体)、任意選択的にヒト化HER2抗体を含む。本明細書においてヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重ドメイン中に取り込まれた非ヒト超可変領域残留物を含むことができ、更に、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に規定された可変ドメイン番号付けシステムを利用して69H、71H及び73Hからなる群より選択された位置にフレームワーク領域(FR)置換を含むことができる。一実施態様では、ヒト化抗体は、位置69H、71H及び73Hのうちの二つ又はすべてにFR置換を含む。

【0091】

本明細書で対象とするヒト化抗体の一例は、以下のVH CDR残基を含む：

- GFTFTDYTMX(配列番号17)(Xは好ましくはD又はS)、例えばCDR
- H1についてGFTFTDYTM(配列番号23)；
- CDR-H2についてDVNPNSGGSIYNQRFKG(配列番号18)；及び/又は

- CDR-H3についてNLGPSSFYFDY(配列番号19)、任意選択的にこれらCDR残基のアミノ酸修飾を含み、例えば、修飾は基本的に抗体の親和性を維持又は改善する。例えば、本発明の方法に使用される抗体変異体は、上記可変重CDR配列に、約一から約七、又は約五のアミノ酸置換を有しうる。このような抗体変異体は、例えば後述するような親和性成熟により調製することができる。

【0092】

ヒト化抗体は、例えば前パラグラフの可変重ドメインCDR残基に加えて、以下のVL CDR残基を含みうる：

- CDR-L1についてKASQDVSIGVA(配列番号20)；
- SASYX¹X²X³、ここでX¹は好ましくはR又はLであり、X²は好ましくはY又はEであり、X³は好ましくはT又はS(配列番号21)であり、例えばCDR-L2についてSASYRYT(配列番号24)であり；及び/又は
- CDR-L3についてQQYYIYPYT(配列番号22)。

【0093】

このようなヒト化抗体は、任意選択的に、上記CDR残基のアミノ酸修飾を含み、例えばこの修飾は基本的に抗体の親和性を維持又は改善する。例えば、対象の抗体変異体は、上記可変軽CDR配列に、約一から約七、又は約五のアミノ酸置換を有しうる。こ

10

20

30

40

50

のような抗体変異体は、親和性成熟により調製することができる。

【0094】

本出願は、HER2に結合する親和性成熟抗体も考慮する。本抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体であり、例えばそれぞれ配列番号7及び8の可変軽及び/又は可変重配列（即ち、ペルツズマブのVL及び/又はVH）を含む抗体である。ペルツズマブの親和性成熟変異体は、好ましくは、マウスの2C4又はペルツズマブを上回る親和性で（例えばHER2 ECD E L I S Aを用いて評価したとき、例えば約二又は約四倍から約100倍又は1000倍高い親和性で）HER2受容体に結合する。置換に関する例示的な可変重CDR残基には、H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99、又は二つ以上（例えば、これら残基の二、三、四、五、六、又は七つ）の組合せが含まれる。変性に関する可変軽CDR残基の例には、L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97又は二つ以上（例えば、これら残基の二から三、四、五、又は約十まで）の組合せが含まれる。
10

【0095】

ヒト化抗体又は親和性成熟抗体の様々な形態が考慮される。例えば、ヒト化抗体又は親和性成熟抗体。或いは、ヒト化抗体又は親和性成熟抗体は、インタクトなIgG1抗体などのインタクトな抗体でもよい。

【0096】

好ましくは、HER2抗体（主要種HER2抗体及びその抗体変異体の一方又は両方）は、HER2のサブドメインIIに結合し、HERの二量体化をトラスツズマブより効果的に阻害し、及び/又はHER2のヘテロダイマー結合部位に結合する。本明細書における主要種抗体の好ましい実施態様は、配列番号3及び4の可変軽及び可変重アミノ酸配列を含み、最も好ましくは配列番号11又は15の軽鎖アミノ酸配列と、配列番号12又は16の重鎖アミノ酸配列とを含むものである。
20

【0097】

(i) 不対システイン変異体

本明細書の実施例1及び3は、ペルツズマブの不対システイン変異体について記載している。このような変異体を単離、特徴付け、及び定量化するための分析アッセイには、鎖内ジスルフィド結合（鎖間ジスルフィド結合とは区別されるものとしての）を特異的に評価するアッセイ、例えば、実施例1のような抗体断片（例えばFab断片）の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)分析、実施例1のようなインタクトな抗体のHIC、実施例3のような差別的にタグ付けされた抗体のペプチドマッピング分析、及び/又は本明細書の実施例3及びZhang et al. Anal. Chem. 84(16):7112-7123 (2012)のような逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)が含まれる。
30

【0098】

一般に、ペルツズマブの優占型は、その二つのFabドメインのVLドメインの両方ににおいて、Cys23とCys88の間にジスルフィド結合を含む。図6を参照。

【0099】

本明細書の一の不対システイン変異体は、ヘテロダイマー変異体であり、その二つのFab領域の一方においてのみ、可変軽(VL)ドメインにCys23/Cys88ジスルフィド結合を欠く。図20(b)参照。これは、主な不対システイン変異体であると決定された。
40

【0100】

本明細書の更なる不対システイン変異体は、ホモダイマー変異体であり、そのFab領域の両方にCys23/Cys88ジスルフィド結合を欠く。図20(c)参照。

【0101】

一実施態様では、組成物中における不対システイン変異体の量（ホモダイマー及びヘテロダイマー変異体を含む）は、例えば、Fab疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)によって決定した場合、25%である。

【0102】

一実施態様では、組成物中のホモダイマー変異体の量は、例えば、インタクトな抗体のHICによって決定した場合、4.9%である。

【0103】

一実施態様では、組成物中のヘテロダイマー変異体の量は、インタクトな抗体のHICによって決定した場合、約13%から約18%である。

【0104】

組成物は、任意選択的に、後述するようにこれ以外にも一又は複数の変異体を更に含む。

【0105】

本発明は、単離されたペルツズマブの不対システイン変異体にも関し、不対システイン変異体は、ペルツズマブの一又は複数の可変軽ドメインにCys23/Cys88不対システインを含む。このような単離された不対システイン変異体は、ヘテロダイマー変異体及び/又はホモダイマー変異体を含むか、又はヘテロダイマー変異体及び/又はホモダイマー変異体からなる。このような変異体は、HIC又は他の精製方法を用いて単離することができ、後述の実施例1のように力価アッセイなどの生物学的アッセイを行うことができる(HER2-陽性乳がん細胞を用いて)。

10

【0106】

(i) アフコシル化変異体

本明細書の実施例2及び4は、ペルツズマブのアフコシル化変異体について記載し、組成物中のアフコシル化ペルツズマブのパーセンテージに基づいてADC活性を決定する方法を実証するものである。

20

【0107】

一実施態様では、本発明は、ペルツズマブ及びペルツズマブのアフコシル化変異体を含む組成物に関し、ここでアフコシル化変異体の量は組成物の2%を上回る。例えば、以下の表9の抗2C4907-2、及びラン1参照。

【0108】

代替的一実施態様では、本発明は、アフコシル化変異体の量は組成物の0.9~4.1%である、ペルツズマブ及びペルツズマブのアフコシル化変異体を含む組成物に関する。このアフコシル化変異体の量は、例えば、実施例4の検証済みCE-LIFアッセイを用いて定量化することができる。

30

【0109】

任意選択的に、組成物は、不対システイン変異体(前セクションにおいて記載したヘテロダイマー及び/又はホモダイマー)及び/又は後述する追加の変異体を更に含む。

【0110】

(iv) LMWS及びHMWS

本発明は更に、単離された形態の又は変異体及び主要種抗体を含む組成物の、ペルツズマブの低分子量種(LMWS)及び/又はペルツズマブの高分子量種(HMWS)に関する。LMWS及びHMWSは、限定しないが、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)、及び/又はキャビラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(CE-SDS)を含む様々な技術を用いて単離、特徴付け、及び定量化することができる。

40

【0111】

SE-HPLCアッセイ(例えば実施例5の)を用いると、組成物中の主要種ペルツズマブ、及びHMWS又はLMWSの量は:

主要ピーク 約96%、例えば、約96.7%、約97.3%、例えば、約97.4%。

HMWS: 約2%、例えば、約1.7%、例えば、約1.5%、例えば、約1.4%、例えば、約0.8%。

LMWS: 約2%、例えば、約1.6%、例えば、約1.2%、例えば、約0.6%。

【0112】

50

N R - C E - S D S アッセイ（例えば実施例 5 の）を用いると、組成物中の主要種ペルツズマブ、及び H M W S 又は L M W S の量は：

主要ピーク 約 9 5 %、例えば、約 9 6 . 0 %、例えば、約 9 7 . 8 %。

H M W S : 約 1 %、例えば 約 0 . 6 %。

L M W S : 約 4 %、例えば 約 3 . 4 %。

【 0 1 1 3 】

例えば、C E - S D S によって決定した場合の主要ピーク又は主要種ペルツズマブ（L M W S 及び H M W S を除く）の量は、約 9 5 % ~ 約 9 9 %、例えば、約 9 6 . 0 % ~ 約 9 7 . 8 %、例えば約 9 5 . 3 % ~ 約 9 7 . 3 % 主要ピークである。

【 0 1 1 4 】

任意選択的に、L M W S は、N R - C E - S D S によって取得される「ピーク 6」を含む又はそのような「ピーク 6」からなる（例えば実施例 5 参照）。このようなピーク 6 は、組成物の約 0 . 9 % ~ 約 2 . 3 %、例えば約 2 % ~ 約 2 . 3 % と決定される。

【 0 1 1 5 】

(v) ペルツズマブのピーク 1 及びピーク 2 断片

本発明は、更に、分離若しくは単離された形態の、又は断片及び主要種抗体を含む組成物の、ペルツズマブのピーク 1 断片及び / 又はピーク 2 断片に関する。ピーク 1 及びピーク 2 は、限定しないが、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（S E - H P L C）、及び / 又は R - C E - S D S 及び N R - C E - S D S を含むキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム（C E - S D S）を含む様々な技術を用いて単離、特徴付け、及び定量化することができる。一実施態様では、ピーク 1 及びピーク 2 は、例えば実施例 5 及び 6 に記載のように、R - C E - S D S によって分離及び / 又は分析され、補正後ピーク面積（C P A）により組成物中の % ピーク 1 又はピーク 2 が提供される。

【 0 1 1 6 】

R - C E - S D S アッセイを使用すると（例えば実施例 5 及び 6 のように）、組成物中のピーク 1 の量は、5 %（例えば 0 . 1 3 % ~ 0 . 4 1 % の C P A）であり、組成物中のピーク 2 の量は 1 . 0 %（例えば 0 . 4 7 % ~ 0 . 7 4 % の C P A）である。

【 0 1 1 7 】

(v i) 更なる変異体

本明細書において組成物は、任意選択的に、米国特許第 7 5 6 0 1 1 1 号（K a o ら）及び / 又は国際公開第 2 0 0 9 / 0 9 9 8 2 9 号（H a r r i s ら）に記載されているものなどの、ペルツズマブの更なる変異体を含む。

【 0 1 1 8 】

このような更なる変異体の例には、限定されないが、糖化変異体、ジスルフィド還元型変異体、非還元性変異体、脱アミド化変異体、シアル酸付加変異体、V H S - 変異体、C 末端リジン変異体、メチオニン - 酸化変異体、アフコシリ化変異体、G 1 グリコシリ化変異体、G 2 グリコシリ化変異体、及び非グリコシリ化重鎖変異体のうちのいずれか一つ又は複数が含まれる。

【 0 1 1 9 】

例えば、組成物は、酸性変異体（国際公開第 2 0 0 9 / 0 9 9 8 2 9 号、H a r r i s ら参照）を含み、ここで組成物中の酸性変異体は、糖化変異体、脱アミド化変異体、ジスルフィド還元型変異体、シアル酸付加変異体、及び非還元性変異体のうちの一つ、二つ、三つ、四つ、又は五つを含みうる。好ましくは、組成物中のすべての酸性変異体の量は、約 2 5 % 未満である。一実施態様では、糖化変異体、脱アミド化変異体、ジスルフィド還元型変異体、シアル酸付加変異体、及び非還元性変異体は、組成物中において酸性変異体の少なくとも約 7 5 ~ 8 0 % を占める。

【 0 1 2 0 】

酸性変異体は、多様な方法によって評価することができるが、好ましくは、そのような方法は、組成物が I E C の前、後、及び / 又は最中にシリダーゼによって処理される（例えばシアル酸付加変異体を評価するため）、イオン交換クロマトグラフィー（I E C）

、還元型 C E - S D S (例えはジスルフィド還元型変異体を評価するため) 、非還元型 C E - S D S (例えは非還元性変異体を評価するため) 、ボロネートクロマトグラフィー (例えは糖化変異体を評価するため) 、及びペプチドマッピング (例えは脱アミド化変異体を評価するため) のうちの一つ、二つ、三つ、四つ、又は五つを含む。

【 0 1 2 1 】

組成物は、任意選択的に、アミノ末端リーダー伸長変異体を含む。好ましくは、アミノ末端リーダー伸長は、抗体変異体の軽鎖上にある (例えは抗体変異体の一つ又は二つの軽鎖上) 。本明細書において抗体変異体は、その重鎖又は軽鎖のいずれか一つ又は複数の上にアミノ末端リーダー伸長を含んでよい。好ましくは、アミノ末端リーダー伸長は、抗体の一つ又は二つの軽鎖上にある。アミノ末端リーダー伸長は、好ましくは、 V H S - (即ち V H S - 変異体) を含むか、又は V H S - からなる。組成物中のアミノ末端リーダー伸長の存在は、様々な分析技術によって検出することができ、そのような技術には、限定されないが、 N 末端配列分析、電荷不均一性に関するアッセイ (例えは、陽イオン交換クロマトグラフィー又はキャピラリーゾーン電気泳動) 、質量分析などが含まれる。組成物中の抗体変異体の量は、通常、変異体を検出するために用いられるいずれかのアッセイ (好ましくは陽イオン交換分析) の検出下限となる量から、主要種抗体の量未満の量にわたる。一般に、組成物中の抗体分子の約 20 % 以下 (例えは約 1 % ~ 約 15 % 、例えは 5 % ~ 約 15 % 、好ましくは約 8 % ~ 約 12 %) が、アミノ末端リーダー伸長を含む。このようなパーセンテージの量は、好ましくは、陽イオン交換分析を用いて決定される。

10

【 0 1 2 2 】

主要種抗体及び / 又は変異体の更なるアミノ酸配列変更が考慮され、それには、限定されないが、その一方又は両方の重鎖上に C 末端リジン残基を含む (例えは抗体変異体が、約 1 % ~ 約 20 % の量で存在する) 抗体、一又は複数の酸化メチオニン残基を含む抗体 (例えは、酸化した M e t - 254 を含むペルツズマブ) などが含まれる。

20

【 0 1 2 3 】

更に、上述のアフコシル化変異体及びシアル酸付加変異体を別にして、主要種抗体又は変異体は更なるグリコシル化変異体を含むことができ、その非限定的な例には、その F c 領域に結合した G 1 又は G 2 オリゴ糖構造を含む抗体、一つ又は二つの非グリコシル化重鎖を含む抗体などが含まれる。

30

【 0 1 2 4 】

I I I . 製造及び分析方法

本発明の一実施態様によれば、ペルツズマブ組成物を評価するための方法が提供され、この方法は : (1) 組成物中の不対システイン変異体の量を測定することであって、不対システイン変異体が、ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメインに C y s 23 / C y s 88 不対システインを含む、測定すること、及び / 又は (2) 組成物中のアフコシル化ペルツズマブの量を測定すること、及び / 又は (3) 組成物中のペルツズマブの低分子量種 (L M W S) の量を測定すること、及び / 又は (4) 組成物中のペルツズマブの高分子量種 (H M W S) の量を測定することのうちの、一つ、二つ、三つ、又は四つを含む。任意選択的に、四つすべての分析アッセイが、ペルツズマブ及びその変異体を含む組成物に對して実行される。

40

【 0 1 2 5 】

本発明は、組成物の作製方法にも関し、この方法は : (1) ペルツズマブ及びその一又は複数の変異体を含む組成物を製造すること、及び (2) そのように製造された組成物に、一又は複数の分析アッセイを行って、含まれる変異体の量を評価することを含む。分析アッセイは : (i) ペルツズマブの一方又は両方の可変軽ドメイン中に C y s 23 / C y s 88 不対システインを含む不対システイン変異体、及び / 又は (i i) ペルツズマブの一方の可変軽ドメインにのみ C y s 23 / C y s 88 不対システインを含むヘテロダイマー変異体及び / 又は (i i i) ペルツズマブの両方の可変軽ドメインに C y s 23 / C y s 88 不対システインを含むホモダイマー変異体及び / 又は (i v) ペルツズマブのアフコシル化変異体及び / 又は (v) ペルツズマブの高分子量種 (H M W S) 及び / 又は (v

50

i) ペルツズマブの低分子量種 (L M W S) 、及び / 又は (v i i) ペルツズマブのピーク 1 断片及び / 又は (v i i i) ペルツズマブのピーク 2 断片のうちのいずれか一つ又は複数の量を評価及び定量化することができる。このようにして、これら変異体の一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つ、七つ、又は八つを分析することができる。

【 0 1 2 6 】

任意選択的に、分析アッセイは、ヘテロダイマー及び / 又はホモダイマー変異体を含む不対システイン変異体を、評価、定量化、又は単離する。例えば、分析アッセイには、抗体断片（例えば F a b 断片）又はインタクトな抗体（例えば実施例 1 参照）の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) 、ペプチドマッピング分析（例えば実施例 3 参照）、又は逆相高速液体クロマトグラフィー (H P L C) （例えば実施例 3 参照）が含まれる。

10

【 0 1 2 7 】

一実施態様では、組成物中の不対システイン変異体（ヘテロダイマー及び / 又はホモダイマー変異体）の量は、 F a b 疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) によって決定した場合、約 2 5 % である。

【 0 1 2 8 】

一実施態様では、組成物中のホモダイマー変異体の量は、インタクトな抗体の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) によって決定した場合、4 . 9 % である。

【 0 1 2 9 】

一実施態様では、組成物中のヘテロダイマー変異体の量は、インタクトな抗体の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) によって決定した場合、約 1 3 % ~ 約 1 8 % である。

20

【 0 1 3 0 】

任意選択的に、分析アッセイは、アフコシル化変異体を評価、定量化、又は単離する。アフコシル化の量を使用して、組成物の生物活性、例えば A D C C を決定又は定量化することができる。

【 0 1 3 1 】

加えて、本方法は、ペルツズマブ組成物の生物活性を評価することを含み、これは、組成物中のアフコシル化ペルツズマブ変異体の量を測定して、組成物の抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) 活性を決定すること、及びアフコシル化ペルツズマブの量が約 0 . 9 % ~ 約 4 . 1 % の範囲内であることを確認することを含む。例えば、本方法は、アフコシル化ペルツズマブの量を、キャピラリー電気泳動 - レーザー誘起蛍光 (C E - L I F) を用いて測定することを含む。

30

【 0 1 3 2 】

任意選択的に、アフコシル化を評価するための分析アッセイはキャピラリー電気泳動 (C E) であり、これにはキャピラリー電気泳動 - レーザー誘起蛍光 (C E - L I F) が含まれる。後述の実施例 2 及び 4 を参照。アフコシル化変異体の量は、任意選択的に、組成物の約 0 . 9 ~ 約 4 . 1 % である（例えば実施例 4 において C E - L I F によって測定した場合）。一実施態様では、アフコシル化変異体の量は、組成物の 2 % を上回っている（例えば実施例 4 において C E - L I F によって測定した場合）。

40

【 0 1 3 3 】

任意選択的に、分析アッセイは、ペルツズマブの低分子量種 (L M W S) 及び / 又は高分子量種 (H M W S) を、評価、定量化又は単離する。例示的アッセイには、 S E - H P L C 及び / 又は C E - S D S (例えば、後述の実施例 5 参照) が含まれる。

【 0 1 3 4 】

一実施態様では、分析アッセイは S E - H P L C を含み（例えば実施例 5 において）、そのようにして分析される組成物中の主要種ペルツズマブ、 H M W S 又は L M W S の量は下記のように決定される：

主要ピーク 約 9 6 % 、例えば、 約 9 6 . 7 % 、 約 9 7 . 3 % 、例えば、 約 9 7 . 4 % 。

H M W S : 約 2 % 、例えば、 約 1 . 7 % 、例えば、 約 1 . 5 % 、例えば 約 1 . 4

50

%、例えば 約 0 . 8 %。

L M W S : 約 2 %、例えば、約 1 . 6 %、例えば、約 1 . 2 %、例えば 約 0 . 6 %。

【 0 1 3 5 】

一実施態様では、分析アッセイは C E - S D S (例えは実施例 5 において) を含み、そのようにして分析される組成物中の主要種ペルツズマブ及び H M W S 又は L M W S ペルツズマブの量は、下記のように決定される：

主要ピーク 約 9 5 %、例えば、約 9 6 . 0 %、例えば、約 9 7 . 8 %。

H M W S : 約 1 %、例えば 約 0 . 6 %。

L M W S : 約 4 %、例えば 約 3 . 4 %。

10

【 0 1 3 6 】

一実施態様では、組成物が N R - C E - S D S によって評価され、主要ピーク又は主要種ペルツズマブ (L M W S 及び H M W S を除く) が、このようにして分析される組成物の約 9 5 % ~ 約 9 9 %、例えは、約 9 6 . 0 % ~ 約 9 7 . 8 %、例えは約 9 5 . 3 % ~ 約 9 7 . 3 % であることが分かる。

【 0 1 3 7 】

一実施態様では、組成物中の「ピーク 6」の量が C E - S D S (例えは実施例 5 参照) によって評価され、ピーク 6 L M W S の量が、このようにして分析される組成物の約 0 . 9 % ~ 約 2 . 3 %、例えは約 2 % ~ 約 2 . 3 % と決定される。

【 0 1 3 8 】

一実施態様では、組成物中のピーク 1 及び / 又はピーク 2 の量が R - C E - S D S によって評価され (例えは実施例 5 及び 6 参照) 、ピーク 1 の量が 5 % (例えは 0 . 1 3 % ~ 0 . 4 1 % C P A) であること、及びピーク 2 の量が 1 . 0 % (例えは 0 . 4 7 % ~ 0 . 7 4 % C P A) であることが決定される。

20

【 0 1 3 9 】

本方法は、任意選択的に、精製された組成物を一又は複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて薬学的組成物を作製することを更に含む。加えて、薬学的組成物を、添付文書 (例えはそのユーザに、がんを治療するために薬学的組成物を使用することを指示する処方情報を有する) と共に包装される容器内に入れて、製品をつくることができる。

【 0 1 4 0 】

I V . 薬学的組成物

ペルツズマブ及びその変異体を含む薬学的組成物は、所望の純度を有する組成物を、一般的に凍結乾燥製剤又は水溶液の形態の任意選択的な薬学的に許容される賦形剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することにより、貯蔵用に調製される。抗体結晶も考慮される (米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 1 3 6 7 1 9 号参照) 。薬学的に許容される賦形剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、ヒスチジンアセテートのようなバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；低分子量 (約 1 0 残基未満) のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンといったタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジンなどのアミノ酸；单糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；E D T A などのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体 (例えは Z n - タンパク質錯体) ；及び / 又はポリソルベート (例えはポリソルベート 2 0 又は 8 0) 、P L U R O N I C S T M 又はポリエチレングリコール (P E G) などの非イオン性界面活性剤を含む。

30

【 0 1 4 1 】

凍結乾燥させた抗体製剤は、米国特許第 6 2 6 7 9 5 8 号、米国特許第 6 6 8 5 9 4 0 号及び米国特許第 6 8 2 1 5 1 5 号に記載されており、これらは参考により本明細書に明示的に包含される。例示的なトラスツズマブの薬学的組成物は、無菌であり、白色から淡

40

50

黄色の、静脈内(IV)投与を目的とした保存料を含まない凍結乾燥粉末であり、440mgのトラスツズマブ、400mgのL-トレハロースデハイドレート、9.9mgのL-ヒスチジン-HCl、6.4mgのL-ヒスチジン、及び1.8mgのポリソルベート20を含んでいる。1.1%のベンジルアルコールを保存料として含有する20mLの静菌性の注射用水(BWFⅠ)の再構築により、21mg/mLのラスツズマブを含む複数回投与溶液(pH約6.0)が得られる。

【0142】

治療的使用のための例示的なペルツズマブの薬学的組成物は、20mMのヒスチジンアセテート、120mMのスクロース、0.02%のポリソルベート20(pH6.0)中に、30mg/mLのペルツズマブを含む。別のペルツズマブ製剤は、25mg/mLのペルツズマブ、10mMのヒスチジン-HClバッファー、240mMのスクロース、0.02%のポリソルベート20を含む(pH6.0)。
10

【0143】

インピボでの投与に使用される薬学的組成物は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0144】

V. 治療的用途及び使用

本明細書の組成物は、例えば転移性又は局所再発性の、切除不能な乳がん、又は新規のステージIVの疾患などの、HER2-陽性乳がんといったがんを治療するために使用することができ、免疫組織化学(IHC)3+及び/又は蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)増殖比2.0と定義される。任意選択的に、集団に含まれる患者は、治療歴を有さないか又はアジュvant療法後に再発している、ベースラインにおいて50%の左室駆出分画率(LVEF)を有する、及び/又東部共同腫瘍学グループのパフォーマンスステータス(ECOG PS)が0又は1である。
20

【0145】

別の実施態様では、組成物は、初期段階HER2-陽性乳がんを治療するために、例えばトラスツズマブ、及び化学療法と組み合わせて使用することができ、この場合化学療法は、アントラサイクリンベースの化学療法、又はカルボプラチニベースの化学療法を含む。一実施態様では、化学療法は、例えば5-FU、エピルビシン、及びシクロホスファミド(FEC)を含む、アントラサイクリンベースの化学療法を含む。別の一実施態様では、化学療法は、例えばハーセプチン(登録商標)/トラスツズマブ(例えばTC赫レジメン)に加えてタキサン(例えばドセタキセル)、カルボプラチニを含む、カルボプラチニベースの化学療法を含む。一実施態様では、組成物は、アントラサイクリンベースの化学療法又はカルボプラチニベースの化学療法と同時に投与され、例えばここでペルツズマブ、トラスツズマブ及び化学療法は、3週のサイクルで投与され、ペルツズマブ、トラスツズマブ及び化学療法は各サイクルの1日目に投与される。本明細書において考慮される初期段階のHER2-陽性乳がん療法には、ネオアジュvant及びアジュvant療法が含まれる。
30

【0146】

また別の実施態様では、組成物は、任意選択的にトラスツズマブ、並びにプラチニ(例えばシスプラチニ)及び/又はフルオロピリミジン(fluoropyrimidine)(例えばカペシタビン及び/又は5-フルオロウラシル(5-FU))といった化学療法と組み合わせて、HER2-陽性胃がんを治療するために使用することができる。
40

【0147】

別の一実施態様では、組成物は、任意選択的にトラスツズマブ及びビノレルビンと組み合わせて、HER2陽性乳がんを治療するために使用することができる。この実施態様による乳がんは、転移性又は局所進行性であってもよい。患者は、転移性の状況で全身非ホルモン抗がん療法を受けたことがなくてもよい。

【0148】

別の一態様では、組成物は、患者のHER2陽性乳がんを治療するために使用され、こ
50

れには組成物、トラスツズマブ、及びアロマターゼ阻害剤（例えばアナストロゾール（anastrozole）又はレトロゾール）を患者に投与することが含まれる。この実施態様によれば、乳がんは、エストロゲン受容体（ER）陽性及び／又はプロゲステロン受容体（PgR）陽性乳がんといったホルモン受容体陽性乳がんを含む進行性乳癌がんである。患者は、転移性の状況で全身非ホルモン抗がん療法を受けたことがなくてもよい。この治療方法は、任意選択的に、導入化学療法（例えばタキサンを含む）を患者に投与することを更に含む。

【0149】

更なる態様では、組成物は、卵巣がん、原発性腹膜がん、又は卵管がんといった低HER3がんを治療するために使用される。例えば、米国特許第7981418号（Amelar）及び米国特許出願公開第2006-0013819-A1号（Kelsay, S.）を参照されたい。10

【0150】

抗体及び化学療法的治療は、既知の方法に従ってヒト患者に対して施される。特定の投与計画及び製剤を、本明細書の実施例に記載する。

【0151】

本発明の特定の一実施態様によれば、約840mg（負荷用量）のペルツズマブが、統いて約420mg（維持量）の単回又は複数回用量のペルツズマブが投与される。維持量は、好ましくは、約3週毎に、合計で少なくとも二回、臨床的に進行性の疾患、又は管理不能な毒性まで、例えば6～20回投与される。これ以上の治療サイクルを含む更に長い治療期間も考慮される。20

【0152】

がんが胃がんである別の特定の実施態様によれば、ペルツズマブはすべての治療サイクルについて840mgの用量で投与される。

【0153】

V I . 製造品

本明細書において、製造品の一実施態様は、本明細書の組成物又は薬学的組成物を収容するバイアル、シリンジ、又は輸液（IV）バッグといった容器を含む。任意選択的に、製品は、本明細書の前セクションによる組成物の使用法を説明した処方情報を有する添付文書を更に含む。30

【0154】

V II . 生物学的物質の寄託

以下のハイブリドーマ細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA）（ATCC）に寄託されている：

抗体名	ATCC番号	寄託日
4D5	ATCC CRL 10463	1990年5月24日
2C4	ATCC HB-12697	1999年4月8日

【0155】

本発明の更なる詳細は、以下の非限定的な実施例により説明される。本明細書中の全ての引用文献の開示内容は、参照により本明細書中に明示的に援用される。

【実施例】

【0156】

実施例 1

ペルツズマブのCys23/Cys88不対システイン変異体及びその特徴付け

ペルツズマブは、ヒトIgG1（）フレームワークに基づくヒト化モノクローナル抗体（MAb）である。組換え抗体は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞により生成され、鎖間及び鎖内ジスルフィド結合を有する二つの軽鎖（それぞれ214アミノ酸

10

20

30

40

50

残基)と二つの重鎖(それぞれ449アミノ酸残基)とを含む。ペルツズマブの軽鎖及び重鎖配列を、それぞれ図3A及び3Bに示す。インタクトなペルツズマブの計算された分子量は145197Daである(ペプチド鎖のみ、重鎖C末端リジン残基は含まない)。

【0157】

また、各重鎖のCH2ドメインは、Asn299に单一の保存グリコシル化部位を有する。

【0158】

ペルツズマブは、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))とは、軽鎖の相補性決定領域(CDR)(12のアミノ酸の相違)、重鎖(29のアミノ酸の相違)及びヒト上皮増殖因子受容体2(p185^{HER2})上で異なるエピトープに結合するという事実において異なる。ヒト上皮細胞上におけるペルツズマブのHER2受容体への結合は、HER2がHER受容体ファミリーの他のメンバー(EGFR、HER3、HER4を含む)と複合体を形成すること、及びHER2ホモダイマーを形成することを防止する。複合体の形成をロックすることにより、ペルツズマブは、リガンドによって開始される、二つの主要なシグナル経路、即ちマイトジエン活性化タンパク質(MAP)キナーゼ及びホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)を介した細胞内シグナル伝達を阻害する結果、それぞれ細胞の増殖及び生存を阻害する。

【0159】

この実施例は、ペルツズマブの不対システイン変異体、即ち抗体の一方又は両方の軽鎖に不対システインを含むCys23/Cys88不対システイン変異体の同定及び特徴付けに関する。

【0160】

遊離スルフヒドリルをエルマン試薬を用いて測定したところ、タンパク質1モルあたり0.1~0.3モルの無反応スルフヒドリル含有量が示された。疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)分析及びペプチドマップ分析により、一方又は両方の軽鎖上のCys23及びCys88における不対システイン残基が明らかになった。パパインHICを使用して、これら部位における遊離スルフヒドリルを含むFab変異体のレベルが、商業的製造方法を用いて製造されたペルツズマブ材料中において12.7%~13.5%であることが分かった。インタクトな抗体のHIC分析は、二つの主要な形態が78%~85%の野生型ペルツズマブと、13.4%~18.4%のペルツズマブヘテロダイマー(一のアーム上の不対システイン対)であることを示した。

【0161】

材料及び方法

試験された組成物：この実施例は、現行のペルツズマブの参照基準バッチ抗2C4907-2及び第I/I相臨床材料であるラン1と、すべて商業的方法を用いて12000リットル(L)規模で生産された五つの第I/I相/市販のバッチ(ラン3~7)の特徴付けについて記載する。第I/I相臨床材料である、以前の参照基準バッチ抗2C4-900-1に対する比較も行われる。

【0162】

試験した組成物は、20mMのL-ヒスチジンアセテート、120mMのスクロース、及び0.02%(w/v)のポリソルベート20(pH6.0)中、30mg/mLで市販の製剤に製剤化された製剤原料であった。バッチ抗2C4-900-1は、臨床開発の初期において、10mMのL-ヒスチジンクロリド、240mMのスクロース、及び0.02%(w/v)のポリソルベート20(pH6.0)中、25mg/mLで製剤化されたものであった。

【0163】

非還元型ペプチドマップ分析及び質量分析によるジスルフィド結合分析：非還元条件下でペルツズマブを変性させ、存在する遊離スルフヒドリル基をすべてアルキル化するために、製剤バッファー中約0.5mgのペルツズマブを、変性バッファー(8MのGdHCl、10mMのN-エチルマレイミド(NEM)、0.1Mの酢酸ナトリウム(pH5.

10

20

30

40

50

0))と混合し、次いで37で3時間インキュベートした。この溶液を、NAP-5カラムを用いて600μLの0.1M Tris、1mM CaCl₂(pH 7.0)にバッファー交換した。アセトニトリル(ACN)を各試料に加え、濃度10%に到達させた。トリプシン消化を、酵素：基質の比1:10(w/w)において37で16時間実行した。結果として得られたペプチドを、亜硫酸分解トリプシンマップのための後述の方法を用いて、RP-HPLCにより分離した。

【0164】

亜硫酸分解トリプシンマップ：ペルツズマップペプチドマップを生成するために、タンパク質を、システイン残基の還元及び亜硫酸分解後、消化した。ペルツズマップのアリコート(1mg)を、システイン残基の還元及び亜硫酸分解のために、360mMのTris-HCl(pH 8.6)、6Mの塩酸グアニジン(GdHCl)、2mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、13mMの亜硫酸ナトリウム、及び38mMのテトラチオニ酸ナトリウムに加えた。試料を37で20分間インキュベートした。亜硫酸分解した試料を、PD-10カラムに充填し、10mMのTris、0.1mMのCaCl₂(pH 8.3)で溶出した。バッファー交換に続いて、20μLの10%オクチル-B-グルコシド溶液及び20μLの1mg/mLトリプシンを加えた。試料を、37で5時間インキュベートした。消化反応を、25μLの10%トリフルオロ酢酸(TFA)でクエンチした。結果として得られたペプチドを、Zorbax 300SB-C8カラム(4.6mm×150mm)を用いて、RP-HPLCによって分離した。ペプチドを、5分間保持した後、溶媒Bを57分で0%から17%へ(直線勾配)、149分で溶媒B 32%、162分で溶媒B 45%、及び173分で溶媒B 95%という初期条件で分離した。179分において、カラムを25分間100%溶媒Aに再調整し、総ランタイムは204分であった。溶媒Aは水中0.1%のTFAからなり、溶媒Bはアセトニトリル中0.08%のTFAからなっていた。カラムを37に維持し、0.5mL/分の流速で溶出した。溶出プロファイルを214nm及び280nmでモニターした。トリプシンペプチドの質量を、分離された消化混合物の、LTQ ORBITRAPTM質量分光計を用いた液体クロマトグラフィー-質量分光学(LC-MS)分析によって決定した。

【0165】

エルマン分析による遊離スルフヒドリル含有量：ペルツズマップ試料を、反応バッファー(100mMのリン酸カリウム、1mMのEDTA、8Mの尿素(pH 8))にバッファー交換し、標準曲線の範囲内で遊離チオール濃度になるような濃度に調節した。ジチオニトロベンゼン(DTNB)の溶液(10mM)及びシステイン標準曲線(0~100μMにハポイント)を、反応バッファー中において調製した。96ウェルプレート上において、165μLの試料又は標準を、3連ウェルに加えた。反応を、10μLのDTNBの付加により開始させ、次いで30分間インキュベートした。インキュベーション後、吸光度を、SPECTRAMAX M²(登録商標)プレートリーダーを用いて412nmで測定した。遊離チオールの濃度を、標準曲線から得られた一次方程式を用いて計算した。タンパク質の濃度を、分光光度計から得られた280nmにおける吸光度を用いて決定した。遊離チオールは、ペルツズマップ1モル当たりの遊離チオールのモル数として報告される。

【0166】

パパインHIC：パパイン消化ペルツズマップ試料のために、試料を、カルボキシペプチダーゼB(CpB)によりC末端リジンを除去した後、パパインにより消化した。Fab及びFcドメインを、ポリプロピルアスパルトアミドカラム(4.6mm×100mm、1500、3μm)を用いたHICにより分離した。溶媒Aは、1.6Mの硫酸アンモニウム、20mMのリン酸カリウム(pH 6.05)からなり、溶媒Bは20mMのリン酸カリウム(pH 6.05)からなっていた。被分析物を、3~6分で0%~18%の勾配の溶媒B、21分で24%の溶媒Bで分離した。カラムを流速0.8mL/分で25に維持した。溶出プロファイルを280nmでモニターした。

【0167】

10

20

30

40

50

インタクトな抗体のH I C：インタクトなペルツズマブ試料を、ポリプロピルアスパルトアミドカラム（9.4 mm × 100 mm、1500、3 μm）を用いたH I Cにより分離した。溶媒Aは1.0 Mの硫酸アンモニウム、20 mMのリン酸カリウム（p H 6.05）からなり、溶媒Bは20 mMのリン酸カリウム（p H 6.05）からなっていた。被分析物を、12%の溶媒Bを用いて25分間均一濃度で分離した。カラムを流速2 mL/分で30°Cに維持した。溶出プロフィールを280 nmでモニターした。

【0168】

ペプチドマスフィンガープリンティングによるS D S - P A G E：還元及び非還元両方のペルツズマブ試料を、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）により分析した。非還元試料について、試料（5 μg）を、ヨードアセトアミドと共に、S D S - P A G E 試料バッファーの存在下で5～10分間、60 ± 2°で加熱することにより変性させた。試料を、80 mMのジチオスレイトール（D T T）存在下において、15～20分間60 ± 2°で還元した。変性した試料を、4%～20%のポリアクリルアミド勾配ゲル中で分離させ、S Y P R O™ R u b y 色素で染色し、タンパク質バンドパターンを得た。ペルツズマブ試料と共に、分子量標準及びS Y P R O™ R u b y - 染色感度標準（2 ng / レーン及び8 ng / レーンのウシ血清アルブミン（B S A））を、ゲル上に含めた。

10

【0169】

ペプチドマスフィンガープリンティングは、タンパク質同定のための分析技術である。ゲルを10 μgの市販の参照基準バッヂ抗2C4907-2及びラン5に充填した。S D S - P A G E によって分離したすべてのバンドを、トリプシンによってペプチドに切断した。ペプチドの絶対質量は、B R U K E R™ M A T R I C X S 支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析（M A L D I - T O F M S）によって正確に測定される。ペプチド質量のリストを使用して、タンパク質配列を検索することによりタンパク質を同定した。非還元及び還元ペルツズマブの両方において観察されたすべてのバンドが、ペプチドマスフィンガープリンティングによって同定された。

20

【0170】

バイオアッセイによる力価：ペルツズマブ力価方法は、ヒトH E R 2 発現乳がん細胞株の増殖を阻害するその能力を測定することによりペルツズマブの力価を評価する。典型的なアッセイにおいて、96ウェルマイクロタイタープレートに乳癌細胞を播種し、加湿したインキュベーター内でインキュベートした。インキュベーション後、培地を除去し、様々な濃度のペルツズマブ参照基準、アッセイコントロール、及び試料をプレートに加えた。次いでプレートをインキュベートし、生細胞の相対数を、酸化還元色素A L A M A R B L U E（登録商標）を用いて間接的に定量化した。530 nmでの励起及び590 nmでの放射を用いて蛍光度を測定した。A L A M A R B L U E（登録商標）は、酸化状態において青色で非蛍光性であるが、細胞の細胞内環境により還元されると蛍光性の高いピンク色の形態となる（Page et al. Int. J. Oncol. 3. 473-476 (1993)）。色及び蛍光度の変化は、生細胞の数に比例する。相対蛍光単位（R F U）で発現した結果を、ペルツズマブ濃度に対してグラフ化し、平行線プログラムを用いて参照基準に対するペルツズマブ試料の抗-増殖活性を予測した。

30

【0171】

結果

ジスルフィド結合の割当て：ペルツズマブには32のシステインが存在して16のジスルフィド結合を形成しており、そのうち四つは鎖間の、12は鎖内の結合である。しかしながら、分子の多量体の性質により、九つの異なるジスルフィド結合のみが存在する。天然タンパク質を、トリプシンで消化し、すべてのジスルフィド結合ペプチドの解放を達成した。ペルツズマブバッヂのクロマトグラフィーによるプロフィールを図7に示す。市販の参照基準バッヂ抗2C4907-2の消化の逆相L C - M S 分析により、予測したジスルフィド結合ペプチド対のすべてが得られた（表2）。

40

【0172】

50

表2：LC-MSにより同定されたジスルフィド結合ペプチド対

予測 ^a	ジスルフィド結合 ^c	実測	予測質量	実測質量	
			(Da) ^b	(Da) ^b	
T2H=T10H	Cys22=Cys96	T2H=T10H	3429.48	3429.48	
T13H=T14H	Cys146=Cys202	T13H=T14H	7917.92	7917.92	
T19H=T19H	Cys228=Cys228	T19H=T19H	5455.78	5455.79	
	Cys231=Cys231				
	T21H=T27H	Cys263=Cys323	T21H=T27H	2329.10	2329.10
	T35H=T40H	Cys369=Cys427	T35H=T40H	3845.82	3845.82
	T18H=T20L	Cys222=Cys214	T18H=T20L	757.24	757.24
	T18H=T20L	Cys222=Cys214	T18H=T19L-	1261.49	1261.49
		T20L ^d			
	T2L=T7L	Cys23=Cys88	T2L=T7L	5393.48	5393.48
	T11L=T18L	Cys134=Cys194	T11L=T18L	3556.75	3556.75

注：等号(=)はジスルフィド結合を表す。

H=重鎖；L=軽鎖；LC-MS=光速液体クロマトグラフィー質量分析；T=トリプシンペプチド

^a 図9及び10参照。

^b モノアイソトピック質量(MH⁺)。

^c ジスルフィドが推察されるT19Hダイマーの割当では、Cys228=Cys228及びCys231=Cys231ジスルフィドの検証を含まなかった。

^d このジスルフィド結合対の存在は、T19L及びT20Lを切断しない別の酵素、Lyso-Cの使用により確認された。

【0173】

同定されたペプチドを、ジスルフィド還元時のペプチド対から予測されるペプチドの同定により更に確認した(図8、並びに図9及び10の拡大図)。重鎖ペプチドT19Hのダイマー(T19H=T19H)が、二つのジスルフィド結合を含むと同定された; Cys228=Cys228及びCys231=Cys231対の同定が推察される。一つのジスルフィド対、T18H=T20Lが、LC-MSによって検出されたが、空隙用量の近くまで溶出され、紫外線(UV)クロマトグラム上の異なるピークとして同定可能ではなかった。このジスルフィド対の存在は、Lyso-C消化のLC-MS分析により更に確認され、ここでペプチドT18H=T19L-T20Lが観察された。不測の結合は見られなかった。一つのジスルフィド結合は、後述のように、部分的に不对であった。

【0174】

10

20

30

40

50

遊離スルフヒドリル分析：適切に折り畳まれたペルツズマブ内のすべてのシステイン残基はジスルフィド結合に関与しているはずである。ペプチド及びタンパク質の遊離スルフヒドリル含有量の測定方法であるエルマンのアッセイ (Ellman, G. Arch. Biochem. Biophys. 82 70-77 (1959)) を使用して、ペルツズマブ中に反応性の非修飾（遊離）チオールが存在するかどうかを決定した。すべての材料を、遊離チオール（不対システイン残基）含有量について評価した。結果は表3にまとめられている。

【0175】

表3：エルマンのアッセイによる遊離チオール含有量

バッチ名	ヘルツズマブ 1モル当たりの 遊離チオールのモル
抗 2C4-900-1	0.06
抗 2C49072	0.15
ラン1	0.28
ラン3	0.16
ラン4	0.17
ラン5	0.16
ラン6	0.16
ラン7	0.14

注：遊離チオールのレベルを、8Mの尿素の存在下において、エルマンのアッセイによって決定した。

10

20

30

40

50

【0176】

ペルツズマブ1モル当たり約0.1~0.3モルの遊離チオールが、分析したすべてのバッチに観察された。8Mの尿素の非存在下において、遊離チオールのレベルは、試験されたすべての材料において定量限界 (QL; タンパク質1モル当たり約0.1モルの遊離チオール) 未満であり、非変性条件下においてペルツズマブ分子中に存在する遊離チオール（即ち、不対システイン）は埋没しておりエルマン試薬に到達不能であることが示された。

【0177】

CpB及びパパイン消化後のHICによるペルツズマブ材料の分析により、FcピークとFabピークの間の別のピークが明らかになり、このピークはCys23及びCys88に不対システイン残基を含有するFab変異体として同定された（図11及び12、遊離チオールFabとして標識化）。この同定は、LC-MSトリプシンペプチドマッピングにより確認され、ここで試料は、還元及びペプチド消化にの前にNEMの存在下において変性を受けた。パパインHIC方法を用いた遊離チオールFab変異体の程度がペルツズマブバッチ全体にわたって測定され、現行プロセスを用いた場合との一貫性が見出された（表4）。

【0178】

表4：パパインHICによって決定されたCys23/Cys88不対システインFab変異体又は計算されたインタクトな抗体変異体の相対量

バッヂ名	不対システイン		10 20
	Fab 変異体 パーセント	インタクトな抗体変異体* パーセント	
抗 2C4-900-1	9.4	17.9	
抗 2C49072	12.7	23.8	
ラン 1	13.2	24.6	
ラン 3	13.3	24.9	
ラン 4	13.5	25.2	
ラン 5	13.3	24.9	
ラン 6	12.9	24.2	
ラン 7	13.2	24.6	

注：不対システイン F a b ピーク面積を不対システイン F a b + F a b のピーク面積で除すことにより、不対システイン F a b ピークのパーセントを得た。

*後述のように計算された

【 0 1 7 9 】

パパイン H I C アッセイによれば、商業的プロセスを用いて製造された材料の値は 12 . 7 % ~ 13 . 5 % にわたり、その一方参照基準バッヂ 2 C 4 - 9 0 0 - 1 (第 I / I I 相) の値はやや低く、 9 . 4 % であった。

【 0 1 8 0 】

パパイン H I C に基づく % F a b 変異体から予測される % インタクト抗体変異体への変換：不対システインを含む F a b 断片の相対量を使用して、不対システイン変異体のヘテロダイマー又はホモダイマー形態の相対分布を計算することができる。パパイン H I C アッセイによって、ペルツズマブ由来の F a b 断片の 10 % (又は x %) が不対システインを C y s 2 3 / C y s 8 8 に含むことが示される場合、パパインによる 50 個の抗体の消化により 100 個の F a b 断片が生じるはずであるため、 50 個のペルツズマブ分子毎に放出される不対システインを含む 10 個の F a b 断片が存在するはずである。これら 10 個の F a b 断片が、 10 個の異なるペルツズマブ分子由来であると仮定すると、 C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを有する一つの F a b を含む相対量のペルツズマブは、約 20 % 、即ち 50 個のペルツズマブ分子のうち 10 個 (又は 2 x %) である。具体的に、 C y s 2 3 / C y s 8 8 不対システインを含む二つの F a b を有するペルツズマブの確率を考慮すると、ペルツズマブのヘテロダイマー不対システイン変異体の相対量は $2 \times 10 \% \times 90 \% = 18 \%$ (又は $2 \times x \% \times [100 - x] \%$) であるはずである。加えて、ペルツズマブのホモダイマーの不対システイン変異体の相対量は、 $10 \% \times 10 \% = 1 \%$ (又は $x \% \times x \%$) であるはずである。この場合、いずれの F a b にも不対システインを有さない 2 つの F a b を含むペルツズマブの相対量は、 $90 \% \times 90 \% = 81 \%$ (又は $[100 - x] \% \times [100 - x] \%$) であるはずである。

【 0 1 8 1 】

加えて、野生型ホモダイマー (不対システインを有さない) 及びヘテロダイマー (一つの F a b に不対システインを有する) は、 H I C によって直接定量化することができる。

30

40

50

インタクトな抗体のHICは、ペルツズマブを二つの主要なピークに分離し(図13)、これらはLC-MSTリップシンペプチドマッピングによって野生型ホモダイマー(遊離チオールを有さない)及びヘテロダイマー(一つのFabに遊離チオール対を有する)に同定された。小さな前部ショルダーピークも収集され、パパインHICによって主にホモダイマー(両方のFab上に遊離チオール対、約40%)及びFc酸化を有するペルツズマブと特徴付けられた。インタクトな抗体のHICを用いて、ペルツズマブは、現行プロセスを用いて製造される材料について約17%~18%のヘテロダイマーを、第I/I相プロセスを用いて製造される材料について同13%を、それぞれ含むと予測された(表5)。いずれか一つの理論に縛られるものではないが、商業的プロセスによって製造される不対システイン変異体の增量(第I/I相プロセスと比較して)は、チオール酸化(ジスルフィド形成)率より速く起こるタンパク質(即ちVLドメイン)のフォールディング率、従って変異体中の遊離システインのトラップに起因している可能性がある。

【0182】

表5：インタクトなペルツズマブのHICにより決定された
インタクトな不対システイン変異体の相対量

バッチ名	ピーグ		
	野生型	不対システイン	部分濃縮不対システイン
	ホモダイマー(%)	ヘテロダイマー(%)	ホモダイマー(%)
抗2C4-900-1	84.7	13.4	1.9
抗2C49072	78.9	18.2	2.9
ラン1	78.4	18.4	3.2
ラン3	79.1	17.6	3.2
ラン4	79.3	17.3	3.4
ラン5	79.1	17.4	3.5
ラン6	79.7	17.2	3.1
ラン7	79.3	17.3	3.4

注：相対ピーグのパーセントは、個々のピーグ面積を三つすべてのピーグの合計ピーグ面積によって除すことにより得られた。

【0183】

HICによりペルツズマブの軽鎖上のCys23/Cys88に不対システイン対が観察されたため、不対システイン変異体の各々の精製された画分を、抗増殖アッセイにおいて試験した。Fabを含む不対システインが精製され、力価の低下が予測された(予測された力価は天然Fabと比較して~50%であった)(表6)。

【0184】

表6：不対システインFab変異体の抗増殖

ペルツズマブ 試料及び条件	平均活性% (n=2)	差異%
天然 Fab	100	-
不対システイン-Fab	50 ^a	67

注：活性パーセントは天然Fabと比較して報告された。

^a 予測力価値。用量反応曲線は平行ではなく、下部プラトーは収束しない。

10

【0185】

加えて、三つのインタクトな形態（野生型ホモダイマー、ヘテロダイマーを含む遊離チオール、及びホモダイマーを含む不対システイン）を、HICによって単離し、抗増殖力価アッセイにより試験した。表7参照。

【0186】

表7：完全長ペルツズマブの抗増殖活性

不対システイン変異体画分

ペルツズマブ 試料及び条件	抗増殖	
	平均活性% (n=3)	CV(%)
出発物質	110	11
ヘテロダイマー	112	7
野生型ホモダイマー	104	15
不対システイン含有ホモダイマー ^a	90	15

注：ペルツズマブ参考基準（バッチ：抗2C4907-2）に対して報告された活性パーセント

20

^a 画分は、約40%の不対システイン含有ホモダイマー及び60%のヘテロダイマー又は野生型ホモダイマー混合物を含む。

30

【0187】

これらデータは、ペルツズマブの不対システイン変異体が、商業的規模で製造された組成物中に存在することを実証するものである。この実施例のHIC法(Fab断片又はインタクトな抗体を評価する)又は後述の実施例3のペプチドマッピングは、ペルツズマブ組成物中の不対システイン変異体の存在及び量を評価するために使用できるアッセイである。

40

【0188】

実施例2

アフコシル化ペルツズマブ組成物及びその特徴付け

抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）は、細胞媒介性免疫の一環であり、これによりエフェクター細胞は能動的に、抗原特異性抗体に結合した標的細胞を溶解する。ペルツズマブは、HER2³⁺細胞を用いて試験したときADCC活性を呈したが、HER2¹⁺細胞の場合は活性は殆ど観察されなかった（図14）。

【0189】

ペルツズマブの第I相及び第II相の参考基準におけるアフコシル化のレベルを、キ

50

キャピラリー電気泳動を用いて測定した。ペルツズマブ第I I I相参照基準の高レベルのアフコシル化材料 (G 0 - F = 2 . 2 %) は、低い G 0 - F (0 . 8 %) を有していた第I相参照基準と比較した場合に観察される、高いADCC活性と相關している(図15)。また、酵素的に脱グリコシル化されたペルツズマブが調製され、試験されて、Fc R I I I aに結合しないこと及びADCC活性を有さないことが示された(表8)。

【0190】

表8：脱グリコシル化ペルツズマブの生物活性

ペルツズマブ試料	平均活性% (n=3)				
及び条件	抗増殖	HER2 結合	Fc γ RIIIa 結合	ADCC	FcRn 結合
コントロール	90	105	106	101	85
脱グリコシル化	87	94	活性なし	活性なし	72

注：ペルツズマブ参照基準(バッチ：抗2C4907-2)に対して報告された活性パーセント

ADCC = 抗体依存性細胞介在性細胞傷害性

【0191】

これらのデータは、G 0 - F (アフコシル化された)ペルツズマブを測定することが、ペルツズマブのADCC活性を定量化するための有効な手段であることを示している。アフコシル化を定量化するための実験は下記の通りである。

【0192】

キャピラリー電気泳動(CE)によるオリゴ糖分析：ペルツズマブ試料(250~500 μ g)を、プロテインA固体相抽出アフィニティーチップ(PHYTIPSTM)及び自動化液体ハンドリングシステムを用いて精製した。ペルツズマブ試料を、12 mMの塩酸(pH 2.0)を用いてプロテインA樹脂から溶出し、50 mMのコハク酸ナトリウム10 μ Lを用いて中和した。結果として得られた試料を、2.5 U/mLのPNGase

Fを用いて15時間37でインキュベートした。タンパク質を、溶液を95で5分間加熱することにより沈殿させ、遠心分離により除去した。放出されたオリゴ糖を含む上清溶液を減圧乾燥した。放出されたグリカンを、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを含む15%の酢酸溶液中において8-アミノピレン-1,2,6-トリスルホン酸(APTS)を用いて55で二時間誘導体化した。アルゴン-イオンレーザー(488 nm励起、520 nm放出)及びN-CHOコーティングキャピラリー(50 μ m × 50 cm)を用いる蛍光検出モジュールを備えたキャピラリー電気泳動(CE)システムを用いて、誘導体化したグリカンの分析を実行した。ランニングバッファーは、40 mMの-アミノ-n-カプロン酸/酢酸(pH 4.5)、0.2%のヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)であった。試料を、0.5 psiの圧力によりキャピラリーに注入した。分離を20 kVで実行し、キャピラリーの温度を20に維持した。

【0193】

ペルツズマブは、分子のFc部分のC_H2ドメイン内においてAsn299にN-結合したオリゴ糖部位を含む。各バッチのこの部位に見られる中性オリゴ糖の相対分布は、PNGase Fによる処理及びAPTSによる標識化の後でCEを使用して決定された。

【0194】

放出された誘導体化オリゴ糖のCE分析に基づく電気泳動図を図16に、拡大図のプロフィールを図17に示す。分析した材料に関するペルツズマブ中のオリゴ糖の相対量は、表9にまとめられている。

【0195】

10

20

30

40

50

表9：ペルツズマブ中のオリゴ糖構造の分布（ピーク面積パーセント）

バッチ名	G0-F	G0-GlcNAc	Man5	G0	G1 ^a	G2
抗2C4-900-1	0.8	2.7	1.2	72.1	20.4	2.0
抗2C4907-2	2.2	0.8	0.3	63.6	27.6	3.0
ラン1	2.5	1.6	0.2	62.4	29.1	3.4
ラン3	1.7	1.2	0.3	70.3	23.4	2.2
ラン4	1.8	1.8	0.3	75.4	18.3	1.4
ラン5	1.4	1.0	0.4	71.8	22.4	2.1
ラン6	1.1	1.0	0.2	73.3	21.3	1.9
ラン7	1.2	0.8	0.2	69.7	24.5	2.5

注：四捨五入により、合計の%は正確に100%にならないこともある。また、小数種(<0.5%)は、ピーク面積パーセントの合計に含まれているが、この表には報告されていない。

^a二つのG1異性体の合計（図17参照）。

【0196】

G0構造を有するオリゴ糖が、すべての材料において優占種である（62%～75%）。G0グリコフォームは、現在の参考基準バッチ抗2C4907-2及びラン1（62%～64%）と比較した場合、ラン3～7及び直前の参考基準バッチ2C4-900-1においてわずかに他より豊富であった（70%～75%）。G1グリコフォームは、二分岐構造のいずれかの分枝上に末端ガラクトースを有する二つの異性体に対応する二つのピークとして観察された。これら二つのピークの面積を混合し、G1グリコフォームの相対量を決定した。G1及びG2グリコフォームは、すべての材料の放出オリゴ糖のそれぞれ約18%～29%及び1%～3%を占めている。電気泳動図には、他のオリゴ糖構造から生じるピークも観察された（すべて3%以下で存在）。これら構造は、G0-F（コアフコースを欠くG0）、G0-GlcNAc（一つのGlcNAcを欠くG0）、Man5、及び他の少数のグリコフォームを含む（Ma and Nashabeh Anal Chem 71:5185-92 (1999)）。ペルツズマブ上のオリゴ糖構造は、観察されたCHO由来のMabs（Ma and Nashabeh、上掲）及び天然に存在するヒト免疫グロブリンと一致していた（Flynn et al. Mol Immunol 47:2074-82 (2010)）。

【0197】

実施例3

不対システィン変異体を評価するためのペプチドマッピング及びRP-HPLC

材料：実験に使用された材料及びデバイスは以下の通り：3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸（MOPS；Sigma-Aldrich）、N-エチルマレイミド（d0-NEM；Thermo Scientific, Rockford, IL）、N-エチルマレイミド（d5-NEM；Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA）、L-システィン（Sigma-Aldrich）、トリプシン（Promega, Madison, WI）、トリフルオロ酢酸（TFA；Fisher, Fair Lawn, NJ）、アセトニトリル（ACN, Burdick

10

20

30

40

50

& Jackson, Muskegon, MI)。すべての化学物質及び試薬は、それ以上精製することなく受け取ったままの状態で使用した。

【0198】

抗体の差別的N-エチルマレイミド(NEM)標識：差別的NEMタグ付け法により、抗体中に既存の遊離チオールがd0-NEMでタグ付けされ、残りのジスルフィド架橋が還元されてd5-NEMでタグ付けされた。最初のd0-NEMタグ付けのために、100μLの抗体(3mg/mL)を、6.25mMのd0-NEMを含む400μLの変性バッファー(7.5M GdnHCl、pH5)と穏やかに混合し、37で2時間インキュベートした。20μLのシステイン(125mM)を試料に加え、37で15分間インキュベートして、残りのd0-NEMを不活性化した。抗体中の残りのジスルフィド架橋を還元するために、10μLのTCEP(0.5M)を試料に加え、37で30分間インキュベートした。次いで70μLのd5-NEM(171mM)を試料に加え、37で2時間インキュベートして、還元型ジスルフィド架橋により生成された遊離チオールをタグ付けした。0.5mLの差別的NEMでタグ付けした試料を、NAP-5カラムを用いてバッファー交換し、0.6mLのMOPSバッファー(20mMMOPS、0.5mM TCEP(pH7))で溶出した。

10

【0199】

抗体のペプチドマップ分析：差別的NEMでタグ付けした試料を、トリプシン：抗体の比1:50(w/w)でトリプシンを用いて37で2時間消化した。消化を10%TFAでクエンチした。トリプシンで消化した、差別的NEMでタグ付けした試料を、Agilent 1200 HPLC System(Agilent, Palo Alto, CA)を用いて分離した。孔径300のJupiter C18カラム(250×2mm、5μm)(Phenomenex, Torrance, CA)を、試料のクラマトグラフ分離のために使用した。注入体積は95μLであり、カラム温度は55であった。移動相Aは水中0.1%TFAであり、移動相Bは90%ACN(v/v)中0.08%TFAであった。初期条件を、100%移動相Aに設定し、試料注入後最初の3分間維持した。移動相Bを、次の20分間に10%に増やし、次いで160分までに40%、162分までに全体に線形勾配で100%まで更に増やした。移動相Bを170分まで100%に維持した。カラムは、195分までに100%移動相Aに再平衡化した。流速は0.28mL/分に維持した。

20

【0200】

HPLCからの流出物は、陽イオンモードで動作するLTQ ORBITRAPTM質量分光計のエレクトロスプレーイオン化源に直接接続された。スプレー電圧は4.5kVであり、キャピラリー温度は300であった。質量分光計は、データ依存性に動作して、MSモードとMS/MSモードの間で自動的に切り替わった。調査のためのフルスキヤンMSスペクトルが、分解能がm/z 400でR=60,000に設定されたFT-Orbitrapにおいて、m/z 300~m/z 200で取得された。五つの最も強力なイオンが、活性化時間30ms及び単離幅2.5m/zユニットを用いた35%の正規化衝突エネルギーで、衝突誘起解離(CID)を用いた線形イオントラップにおいて断片化された。動的除外(DE)機能を有効にしてデータ冗長性を低減し、低強度イオンをデータ依存性MS/MSスキヤンのために選択することが可能にした。動的除外パラメータは以下の通りであった：反復期間30秒、除外リストサイズ500、除外期間90秒、低除外質量幅0.76、高除外質量幅1.56、及び反復カウント2。XCALIBURTMを用いてデータ分析を実行した。

30

【0201】

現在のペルツズマップ参照基準バッチである抗2C4907-2を、上記方法を用いて分析した。10.9%のT2Lペプチド(トリプシン消化によって生成され、Cys23を含む)及び8.3%のT7Lペプチド(トリプシン消化によって生成され、Cys88を含む)がd0-NEMでタグ付けされることが判明した。この実験では不対システインのみがd0-NEMでタグ付けされたことから、これらの結果は、抗2C4907-2の中

40

50

で約10%のCys23及びCys88がジスルフィド結合によって結合されないことを示唆していた（即ち、10%の不対システイン変異体）。不対システインFab変異体パーセントを不対システインインタクト変異体パーセントに変換するために上記と類似の計算方法を使用して、抗2C4907-2の中で18%のペルツズマブ分子がヘテロダイマー-不対システイン変異体であり、1%のペルツズマブ分子がホモダイマー-不対システイン変異体であり、81%が野生型ホモダイマー形態（不対システインを含まない）であることが推定された。このような結果は、Fab断片又はインタクトペルツズマブのHIC分析の結果と概ね一致する。

【0202】

制限エンドプロテイナーゼLyS-C消化によるFabの生成：Mab AのFab断片を、限定LyS-C消化手順により生成した。簡単に説明すると、Mab A (1mg/ml)をLyS-C酵素と1:400の比で100mM Tris (pH 7.6)中ににおいて混合し、次いで混合物を37℃で30分間インキュベートした。反応混合物を、NEMin (pH 5.5)、350mMの酢酸ナトリウム及び8MのグアニジンHClでタグ付けした。消化を、後述するRP-HPLC法により分析した。

【0203】

RP-HPLC条件：RP-HPLC分析を、バイナリーグラジエントポンプ、オートサンプラー、温度制御カラムコンパートメント、及びダイオードアレイ検出器を備えたAGILENT 1200TM HPLC System (Palo Alto, CA, USA)で実行した。このシステムは、75°及び1ml/minで使用されるPursuit 3ジフェニル逆相カラム (150×4.6mm, 3μm, Varian, Lake Forest, CA, USA)を含んでいた。分離を、280nmでの吸光度を用いてモニターした。移動相は、水中0.1%のTFA (移動相A) 及びACN中0.09%のTFA (移動相B) からなっていた。38分法は、移動相B 32%から36%への三分勾配で開始され、続いて移動相B 42%まで18分の線形勾配が用いられた。カラムを95%移動相Bで5分間洗浄し、32%移動相Bで10分間平衡化した。

【0204】

限定LyS-C消化（図18）により生成された遊離チオールFabのRP-HPLC分析により、遊離チオールFabが約13%であることが示唆され、これは実施例1のHICと一貫していた。このように溶出されて後に遊離チオールFab（図18）と比較した、NEMタグ付けされた遊離チオールFabの疎水性は比較的高くなり、遊離チオールの存在が更に確認された。ペプチドマッピングにより遊離チオールFabが確認される図19も参照されたい。

【0205】

実施例4

CE-LIFによるアフコシル化の定量化

この実施例は、アフコシル化ペルツズマブ変異体を定量化するための、十分に確認されたキャピラリー電気泳動-レーザー誘起蛍光(CE-LIF)アッセイについて記載する。上記実施例2に開示された方法の修正例には：非ロボット試料調製、試料中の一定のタンパク質濃度を保証する非プロテインA精製工程、及び電気泳動的パラメータの変更(バッファー賦形剤濃度)が含まれる。

【0206】

アッセイにおいて、ペルツズマブ試料は、製剤バッファーを用いて10mg/mlに希釈され、ペプチド-N-グリカナーゼF (PNGase F)消化バッファーにバッファー交換される。すると、アスパラギン-結合オリゴ糖が、PNGase Fにより酵素的に解放される。解放されたグリカンは、その後、負に帯電したフルオロフォアである8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸(APTS)により誘導体化される。APTSはすべてのグリカンに三の負電荷を供給し、これによりそれらの迅速な電気泳動分析が可能になる。過剰な誘導体化剤及びAPTS-グリカンコンジュゲートを含有する混合物を、電気浸透流を低減するコーティングしたキャピラリーを用いるCEにより分析する。分

10

20

30

40

50

離を、488 nmの励起波長及び520 nmの放出バンドパスフィルターを有するアルゴン-イオンレーザーを用いるレーザー誘起蛍光システムによりモニターする。

【0207】

アッセイを用いて、相関図を図21に示す。相関図(%ADC C = 30.133 + 12.439x, x = %G0-F)及び40~135%のADC C範囲を用いると、ペルツズマブの最終スペックは0.9~4.1%G0-Fに相当する。

【0208】

このように、確認されたこのCE-LIFアッセイを用いると、ペルツズマブ組成物を評価することにより、ADC Cの観点から生物活性が所望の範囲内(40~135%のADC C活性=0.9~4.1%のG0-F)であることが確認できる。

10

【0209】

実施例5

ペルツズマブ高分子量種(HMW S)、低分子量種(LMW S)とそれらの特徴付け

ペルツズマブを、SE-HPLC及びCE-SDSにより分析し、分子量種(HMW S)、一般にはダイマーと、低分子量種(LMW S)の量を決定した。希釈時にHMWSに差異はなく、凝集物が非解離性であることが示唆された。分析超遠心(AUC)とSE-HPLCの結果は、HMWS定量化的観点からよく一致しており、サイズ排除クロマトグラフィーの不測又は主要なHMWSの過小評価の証拠は示されなかった。

【0210】

材料及び方法

試験対象のペルツズマブ組成物：この実施例は、現行のペルツズマブの参照基準バッチ抗2C4907-2及び第III相臨床材料であるラン1と、すべて商業的方法を用いて12000リットル(L)規模で生産された五つの第III相/市販のバッチ(ラン3~7)の特徴付けについて記載する。

20

【0211】

単離されたHMWS：生物学的特徴付けに使用される代表的HMWSを調製するために、ラン3のペルツズマバッヂを分取HPLCシステムに、調製用SE-HPLCカラム(TSK G3000SW、21.5 mm × 600 mm)及び上記と同じ均一濃度の移動相を用いて、4.5 mL/分で注入した。高分子量種を分別捕集し、その後製剤バッファーにバッファー交換した。HMWSは、続くSE-HPLC分析により純度70%を示し、残りは主に主要ピークであった。主要ピークも収集され、純度100%を示した。

30

【0212】

単離されたLMWS：単離されたLMWSを調製するために、ラン3のバッヂ番号を、上述のように、パパインで消化し、分取HPLCを用いて分別捕集した。優占的な形態は、インタクトなESI-MS分析によりFc及びFabであることが確認された。LMWSは、その後の分析的SE-HPLCにより純度99%を示した。また、単離されたFab変異体を、パパイン処理を用いて調製し、調製用IE-HPLCにより収集した。Fab変異体は、その後の分析的SE-HPLCにより純度100%を示した。

30

【0213】

SE-HPLC：ペルツズマブのアリコートを、移動相(0.2Mのリン酸カリウム(pH 6.2)、0.25Mの塩化カリウム)を用いて10 mg/mLに希釈した。試料を、均一濃度に溶出されたTSK G3000SW_xLカラム(7.8 mm × 300 mm)上で分離した。流速は0.5 mL/分であり、カラム温度は常温であった。溶出プロファイルを280 nmでモニターした。多角度光散乱(MALS)による検出のために、ペルツズマブ試料を、WYATT DAWN HELEOTM MALS検出器(658 nmレーザー使用、17の検出器)及びWYATT OPTILABTMレックス屈折率検出器にインライン接続された、二つの連続するカラムを用いて分離した。

40

【0214】

CE-SDS各ペルツズマブバッヂを、蛍光性染料である5カルボキシテトラメチルローダミンスクシニミジルエステルを用いて誘導体化した。NAP-5カラムを用いて

50

遊離染料を除去した後、非還元試料を、40 mMのヨードアセトミドを付加し、70℃で5分間加熱することにより調製した。還元試料の分析のために、誘導体化したペルツズマブを、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び1MのDTTと、最終濃度1%のSDS(v/v)になるように混合した。次いで試料を、70℃で20分間加熱した。調製された試料を、分析中20℃に維持された、内径5.0 μm × 31.2 cmの融合シリカキャピラリーを用いたCEシステム上で分析した。試料を、10 kVで40秒間の動電注入によりキャピラリーに導入した。分離を、ふるい媒体としてCE-SDSランニングバッファーを用いる逆極性(負から正へ)モードにおいて、15 kVの一定電圧で実行した。488 nmで動作するアルゴンイオンレーザーを、蛍光励起のために使用し、結果として得られる放出シグナルを560 nmでモニターした。

10

【0215】

結果と考察

SE-HPLCは、天然タンパク質の分子サイズの分布に関する定量的情報を提供した。ペルツズマブバッチのSE-HPLCプロフィールを図25に、プロフィールの拡大図を図26に、それぞれ示す。サイズ除外ピークの相対ピーク面積の分布を表10に示す。

【0216】

表10：サイズ除外クロマトグラフィーによるペルツズマブの相対的サイズ分布

バッチ名	ヒーク		
	HMWS (%)	主要ヒーク(%)	LMWS (%)
抗2C4-900-1	0.1	99.8	0.1
抗2C4907-2 ^a	0.2	99.8	0.0
ラン1	0.2	99.8	0.0
ラン3	0.2	99.8	0.0
ラン4	0.1	99.8	0.0
ラン5	0.2	99.8	0.0
ラン6	0.2	99.8	0.0
ラン7	0.2	99.8	0.0

20

30

注：四捨五入により合計パーセントは正確に100%にならない可能性がある。

HMWS=高分子量種；LMWS=低分子量種。

40

^a 参照基準の抗2C4907-2から得られた値

【0217】

主要ピーク内のペルツズマブ溶出の割合は、すべての材料について99%を上回った。高分子量種(HMWS)の量は、0.1%~0.2%の範囲であり、低分子量種(LMWS)は0.1%であった。すべてのバッチは同様のクロマトグラフィープロフィールを示した。ダイマー及びそれよりも高い凝集物を含め、精製されたHMWS画分は、参照基準バッチの抗2C4907-2に対して46%の力価を有することが示された。

【0218】

SE-HPLCを、30℃に維持された希釈していない試料及び希釈した試料の両方に

50

対して実行し、希釈及び／又は上昇した室温への曝露延長に起因しうる速く分解する凝集物及びゆっくり分解する凝集物の両方についてペルツズマブHMWSを試験した。希釈及び／又は加熱した参照基準バッヂ抗2C4907-2のHMWS含有量に、コントロールと比較して低減は見られなかった。

【0219】

参照基準バッヂ抗2C4907-2に対するMAL Sと組み合わせたSE-HPLC分離の実行により、SE-HPLCの主要ピークが分子量約150kDaのモノマーであることが確認された。

【0220】

沈降速度モードでAUCを使用して、ペルツズマブ試料中に存在するHMWSの特徴を明らかにした。沈降速度は、固体カラムマトリックスの非存在下において、試料中のHMWSのレベルを測定するサイズ排除クロマトグラフィーから独立した技術である。AUCを、ペルツズマブ試料に対してHMWSのレベルを上昇させながら実行し、SE-HPLCが、沈降速度により決定される凝集物のレベル及び種をSE-HPLCにより決定される凝集物のレベル及び種と比較することにより、すべての主要なペルツズマブHMWSの検出を常に可能にするかを決定した。総HMWSが0.2%～7.2%の五つの試料(SE-HPLCにより決定)を、沈降速度により特徴付け、表11及び図27のA～Eに分類した。

【0221】

これら試料は、代表的ペルツズマブ製剤バッヂ(Aに分類)及び濃縮HMWSの四つの試料からなっていた。濃縮HMWSの試料は、幅広い劣化メカニズム(光への暴露、酸性pHへの暴露、及び精製IE-HPLCの基本的変異体)の代表となるように選ばれた。

【0222】

SE-HPLCは、試料A、B、C及びEに一つの主要なHMWSピークを、試料Dに二つのHMWSピークを、それぞれ示す(図27)。試料A、B、C及びEについて、AUCは、沈降係数約9.1SのHMWSピークを一つのみ示した。試料Dにおいて、AUCは、沈降係数約9.1S及び10.8Sの二つのHMWSピークを示した。AUCによって検出されるHMWSは、SE-HPLCの結果と一致している；両方法が、一つの主要な劣化生成物を示し、試料Dの大部分のHMWSのレベルは低い。

【0223】

二つの方法に基づくこれら試料の定量結果の比較を表11に示す。

表11：AUC及びSE-HPLCの結果の比較

10

20

30

試料	HMWS % (合計)	
	AUC	SE-HPLC
A	1.2 [31.4% RSD] ^a	0.2
B	1.9	1.3
C	4.8	5.5
D	6.4	6.6
E	7.6 [7.9% RSD]	7.2

注1：試料Aは、代表的なペルツズマブ製剤バッチからなり、試料Bは、1. 2 m l u x 時間で光曝露したペルツズマブバッチからなり、試料Cは、3. 6 m l u x 時間で光曝露したペルツズマブバッチからなり、試料Dは、pH 3. 2で酸処理したペルツズマブバッチからなり、試料Eは、IE-HPLCからの、精製された基本的変異体からなる。

注2：対応するSE-HPLCクロマトグラムについて、図27参照。

AUC=分析超遠心；HMWS=高分子量種；RSD=相対標準偏差；SE-HPLC=サイズ排除高速液体クロマト그래이fer。

^a 試料A及びBは、AUC技術の定量化の限界を下回るHMWSレベルを有する。

【0224】

試料C、D、及びEの場合、両方の技術により測定されるHMWSパーセントはよく一致している。試料A及びB中に存在する低レベルのHMWSは、3.7%の予測定量化限界を有する(Gabrielson and Arthur, Methods 54:83-91 (2011)) AUCによる種の正確な定量化を妨げる。これは、SE-HPLCとAUCとのHMWSパーセントに見られる相違に反映される(表11)。一定範囲のHMWSレベルにわたる相関を評価した。相関係数(Lin, L, Biometrics 45:255-68 (1989))は0.97(n=5)と計算され、HMWSの定量化に関するAUCとSE-HPLCの良好な合致が示唆された(図28)。

【0225】

これら結果は、SE-HPLCがペルツズマブのHMWSの測定においてロバストであることを確認する。SE-HPLCは、AUCにより観察されるすべてのHMWS種を検出し、正確に定量化することができる。

【0226】

SE-HPLC、SDS-PAGE, 及びCE-SDSにより分析された、サイズに基づく不均一性は、バッチを通して一貫していた。SE-HPLCアッセイは、試験したすべてのバッチについて、同様のレベルのHMWS(0.1%~0.2%)及びLMWS(0.0%~0.1%)を示した。還元試料及び非還元試料のSDS-PAGE分析により明らかになったバンドパターンは、CE-SDSにより生成された電気泳動プロフィールと同様に、一貫していた。

【0227】

一実施態様では、SE-HPLCによって評価された、主要種ペルツズマブ及びHMWS変異体及びLMWS変異体の量は、以下の通りである：

9.6%の主要ピーク、例えば、9.6.7%の主要ピーク、例えば、9.7.3%の主要ピーク、例えば、9.7.4%の主要ピーク。

2%のHMWS、例えば、1.7%のHMWS、例えば、1.5%のHMWS、例

10

20

30

40

50

えば、1.4%のHMWS、例えば0.8%のHMWS。

2%のLMWS、例えば、1.6%のMWs、例えば、1.2%のLMWS、例えば0.6%のLMWS。

【0228】

SE-HPLCによって精製されたペルツズマブのHMWS及びLMWS画分の両方は、主要ピーク及びコントロールと比較して低い抗増殖活性を呈し、これは十分に有効であった。すべてのサイズ変異体は、コントロールと比較して同等なHER2結合活性及びFcRn結合活性を示したが、但しLMWSだけは低いFcRn結合を示した。LMWS試料は2/3のFab断片と1/3のFc断片を含み、抗増殖及びFcRn結合活性が低いことが予想される。HMWSは高いFcRIIIa(CD16)V158結合活性を示したが、ADCC活性は低かった。LMWSは低いFcRIIIa(CD16)V158結合活性を示したが、この変異体についてはADCC活性は観察されなかった(表12)。

【0229】

表12：ペルツズマブの主要ピーク、HMWS、及びLMWSの生物活性

ペルツズマブ試料 及び条件	平均活性% (n=3)				
	抗増殖	HER2 結合	Fc γ RIIIa 結合	ADCC	FcRn 結合
コントロール	103	108	91 ^b	80 ^b	80
主要ピーク	104	96	96	79	87
HMWS	46	82	522	38	73
LMWS	12 ^a	73 ^a	23 ^a	活性なし	7 ^a

注：ペルツズマブ参照基準(バッチ：抗2C4907-2)に対して報告された活性パーセント。

ADCC=抗体依存性細胞介在性細胞傷害；HMWS=高分子量種；LMWS=低分子量種。

^a LMWS試料は、2/3のFabと1/3のFc断片からなる。示された値は、分子量に基づくnM/nM調整を反映している(Fab=47644Da、Fc=52800Da、及び完全長抗体=148088Da)。

^b ペルツズマブ参照基準(バッチ：抗2C4907-2)は、2.2%のG0-Fレベルを有し、コントロール試料は1.7%のG0-Fを有していた。結果は、アフコシル化材料のレベルの差異について修正していない。

【0230】

キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(CE-SDS)：レーザー誘起蛍光(ЛИF)検出分析によるCE-SDSは、変性条件下におけるタンパク質の分子サイズ分布を定量的に評価する手段を提供する高感度アッセイである。非還元試料のCE-SDS分析(図29)において、ペルツズマブは、LMWS及びHMWSを表す小さなピークを伴う、合計ピーク面積9.6%~9.8%からなる突出したピークとして移動した。この技術によって決定されたHMWSの量は、試験したすべての材料について0.6%であった。LMWSとして移動した残りの種を図30(拡大図)に示す。試料の加熱により誘起された断片化は、アルキル化により最小化された(Salas-Solano et al. Anal Chem 78:6583-6594 (2006))。CE-SDSによって分離された種の相対分布を表13に列挙する。

【0231】

表13：CE-SDSによる非還元型ペルツズマブの相対分布(ピーク面積パーセント)

10

20

30

40

50

バッチ名	ピーク							HMWS
	1	2	3	4	5	6	主要	
抗 2C4-900-1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.9	97.8	0.6
抗 2C4907-2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	1.9	96.5	0.6
ラン 1	0.1	0.3	0.1	0.4	0.2	1.7	96.7	0.6
ラン 3	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.0	0.6
ラン 4	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.1	0.6
ラン 5	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	2.0	96.4	0.6
ラン 6	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.2	96.2	0.6
ラン 7	0.1	0.4	0.0	0.2	0.2	2.1	96.3	0.6

10

20

注:四捨五入により、合計の%は正確に 100 %にならないこともある。

C E - S D S = キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム；

HMWS = 高分子量種。

【0232】

小さな差異が観察され、ピーク 6 は、参照基準バッチである抗 2 C 4 - 9 0 0 - 1 における 0 . 9 % (第 I / II 相プロセス) から参照基準バッチである抗 2 C 4 9 0 7 - 2 、 ラン 1 、 及びラン 3 ~ 7 の場合の 1 . 7 % ~ 2 . 3 % へと増加していた。

【0233】

一実施態様では、N R - C E - S D S によって分離又は単離されたペルツズマブの主要ピーク (L M W S 及び H M W S を含まない) は、約 9 5 % ~ 約 9 9 % 、 例えは約 9 6 . 0 % ~ 約 9 7 . 8 % である。任意選択的に、C E - S D S によって分離又は単離された H M W S の量は、 1 % 、 例えは 0 . 6 % であり、L M W S の量は 4 % 、 例えは 3 . 4 % である。

【0234】

実施例 6

ペルツズマブ断片化の検出及び定量化

この実施例の目的は、ペルツズマブ断片検出のための、サイズ排除クロマトグラフィー (S E - H P L C) 、還元型キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (R - C E - S D S) 、及び非還元型 C E - S D S (N R - C E - S D S) 法を評価することである。

【0235】

材料及び方法

この試験において評価される試料を下記にまとめる。これらは、断片化の増大を引き起こすと思われる種々のストレス条件に暴露されたペルツズマブ試料を含む。

- ・ 参照基準 (2 C 4 9 0 7 - 2)
- ・ 熱的ストレス (4 2 日間、 4 0)
- ・ 酸処理 (p H 3 . 2 、 1 日間、 4 0)
- ・ 加速安定性 (4 0 で 3 0 日、 次いで約 5 で貯蔵)
- ・ 実時間製剤 (D P) 安定性 (T = 0 及び T = 5 4 8 日及び約 5 での貯蔵) 及び対応す

30

40

50

る製剤原料(D S)

【 0 2 3 6 】

S E - H P L C を、上記実施例 5 のように実行し、以下の報告可能な値を得た： L M W S 、主要ピーク、 H M W S 、及び定量限界(L O Q)を超えた上記他のすべての有意なピーク。

【 0 2 3 7 】

還元型 C E - S D S (R - C E - S D S)を、上記実施例 5 に従って実行し、次のような報告可能な値を得た：ピーク 1 、 L C 、ピーク 2 、ピーク 3 、 N G H C 、 H C 、ピーク 5 、 I n c . R e d . 、及び L O Q を超える他の有意なピーク。

【 0 2 3 8 】

非還元型 C E - S D S (N R - C E - C D S)を、上記実施例 5 のようにして、抗体還元工程を除く試料調製により実行し、 S D S 複合体形成工程からジチオスレイトール(D T T)を除外することにより非還元型分析を可能にした。

【 0 2 3 9 】

S E - H P L C 、 N R - C E - S D S 、及び R - C E - S D S により得られる定性的結果を、それぞれ図 3 1 A ~ B 、図 3 2 A ~ B 、及び図 3 3 A ~ B と、それぞれ表 1 4 、 1 5 、及び 1 6 に示す。

【 0 2 4 0 】

ピークの同定は、 Hunt & Nashabeh Analytical Chemistry 71: 2390-2397 (1999) 、及び Ma & Nashabeh Chromatographia Supplement 53: S75-S89 (2001) に基づく。 N R - C E - S D S 分析のために、ピーク 2 後の小さなピークが、典型的にはデータ報告の間のピーク 2 の一部として含まれる。この試験のために、この小さなピークはピーク 2 a として別途報告され、断片と軽鎖(L C)を差別化する。

【 0 2 4 1 】

表 1 4 : S E - H P L C 定量的データ(ピーク面積 %)

	HMWS (%)	主要ピーク(%)	LMWS (%)
2C4907-2	0.18	99.77	0.04
熱的	0.40	98.96	0.64
酸処理	7.09	92.65	0.26
加速安定性	0.26	99.23	0.51
DP安定性	0.19	99.68	0.13

【 0 2 4 2 】

表 1 5 : N R - C E - S D S 定量的データ(C P A %)

10

20

30

40

	ピーカ1 (LC)	ピーカ2 2a	ピーカ (Fab)	ピーカ3 (Fab)	ピーカ4 (HL)	ピーカ5 (HH/des Fab)	ピーカ6 (HHL)	主要 ピーカ	HMWS
2C4907-2	0.12	0.29	0.05	0.07	0.35	0.18	1.90	96.32	0.73
熱的	0.42	0.70	0.09	0.61	0.52	1.36	3.62	91.99	0.71
酸処理	0.15	0.37	0.17	0.35	0.45	0.66	3.19	93.42	1.25
加速安定性	0.35	0.59	0.09	0.48	0.44	1.07	3.25	92.90	0.84
DP安定性	0.22	0.37	0.06	0.20	0.33	0.43	2.53	95.27	0.60

LC = 軽鎖、 HC = 重鎖、 L = 軽、 H = 重

10

20

【0243】

表16：R - C E - S D S 定性的データ (C P A %)

	ピーカ1 LC	LC	ピーカ2 LC	ピーカ3 NGHC	NGHC	HC	ピーカ5 HC	Inc. Red.
2C4907-2	0.31	25.30	0.92	2.44	2.81	66.82	0.48	0.91
熱	0.54	26.16	1.12	3.13	2.81	64.54	0.27	1.43
酸処理	0.38	25.04	5.58 ^c	2.77	2.41	62.91	0.19	0.71
加速安定性	0.51	25.01	0.98	2.99	3.16	66.10	0.25	1.03
DP安定性	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

NGHC = 非グリコシル化重鎖、 HC = 重鎖、 Inc. Red. = 不完全な還元

【0244】

データ評価：関連断片のピーク面積パーセント（又は C E - S D S のための、修正ピーク面積パーセント（ C P A % ））を比較して、 C E - S D S 法のいずれかが S E - H P L C と比較して非冗長情報を提供するかどうかを決定する。関連断片は、未知の構造を有するピーク、又はポリペプチド鎖の切断から得られる生成物を含むことが既知であるピークを含む。これら断片は、抗体生成物中に存在して C E - S D S により一般的に観察される、解離性の非ジスルフィド結合した重鎖及び / 又は軽鎖断片とは別個である。断片のピークは、高感度な検出と、正確な定量化を可能にするために、他のピークから分離されなければならない。

40

【0245】

小断片の検出能：小断片は、 R - C E - S D S 及び N R - C E - S D S 分析の両方で観察することができ、両アッセイにおいてピーク 1 と命名されている。これらピークは同じ

50

一般的形状及び移動時間を保持し、両アッセイにおいてストレス条件下で同様に上昇する。したがって、ピーク1は、両アッセイにおいて同じ種を含むと推定される。両CE-SDSアッセイは、表17に注記したように、同じ断片を検出することができる。

【0246】

酸加水分解により生成された断片の検出能(酸クリップ)：長時間にわたる酸性条件への暴露は、特に、29039Da(HC 1-272)及び21513Da(HC 273-448、G0グリカン)の質量を示す酸処理試料の質量分光分析によりサポートされるように、Asp-Pro配列(ペルツズマブ重鎖残基272~273)に断片を生成する。これら形態の理論的質量は、それぞれ29031Da及び21510Daである。これら形態の予想される移動時間に基づき、対応するピークは、酸処理試料の還元型CE-SDS分析において明瞭に見ることができる(ピーク2、図34)が、非還元型アッセイでは更に低いレベルで検出される(低シグナル)。INR-CE-SDSアッセイではピーク2の断片は恐らくはジスルフィド結合しており、したがって検出されないと仮定することができる。酸処理試料においてR-CE-SDSにより検出されるピーク2のレベル(5.58%)が、この試料についてSE-HPLCにより検出されるLMWSの合計(0.26%)を超過していることから、SE-HPLCもこれら形態の検出には不十分であると結論付けることができる。したがって、還元型CE-SDSアッセイは、表17に示されるように、酸加水分解の結果として生じる断片化を検出することができる、本明細書において提示される唯一のアッセイである。

【0247】

Fab/DesFab断片の検出能：SE-HPLCにより検出されるLMWSと、非還元型CE-SDSアッセイからのピーク3との間には、良好な線形相関がある($r^2 = 0.97$)(図35)。LMWSは、酵素的に生成されたFabを用いた共溶出の研究により、Fab断片を含有していると同定された。同様に、NR-CE-SDSアッセイにおけるピーク3及びピーク5は、それぞれ酵素的に生成されたFab及びDesFabを用いた共移動の研究により、同定された(Ma & Nashabeh、上掲)。desFabのピークは、Fab形態を生成する重鎖切断から生じ、したがって、Fab断片に対して等価なモル量(2:1の質量比に対応)にあり、よって表17に示すように、この形態に関する情報も、SE-HPLCにより間接的に取得できると仮定される。

【0248】

表17：SE-HPLC、NR-CE-SDS、及びR-CE-SDSによる断片の検出能

断片	SE-HPLC	NR-CE-SDS	R-CE-SDS
小断片 CE-SDSのピーク1	不明	あり	あり
酸性クリップ (R-CE-SDSのピーク2)	なし	なし	あり
Fab / DesFab	あり / (間接的)	あり	なし

【0249】

還元型CE-SDSのピーク3：R-CE-SDSのピーク3は、ペルツズマブに固有であり、他の抗体のCE-SDS分析では観察されなかった。更なる特徴付けにより、ピーク3が生成物変異体又は不純物ではなく、方法により誘起された、LC-LCダイマーの分離可能形態からなるペルツズマブに特異的なアーチファクトであるという結論が支持

10

20

30

40

50

される。複数の技術を用いてピーク 3 の特徴を明らかにした。

ピーク 3 は、UV 及び LIF 検出を用いた R - C E - S D S により観察され、染料による標識又は試料調製アーチファクトでないことが示唆される。

R - C E - S D S による分析時、精製されたペルツズマブの軽鎖画分は、LC の理論的サイズの約 2 倍の明らかな MW を有するピーク 3 を生成する。
10

ピーク 3 は、電気泳動条件に高いキャピラリー温度が含まれるときは観察されず、このような条件下では他のどのような共移動断片も観察されない。

単一のアミノ酸変異体を含む研究は、LC - LC ダイマー形成に相關する LC CDR 1 及び CDR 2 内の三つのアミノ酸残基を同定した。これら三つの残基のいずれかが別のアミノ酸により置換されると、ピーク 3 は完全に分離し、もはや還元型 C E - S D S によっては観察されない。

MALDI - TOF タンパク質質量フィンガープリンティング (PMF) に連結した SDS - PAGE 分析により、ペルツズマブに宿主細胞タンパク質が存在せず、類似のバンドも C E - S D S によって観察されるレベルでは検出されないことが確認された。

つまり、これら結果は、方法により誘起された、ペルツズマブに特異的な LC - LC ダイマーとしてピーク 3 が同定されることを支持するものである。

【0250】

考察

本試験から得られたデータの評価は以下を示す：

(1) NR - C E - S D S は、断片の検出について S E - H P L C と比較した場合、非冗長の情報を提供する。
20

(2) (S E - H P L C と比較したとき) NR - C E - S D S 法によって得られる非冗長の断片化情報は、R - C E - S D S 法を使用しても得られる。

表 16 に示すように、還元型アッセイにより、製剤原料の製造中に起こりうる低 pH への暴露に起因する切斷生成物が検出された。表 18 は、ペルツズマブ参照基準、第 I II 相材料 (n = 3)、及び商業的製造プロセスを用いて製造されたバッチ (n = 39) に関する還元型 C E - S D S のピーク 1 及びピーク 2 について得られる値を含む。k 値 3 . 2 を用いて、95 / 99 の許容差 (T I) がピーク 1 及びピーク 2 について計算され、表 18 に示されている。ピーク 1 の 95 / 99 許容差は 0 . 0 ~ 0 . 4 % CPA である。ピーク 2 の 95 / 99 許容差は 0 . 3 ~ 0 . 9 % CPA である。
30

【0251】

表 18 : 試験した 43 バッチに関する R - C E - S D S 定量的データ (CPA%)

n	ハッシュ	ヒューリスティクス1 (CPA%)	ヒューリスティクス2 (CPA%)
1	抗2C4907-2	0.31	0.92
2	SSF0001	0.25	0.63
3	SSF0002	0.20	0.62
4	SSF0003	0.27	0.60
5	VV0002	0.27	0.47
6	VV0003	0.28	0.49
7	VV0004	0.25	0.51
8	VV0005	0.41	0.55
9	VV0006	0.27	0.50
10	VV0007	0.29	0.50
11	VV0008	0.30	0.53
12	VV0009	0.26	0.54
13	VV0013	0.19	0.54
14	VV0018	0.17	0.56
15	VV0020	0.17	0.58
16	VV0021	0.18	0.62
17	VV0023	0.14	0.62
18	VV0024	0.13	0.64
19	VV0025	0.18	0.69
20	VV0026	0.13	0.58
21	VV0028	0.17	0.60
22	VV0029	0.18	0.61
23	VV0031	0.18	0.65
24	VV0032	0.16	0.69
25	VV0033	0.18	0.69
26	VV0034	0.18	0.67
27	VV0035	0.17	0.59
28	VV0036	0.17	0.67

29	VV0037	0.19	0.74
30	VV0038	0.19	0.71
31	VV0039	0.19	0.73
32	VV0040	0.19	0.70
33	VV0041	0.18	0.72
34	VV0042	0.19	0.73
35	VV0043	0.19	0.61
36	VV0044	0.20	0.67
37	VV0046	0.20	0.62
38	VV0047	0.22	0.66
39	VV0048	0.22	0.63
40	VV0049	0.20	0.69
41	VV0050	0.18	0.49
42	VV0051	0.16	0.63
43	VV0052	0.18	0.60

平均 0.21 0.62

標準偏差 0.06 0.09

最小値 0.13 0.47

最大値 0.41 0.92

N 43 43

K 3.2 3.2

下方TI 0.02 0.33

上方TI 0.40 0.91

【0252】

ここでは、製剤原料リリース時ピーク1 0.5%及びピーク2 1.0%という最終的な許容基準が選択される。

【0253】

ペルツズマブ製剤原料が冷凍保存される場合、DS安定性に予測される変化はない。加えて、T=0及びT548dの両方において製剤について得られたR-C-E-S-D-Sデータによれば(表19)、名前を挙げる種のいずれについても有意な変化は観察されなかった。

【0254】

表19：DP安定性試料のR-C-E-S-D-Sの定量的データ(CPA%)

10

20

30

40

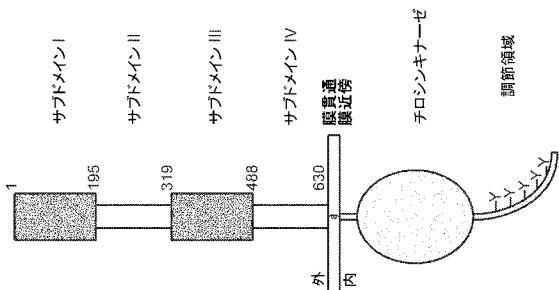
	ヒ°-ケ1	LC	ヒ°-ケ2	ヒ°-ケ3	NGHC	HC	ヒ°-ケ5	Inc. Red.
DSリリース	0.25	26.72	0.51	2.27	2.76	66.66	0.27	0.56
DP安定性 T=0	0.13	26.45	0.54	2.78	2.78	66.53	0.30	0.49
DP安定性 T=548d	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

NGHC=非グリコシル化重鎖、HC=重鎖、Inc. Red.=不完全な還元

10

〔 図 1 〕

TCUCCCTGKPLASPESTEDLMDRHYGGCQVQVNLLELYPTPNASLSLSDTQEVGCVY
LIAHRRVQFLVPRVTRVGLPFDYALIVDNPBLNTPTGASPQIREQLSRL
SEDCQSLTR (順番号: 1)



(2)

		可変軽			
		10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVDGRVTSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	*	*
574	DIQMTCQSPSSLASAVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	*	*
hum κI	DIQMTCQSPSSLASAVGDRVTITC	[RASQSIISNYLA]	WYQQKP		
		50	60	0	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTIISVQA	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIISSLQP	*	*****	*
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIISSLQP			
		90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (配列番号:5)	*	*	
574	EOFATYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKVEIK (配列番号:7)	***	*	
hum κI	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKVEIK (配列番号:9)			

A

		可变重			
		10	20	30	40
2C4	EVQLQSGPDELVPQPGTWSKISCKAS	[GFTFTDYTM]	WVKWV	**	**
574	EVQLVESGGGLWQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTM]	WVRQA	***	*
hum	III	EVQLVESGGGLWQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSYYMSL]	WVRQA	

		50	a	60	70	80
2C4	HGKSLIEWIG	[DVNPNSGGSIYQNQRFKG]		KASLTVDRSRIVVM	*****	*****
	*	*			*****	*****
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYQNQRFKG]		RFTLSVDRSKNTLYL	*****	*****
		*****	*****	*****	*****	*****
hum III	PGKGLEWVA	[VISGIGGGSTYYADSVKG]		RFTISRDNSKNTLYL		
		abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTIFEDTAVYYCAR	[NLGPFSYFYD]		WGQGTLLTVSS	(
	***	**			**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPFSYFYD]		WGQGTLLTVSS	(
			*****	*****		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRGVGYSLYDY]		WGQGTLLTVSS	(

B

【図3】

ペルツズマブ軽鎖のアミノ酸配列

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAVYQQKPGKAPKLLIYSASRYTGVPS
 10 16 20 30 40 50 60
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTISLLOPEDFATYYCQQYYIYPYTFGGQTKEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEHKKVYACEVTHQGLSPVTKSFRNGEC (配列番号: 11)

A

【図4 A】

ペルツズマブ重鎖のアミノ酸配列

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPGKG
 10 20 30 40 50 60
 70 80 90 100 110 120
 NQRFKRFTLSVDRSKNTLYLQMNLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWQGQTLTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSNNSGALTSGVHTFPPLAASS
 190 200 210 220 230 240
 LYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEPVEVKFNWYVGDVEVHNARTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYRIVSVLTVLHQDNLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSKAKGQPREPQVYTLPSSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPVLDSDG
 430 440 448
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号: 12)

B

【図4 B】

ペルツズマブ重鎖

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWVRQAPGKG
 15 30 45
 46 60 75 90 105 120 135
 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSSLRAED
 181 GLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 226 240 255 270 285 300 315
 THTCPPCPAPELGLGSVFLFPKDKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 271 HEDEPEVKFVNWYVGDGEVHNAAKTKPREEQYNSSTYRVVSVLTVLHQD
 316 330 345 360 375 390 405
 WLNCGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSKAKGQPREPQVYTLPSSRE
 361 MTKNQVSSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPVLDSDG
 406 420 435 449 464 480 499
 SFPLYSSKLTVDKSRWQQGNNVFSCSSVMHEALHNHYTQKSSLSSPG
 (配列番号: 14)

トラスツズマブ軽鎖

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK
 15 30 45
 46 60 75 90 105 120 135
 LLIYSSASFPLYSSGVPSSRFSGSGTDFTLTISLQPEPDFA
 91 HYTTPPTPGQGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLSGTA
 136 LNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSS
 181 TLLTSLSKADYEHKKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGECEC (配列番号: 13)

【図5 A】

ペルツズマブ変異体軽鎖

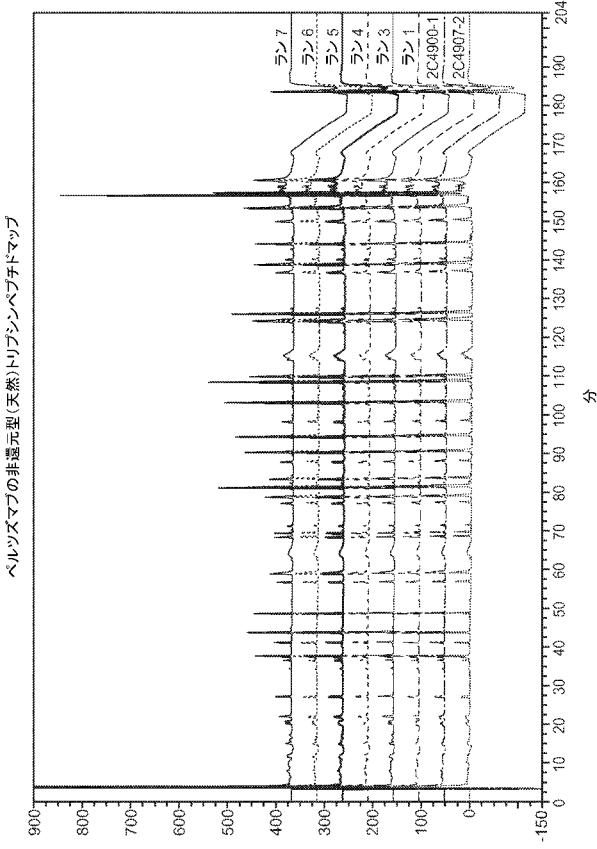
1 VHSQDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTAVAWYQQKPGK
 15 30 45
 46 60 75 90 105 120 135
 APKLLIYSSASYRRTGVPSSRFSGSGTDFTLTISLQPEPDFA
 91 CQOYYIYPYTPQOGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLSGTA
 136 VCLLNWFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSS
 181 TLLTSLSKADYEHKKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGECEC (配列番号: 15)

【図 5 B】

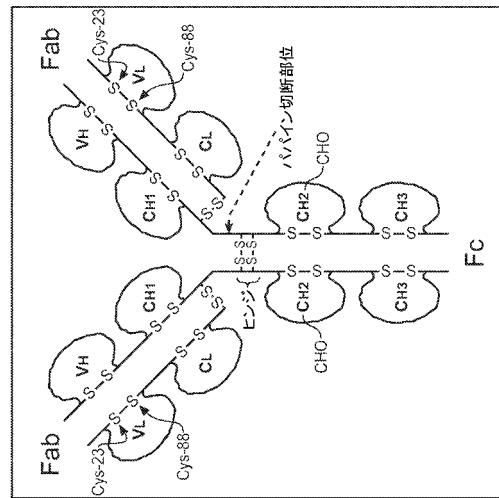
ベルツスマフ変異体重鎖

1 E V Q L V E S G G G L V Q O P G G S L R L S C A S G E T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L
 15 45 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R P K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 30 60 91 T A V V Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K
 45 105 120 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y P P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
 150 165 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D R T
 195 210 225
 226 H T C P P C P A P E L L G P S V F L F P P K P K D T L N T S R T P E V T C V V V D V S H
 240 255 270
 271 E D P E V X F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E B Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W
 285 300 315
 316 L N G K E Y V K C K V S N K A L P A P I E K T T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E H
 330 345 360
 361 T K N Q V S L E T C L V K G P Y S P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V U L D S D G S
 375 390 405
 406 F P L V S X L T P V D K S R W Q Q G N V P S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S S L S P G K
 420 435 449
 (配列番号: 16)

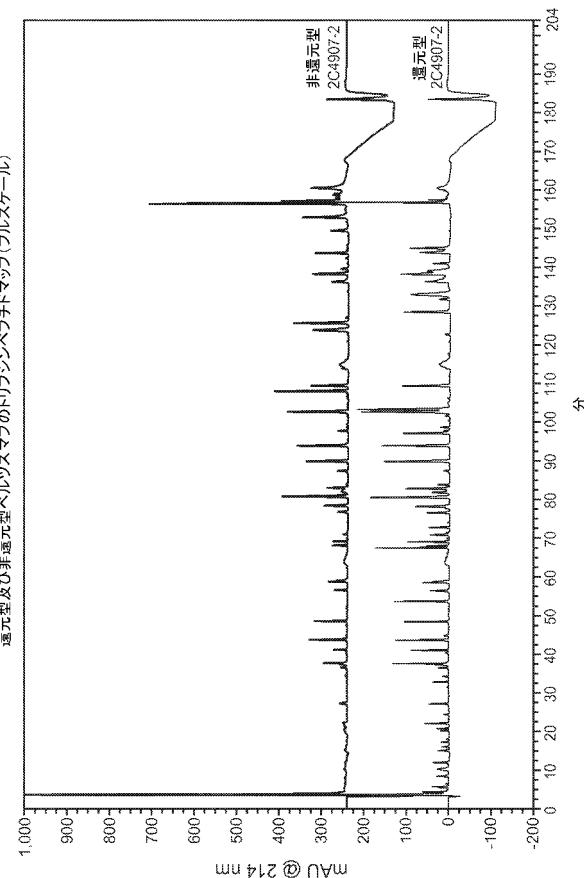
【図 7】



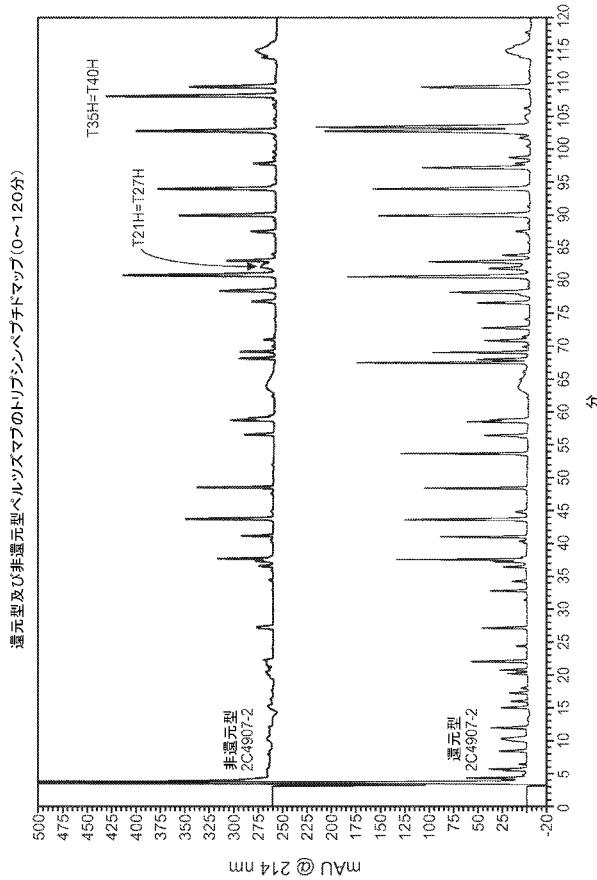
【図 6】



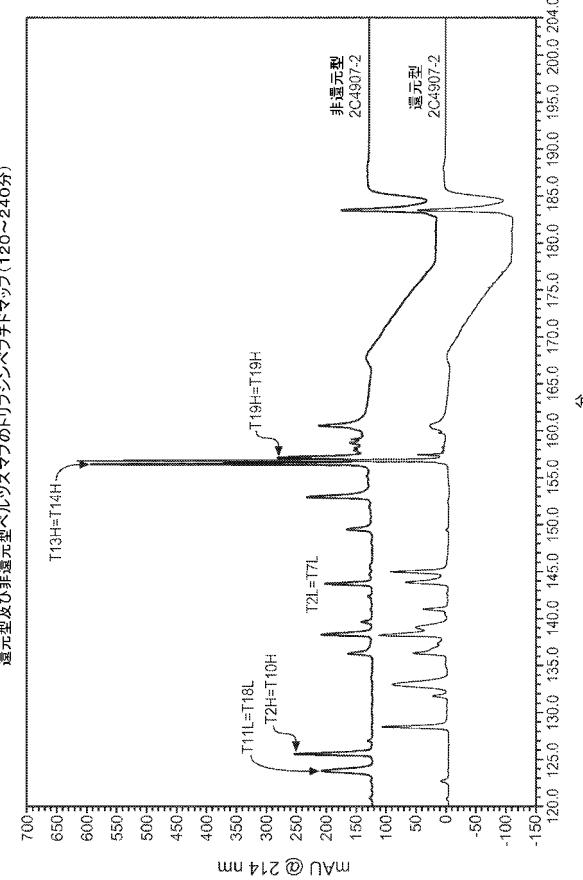
【図 8】



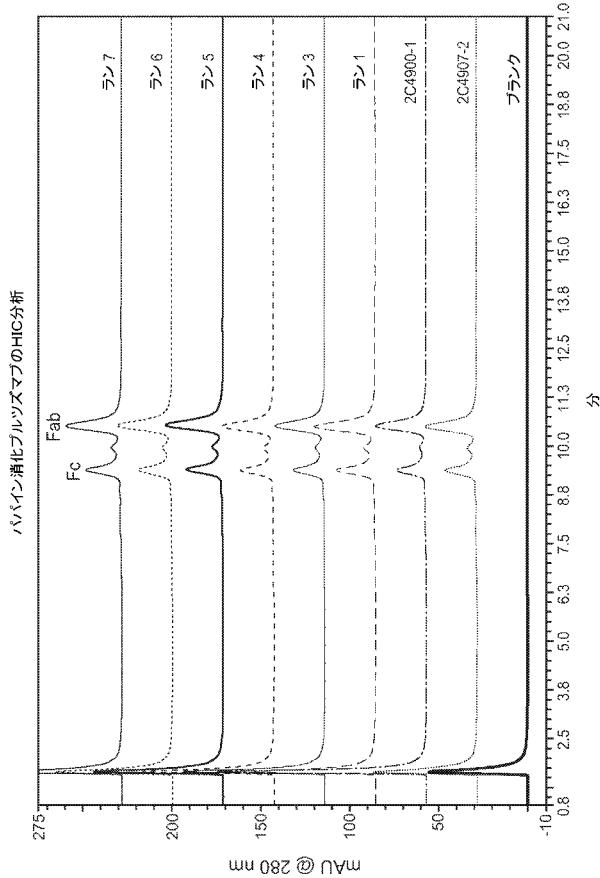
【図 9】



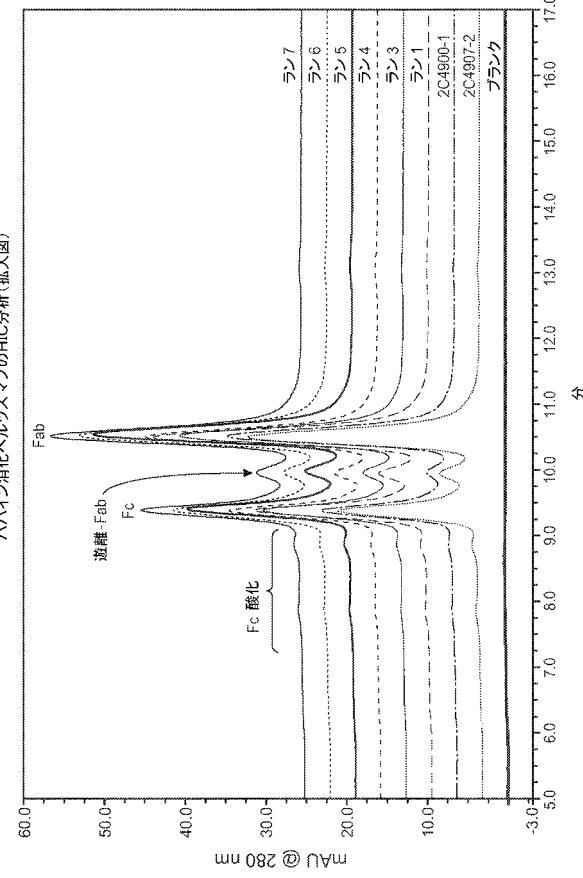
【図 10】



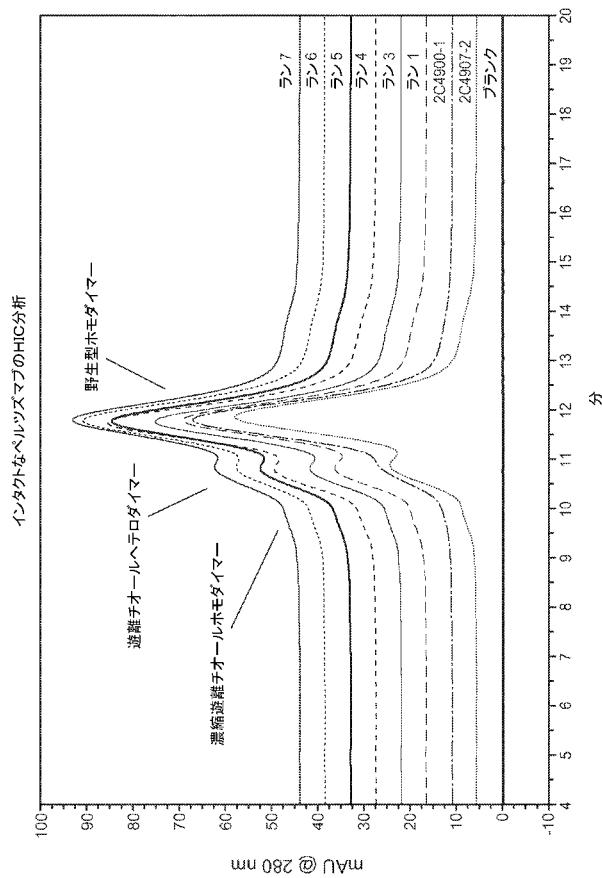
【図 11】



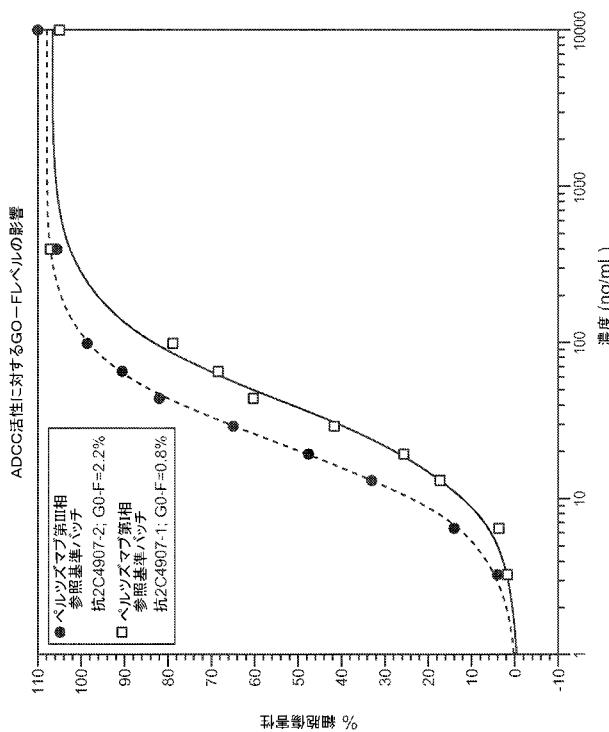
【図 12】



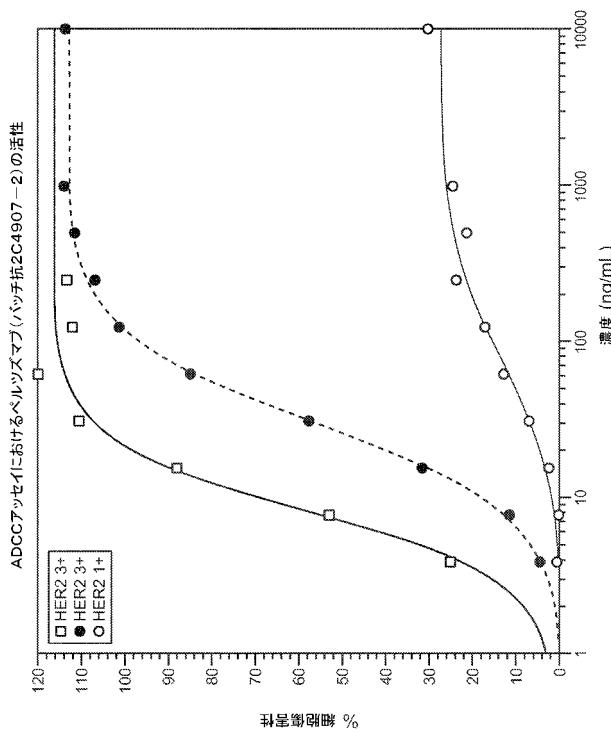
【図 1 3】



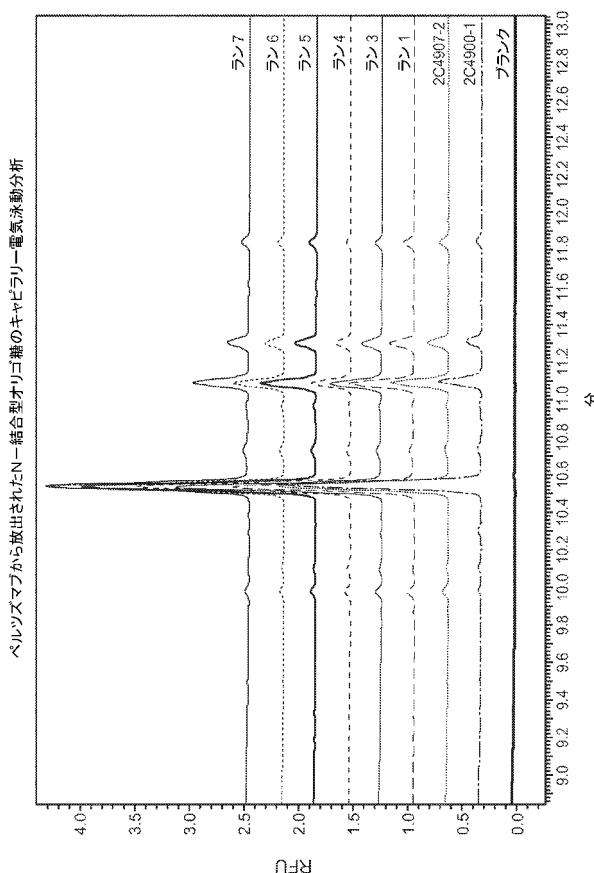
【図 1 5】



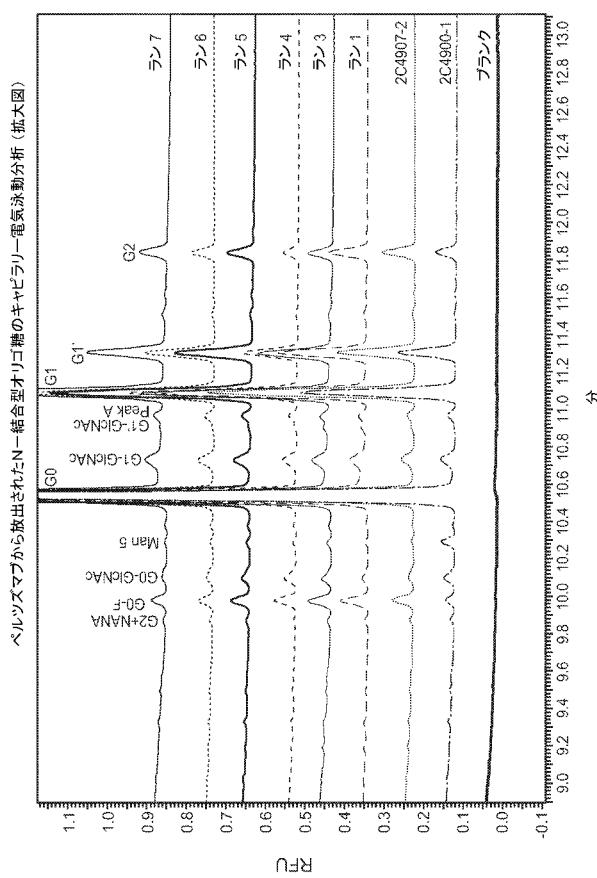
【図 1 4】



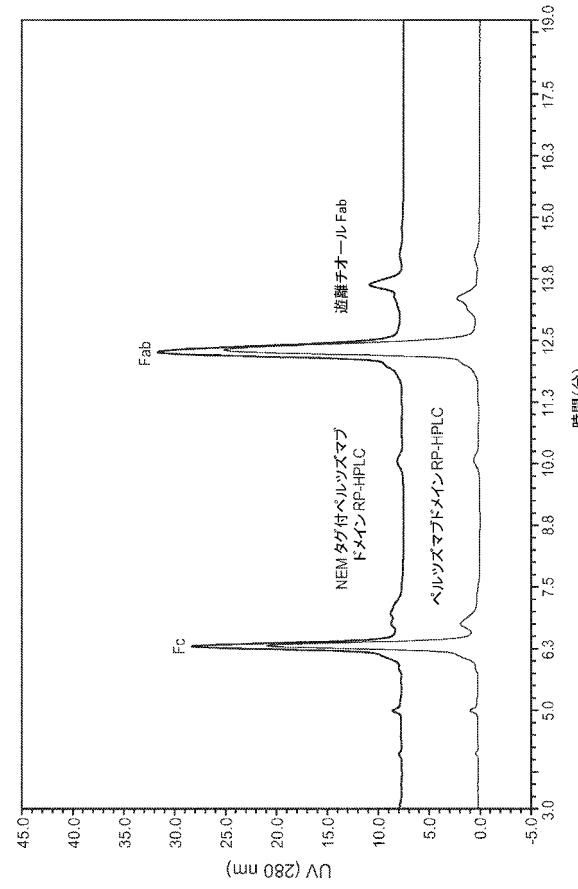
【図 1 6】



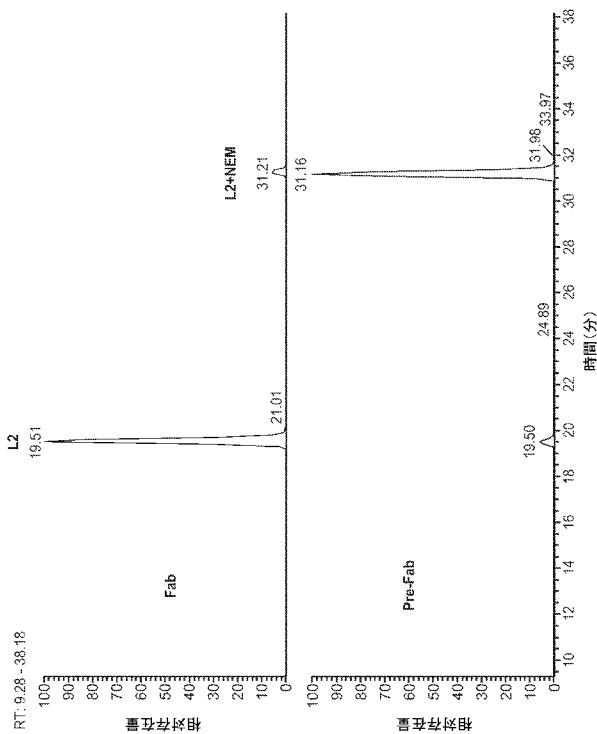
【図 17】



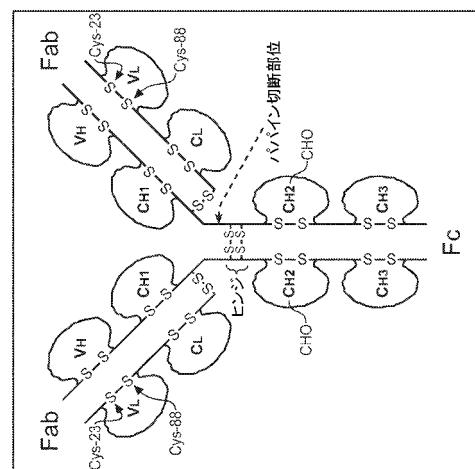
【図 18】



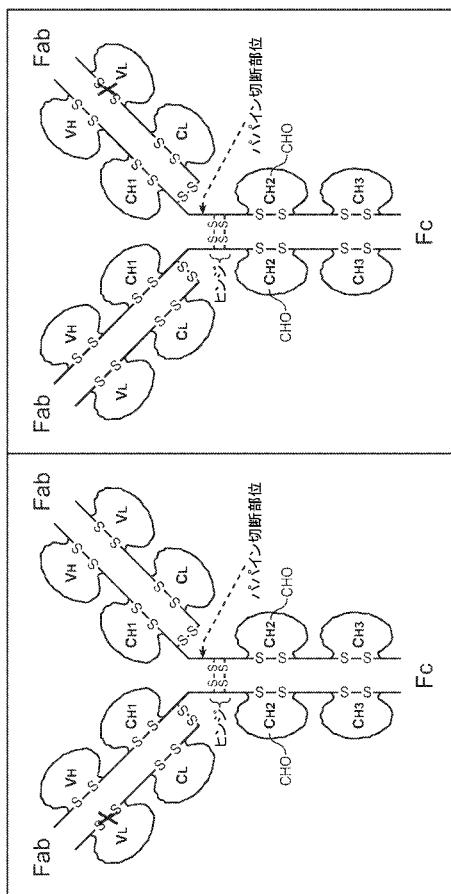
【図 19】



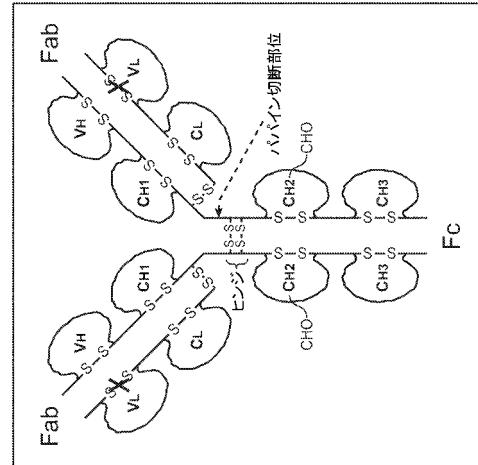
【図 20A】



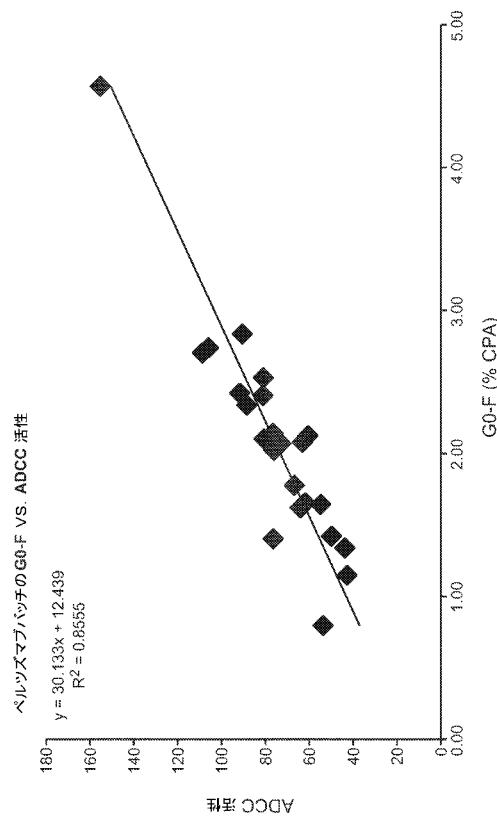
【図 20B】



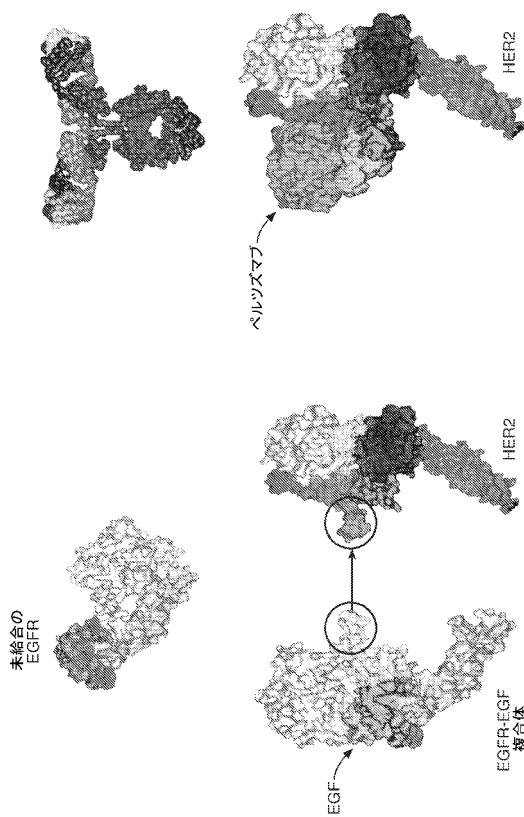
【図 20C】



【図 21】



【図 22】



【図 2 3】



【図 2 4 B】

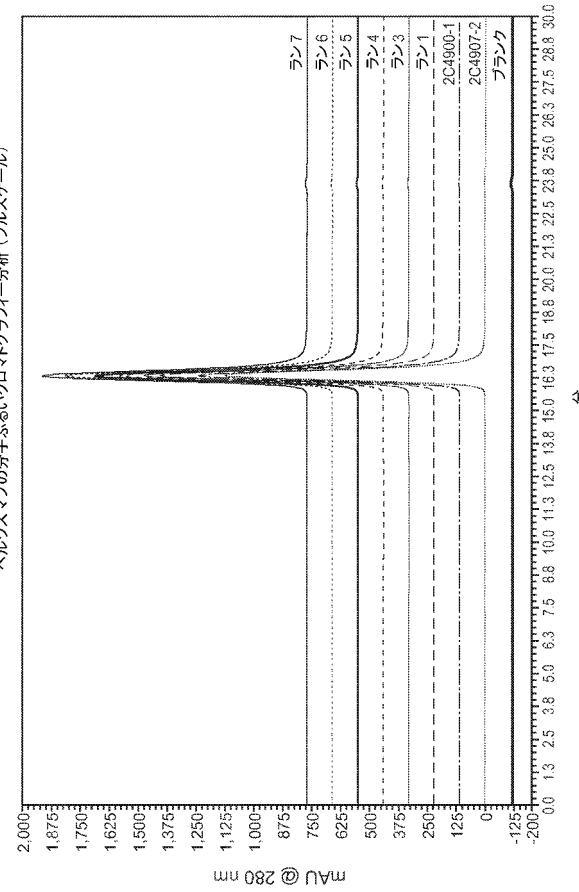
構造	路記	質量
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\left\{\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3) \end{array}\right\} > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	G1 (1-6)	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$	G2	1788

図中に示される質量は $(M + Na)^+$ 値に対応する。

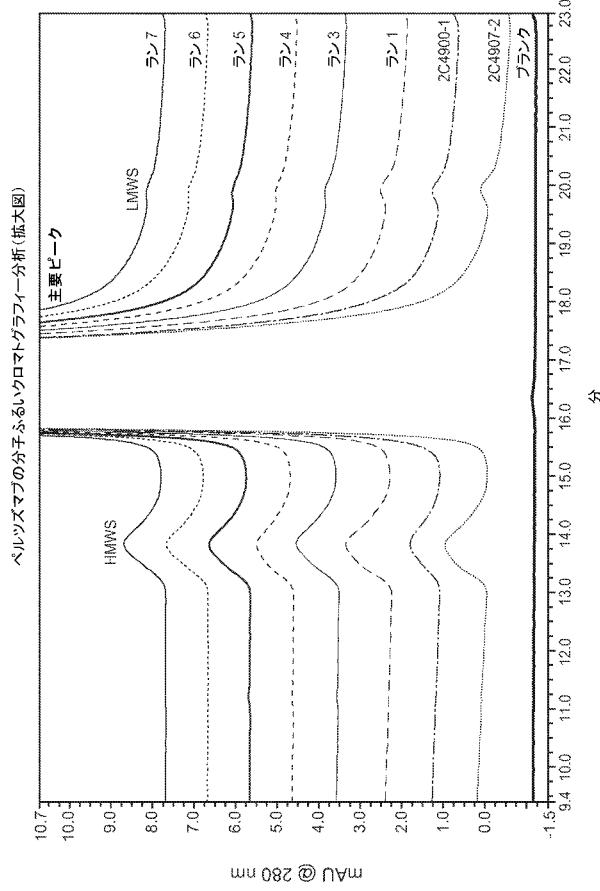
【図 2 4 A】

- サブメインIIの二量体形成面に結合
- サブメインIVに結合
- 受容体切断に対する保護
- 受容体の発現低下に中程度に影響
- HER2の共受容体としての役割にやや影響
- HER2の共受容体としての役割に大きく影響

【図 2 5】

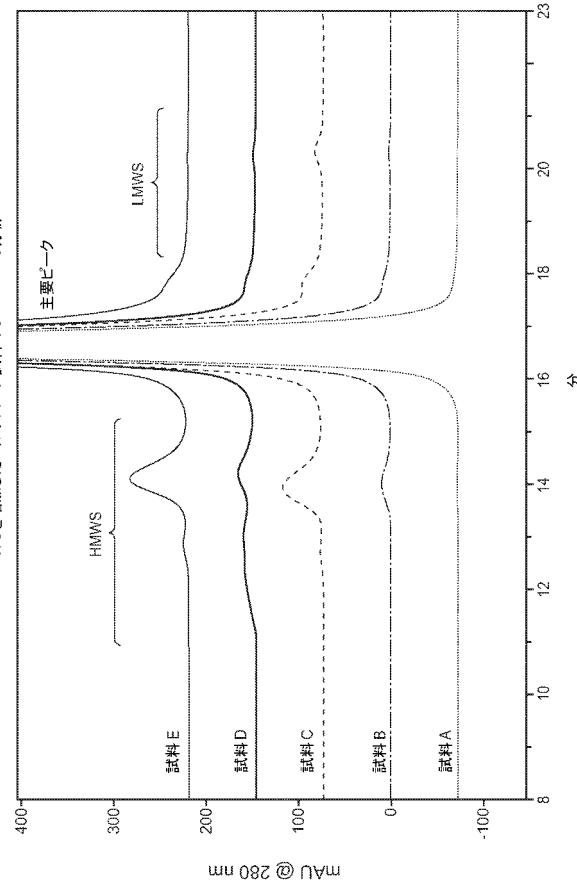


【 図 2 6 】

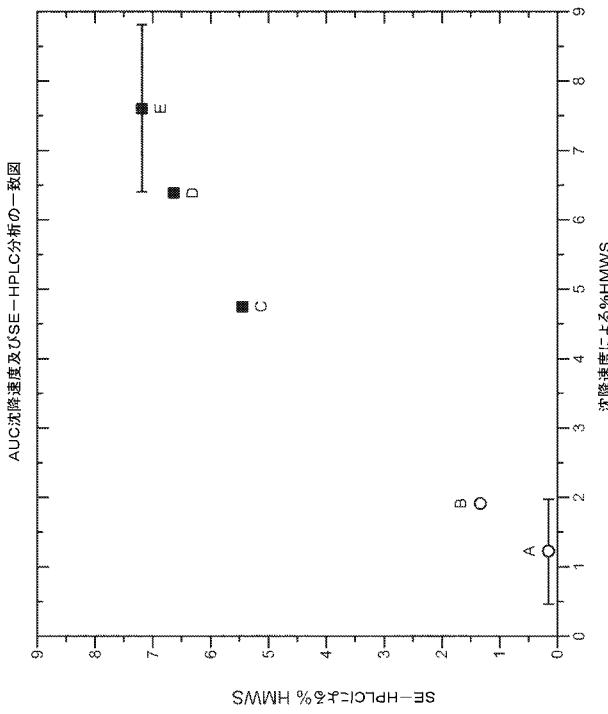


【図28】

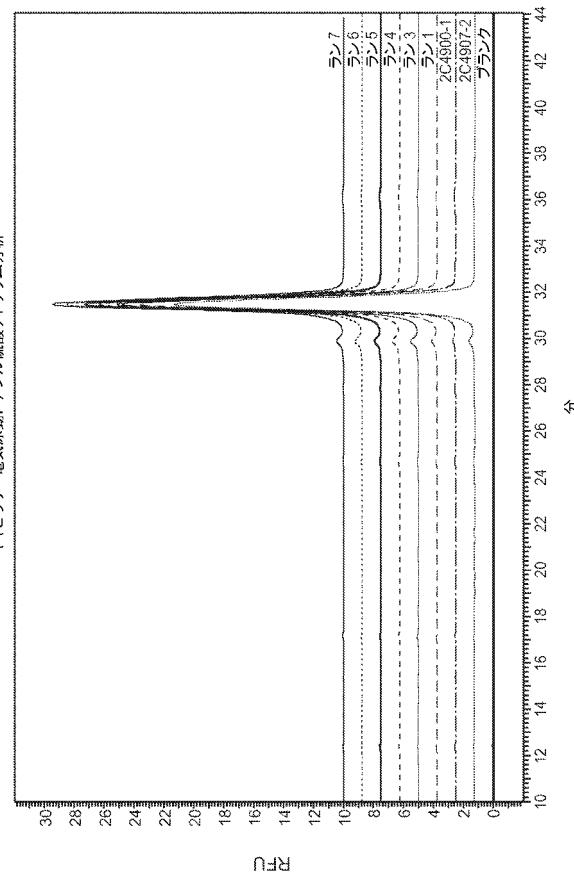
【図27】



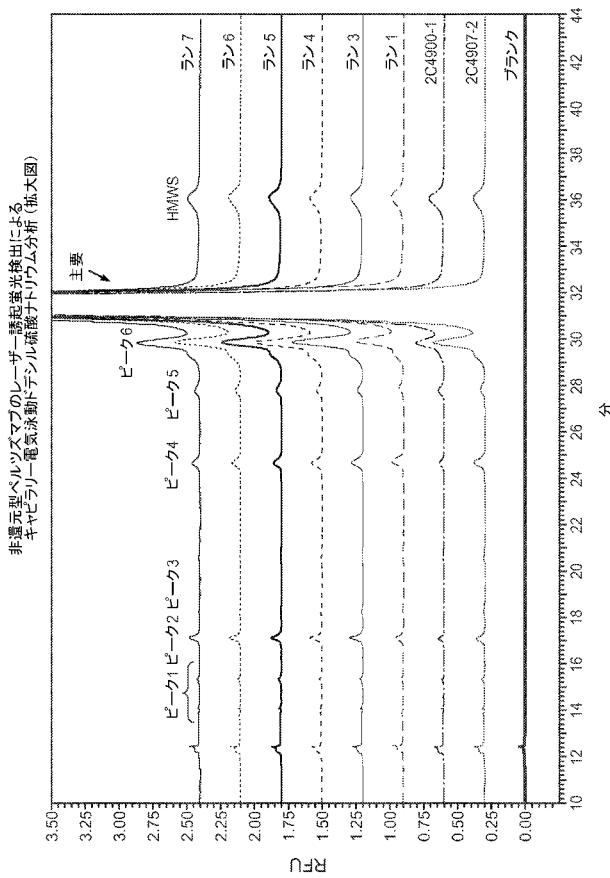
【 図 2 9 】



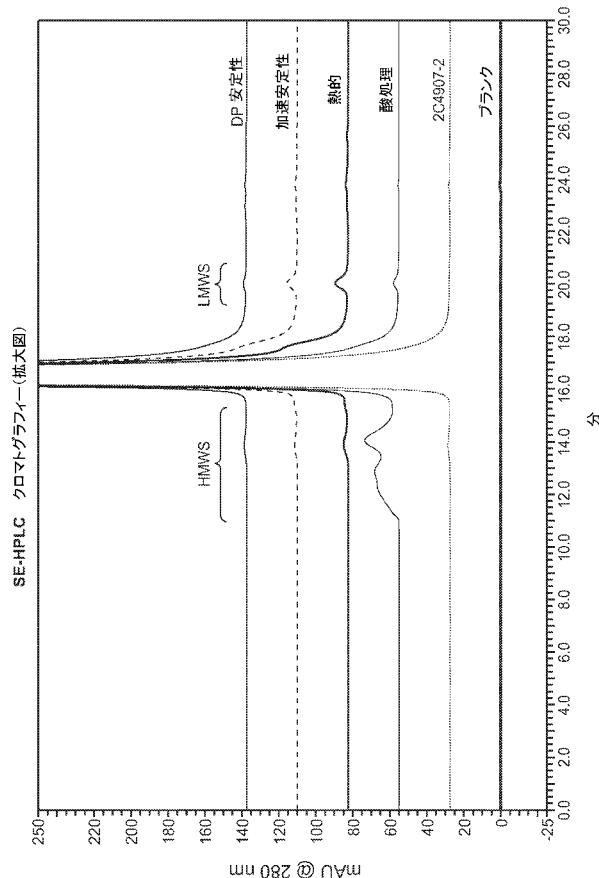
非還元型ペルツズマブのレーザー誘起蛍光検出による
ラリーエネルギ泳動ドミンゴ法による分析



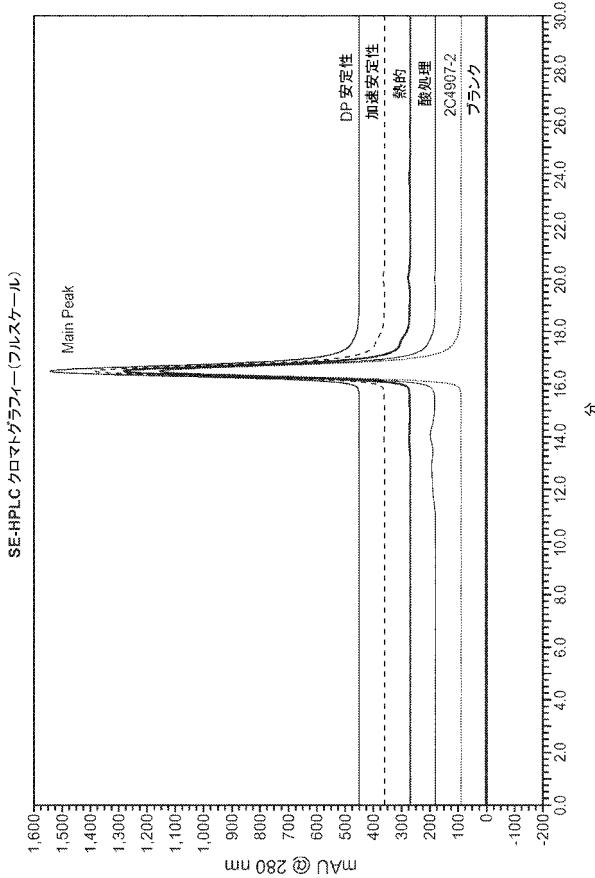
【図 3 0】



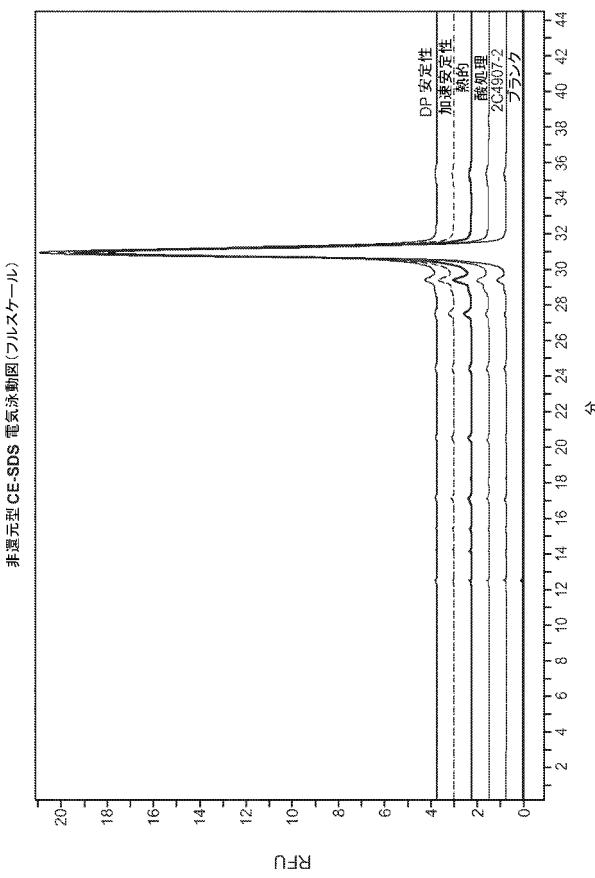
【図 3 1 B】



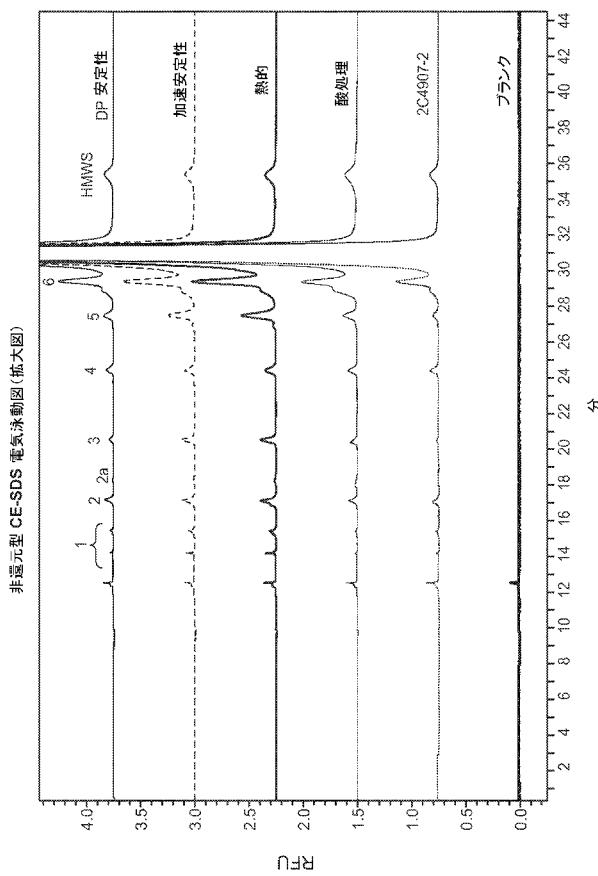
【図 3 1 A】



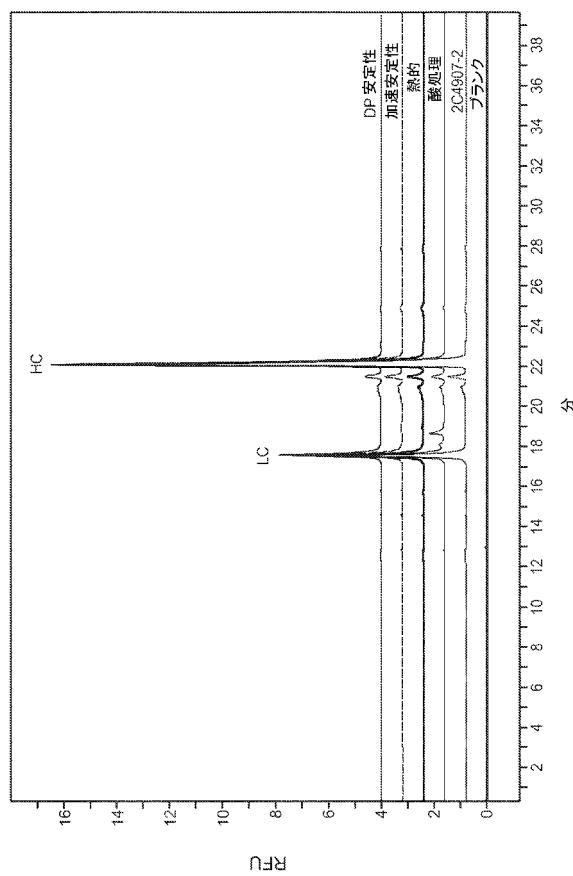
【図 3 2 A】



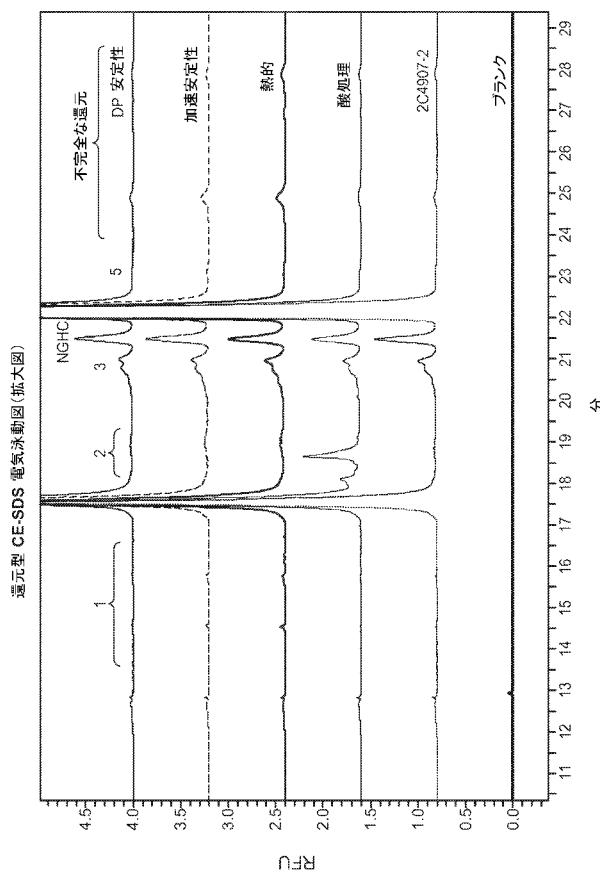
【図 3 2 B】



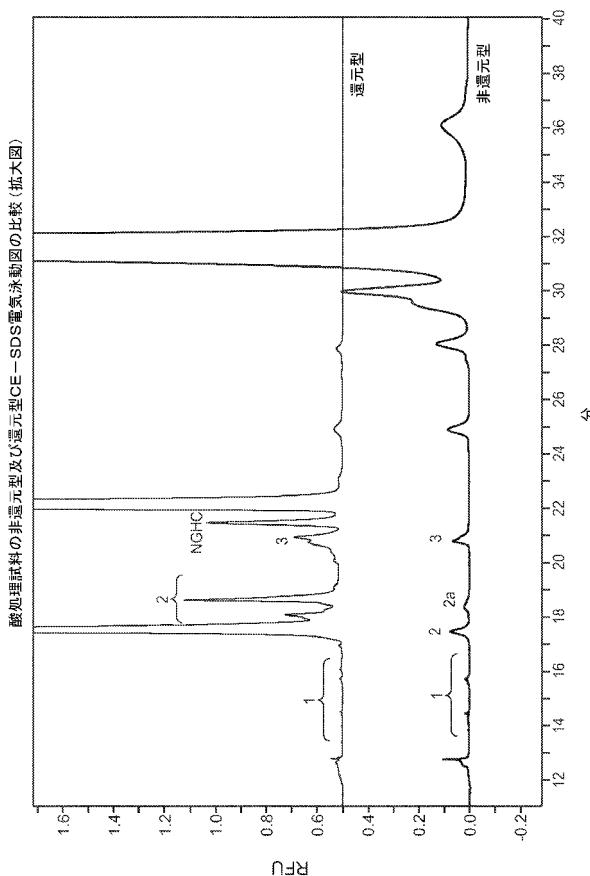
【図 3 3 A】



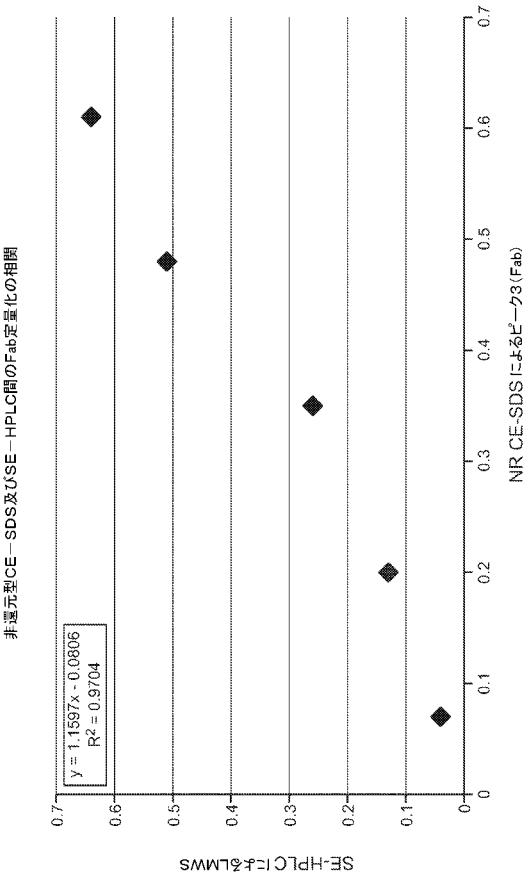
【図 3 3 B】



【図 3 4】



【図 3 5】



【配列表】

2016522176000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/034200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/32 G01N33/53 A61P35/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/018899 A1 (KAO YUNG-HSIANG [US] ET AL) 26 January 2006 (2006-01-26) page 3, left-hand column; figure 3; sequences 15,16	1-13, 15-25
Y	page 26, paragraph 0283 - page 28, paragraph 0289; figure 9 page 29, paragraph 300; figures 13-14; table 5 ----- -/-	26,27

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 November 2014

21/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/034200

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG TAYLOR ET AL: "Identification and characterization of buried unpaired cysteines in a recombinant monoclonal IgG1 antibody.", ANALYTICAL CHEMISTRY 21 AUG 2012, vol. 84, no. 16, 21 August 2012 (2012-08-21), pages 7112-7123, XP002727814, ISSN: 1520-6882 page 7112, left-hand column -----	1-10
X	US 2004/013667 A1 (KELSEY STEPHEN M [US] ET AL) 22 January 2004 (2004-01-22) page 28, paragraph 305 - page 35, paragraph 371; claims 1-12 -----	1-10, 15-18
X	WO 2004/008099 A2 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; KOLL HANS [DE]; BOSSENMAIE) 22 January 2004 (2004-01-22) examples 1-7 -----	1-10
A	T. T. JUNTTILA ET AL: "Superior In vivo Efficacy of Afucosylated Trastuzumab in the Treatment of HER2-Amplified Breast Cancer", CANCER RESEARCH, vol. 70, no. 11, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 4481-4489, XP055053914, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3704 page 4483; table 1 -----	11,12, 21,22
A	HARRIS R J: "Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function", DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS, KARGER, BASEL, vol. 122, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 117-127, XP008090894, ISSN: 1424-6074 abstract; figures 1-5 ----- -/-	11-13, 21,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/034200

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATRICK DIEDERICH ET AL: "A sub-two minutes method for monoclonal antibody-aggregate quantification using parallel interlaced size exclusion high performance liquid chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 50, 16 September 2011 (2011-09-16), pages 9010-9018, XP028119435, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.09.086 [retrieved on 2011-10-25] abstract -----	13
Y	NICOLE STACKHOUSE ET AL: "A high-throughput UPLC method for the characterization of chemical modifications in monoclonal antibody molecules", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 100, no. 12, 24 December 2011 (2011-12-24), pages 5115-5125, XP055152240, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.22710 abstract; figures 3,4 -----	26,27
A		14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/034200

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2014/ 034200

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10(completely); 15-20, 23-25(partially)

A composition comprising Pertuzumab and unpaired cysteine variant thereof, wherein the unpaired cysteine variant comprises Cys23/Cys88 unpaired cysteines in one or both variable light domains or Pertuzumab.

2. claims: 11, 12, 21, 22(completely); 15-20, 23-25(partially)

A composition comprising Pertuzumab and an afucosylated variant of Pertuzumab, wherein the amount of the afucosylated variant is from 0.9 to 4.1 % of the composition.

3. claims: 13(completely); 15-20, 23-25(partially)

A composition comprising a mixture of Pertuzumab, low-molecular-weight species (LMWS) of Pertuzumab, and high-molecular-weight-species (HMWS) of Pertuzumab, wherein the amount of LMWS is < 1.6% and the amount of HMWS is < 1.7% as determined by size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC).

4. claims: 14, 26, 27

A composition comprising a mixture of Pertuzumab, Peak 1, and Peak 2, wherein the amount of Peak 1 is < 0.5% and the amount of Peak 2 is < 1.0% as measured by reduced capillary electrophoresis sodium dodecyl sulphate (R-CE-SDS) assay.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/034200

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006018899	A1	26-01-2006	AR 050353 A1 AU 2005287404 A1 BR P10513681 A CA 2574821 A1 CN 101023100 A CO 5720212 A1 CR 8932 A DK 1771482 T3 EC SP077261 A EP 1771482 A2 ES 2521140 T3 GT 200500199 A HK 1102599 A1 JP 2008507520 A JP 2011173914 A KR 20070038557 A KR 20100101023 A KR 20110050567 A KR 20120068807 A KR 20130079648 A KR 20140032004 A MA 28784 B1 NZ 552580 A PA 8639701 A1 PE 05522006 A1 RU 2361880 C2 SV 2006002174 A UA 90480 C2 US 2006018899 A1 US 2009285837 A1 US 201117097 A1 WO 2006033700 A2 ZA 200701234 A	18-10-2006 30-03-2006 13-05-2008 30-03-2006 22-08-2007 31-01-2007 25-04-2008 20-10-2014 26-04-2007 11-04-2007 12-11-2014 23-03-2007 24-05-2013 13-03-2008 08-09-2011 10-04-2007 15-09-2010 13-05-2011 27-06-2012 10-07-2013 13-03-2014 01-08-2007 28-08-2009 03-07-2006 06-09-2006 20-07-2009 06-03-2006 11-05-2010 26-01-2006 19-11-2009 19-05-2011 30-03-2006 31-12-2008
US 2004013667	A1	22-01-2004	US 2004013667 A1 US 2007269429 A1	22-01-2004 22-11-2007
WO 2004008099	A2	22-01-2004	AT 535254 T AU 2003273218 A1 AU 2010200692 A1 BR 0312534 A CA 2490758 A1 CN 101711866 A CN 102295703 A DK 1585966 T3 DK 2263691 T3 EP 1585966 A2 EP 2263691 A1 ES 2376165 T3 ES 2392525 T3 HK 1082687 A1 IL 165952 A JP 5069843 B2 JP 2006508336 A JP 2012232987 A MX PA05000403 A NZ 537660 A PL 214010 B1	15-12-2011 02-02-2004 18-03-2010 13-03-2007 22-01-2004 26-05-2010 28-12-2011 20-02-2012 22-10-2012 19-10-2005 22-12-2010 09-03-2012 11-12-2012 10-08-2012 28-06-2012 07-11-2012 09-03-2006 29-11-2012 22-07-2005 24-12-2008 28-06-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/034200

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
	PT	1585966 E	20-02-2012
	PT	2263691 E	12-11-2012
	RU	2005103824 A	27-08-2005
	US	2004106161 A1	03-06-2004
	US	2011117096 A1	19-05-2011
	WO	2004008099 A2	22-01-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72) 発明者 カオ, ユン - シャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーワエイ 1, シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72) 発明者 チャン, ヨンホア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーワエイ 1, シー / オー ジェネンテック インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B063 QA01 QS16 QS17

4B064 AG27	CA10	CA19	CE11	CE12	DA01				
4C085 AA14	AA16	BB41	CC23	DD59	EE01				
4H045 AA11	AA30	BA10	CA40	DA76	EA20	GA23	GA26	GA31	HA07