



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105121471 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201480020921. 2

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 04. 15

A61P 35/04(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/812, 603 2013. 04. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/034200 2014. 04. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/172371 EN 2014. 10. 23

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 L·A·热纳罗 Y-H·高 张永华

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/32(2006. 01)

权利要求书2页 说明书40页

序列表13页 附图44页

(54) 发明名称

帕妥珠单抗变体及其评估

(57) 摘要

本申请公开帕妥珠单抗的变体。特别地,它公开:在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的未配对半胱氨酸变体,帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体,帕妥珠单抗的低分子量种类(LMWS),和帕妥珠单抗的高分子量种类(HMWS)。本申请进一步公开分离的变体,包含变体的组合物,药物组合物,和制品,以及生成和表征变体及其组合物的方法。

1. 一种包含帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 及其未配对半胱氨酸变体的组合物, 其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中未配对半胱氨酸变体是在帕妥珠单抗的仅一个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的异二聚体变体。

3. 权利要求 1 的组合物, 其中未配对半胱氨酸变体是在帕妥珠单抗的全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的同二聚体变体。

4. 前述权利要求任一项的组合物, 其中帕妥珠单抗和未配对半胱氨酸变体各自包含分别在 SEQ ID NO:7 和 8 中的可变轻和可变重氨基酸序列。

5. 前述权利要求任一项的组合物, 其中帕妥珠单抗和未配对半胱氨酸变体各自包含在 SEQ ID NO:11 或 15 中的轻链氨基酸序列和在 SEQ ID NO:12 或 16 中的重链氨基酸序列。

6. 前述权利要求任一项的组合物, 其进一步包含一种或多种别的帕妥珠单抗变体, 其中别的变体选自下组: 无岩藻糖基化变体, 低分子量种类 (LMWS), 高分子量种类 (HMWS), 糖化变体, 二硫化物还原变体, 不可还原变体, 脱酰胺变体, 唾液酸化变体, VHS- 变体, C 末端赖氨酸变体, 甲硫氨酸氧化变体, G1 糖基化变体, G2 糖基化变体, 和非糖基化重链变体。

7. 前述权利要求任一项的组合物, 其中组合物中未配对半胱氨酸变体的量为 $\leq$ 约 25%, 通过 Fab 疏水相互作用层析 (HIC) 测定。

8. 权利要求 3 的组合物, 其中组合物中同二聚体变体的量为 $\leq$ 4.9%, 通过完整抗体的疏水相互作用层析 (HIC) 测定。

9. 权利要求 2 的组合物, 其中组合物中异二聚体变体的量为自约 13% 至约 18%, 通过完整抗体的疏水相互作用层析 (HIC) 测定。

10. 权利要求 1 至 9 任一项的组合物, 其已经进行分析性测定法以确认组合物中未配对半胱氨酸变体的量为 $\leq$ 约 25%, 通过 Fab 疏水相互作用层析 (HIC) 测定。

11. 一种包含帕妥珠单抗和帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体的组合物, 其中无岩藻糖基化变体的量为组合物的 0.9-4.1%。

12. 权利要求 11 的组合物, 其中无岩藻糖基化变体的量为大于组合物的 2%。

13. 一种包含帕妥珠单抗, 帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS), 和帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS) 的混合物的组合物, 其中 LMWS 的量为 $\leq$ 1.6% 且 HMWS 的量为 $\leq$ 1.7%, 通过大小排阻高效液体层析 (SE-HPLC) 测定。

14. 一种包含帕妥珠单抗, 峰 1, 和峰 2 的混合物的组合物, 其中峰 1 的量为 $\leq$ 0.5% 且峰 2 的量为 $\leq$ 1.0%, 通过还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (R-CE-SDS) 测定法测量。

15. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1 至 14 任一项的组合物和一种或多种药学可接受赋形剂。

16. 一种制品, 其包含其中装有权利要求 15 的药物组合物的容器, 和印有指导其使用者使用药物组合物来治疗癌症患者的处方信息的包装插页。

17. 一种治疗具有癌症的患者的方法, 其包括对癌症患者施用权利要求 1 至 14 任一项的组合物或权利要求 15 的药物组合物。

18. 权利要求 17 的方法, 其中癌症为乳腺癌, 胃癌, 卵巢癌, HER2 阳性癌症, 或低 HER3 癌症。

19. 一种用于评估帕妥珠单抗组合物的方法,其包括:(1) 测量组合物中未配对半胱氨酸变体的量,其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸;(2) 测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量;或(3) 测量组合物中帕妥珠单抗的低分子量种类(LMWS)或高分子量种类(HMWS)的量。

20. 权利要求 19 的方法,其包括(1),(2),和(3)中的两项或三项。

21. 一种用于评估帕妥珠单抗组合物的生物学活性的方法,其包括测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗变体的量以测定组合物的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性,并确认无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量在自约 0.9%至约 4.1%的范围中。

22. 权利要求 21 的方法,其包括使用毛细管电泳-激光诱导荧光(CE-LIF)测量无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量。

23. 一种用于生成组合物的方法,其包括:(1) 生成包含帕妥珠单抗及一种或多种其变体的组合物,并(2) 对如此生成的组合物进行分析性测定法以评估其中变体的量,其中变体包含:(i) 在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的未配对半胱氨酸变体;(ii) 帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体;(iii) 帕妥珠单抗的高分子量种类(HMWS);或(iv) 帕妥珠单抗的低分子量种类(LMWS)。

24. 权利要求 23 的方法,其中(1)包括以制造规模自重组中国仓鼠卵巢(CHO)表达帕妥珠单抗和变体并纯化组合物。

25. 一种分离的帕妥珠单抗变体,其中分离的变体包含:(a) 如下的帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体,其中变体为在帕妥珠单抗的仅一个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的异二聚体变体;(b) 如下的帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体,其中变体为在帕妥珠单抗的全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的同二聚体变体;(c) 帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体;(d) 帕妥珠单抗的高分子量种类(HMWS);或(e) 帕妥珠单抗的低分子量种类(LMWS)。

26. 一种用于评估帕妥珠单抗组合物的片段化的方法,其包括通过还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(R-CE-SDS)测定法测量组合物中峰 1 和峰 2 的量并确认峰 1 的量为 $\leq 5\%$ 且峰 2 的量为 $\leq 1.0\%$ 。

27. 一种用于生成组合物的方法,其包括:(1) 生成包含帕妥珠单抗及一种或多种其片段的组合物,和(2) 对如此生成的组合物进行分析性测定法以评估组合物中峰 1 和峰 2 的量。

帕妥珠单抗变体及其评估

[0001] 依照 37CFR § 1.53(b) 提交的此非临时申请要求 2013 年 4 月 16 日提交的流水号 61/812,603 的美国临时申请依照 35USC § 119(e) 的权益,通过援引将其完整收录。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有经 EFS-Web 提交并通过援引在此完整收录的序列表。2014 年 4 月 8 日创建的所述 ASCII 拷贝的名称为 P5584R1-W0_SeqList.txt 且大小为 31,363 个字节。

发明领域

[0004] 本发明关注帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 的变体。特别地,它关注:在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的未配对半胱氨酸变体,帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体,帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS),和帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS)。本发明进一步关注分离的变体,包含变体的组合物,药物组合物,和制品,以及生成和表征变体及其组合物的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 帕妥珠单抗 (**PERJETA®**) (也称作 rhuMAb 2C4) 是一种单克隆抗体 (MAb),它是称作“HER 二聚化抑制剂”的一系列药剂中它所在类别的第一种。通过结合 HER2,它抑制 HER2 与其它 HER 受体二聚化并由此抑制肿瘤生长。帕妥珠单抗在 2012 年 6 月 8 日收到美国食品和药品管理局 (US FDA) 批准用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。

[0007] 美国专利 No. 7,862,817 (Adams 等人) 记载了 2C4 抗体的人源化变体,称作人源化 2C4 型式 574 或重组人源化单克隆抗体 2C4 (rhuMAb 2C4)。抗体结合人表皮生长因子受体 2 (HER2) 胞外域 (ECD) 中的亚域 II。以实验室规模生成 rhuMAb 2C4 抗体,并显示结合 HER2 并抑制 MDA-175 细胞 (其以 1+ 水平表达 HER2) 和植入小鼠中的 MCF7 异种移植物生长。还可参见 Adams 等人, Cancer Immunol. Immunother. 55(6) :717-727 (2006)。

[0008] 美国专利 No. 6,339,142 (Blank 和 Basey) 记载了包含抗 HER2 抗体及一种或多种其酸性变体的混合物的 HER2 抗体组合物,其中酸性变体的量小于约 25%。人源化单克隆抗体 4D5 变体 8 (humMAb4D5-8 或曲妥珠单抗 (Trastuzumab)) 是例示的 HER2 抗体。

[0009] 美国专利 No. 7,560,111,美国专利 No. 7,879,325,和美国专利 No. 8,241,630 (Kao 等人) 记载了在抗体的一条或全部两条轻链中包含氨基末端前导延伸 (VHS-) 的帕妥珠单抗变体 (rhuMAb 2C4),即所谓的“VHS- 变体”。在于天然条件使用 Ellman 氏分析对参照材料 (I 期), Lot S9802A (II 期), 和 400L 规模工艺开发材料测试游离硫醇时,在测试的所有材料中游离硫醇水平低于检测限度。测试的组合物中 1-2% 的帕妥珠单抗是无岩藻糖基化 (G0-F) 的,如通过毛细管电泳 (CE) 测定的。参见美国专利 No. 7,560,111 (Kao 等人) 的表 5。

[0010] WO 2009/099829 (Harris 等人) 记载了帕妥珠单抗的酸性变体,包括:脱酰胺变体,糖化变体,二硫化物还原变体,不可还原变体,和唾液酸化变体。如披露的,变体表征如下:

[0011] 表 1:WO 2009/099829 (Harris 等人) 中的酸性变体

[0012]

用于表征酸性变体的方法		
方法	检测的变体	变体名称
CEX +/- 唾液酸酶处理	6%唾液酸化的	唾液酸化变体
还原CE-SDS	1.5%不完全还原的	不可还原变体
非还原CE-SDS	6%还原的二硫化物	二硫化物还原变体
硼酸盐层析	3.5%糖化（较高级别）	糖化变体
肽图	脱酰胺	脱酰胺变体

[0013] CEX = 阳离子交换。CE-SDS = 具有十二烷基硫酸钠的毛细管电泳。

[0014] WO 2009/099829 (Harris 等人) 中用于表征二硫化物还原变体的实验方法（即对完整抗体的非还原 CE-SDS）评估还原的链间二硫键，而非链内二硫键。

[0015] Zhang 等人, Anal. Chem. 84(16) :7112-7123 (2012) 报告了在其可变重 (VH 域) 中具有未配对半胱氨酸 (Cys22 和 Cys96) 的重组抗体 (mAb A)。发现未配对半胱氨酸对抗体结合 CD20 没有显著影响, 而且具有未配对半胱氨酸的 mAb A 在效力测定法（补体依赖性细胞毒性, CDC, 测定法）中是有完全活性的。

[0016] WO 2009/009523 (Kao 等人) 披露了结合 CD20 的 ocrelizumab (rhuMAb 2H7) 抗体的重组生产期间链间二硫键还原的阻止。

[0017] Harris, R., Dev. Biol. (Basel, Switzerland) 122 :117-127 (2005) 披露了 omalizumab (一种人源化抗 IgE 抗体) 的可变重 (VH) 域中的未配对半胱氨酸 (Cys22 和 Cys96)。未配对半胱氨酸形式具有显著更低的效力。

[0018] 发明概述

[0019] 本文中的实验数据关注帕妥珠单抗的变体形式, 包括未配对半胱氨酸变体, 无岩藻糖基化变体, 低分子量种类 (LMWS), 和高分子量种类 (HMWS)。用于鉴定, 表征, 和量化这些变体的手段在用于帕妥珠单抗药物组合物的制造和品质控制方法中是有价值的。

[0020] 如此, 在第一个方面, 本发明关注包含帕妥珠单抗及其未配对半胱氨酸变体的组合物, 其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸。未配对半胱氨酸变体包括异二聚体变体（在帕妥珠单抗的仅一个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸）和 / 或同二聚体变体（在帕妥珠单抗的全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸）。

[0021] 组合物任选进一步包含一种或多种别的帕妥珠单抗变体, 诸如无岩藻糖基化变体, 低分子量种类 (LMWS) 变体, 高分子量种类 (HMWS) 变体, 糖化变体, 二硫化物还原变体, 不可还原变体, 脱酰胺变体, 唾液酸化变体, VHS- 变体, C 末端赖氨酸变体, 甲硫氨酸氧化变体, G1 糖基化变体, G2 糖基化变体, 和非糖基化重链变体。

[0022] 本发明还关注包含帕妥珠单抗和帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体的组合物, 其中无岩藻糖基化变体的量为组合物的 0.9-4.1%。在一个实施方案中, 本发明关注包含帕妥珠单抗和帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体的组合物, 其中无岩藻糖基化变体的量为大于组合物的 2%。依照这个实施方案, 无岩藻糖基化变体的量大于美国专利 No. 7, 560, 111, 美国专

利 No. 7, 879, 325, 和美国专利 No. 8, 241, 630 (Kao 等人) 中报告的量。

[0023] 在一个别的方面, 本发明关注包含帕妥珠单抗, 帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS), 和帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS) 的混合物的组合物, 其中 LMWS 的量为 $\leq 1.6\%$ 且 HMWS 的量为 $\leq 1.7\%$ 。

[0024] 本发明还关注包含帕妥珠单抗, 峰 1, 和峰 2 的混合物的组合物, 其中峰 1 的量为 $\leq 0.5\%$ 且峰 2 的量为 $\leq 1.0\%$, 如通过还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (R-CE-SDS) 测定法测量的。

[0025] 本发明的别的方面关注使用或包含本文中的组合物的药物组合物, 制品, 和治疗癌症患者的方法。

[0026] 在一个别的方面, 本发明关注用于评估帕妥珠单抗组合物的方法, 其包括: (1) 测量组合物中未配对半胱氨酸变体的量, 其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸; 和 / 或 (2) 测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量; 和 / 或 (3) 测量组合物中帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS) 或高分子量种类 (HMWS) 的量。

[0027] 在还有一个别的方面, 本发明关注用于评估帕妥珠单抗组合物的生物学活性的方法, 其包括测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗变体的量以测定组合物的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 活性, 并确认无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量在自约 0.9 至约 4.1% 的范围中。

[0028] 在另一个方面, 本发明关注用于生成组合物的方法, 其包括: (1) 生成包含帕妥珠单抗及一种或多种其变体的组合物, 并 (2) 对如此生成的组合物进行分析性测定法以评估其中变体的量, 其中变体包含: (i) 在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的未配对半胱氨酸变体; 和 / 或 (ii) 帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体; 和 / 或 (iii) 帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS); 和 / 或 (iv) 帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS), 和 / 或 (v) 帕妥珠单抗的峰 1 片段, 和 / 或 (vi) 帕妥珠单抗的峰 2 片段。

[0029] 在另一个方面, 本发明关注分离的帕妥珠单抗变体, 其中分离的变体包含: (a) 帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体, 其中变体为在帕妥珠单抗的仅一个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的异二聚体变体; 和 / 或 (b) 帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体, 其中变体为在帕妥珠单抗的全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的同二聚体变体; 和 / 或 (c) 帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体; 和 / 或 (d) 帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS); 和 / 或 (e) 帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS); 和 / 或 (f) 帕妥珠单抗的峰 1 片段, 和 / 或 (g) 帕妥珠单抗的峰 2 片段。

[0030] 在一个别的方面, 本发明关注用于评估帕妥珠单抗组合物的片段化的方法, 其包括通过还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (R-CE-SDS) 测定法测量组合物中峰 1 和峰 2 的量并确认峰 1 的量为 $\leq 5\%$ 且峰 2 的量为 $\leq 1.0\%$ 。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 提供 HER2 蛋白质结构的示意图, 及其胞外域的亚域 I-IV (分别为 SEQ ID NO: 1-4) 的氨基酸序列。

[0033] 图 2A 和 2B 描绘鼠单克隆抗体 2C4 的可变轻 (VL) (图 2A) 和可变重 (VH) (图 2B)

域（分别为 SEQ ID NO :5 和 6）；变体 574/帕妥珠单抗的 VL 和 VH 域（分别为 SEQ ID NO :7 和 8），和人 VL 和 VH 共有框架（hum κ 1, 轻卡帕亚组 I ;humIII, 重亚组 III）（分别为 SEQ ID NO :9 和 10）的氨基酸序列比对。星号鉴别帕妥珠单抗和鼠单克隆抗体 2C4 的可变域之间或帕妥珠单抗和人框架的可变域之间的差异。互补决定区（CDR）在括号中。

[0034] 图 3A 和 3B 显示帕妥珠单抗轻链（图 3A ;SEQ ID NO :11）和重链（图 3B ;SEQ ID NO :12）的氨基酸序列。CDR 以粗体显示。轻链和重链的计算分子量为 23,526.22Da 和 49,216.56Da（半胱氨酸处于还原形式）。碳水化合物模块附着至重链的 Asn 299。

[0035] 图 4A 和 4B 分别显示曲妥珠单抗轻链（图 4A ;SEQ ID NO :13）和重链（图 4B ;SEQ ID NO :14）的氨基酸序列。可变轻和可变重域的边界以箭指示。

[0036] 图 5A 和 5B 分别描绘一种变体帕妥珠单抗轻链序列（图 5A ;SEQ ID NO :15）和一种变体帕妥珠单抗重链序列（图 5B ;SEQ ID NO :16）。

[0037] 图 6 描绘（主要种类）帕妥珠单抗的结构，包括其 4 个链间和 12 个链内二硫键，包括每个可变轻（VL）域中的 Cys23/Cys88 链内二硫键。描绘的域为：VL = 可变轻域；VH = 可变重域；CL = 轻链恒定域；CH1 = 重链恒定域 1；CH2 = 重链恒定域 2；CH3 = 重链恒定域 3。

[0038] 图 7 显示帕妥珠单抗的非还原（天然）胰蛋白酶肽图。

[0039] 图 8 描绘还原的和非还原的帕妥珠单抗的胰蛋白酶肽图（全刻度）。

[0040] 图 9 描绘还原的和非还原的帕妥珠单抗的胰蛋白酶肽图（0-120 分钟）。

[0041] 图 10 描绘还原的和非还原的帕妥珠单抗的胰蛋白酶肽图（120-204 分钟）。

[0042] 图 11 描绘木瓜蛋白酶消化的帕妥珠单抗的疏水相互作用层析（HIC）分析。

[0043] 图 12 描绘木瓜蛋白酶消化的帕妥珠单抗的 HIC 分析（扩展视图）。

[0044] 图 13 描绘完整帕妥珠单抗的 HIC 分析。显示包含下述各项的峰：富集的游离硫醇同二聚体（全部两条轻链上的游离硫醇），游离硫醇异二聚体（一个轻链上的游离硫醇），和野生型同二聚体（主要种类抗体）。

[0045] 图 14 描绘帕妥珠单抗（批次 anti2C4907-2）在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）测定法中的活性。

[0046] 图 15 描绘 G0-F 水平对 ADCC 活性的影响。测试的样品为 III 期帕妥珠单抗（G0-F = 2.2%）和 I 期帕妥珠单抗（G0-F = 0.8%）。

[0047] 图 16 描绘对自帕妥珠单抗释放的 N 连接寡糖的毛细管电泳分析。

[0048] 图 17 描绘对自帕妥珠单抗释放的 N 连接寡糖的毛细管电泳分析（扩展视图）。注意：G1 寡糖具有两种异构形式（标记为 G1 和 G1'），其中末端半乳糖残基附着至 α 1-6 分支或 α 1-3 分支任一。

[0049] 图 18 描绘帕妥珠单抗 Fab 和 Fc（有限的 Lys-C 消化）分开的反相 - 高效液体层析（RP-HPLC）。显示有限的 Lys-C 消化的帕妥珠单抗和然后用 N-乙基马来酰亚胺（NEM）处理的有限的 Lys-C 消化的帕妥珠单抗。

[0050] 图 19 描绘肽作图，确认帕妥珠单抗游离硫醇 Fab 在其轻链含有游离 Cys23 和 Cys88。来自含有游离硫醇的 Fab 的 L2 肽被 NEM 标记并因此在肽图分析中移位。

[0051] 图 20 示意性描绘：主要种类或野生型 IgG1（图 20A），Cys23/Cys88 异二聚体变体（图 20B），和 Cys23/Cys88 同二聚体变体（图 20C）。

[0052] 图 21 描绘帕妥珠单抗批次的 % G0-F 对 ADCC 活性,使用本文中实施例 4 中的测定法。

[0053] 图 22 示意性描绘帕妥珠单抗在 HER2 的异二聚体结合位点处结合,由此阻止与活化的 EGFR 或 HER3 异二聚化。

[0054] 图 23 比较曲妥珠单抗 (其结合 HER2ECD 的近膜域附近的亚域 IV) 和帕妥珠单抗 (其结合 HER2ECD 的亚域 II) 的活性。

[0055] 图 24A 和 24B 描绘附着至 IgG 抗体的寡糖结构。

[0056] 图 25 描绘帕妥珠单抗的大小排阻层析 (SEC) 分析 (全刻度)。

[0057] 图 26 描绘帕妥珠单抗的 SEC 分析 (扩展刻度)。峰包括主峰 (主要种类抗体),高分子量种类 (HMWS),和低分子量种类 (LMWS)。

[0058] 图 27 描绘帕妥珠单抗样品的大小排阻-高效液体层析 (SE-HPLC) 分析。样品 A 为代表性帕妥珠单抗成品药批次。样品 B 为以 1.2 毫勒克斯小时进行光暴露的帕妥珠单抗批次。样品 C 为以 3.6 毫勒克斯小时进行光暴露的帕妥珠单抗批次。样品 D 为于 pH 3.2 进行酸处理的帕妥珠单抗批次。样品 E 为来自离子交换-HPLC (IE HPLC) 的纯化的碱性变体。

[0059] 图 28 描绘分析性超速离心 (AUC) 沉降速度和 SE-HPLC 分析的一致性图 (concordance plot)。误差棒代表来自 $n = 3$ 测定的两个标准偏差。所有其它数据点表示单次测定。圆圈表示具有低于 AUC 检测水平的 HMWS 水平的样品。

[0060] 图 29 描绘非还原帕妥珠单抗的毛细管电泳十二烷基硫酸钠分析 (CE-SDS) 及激光诱导荧光 (LIF) 检测。

[0061] 图 30 描绘非还原 (NR) 帕妥珠单抗的 CE-SDS-LIF (扩展视图)。

[0062] 图 31A 和 31B 描绘实施例 6 的 SE-HPLC 层析图:全刻度 (图 31A) 和扩展刻度 (图 31B)。

[0063] 图 32A 和 32B 描绘实施例 6 的非还原 CE-SDS (NR-CE-SDS) 电泳图:全刻度 (图 32A) 和扩展刻度 (图 32B)。

[0064] 图 33A 和 33B 描绘实施例 6 的还原 CE-SDS (R-CE-SDS) 电泳图:全刻度 (图 33A),和扩展刻度 (图 33B)。

[0065] 图 34 提供酸处理样品的 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS 电泳图的比较 (扩展刻度)。

[0066] 图 35 描绘 NR-CE-SDS 和 SE-HPLC 之间 Fab 量化的相关性。

[0067] 发明详述

[0068] I. 定义

[0069] “配对半胱氨酸”在本文中指蛋白质 (诸如抗体) 中形成二硫键的两个半胱氨酸残基。此类二硫键可以是链间二硫键 (例如抗体的重和轻链之间的或抗体的两条重链之间的二硫键),或链内二硫键 (例如抗体的一条轻链内的或抗体的一条重链内的)。大多数 IgG1 抗体包含四个链间二硫键和十二个链内二硫键。见图 6。

[0070] “未配对半胱氨酸变体”为蛋白质 (例如抗体,诸如帕妥珠单抗) 的一种变体,其中一个或多个配对半胱氨酸没有处于成二硫键状态。此类未配对半胱氨酸可以是尚未配对以形成二硫键 (例如当蛋白质最初折叠成它的三级结构时) 或可以是已经形成二硫键但其稍后断裂 (例如在制造期间或在贮藏后)。未配对半胱氨酸常常称作游离硫醇或游离氢硫基。在一个实施方案中,未配对半胱氨酸来自链内二硫键。在一个实施方案中,未配对半胱氨酸

酸在抗体的轻链（例如可变轻域）中。在一个实施方案中，未配对半胱氨酸变体为 Cys23/Cys88 变体。

[0071] “Cys23/Cys88”未配对半胱氨酸变体缺乏抗体的一个或全部两个可变轻域中的半胱氨酸残基 23 和 88 处的分子内二硫键。见本文中的图 20(b) 和 (c)。

[0072] “同二聚体变体”缺乏抗体的全部两个可变轻域中的 Cys23/Cys88 二硫键。见本文中的图 20(c)。

[0073] “异二聚体变体”缺乏抗体的一个可变轻域中的仅一个 Cys23/Cys88 二硫键。见本文中的图 20(b)。

[0074] “无岩藻糖基化变体”为抗体的一种糖基化变体，其中附着至一条或全部两条重链中的残基 Asn299 的一个或全部两个寡糖结构中缺乏岩藻糖，例如在核心寡糖结构中缺乏 Fuc α (1 $\rightarrow$ 6)。

[0075] 帕妥珠单抗的“低分子量种类”或“LMWS”包含帕妥珠单抗的一种片段，其具有小于主要种类或完整帕妥珠单抗的分子量的分子量（例如其中完整帕妥珠单抗具有约 145, 197Da 的分子量，仅测量它的肽链）。LMWS 可通过大小排阻高效液体层析 (SE-HPLC) 和 / 或具有十二烷基硫酸钠的非还原毛细管电泳 (CE-SDS) 来检测，例如实施例 5 中的。在一个实施方案中，LMWS 包含通过 CE-SDS 获得的“峰 6”或由通过 CE-SDS 获得的“峰 6”组成（见例如实施例 5）。

[0076] “高分子量种类”或“HMWS”包含帕妥珠单抗的一种制备物，其具有大于主要种类或完整帕妥珠单抗的分子量的分子量（例如其中完整帕妥珠单抗具有约 145, 197Da 的分子量，仅测量它的肽链）。HMWS 可通过大小排阻高效液体层析 (SE-HPLC) 和 / 或具有十二烷基硫酸钠的非还原毛细管电泳 (CE-SDS) 测定法来检测，例如实施例 5 中的。

[0077] 本文中的“峰 1”指其大小比帕妥珠单抗轻链 (LC) 要小的帕妥珠单抗片段。可以通过 CE-SDS 测定法（优选还原 CE-SDS (R-CE-SDS) 测定法）将峰 1 片段与主要种类帕妥珠单抗分开。见例如本文中的图 33B, 表 16, 和表 18。优选地，帕妥珠单抗组合物中峰 1 的量为 $\leq 0.5\%$ 。任选地，如实施例 6 中所述进行 R-CE-SDS 测定法，而且校正峰面积 (CPA) 提供组合物中的 % 峰 1。

[0078] 本文中的“峰 2”指其大小比帕妥珠单抗轻链 (LC) 大且比帕妥珠单抗非糖基化重链 (NGHC) 要小的帕妥珠单抗片段。可以通过 CE-SDS (优选还原 (R-CE-SDS) 测定法) 将峰 2 与主要种类帕妥珠单抗分开。峰 2 排除 R-CE-SDS 测定法期间可出现的峰 3, 如本文中的实施例 6 中解释的。见例如本文中的图 33B, 表 16, 和表 18。优选地，帕妥珠单抗组合物中峰 2 的量为 $\leq 1.0\%$ 。任选地，如实施例 6 中所述进行 R-CE-SDS 测定法，而且校正峰面积 (CPA) 提供组合物中的 % 峰 2。

[0079] “片段化”指多肽链切割，例如帕妥珠单抗轻链和 / 或重链的切割。它不包括例如 NR-CE-SDS 分析期间非共价联合的多肽链的解离。

[0080] “分析性测定法”为定性评估和 / 或定量测量组合物中分析物（例如抗体变体）的存在或量的测定法。进行测定法的组合物可以是纯化的组合物，包括药物组合物。

[0081] “Fab 疏水性相互作用层析测定法”或“Fab HIC 测定法”包含生成组合物中的抗体的片段（例如 Fab 片段）（例如使用酶木瓜蛋白酶）并对如此生成的抗体片段进行 HIC 以将未配对半胱氨酸变体与主要种类帕妥珠单抗分开。本文中的实施例 1 中公开一种例示性

此类测定法。

[0082] “HER 受体”为属于 HER 受体家族的受体蛋白质酪氨酸激酶,而且包括 EGFR,HER2,HER3 和 HER4 受体。HER 受体通常会包含胞外域,其可结合 HER 配体和 / 或与另一个 HER 受体分子二聚化;亲脂性跨膜域;保守的细胞内酪氨酸激酶域;和羧基末端信号传导域,其包含数个可被磷酸化的酪氨酸残基。

[0083] 表述“HER2”指例如 Semba 等人,PNAS(USA)82:6497-6501(1985)和 Yamamoto 等人,Nature 319:230-234(1986)中记载的人 HER2 蛋白质(Genebank 登录号 X03363)。

[0084] 在本文中,“HER2 胞外域”或“HER2ECD”指 HER2 中在细胞外部的域,或是锚定至细胞膜或是在循环中,包括其片段。图 1 中显示 HER2 的氨基酸序列。在一个实施方案中,HER2 的胞外域可包含四个域:“亚域 I”(氨基酸残基约 1-195;SEQ ID NO:1),“亚域 II”(氨基酸残基约 196-319;SEQ ID NO:2),“亚域 III”(氨基酸残基约 320-488;SEQ ID NO:3),和“亚域 IV”(氨基酸残基约 489-630;SEQ ID NO:4)(残基编号不含信号肽)。参见 Garrett 等人,Mol. Cell. 11:495-505(2003);Cho 等人,Nature 421:756-760(2003);Franklin 等人,Cancer Cell 5:317-328(2004);和 Plowman 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750(1993);以及本文中的图 1。

[0085] “HER 二聚体”在本文中为非共价联合的二聚体,其包含至少两个 HER 受体。例如,此类复合物可在表达两种或更多种 HER 受体的细胞暴露于 HER 配体时形成,而且可以通过免疫沉淀来分离,通过 SDS-PAGE 来分析,如 Sliwowski 等人,J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994)中记载的。其它蛋白质(诸如细胞因子受体亚基,例如 gp130)可以与二聚体联合。优选地,HER 二聚体包含 HER2。

[0086] “HER 异二聚体”在本文中为非共价联合的异二聚体,其包含至少两个不同 HER 受体,诸如 EGFR-HER2,HER2-HER3 或 HER2-HER4 异二聚体。

[0087] “HER 活化”指任一种或多种 HER 受体的活化或磷酸化。通常,HER 活化导致信号转导(例如由 HER 受体的细胞内激酶域磷酸化 HER 受体或底物多肽中的酪氨酸残基引起的)。HER 活化可通过 HER 配体结合包含感兴趣 HER 受体的 HER 二聚体来介导。HER 配体结合 HER 二聚体可活化二聚体中的 HER 受体中的一种或多种的激酶域,并由此导致 HER 受体中的一种或多种中的酪氨酸残基磷酸化和 / 或别的底物多肽(诸如 Akt 或 MAPK 细胞内激酶)中的酪氨酸残基磷酸化。

[0088] “人源化”形式的非人(例如啮齿类)抗体为最小限度含有自非人免疫球蛋白衍生的序列的嵌合抗体。对于绝大部分,人源化抗体为如下的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的残基用来自具有期望特异性,亲和力,和能力的非人种类(供体抗体)(诸如小鼠,大鼠,家兔或非人灵长类)的高变区的残基替换。在一些情况中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应非人残基替换。而且,人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰以进一步细调抗体性能。一般而言,人源化抗体会包含基本上整个如下的至少一个,通常两个可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,而且所有或基本上所有 FR 为人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选还会包含免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的至少一部分。关于更多详情,参见 Jones 等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann 等人,Nature 332:323-329(1988);和 Presta,Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。人源化 HER2 抗体具

体包括曲妥珠单抗和人源化 2C4 抗体,诸如帕妥珠单抗,如本文中描述和定义的。

[0089] “完整抗体”在本文中为包含两个抗原结合区和一个 Fc 区的。优选地,完整抗体具有功能性 Fc 区。在一个实施方案中,“完整帕妥珠单抗”具有约 145,197Da 的分子量,仅测量它的肽链。

[0090] 术语“高变区”在本文中使用时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基 24-34(L1),50-56(L2)和 89-97(L3)和重链可变域中的 31-35(H1),50-65(H2)和 95-102(H3);Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(例如轻链可变域中的残基 26-32(L1),50-52(L2)和 91-96(L3)和重链可变域中的 26-32(H1),53-55(H2)和 96-101(H3);Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 : 901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基为那些除高变区残基以外的可变域残基,如本文中定义的。

[0091] 术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端区域,包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以有所变化,但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自位于位置 Cys226 的氨基酸残基或自 Pro230 延伸至其羧基末端。可去除 Fc 区的 C 末端赖氨酸(依照 EU 编号系统的残基 449),例如在抗体生产或纯化期间或通过重组工程改造编码抗体重链的核酸。因而,完整抗体的组合物可包含去除所有 K449 残基的抗体群体,无一 K449 残基去除的抗体群体,和具有有和无 K449 残基的抗体的混合物的抗体群体。

[0092] 除非另外指明,在本文中免疫球蛋白重链中的残基的编号为 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中 EU 索引的,通过援引明确收入本文。“Kabat 中的 EU 索引”指人 IgG1EU 抗体的残基编号。

[0093] “功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的“效应器功能”。例示性“效应器功能”包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;下调细胞表面受体(例如 B 细胞受体;BCR);等。此类效应器功能通常要求 Fc 区与结合域(例如抗体可变域)组合,而且可使用多种测定法来评估。

[0094] “天然序列 Fc 区”包含与在自然界中找到的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1Fc 区(非 A 和 A 同种异型);天然序列人 IgG2Fc 区;天然序列人 IgG3Fc 区;和天然序列人 IgG4Fc 区,以及其天然发生变体。

[0095] “裸抗体”为未缀合异源分子(诸如细胞毒性模块或放射性标记物)的抗体。

[0096] 术语“主要种类抗体”或“野生型抗体”在本文中指组合物中如下的抗体氨基酸序列结构,它是组合物中数量上占优势的抗体分子。优选地,主要种类抗体为 HER2 抗体,诸如结合 HER2 亚域 II 的抗体,比曲妥珠单抗更加有效地抑制 HER 二聚化的抗体,和/或结合 HER2 上的异二聚体结合位点的抗体。在一个实施方案中,主要种类抗体为如下的抗体,其包含 CDR-H1(SEQ ID NO:17 或 23),CDR-H2(SEQ ID NO:18),和 CDR-H3(SEQ ID NO:19),CDR-L1(SEQ ID NO:20),CDR-L2(SEQ ID NO:21 或 24)和 CDR-L3(SEQ ID NO:22),分别在 SEQ ID NO:7 和 8 中的 VL 和 VH 氨基酸序列(见图 2A-2B),和任选的 SEQ ID NO:11 或 15

中的轻链氨基酸序列和 SEQ ID NO :12 或 16 中的重链氨基酸序列（见图 3A-3B 和 5A-5B）。在一个实施方案中，主要种类抗体为帕妥珠单抗。

[0097] “抑制 HER 二聚化”的抗体为抑制或干扰 HER 二聚体或异二聚体形成的抗体。在一个实施方案中，此类抗体在其异二聚体结合位点处结合 HER2。本文中最优选的二聚化抑制性抗体为帕妥珠单抗。

[0098] HER2 上的“异二聚体结合位点”指 HER2 的胞外域中如下的区域，其与 EGFR，HER3 或 HER4 的胞外域中的一个区域形成二聚体，此时接触后者或与后者成界面。区域在 HER2 的亚域 II (SEQ ID NO :2) 中找到。Franklin 等人，Cancer Cell 5 :317-328 (2004)。

[0099] “结合 HER2 的异二聚体结合位点”的 HER2 抗体结合亚域 II (SEQ ID NO :2) 中的残基且任选还结合 HER2 胞外域的其他域，诸如亚域 I 和 III (SEQ ID NO :1 和 3) 中的残基，而且能至少一定程度地在空间上阻碍 HER2-EGFR，HER2-HER3，或 HER2-HER4 异二聚体形成。Franklin 等人，Cancer Cell 5 :317-328 (2004) 表征 HER2-帕妥珠单抗晶体结构，保存于 RCSB 蛋白质数据库（身份代码 IS78），例示结合 HER2 的异二聚体结合位点的例示性抗体。

[0100] “结合 HER2 的亚域 II”的抗体结合亚域 II (SEQ ID NO :2) 中的残基和任选的 HER2 的其他亚域，诸如亚域 I 和 III（分别为 SEQ ID NO :1 和 3）中的残基。

[0101] 为了本文中的目的，可互换使用的“帕妥珠单抗”和“rhuMAb 2C4”指包含分别在 SEQ ID NO :7 和 8 中的可变轻 (VL) 和可变重 (VH) 氨基酸序列的抗体。本文中的图 22 和 23 例示帕妥珠单抗的例示性生物学功能。在帕妥珠单抗为完整抗体的情况中，它优选包含 IgG1 抗体；在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO :11 或 15 中的轻链氨基酸序列，和 SEQ ID NO :12 或 16 中的重链氨基酸序列。抗体任选是由重组中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞生成的。术语“帕妥珠单抗”和“rhuMAb 2C4”在本文中涵盖美国采用名称 (USAN) 或国际非专利名称 (INN) 为帕妥珠单抗的药物的生物仿制药或故意拷贝。

[0102] 为了本文中的目的，可互换使用的“曲妥珠单抗”和 rhuMAb4D5”指抗体包含分别在 SEQ ID NO :13 和 14 内的可变轻 (VL) 和可变重 (VH) 氨基酸序列（见图 4A-4B）。在曲妥珠单抗为完整抗体的情况中，它优选包含 IgG1 抗体；在一个实施方案中包含 SEQ ID NO :13 的轻链氨基酸序列和 SEQ ID NO :14 的重链氨基酸序列。抗体任选是由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞生成的。术语“曲妥珠单抗”和“rhuMAb4D5”在本文中涵盖美国采用名称 (USAN) 或国际非专利名称 (INN) 为曲妥珠单抗的药物的生物仿制药或故意拷贝。

[0103] “氨基酸序列变体”抗体在本文中为具有与主要种类抗体不同的氨基酸序列的抗体。通常，氨基酸序列变体会与主要种类抗体拥有至少约 70% 同源性，且优选地，它们会与主要种类抗体至少约 80%，和更优选至少约 90% 同源。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置处拥有替代，删除，和 / 或添加。本文中的氨基酸序列变体的例子包括脱酰胺抗体变体，在其一条或两条轻链上具有氨基末端前导延伸（例如 VHS-）的抗体，在其一条或两条重链上具有 C 末端赖氨酸残基的抗体，等，而且包括对重和 / 或轻链的氨基酸序列的变异的组合。

[0104] “酸性变体”为主要种类抗体如下的变体，其比主要种类抗体更加酸性。酸性变体相对于主要种类抗体已经获得负电荷或丢失正电荷。此类酸性变体可使用依照电荷将蛋白质分开的分离方法学来解析，诸如离子交换层析。在通过阳离子交换层析分开时，主要种类抗体的酸性变体比主峰要早洗脱。

[0105] “二硫化物还原变体”具有一个或多个成链间二硫键半胱氨酸化学还原成游离硫醇形式。这种变体可通过具有十二烷基硫酸钠的非还原毛细管电泳 (CE-SDS) 来监测,例如如 W0 2009/099829 (Harris 等人) 在记载的。

[0106] 在本文中,“不可还原变体”或“不完全还原变体”为主要种类抗体如下的变体,其不能通过还原剂(诸如二硫苏糖醇)处理化学还原成重链和轻链。此类变体可通过用还原剂处理组合物并使用评估蛋白质大小的方法学(诸如具有十二烷基硫酸钠的毛细管电泳 (CE-SDS),例如使用 W0 2009/099829 (Harris 等人) 中记载的技术)评估所得组合物来评估。

[0107] “糖基化变体”抗体在本文中为具有与附着至主要种类抗体的一种或多种碳水化合物模块不同的一种或多种碳水化合物模块附着至其的抗体。在一个实施方案中,糖基化变体具有附着至抗体的一条或全部两条重链的寡糖结构,例如在重链的残基 299 处。在一个实施方案中,主要种类抗体(例如帕妥珠单抗)包含 G0 寡糖,作为占优势的附着至它的 Fc 区的寡糖。图 24A-24B 中描绘附着至 IgG1 的例示性寡糖结构。本文中的糖基化变体的例子包括无岩藻糖基化变体,具有 G1 或 G2 寡糖结构代替 G0 寡糖结构附着至其 Fc 区的抗体(“G1 糖基化变体”或“G2 糖基化变体”),没有碳水化合物附着至抗体的一条或两条重链的抗体(“非糖基化重链变体”),唾液酸化变体,等,以及此类糖基化改变的组合。参见例如美国专利 7,560,111 (Kao 等人)。

[0108] 在抗体具有 Fc 区的情况中,寡糖结构可附着至抗体的一条或两条重链,例如在残基 299 处。在一个实施方案中,G0 为占优势的寡糖结构,其它寡糖结构,诸如 G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 和 G2 以较少的量在组合物中找到。

[0109] 除非另外指明,“G1 寡糖结构”在本文中包括 G1(1-6) 和 G1(1-3) 结构。

[0110] 为了本文中的目的,“唾液酸化变体”为主要种类抗体如下的变体,其包含一种或多种唾液酸化碳水化合物模块附着至一条或两条其重链。唾液酸化变体可通过在有或无唾液酸酶处理的情况下评估组合物(例如通过离子交换层析)来鉴定,例如如 W0 2009/099829 中记载的。

[0111] “糖化变体”为糖(诸如葡萄糖)已经共价附着至例如其一条或全部两条轻链的抗体。这种添加可通过葡萄糖与蛋白质(例如细胞培养培养基中的)上的赖氨酸残基的反应而发生。糖化变体可通过对还原抗体的质谱术分析来鉴定,即评估重或轻链的质量的增加。糖化变体还可通过硼酸盐层析来量化,如 W0 2009/099829 (Harris 等人) 中解释的。

[0112] “脱酰胺”抗体为其中一个或多个其天冬酰胺残基已经衍生化成例如天冬氨酸,琥珀酰亚胺,或异天冬氨酸的。脱酰胺抗体的一个例子是如下的帕妥珠单抗变体,其中帕妥珠单抗的一条或两条重链上的 Asn-386 和 / 或 Asn-391 是脱酰胺的。参见例如 W0 2009/099829 (Harris 等人)。

[0113] “氨基末端前导延伸变体”在本文中指在主要种类抗体的任一条或多条重或轻链的氨基末端处具有氨基末端前导序列的一个或多个氨基酸残基的主要种类抗体。一种例示性氨基末端前导延伸在抗体变体的一条或全部两条轻链上包含三个氨基酸残基,VHS- 或由其组成,在本文中称作“VHS- 变体”。参见美国专利 7,560,111 (Kao 等人)。

[0114] “C 末端赖氨酸变体”指在其重链的 C 末端处包含赖氨酸 (K) 残基的变体。参见美国专利 7,560,111 (Kao 等人)。

[0115] “甲硫氨酸氧化变体”指其中包含一个或多个氧化的甲硫氨酸残基（例如氧化的 Met-254）的变体。参见美国专利 7,560,111 (Kao 等人)。

[0116] 术语“癌症”指哺乳动物中通常特征为不受调节的细胞生长的生理状态。本文中的癌症的例子包括乳腺癌（例如转移性乳腺癌），胃癌，卵巢癌，原发性腹膜癌，和输卵管癌。本文中的癌症的例子包括 HER2 阳性癌症和低 HER3 癌症。

[0117] “展示 HER 表达，扩增，或活化”的癌症或生物学样品为在诊断性测试中表达（包括过表达）HER 受体，已经扩增 HER 基因，和 / 或以其它方式证明 HER 受体活化或磷酸化的。

[0118] “HER2 阳性”癌症包含具有比正常要高的 HER2 水平的癌细胞。HER2 阳性癌症的例子包括 HER2 阳性乳腺癌和 HER2 阳性胃癌。用于鉴定 HER2 阳性癌症的方法包括：测量 HER2 蛋白质的测定法，诸如免疫组织化学测定法 (IHC)，测量 HER2 编码核酸的测定法，诸如原位杂交 (ISH)，包括荧光原位杂交 (FISH；参见 1998 年 10 月公布的 W098/45479) 和发色原位杂交 (CISH；参见例如 Tanner 等人, Am. J. Pathol. 157 (5) :1467-1472 (2000) ;Bella 等人, J. Clin. Oncol. 26 : (May 20 suppl ;abstr 22147) (2008))，Southern 印迹，或聚合酶链式反应 (PCR) 技术，诸如定量实时 PCR (qRT-PCR)；脱落抗原（例如 HER2ECD）测定法（参见例如 1990 年 6 月 12 日公告的美国专利 No. 4,933,294；和 1995 年 3 月 28 日公告的美国专利 5,401,638）；和体内测定法。任选地，HER2 阳性癌症具有 2+ 或 3+ 的免疫组织化学 (IHC) 得分和 / 或 ≥ 2.0 的原位杂交 (ISH) 扩增比。

[0119] “低 HER3”癌症包含具有比正常要低的 HER3 水平的癌细胞。低 HER3 癌症的例子包括卵巢癌，原发性腹膜癌，和输卵管癌。参见例如美国专利 No. 7,981,418 (Amler 等人)。在一个实施方案中，低 HER3 是基于 HER3mRNA 表达水平测定的（等于或低于 2.81 的浓度比，如在 COBAS **z480**® 仪器上通过 qRT-PCR 评估的）。

[0120] “表位 2C4”为 HER2 的胞外域中抗体 2C4 结合的区域。为了筛选本质上结合 2C4 表位的抗体，可实施常规交叉阻断测定法，诸如 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988) 中记载的。优选地，抗体阻断 2C4 结合 HER2 达约 50% 或更多。或者，可实施表位作图来评估抗体是否本质上结合 HER2 的 2C4 表位。表位 2C4 包含来自 HER2 的胞外域中的亚域 II (SEQ ID NO :2) 的残基。2C4 和帕妥珠单抗在亚域 I, II 和 III (分别为 SEQ ID NO :1, 2, 和 3) 附近结合 HER2 的胞外域。Franklin 等人, Cancer Cell 5 :317-328 (2004)。

[0121] “处理 / 治疗”指治疗性处理和防范性或预防性措施二者。需要治疗的那些包括早就具有癌症的那些以及其中要预防癌症的那些。因此，本文中要治疗的患者可以是已经诊断为具有癌症或可以是倾向或易得癌症。

[0122] 术语“有效量”指药物有效治疗患者中的癌症的量。有效量的药物可减少癌细胞的数目；缩小肿瘤大小；抑制（即一定程度减缓和优选停止）癌细胞浸润入周围器官中；抑制（即一定程度减缓和优选停止）肿瘤转移；一定程度抑制肿瘤生长；和 / 或一定程度减轻一种或多种与癌症有关的症状。就药物可阻止生长和 / 或杀死现有癌细胞的程度而言，它可以是细胞抑制性的和 / 或细胞毒性的。有效量可延长无进展存活（例如如通过实体瘤响应评估标准 (RECIST) 或 CA-125 变化测量的），导致客观响应（包括部分响应，PR，或完全响应，CR），延长总体存活时间，和 / 或改善癌症的一种或多种症状（例如如通过 FOSI 评估的）。

[0123] 本文中的治疗剂的“固定”或“平坦”剂量指不管患者的重量 (WT) 或体表面积 (BSA) 施用于人患者的剂量。因此,固定或平坦剂量不是以 mg/kg 剂量或 mg/m²剂量,而是以治疗剂的绝对量提供的。

[0124] “容器”指可用于容纳或装载药物组合物或组合物的物体。本文中的容器的例子包括管形瓶,注射器,静脉内袋,等。

[0125] “静脉内袋”或“IV 袋”为可容纳可经患者的静脉施用的溶液的袋。在一个实施方案中,溶液为盐水溶液(例如约 0.9%或约 0.45% NaCl)。任选地,IV 袋是自聚烯烃或聚氯乙烯形成的。

[0126] “管形瓶”为适合于容纳液体或冻干制备物的一种容器。在一个实施方案中,管形瓶为单次使用管形瓶,例如带塞子的 20-cc 单次使用管形瓶。

[0127] “包装插页”为奉食品和药物管理局 (FDA) 或其它管理机构之命,必须放置在每一种处方药物的包装内部的传单。传单通常包括药物的商标,它的通用名,和它的作用机制;陈述它的适应症,禁忌症,警告,预防措施,不利作用,和剂量形式;而且包括关于施用的推荐剂量,时间,和路径的用法说明。

[0128] “药物组合物”为包含可安全施用于人患者的药学活性药物(例如帕妥珠单抗和变体形式,诸如本文中公开的那些)和一种或多种“药学活性赋形剂”(例如缓冲剂,稳定剂,张力调节剂,防腐剂,表面活性剂,等)的组合物。例如,此类组合物可以是液体的或冻干的。

[0129] “重组”蛋白质为已经由遗传修饰宿主细胞(诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 宿主细胞)生成的蛋白质。

[0130] “制造规模”指以商业规模(例如 12,000 升 (L) 或更多)使用得到 FDA 或其它管理机构批准的商业性工艺生产蛋白质药物(例如抗体)。

[0131] “纯化”指一个或多个纯化步骤,诸如蛋白 A 层析,离子交换层析,等。

[0132] “分离的”变体指通过一种或多种纯化或分析规程已经与主要种类或野生型抗体分开的变体。此类分离的变体可评估它的生物学活性和 / 或效力。

[0133] II. 抗体组合物

[0134] (i) 主要种类抗体

[0135] 本文中的抗体组合物包含结合 HER2 的抗体 (HER2 抗体),任选人源化 HER2 抗体。例如,本文中的人源化抗体可包含掺入人可变重域中的非人高变区残基且可进一步在选自下组的位置包含框架区 (FR) 替代:69H,71H 和 73H,利用 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991) 中列出的可变域编号系统。在一个实施方案中,人源化抗体在位置 69H,71H 和 73H 中的两个或全部包含 FR 替代。

[0136] 本文中一种例示性感兴趣人源化抗体包含 VH CDR 残基:

[0137] -GFTFTDYTMX (SEQ ID NO:17),其中 X 优选为 D 或 S,例如 GFTFTDYTMD (SEQ ID NO:23),作为 CDR-H1;

[0138] -DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:18),作为 CDR-H2;和 / 或 -NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:19),作为 CDR-H3,任选包含那些 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中修饰本质上维持或改善抗体的亲和力。例如,供本发明的方法使用的抗体变体可在上述可变重 CDR 序列中具有

自约一处至约七处或约五处氨基酸替代。可通过亲和力成熟制备此类抗体变体,例如如下文所述。

[0139] 人源化抗体可包含 VL CDR 残基:

[0140] -KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:20), 作为 CDR-L1;

[0141] -SASYX¹X²X³, 其中 X¹优选为 R 或 L, X²优选为 Y 或 E, 且 X³优选为 T 或 S (SEQ ID NO:21), 例如 SASRYT (SEQ ID NO:24), 作为 CDR-L2; 和 / 或

[0142] -QQYYIYPYT (SEQ ID NO:22), 作为 CDR-L3,

[0143] 例如, 在前一段中的那些可变重域 CDR 残基之外。

[0144] 此类人源化抗体任选包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰, 例如其中修饰本质上维持或改善抗体的亲和力。例如, 感兴趣抗体变体可在上述可变轻 CDR 序列中具有自约一处至约七处或约五处氨基酸替代。可通过亲和力成熟制备此类抗体变体。

[0145] 本申请还涵盖结合 HER2 的亲和力成熟抗体。亲本抗体可以为人抗体或人源化抗体, 例如包含分别为 SEQ ID NO:7 和 8 的可变轻和 / 或可变重序列 (即包含帕妥珠单抗的 VL 和 / 或 VH) 的。帕妥珠单抗的一种亲和力成熟变体优选以优于鼠 2C4 或帕妥珠单抗亲和力的亲和力 (例如改善自约 2 或约 4 倍, 至约 100 倍或约 1000 倍的亲和力, 例如如使用 HER2ECD ELISA 评估的) 结合 HER2 受体。用于替代的例示性可变重 CDR 残基包括 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 或两个或更多个 (例如这些残基中的 2 个, 3 个, 4 个, 5 个, 6 个, 或 7 个) 的组合。用于改变的可变轻 CDR 残基的例子包括 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 或两个或更多个的组合 (例如这些残基中的 2 个至 3 个, 4 个, 5 个或直至约 10 个)。

[0146] 涵盖各种形式的人源化抗体或亲和力成熟抗体。例如, 人源化抗体或亲和力成熟抗体。或者, 人源化抗体或亲和力成熟抗体可以为完整抗体, 诸如完整 IgG1 抗体。

[0147] 优选, HER2 抗体 (主要种类 HER2 抗体及其抗体变体任一或二者) 为结合 HER2 的亚域 II, 比曲妥珠单抗更加有效地抑制 HER 二聚化, 和 / 或结合 HER2 的异二聚体结合位点的。本文中主要种类抗体的优选实施方案为包含 SEQ ID NO:3 和 4 中的可变轻和可变重氨基酸序列, 且最优选包含 SEQ ID NO:11 或 15 中的轻链氨基酸序列和 SEQ ID NO:12 或 16 中的重链氨基酸序列的。

[0148] (ii) 未配对半胱氨酸变体

[0149] 本文中的实施例 1 和 3 描述帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体。用于分离, 表征, 和量化此类变体的分析性测定法包括特异性评估链内二硫键 (不同于链间二硫键) 的测定法, 例如抗体片段 (例如 Fab 片段) 的疏水相互作用层析 (HIC) 分析 (如实施例 1 中的), 完整抗体的 HIC (如实施例 1 中的), 带不同标签的抗体的肽作图分析 (如实施例 3 中的), 和 / 或反相高效液体层析 (RP-HPLC) (如本文中的实施例 3 中的), 和 Zhang 等人, Anal. Chem. 84(16):7112-7123 (2012) 中的。

[0150] 通常, 帕妥珠单抗的优势形式在其两个 Fab 域的全部两个 VL 域中包含 Cys23 和 Cys88 之间的二硫键。见图 6。

[0151] 本文中一种未配对半胱氨酸变体, 异二聚体变体, 在其两个 Fab 区中仅一个的可变轻 (VL) 域中缺乏 Cys23/Cys88 二硫键。见图 20(b)。这测定为占优势的未配对半胱氨酸变体。

[0152] 本文中的又一种未配对半胱氨酸变体,同二聚体变体,在其全部两个 Fab 区中缺乏 Cys23/Cys88 二硫键。见图 20(c)。

[0153] 在一个实施方案中,组合物中未配对半胱氨酸变体(包括同二聚体和异二聚体变体)的量为 $\leq$ 约 25%,例如如通过 Fab 疏水相互作用层析(HIC)测定的。

[0154] 在一个实施方案中,组合物中同二聚体变体的量为 $\leq$ 4.9%,如通过完整抗体的 HIC 测定的。

[0155] 在一个实施方案中,组合物中异二聚体变体的量为自约 13%至约 18%,例如如通过完整抗体的 HIC 测定的。

[0156] 组合物任选进一步包含一种或多种下文所述别的变体。

[0157] 本发明还关注分离的帕妥珠单抗的未配对半胱氨酸变体,其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸。此类分离的未配对半胱氨酸变体可包含异二聚体变体和/或同二聚体变体或由异二聚体变体和/或同二聚体变体组成。此类变体可使用 HIC 或其它纯化方法来分离的,且可进行生物学测定法,诸如效力测定法(使用 HER2 阳性乳腺癌细胞),如下文实施例 1 中的。

[0158] (iii) 无岩藻糖基化变体

[0159] 本文中的实施例 2 和 4 描述帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体并演示如何基于组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗的百分比测定 ADCC 活性。

[0160] 在一个实施方案中,本发明关注包含帕妥珠单抗和帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体的组合物,其中无岩藻糖基化变体的量为大于组合物的 2%。见例如下文表 9 中的 anti2C4907-2 和运行 1。

[0161] 在一个备选实施方案中,本发明关注包含帕妥珠单抗和帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体的组合物,其中无岩藻糖基化变的量为组合物的自 0.9 至 4.1%。例如,无岩藻糖基化变体的这种量可使用实施例 4 中经过验证的 CE-LIF 测定法来量化。

[0162] 任选地,组合物进一步包含未配对半胱氨酸变体(先前部分中描述的异二聚体和/或同二聚体)和/或下文要描述的别的变体。

[0163] (iv) LMWS 和 HMWS

[0164] 本发明进一步关注帕妥珠单抗的低分子量种类(LMWS)和/或帕妥珠单抗的高分子量种类(HMWS),或是分离的形式或是在包含变体和主要种类抗体的组合物中。可使用多种技术来分离,表征,和量化 LMWS 和 HMWS,包括但不限于大小排阻高效液体层析(SE-HPLC)和/或毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)。

[0165] 使用 SE-HPLC 测定法(例如如实施例 5 中的),组合物中主要种类帕妥珠单抗和 HMWS 或 LMWS 的量可以为:

[0166] 主峰: $\geq$ 约 96%,例如 $\geq$ 约 96.7%, $\geq$ 约 97.3%,例如 $\geq$ 约 97.4%。

[0167] HMWS: $\leq$ 约 2%,例如 $\leq$ 约 1.7%,例如 $\leq$ 约 1.5%,例如 $\leq$ 约 1.4%,例如 $\leq$ 约 0.8%。

[0168] LMWS: $\leq$ 约 2%,例如 $\leq$ 约 1.6%,例如 $\leq$ 约 1.2%,例如 $\leq$ 约 0.6%。

[0169] 使用 NR-CE-SDS 测定法(例如如实施例 5 中的),组合物中主要种类帕妥珠单抗和 HMWS 或 LMWS 的量可以为:

[0170] 主峰: $\geq$ 约 95%,例如 $\geq$ 约 96.0%,例如 $\geq$ 约 97.8%。

[0171] HMWS : $\leq$ 约 1%, 例如 $\leq$ 约 0.6%。

[0172] LMWS : $\leq$ 约 4%, 例如 $\leq$ 约 3.4%。

[0173] 例如, 如通过 CE-SDS 测定的, 主峰或主要种类帕妥珠单抗 (排除 LMWS 和 HMWS) 的量可以为约 95% 至约 99%, 例如自约 96.0% 至约 97.8%, 例如自约 95.3% 至约 97.3% 主峰。

[0174] 任选地, LMWS 包含通过 NR-CE-SDS (见例如实施例 5) 获得的“峰 6”或由通过 NR-CE-SDS (见例如实施例 5) 获得的“峰 6”组成。此类峰 6 可测定为组合物的约 0.9% 至约 2.3%, 例如约 2% 至约 2.3%。

[0175] (v) 帕妥珠单抗的峰 1 和峰 2 片段

[0176] 本发明进一步关注帕妥珠单抗的峰 1 片段和 / 或峰 2 片段, 或是分开的或分离的形式, 或是在包含片段和主要种类抗体的组合物中。可使用多种技术来分离, 表征, 和量化峰 1 和峰 2, 包括但不限于大小排阻高效液体层析 (SE-HPLC) 和 / 或毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (CE-SDS), 包括 R-CE-SDS 和 NR-CE-SDS。在一个实施方案中, 通过 R-CE-SDS 来分开和 / 或分析峰 1 和峰 2, 例如如实施例 5 和 6 中描述的, 而且校正峰面积 (CPA) 提供组合物中的 % 峰 1 或峰 2。

[0177] 使用 R-CE-SDS 测定法 (例如如实施例 5 和 6 中的), 组合物中峰 1 的量为 $\leq$ 5% (例如自 0.13% 至 0.41% CPA) 且组合物中峰 2 的量为 $\leq$ 1.0% (例如自 0.47% 至 0.74% CPA)。

[0178] (vi) 别的变体

[0179] 本文中的组合物任选包含帕妥珠单抗的别的变体, 诸如美国专利 7,560,111 (Kao 等人) 和 / 或 WO 2009/099829 (Harris 等人) 中记载的那些。

[0180] 此类别的变体的例子包括但不限于下述任一项或多项: 糖化变体, 二硫化物还原变体, 不可还原变体, 脱酰胺变体, 唾液酸化变体, VHS- 变体, C 末端赖氨酸变体, 甲硫氨酸氧化变体, 无岩藻糖基化变体, G1 糖基化变体, G2 糖基化变体, 和非糖基化重链变体。

[0181] 例如, 组合物可包含酸性变体 (见 WO 2009/099829, Harris 等人), 其中组合物中的酸性变体可包括糖化变体, 脱酰胺变体, 二硫化物还原变体, 唾液酸化变体, 和不可还原变体中的一项, 两项, 三项, 四项, 或五项。优选, 组合物中所有酸性变体的总量为小于约 25%。在一个实施方案中, 糖化变体, 脱酰胺变体, 二硫化物还原变体, 唾液酸化变体, 和不可还原变体占组合物中的酸性变体的至少约 75-80%。

[0182] 可通过各种方法来评估酸性变体, 但优选的此类方法包括下述一项, 两项, 三项, 四项, 或五项: 离子交换层析 (IEC), 其中在 IEC (例如用于评估唾液酸化变体) 之前, 之后, 和 / 或期间用唾液酸酶处理组合物, 还原 CE-SDS (例如用于评估二硫化物还原变体), 非还原 CE-SDS (例如用于评估不可还原变体), 硼酸盐层析 (例如用于评估糖化变体), 和肽作图 (例如用于评估脱酰胺变体)。

[0183] 组合物任选包括氨基末端前导延伸变体。优选, 氨基末端前导延伸在抗体变体的轻链上 (例如在抗体变体的一条或两条轻链上)。本文中的抗体变体可在任一条或多条其重或轻链上包含氨基末端前导延伸。优选地, 氨基末端前导延伸在抗体的一条或两条轻链上。氨基末端前导延伸优选包含 VHS- 或由 VHS- 组成 (即 VHS- 变体)。可通过各种分析技术检测组合物中氨基末端前导延伸的存在, 包括但不限于 N 末端序列分析, 用于电荷异质

性的测定法（例如阳离子交换层析或毛细管区带电泳），质谱术，等。组合物中抗体变体的量通常范围为自构成用于检测变体的任何测定法（优选阳离子交换分析）的下检测限度的量至小于主要种类抗体的量的量。通常，组合物中约 20% 或更少（例如自约 1% 至约 15%，例如自 5% 至约 15%，和优选自约 8% 至约 12%）的抗体分子包含氨基末端前导延伸。优选使用阳离子交换分析测定此类百分比量。

[0184] 涵盖主要种类抗体和 / 或变体的别的氨基酸序列改变，包括但不限于在一条或全部两条其重链上包含 C 末端赖氨酸残基的抗体（此类抗体变体可以自约 1% 至约 20% 的量存在），具有一个或多个氧化的甲硫氨酸残基的抗体（例如包含氧化的 Met-254 的帕妥珠单抗），等。

[0185] 此外，除上文讨论的无岩藻糖基化变体和唾液酸化变体之外，主要种类抗体或变体可包含别的糖基化变异，其非限制性例子包括包含附着于其 Fc 区的 G1 或 G2 寡糖结构的抗体，包含一条或两条非糖基化重链的抗体，等。

[0186] III. 制造和分析方法

[0187] 依照本发明的一个实施方案，提供用于评估帕妥珠单抗组合物的方法，其包括下述一项，两项，三项，或四项：(1) 测量组合物中未配对半胱氨酸变体的量，其中未配对半胱氨酸变体在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸，和 / 或 (2) 测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量，和 / 或 (3) 测量组合物中帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS) 的量，和 / 或 (4) 测量组合物中帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS) 的量。任选地，对包含帕妥珠单抗及其变体的组合物实施所有四种分析性测定法。

[0188] 本发明还关注用于生成组合物的方法，其包括：(1) 生成包含帕妥珠单抗及一种或多种其变体的组合物，并 (2) 对如此生成的组合物进行一种或多种分析性测定法以评估本文中的变体的量。分析性测定法可评估及量化下述任一项或多项的量：(i) 在帕妥珠单抗的一个或全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的未配对半胱氨酸变体和 / 或 (ii) 在帕妥珠单抗的仅一个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的异二聚体变体和 / 或 (iii) 在帕妥珠单抗的全部两个可变轻域中包含 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的同二聚体变体和 / 或 (iv) 帕妥珠单抗的无岩藻糖基化变体和 / 或 (v) 帕妥珠单抗的高分子量种类 (HMWS) 和 / 或 (vi) 帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS)，和 / 或 (vii) 帕妥珠单抗的峰 1 片段和 / 或 (viii) 帕妥珠单抗的峰 2 片段。如此，可分析这些变体中的一种，两种，三种，四种，五种，六种，七种或八种。

[0189] 任选地，分析性测定法评估，量化，或分离未配对半胱氨酸变体，包括异二聚体和 / 或同二聚体变体。例如，分析性测定法可包括抗体片段（例如 Fab 片段）或完整抗体（见例如实施例 1）的疏水相互作用层析 (HIC)，肽作图分析（见例如实施例 3），或反相高效液相层析 (HPLC)（见例如实施例 3）。

[0190] 在一个实施方案中，组合物中未配对半胱氨酸变体（异二聚体和 / 或同二聚体变体）的量为 $\leq$ 约 25%，如通过 Fab 疏水相互作用层析 (HIC) 测定的。

[0191] 在一个实施方案中，组合物中同二聚体变体的量为 $\leq$ 4.9%，如通过完整抗体的疏水相互作用层析 (HIC) 测定的。

[0192] 在一个实施方案中，组合物中异二聚体变体的量为自约 13% 至约 18%，如通过完整抗体的疏水相互作用层析 (HIC) 测定的。

[0193] 任选地,分析性测定法评估,量化,或分离无岩藻糖基化变体。无岩藻糖基化的量可用于测定或量化组合物的生物学活性,例如 ADCC。

[0194] 另外,方法包括评估帕妥珠单抗组合物的生物学活性,其包括测量组合物中无岩藻糖基化帕妥珠单抗变体的量以测定组合物的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 活性,并确认无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量在自约 0.9% 至约 4.1% 的范围中。例如,方法包括使用毛细管电泳-激光诱导荧光 (CE-LIF) 测量无岩藻糖基化帕妥珠单抗的量。

[0195] 任选地,用于评估无岩藻糖基化的分析性测定法为毛细管电泳 (CE),包括毛细管电泳-激光诱导荧光 (CE-LIF),见下文实施例 2 和 4。无岩藻糖基化变体的量任选为组合物的自约 0.9 至约 4.1% (例如如通过实施例 4 中的 CE-LIF 测量的)。在一个实施方案中,无岩藻糖基化变体的量为大于组合物的 2% (例如如通过实施例 4 中的 CE-LIF 测量的)。

[0196] 任选地,分析性测定法评估,量化,或分离帕妥珠单抗的低分子量种类 (LMWS) 和 / 或高分子量种类 (HMWS)。例示性测定法包括 SE-HPLC 和 / 或 CE-SDS (见例如下文实施例 5)。

[0197] 在一个实施方案中,分析性测定法包括 SE-HPLC (例如实施例 5 中的),而且如此分析的组合物中主要种类帕妥珠单抗, HMWS 或 LMWS 的量测定为:

[0198] 主要峰: $\geq$ 约 96%, 例如 $\geq$ 约 96.7%, $\geq$ 约 97.3%, 例如 $\geq$ 约 97.4%。

[0199] HMWS: $\leq$ 约 2%, 例如 $\leq$ 约 1.7%, 例如 $\leq$ 约 1.5%, 例如 $\leq$ 约 1.4%, 例如 $\leq$ 约 0.8%。

[0200] LMWS: $\leq$ 约 2%, 例如 $\leq$ 约 1.6%, 例如 $\leq$ 约 1.2%, 例如 $\leq$ 约 0.6%。

[0201] 在一个实施方案中,分析性测定法包括 CE-SDS (例如实施例 5 中的),而且如此分析的组合物中主要种类帕妥珠单抗和 HMWS 或 LMWS 帕妥珠单抗的量测定为:

[0202] 主要峰: $\geq$ 约 95%, 例如 $\geq$ 约 96.0%, 例如 $\geq$ 约 97.8%。

[0203] HMWS: $\leq$ 约 1%, 例如 $\leq$ 约 0.6%。

[0204] LMWS: $\leq$ 约 4%, 例如 $\leq$ 约 3.4%。

[0205] 在一个实施方案中,通过 NR-CE-SDS 评估组合物,而且发现主峰或主要种类帕妥珠单抗 (排除 LMWS 和 HMWS) 的量为如此分析的组合物自约 95% 至约 99%, 例如自约 96.0% 至约 97.8%, 例如自约 95.3% 至约 97.3%。

[0206] 在一个实施方案中,通过 CE-SDS (见例如实施例 5) 评估组合物中“峰 6”的量,而且峰 6 LMWS 的量测定为如此分析的组合物约 0.9% 至约 2.3%, 例如约 2% 至约 2.3%。

[0207] 在一个实施方案中,通过 R-CE-SDS (见例如实施例 5 和 6) 评估组合物中峰 1 和 / 或峰 2 的量,而且峰 1 的量测定为 $\leq$ 5% (例如自 0.13% 至 0.41% CPA) 而且峰 2 的量测定为 $\leq$ 1.0% (例如自 0.47% 至 0.74% CPA)。

[0208] 方法任选进一步包括将纯化的组合物与一种或多种药学可接受赋形剂组合以生成药物组合物。另外,药物组合物可放置入容器中,与包装插页 (例如印有指导其使用者使用药物组合物来治疗癌症的处方信息) 一起包装以生成制品。

[0209] IV. 药物组合物

[0210] 通过混合具有期望纯度的组合物与任选的药学可接受赋形剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 来制备包含帕妥珠单抗及其变体的药物组合物供贮藏,通常是冻干配制剂或水溶液的形式。还涵盖抗体晶体 (参见美国

专利申请 2002/0136719)。药学可接受赋形剂在采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括:缓冲剂,诸如乙酸组氨酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸,或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖,诸如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如 Zn-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚山梨酯(例如聚山梨酯 20 或 80), PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0211] 冻干抗体配制剂记载于每个专利 No. 6, 267, 958, 美国专利 No. 6, 685, 940 和美国专利 No. 6, 821, 515, 通过援引明确收入本文。一种例示性曲妥珠单抗药物组合物是无菌的, 白色至浅黄色的, 不含防腐剂的冻干粉, 用于静脉内 (IV) 施用, 包含 440mg 曲妥珠单抗, 400mg α , α -海藻糖二水合物, 9.9mg L-组氨酸-HCl, 6.4mg L-组氨酸, 和 1.8mg 聚山梨酯 20。20mL 含有 1.1% 苄醇作为防腐剂的注射用抑菌水 (BWFI) 的重建产生含有 21mg/mL 曲妥珠单抗, 处于 pH 大约 6.0 的多剂溶液。

[0212] 一种用于治疗用途的例示性帕妥珠单抗药物组合物在 20mM 乙酸组氨酸, 120mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨酯 20, pH 6.0 中包含 30mg/mL 帕妥珠单抗。一种备选帕妥珠单抗配制剂包含 25mg/mL 帕妥珠单抗, 10mM 组氨酸-HCl 缓冲剂, 240mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨酯 20, pH 6.0。

[0213] 要用于体内施用的药物组合物必须是无菌的。这通过穿过无菌滤膜过滤容易实现。

[0214] V. 治疗性应用和用途

[0215] 本文中的组合物可用于治疗癌症, 诸如 HER2 阳性乳腺癌, 例如转移性或局部复发性, 不可切除乳腺癌, 或从头 IV 期疾病, 如免疫组织化学 (IHC) 3+ 和/或荧光原位杂交 (FISH) 扩增比 ≥ 2.0 定义的。任选地, 群体中的患者尚未接受在先处理或已经在辅助疗法后复发, 基线时具有 $\geq 50\%$ 的左心室射血分数 (LVEF), 和/或具有 0 或 1 的东部合作肿瘤学小组性能状态 (Eastern Cooperative Oncology Group performance status) (ECOG PS)。

[0216] 在一个备选实施方案中, 组合物可用于治疗早期 HER2 阳性乳腺癌, 例如与曲妥珠单抗和化疗组合, 其中化疗包含基于蒽环类抗生素的化疗或基于卡铂的化疗。在一个实施方案中, 化疗包含基于蒽环类抗生素的化疗, 例如包含 5-FU, 表柔比星, 和环磷酰胺 (FEC)。在一个备选实施方案中, 化疗包含基于卡铂的化疗, 例如包含紫杉烷(例如多西他赛), 卡铂加 HERCEPTIN®/曲妥珠单抗(例如 TCH 方案)。在一个实施方案中, 组合物与基于蒽环类抗生素的化疗或基于卡铂的化疗并行施用, 例如其中以 3 周周期施用帕妥珠单抗, 曲妥珠单抗和化疗, 在每个周期的第 1 天施用帕妥珠单抗, 曲妥珠单抗和化疗。本文中涵盖的早期 HER2 阳性乳腺癌疗法包括新辅助和辅助疗法。

[0217] 在还有另一个实施方案中, 组合物可用于治疗 HER2 阳性胃癌, 任选与曲妥珠单抗和化疗, 诸如铂(例如顺铂)和/或氟嘧啶(例如卡培他滨和/或 5-氟尿嘧啶 (5-FU)) 组合。

[0218] 在备选实施方案中, 组合物可用于治疗 HER2 阳性乳腺癌, 任选与曲妥珠单抗和长春瑞滨组合。依照这个实施方案的乳腺癌任选为转移性的或局部晚期的。任选地, 患者先

前没有在转移性设定中接受系统性非激素抗癌疗法。

[0219] 在另一个方面,组合物用于治疗患者中的 HER2 阳性乳腺癌,包括对患者施用组合物,曲妥珠单抗,和芳香酶抑制剂(例如阿那曲唑或来曲唑)。依照这个实施方案,乳腺癌为晚期乳腺癌,包括激素受体阳性乳腺癌,诸如雌激素受体(ER)阳性和/或孕酮受体(PgR)阳性乳腺癌。任选地,患者先前没有在转移性设定中接受系统性非激素抗癌疗法。这种治疗方法任选进一步包括对患者施用诱导化疗(例如包含紫杉烷)。

[0220] 在另一个方面,组合物用于治疗低 HER3 癌症,诸如卵巢癌,原发性腹膜癌,或输卵管癌。参见例如美国专利 7,981,418(Amler 等人)和美国专利公开文本 US-2006-0013819-A1(Kelsey, S.)。

[0221] 依照已知方法对人患者施用抗体和化疗治疗。本文中的实施例中描述具体施用时间表和配制剂。

[0222] 依照本发明的一个特定实施方案,施用大约 840mg(加载剂量)帕妥珠单抗,接着是一剂或多剂大约 420mg(维持剂量)帕妥珠单抗。优选约每 3 周施用维持剂量,总共至少 2 剂,直至临床进展性疾病,或不可管理的毒性,例如自 6 至 20 剂。还涵盖更长的治疗期,包括更多的治疗周期。

[0223] 依照癌症为胃癌的另一个特定实施方案,对于所有治疗周期以 840mg 的剂量施用帕妥珠单抗。

[0224] VI. 制品

[0225] 本文中的制品的一个实施方案包含装有本文中的组合物或药物组合物的容器,诸如管形瓶,注射器,或静脉内(IV)袋。任选地,制品进一步包含印有描绘如何依照本文中的先前部分使用组合物的处方信息的包装插页。

[0226] VII. 生物材料的保藏

[0227] 下述杂交瘤细胞系已经保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA)(ATCC):

[0228]	抗体名称	ATCC No.	保藏日期
[0229]	4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日
[0230]	2C4	ATCC HB-12697	1999 年 4 月 8 日

[0231] 通过下述非限制性实施例例示本发明的更多详情。通过援引明确将说明书中的所有引文的公开内容收入本文中。

[0232] 实施例 1:帕妥珠单抗的 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸变体及其表征

[0233] 帕妥珠单抗是一种基于人 IgG1(κ)框架的人源化单克隆抗体(单抗)。该重组抗体是由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞生成的,而且包含具有链间和链内二硫键的两条重链(每条 449 个氨基酸残基)和两条轻链(每条 214 个氨基酸残基)。图 3A 和 3B 中分别显示帕妥珠单抗的轻链和重链序列。完整帕妥珠单抗的计算分子量为 145,197Da(仅肽链,不含重链 C 末端赖氨酸残基)。

[0234] 每条重链的 CH2 域还具有一个在 Asn299 处的保守糖基化位点。

[0235] 帕妥珠单抗与曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)的不同在于轻链(12 处氨基酸差异)和重链(29 处氨基酸差异)的互补决定区(CDR),和它结合人表皮生长因子受体

2(p185^{HER2})上的不同表位的事实。帕妥珠单抗对人上皮细胞上的HER2受体的结合阻止HER2与HER受体家族的其它成员(包括EGFR, HER3, HER4)形成复合物和形成HER2同二聚体。通过阻断复合物形成,帕妥珠单抗抑制配体启动的细胞内信号传导,其经由两种主要信号途径,丝裂原活化的蛋白质(MAP)激酶和磷酸肌醇3激酶(PI3K),分别导致对细胞增殖和存活的抑制。

[0236] 这个实施例关注帕妥珠单抗的一种未配对半胱氨酸变体的鉴定和表征:在抗体的一条或全部两条轻链中包含未配对半胱氨酸的Cys23/Cys88未配对半胱氨酸变体。

[0237] 使用Ellman氏试剂测量游离氢硫基,显示0.1-0.3摩尔每摩尔蛋白质的反应性游离氢硫基含量。疏水相互作用层析(HIC)分析和肽图分析揭示一条或全部两条轻链上的Cys23和Cys88处的未配对半胱氨酸残基。使用木瓜蛋白酶HIC,发现在使用商业制造工艺生成的帕妥珠单抗材料中含有这些位点处的游离氢硫基的Fab变体的水平为12.7%-13.5%。完整抗体的HIC分析指示两种主要形式为78%-85%野生型帕妥珠单抗和13.4%-18.4%帕妥珠单抗异二聚体(一个臂上的未配对半胱氨酸对)。

[0238] 材料和方法

[0239] 测试的组合物:这个实施例描述当前的帕妥珠单抗参照标准批次anti2C4907-2和运行1(代表III期临床材料)和五个III期/商业性批次(运行3-7)的表征,均是与以12,000升(L)规模使用商业性工艺生成的。还进行与先前的参照标准批次anti2C4-900-1(它是I/II期临床材料的代表)的比较。

[0240] 测试的组合物为在20mM乙酸L-组氨酸,120mM蔗糖,和0.02%(w/v)聚山梨酯20, pH 6.0中以30mg/mL在商业配制剂中配制的原料药(drug substance)批次。早先在10mM盐酸L-组氨酸,240mM蔗糖,和0.02%(w/v)聚山梨酯20, pH 6.0中以25mg/mL在临床开发中配制批次anti2C4-900-1。

[0241] 通过非还原肽图分析和质谱术进行的二硫键分析:为了在非还原条件下使帕妥珠单抗变性并烷基化任何埋藏的游离氢硫基基团,配制缓冲液中的大约0.5mg帕妥珠单抗与变性缓冲液(有8M GdHCl, 10mM N-乙基马来酰亚胺(NEM), 0.1M乙酸钠, pH 5.0组成)混合,然后于37°C温育3小时。使用NAP-5柱将溶液缓冲液交换入600 μL 0.1M Tris, 1mM CaCl₂, pH 7.0中。将乙腈(ACN)添加至每份样品以实现10%的浓度。以1:10(w/w)的酶对底物比于37°C进行胰蛋白酶消化16小时。使用下文为亚硫酸盐解胰蛋白酶图描述的方法通过RP-HPLC将所得肽分开。

[0242] 亚硫酸盐解胰蛋白酶肽图:为了生成帕妥珠单抗肽图,还原和亚硫酸盐解半胱氨酸残基后用胰蛋白酶消化该蛋白质。将帕妥珠单抗的等分试样(1mg)添加至360mM Tris HCl pH 8.6, 6M盐酸胍(GdHCl), 2mM乙二胺四乙酸(EDTA), 13mM亚硫酸钠, 和38mM连四硫酸钠以还原和亚硫酸盐解半胱氨酸残基。将样品于37°C温育20分钟。将亚硫酸盐解样品加载到PD-10柱上,并用10mM Tris, 0.1mM CaCl₂, pH 8.3洗脱。缓冲液交换后,添加20 μL 10%辛基-B-葡萄糖苷溶液和20 μL 1mg/mL胰蛋白酶。将样品于37°C温育5小时。用25 μL 10%三氟乙酸(TFA)淬灭消化反应。使用Zorbax 300SB C8柱(4.6mm x 150mm)通过RP-HPLC将所得肽分开。于初始条件保持5分钟后,用线性梯度57分钟中自0%至17%溶剂B,于149分钟至32%溶剂B,于162分钟至45%溶剂B,并于173分钟至95%溶剂B将肽分开。在179分钟时,于100%溶剂A将柱再条件化25分钟,总运行时间204分钟。溶

剂 A 由水中的 0.1% TFA 组成,而溶剂 B 由乙腈中的 0.08% TFA 组成。将柱维持于 37°C,并以流速 0.5mL/min 洗脱。于 214nm 和 280nm 监测洗脱概况。使用 LTQ ORBITRAP™ 质谱仪通过分开的消化物混合物的液体层析质谱 (LC-MS) 分析测定胰蛋白酶肽的质量。

[0243] 通过 Ellman 氏分析的游离氢硫基含量:将帕妥珠单抗样品缓冲液交换入反应缓冲液 (100mM 磷酸钾, 1mM EDTA, 8M 脲, pH 8) 中,并调节至导致标准曲线范围内的游离硫醇浓度的浓度。在反应缓冲液中制备二硫代硝基苯 (DTNB) 的溶液 (10mM) 和半胱氨酸标准曲线 (0 和 100 μ M 之间的八个点)。在 96 孔板上,将 165 μ L 样品或标准品添加至一式三份孔。通过添加 10 μ L DTNB,然后温育 30 分钟来启动反应。温育后,使用 SPECTRAMAX M²® 读板仪于 412nm 测量吸光度。使用自标准曲线获得的线性方程计算游离硫醇的浓度。使用自分光光度计获得的于 280nm 的吸光度测定蛋白质的浓度。以摩尔游离硫醇每摩尔帕妥珠单抗报告游离硫醇。

[0244] 木瓜蛋白酶 HIC:对于木瓜蛋白酶消化的帕妥珠单抗样品,用羧肽酶 B (CpB) 去除 C 末端赖氨酸后用木瓜蛋白酶消化样品。使用 PolyPropyl Aspartamide 柱 (4.6mm x 100mm, 1500 Å, 3 μ m) 通过 HIC 将 Fab 和 Fc 域分开。溶剂 A 由 1.6M 硫酸铵, 20mM 磷酸钾, pH 6.05 组成,而溶剂 B 由 20mM 磷酸钾, pH 6.05 组成。用梯度自 3 至 6 分钟自 0% 至 18% 溶剂 B, 于 21 分钟至 24% 溶剂 B 将分析物分开。将柱维持于 25°C,流速 0.8mL/min。于 280nm 监测洗脱概况。

[0245] 完整抗体的 HIC:使用 PolyPropyl Aspartamide 柱 (9.4mm x 100mm, 1500 Å, 3 μ m) 通过 HIC 将完整帕妥珠单抗样品分开。溶剂 A 由 1.0M 硫酸铵, 20mM 磷酸钾, pH 6.05 组成,而溶剂 B 由 20mM 磷酸钾, pH 6.05 组成。用 12% 溶剂 B 等度 25 分钟将分析物分开。将柱维持于 30°C,流速 2mL/min。于 280nm 监测洗脱概况。

[0246] SDS-PAGE 及肽质量指纹:通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析还原和非还原帕妥珠单抗样品二者。通过在 SDS-PAGE 样品缓冲液存在下于 60 $\pm$ 2°C 加热 5-10 分钟使样品 (5 μ g) 变性,非还原样品有碘乙酰胺。在 80mM 二硫苏糖醇 (DTT) 存在下于 60°C $\pm$ 2°C 使样品还原 15-20 分钟。在 4% -20% 聚丙烯酰胺梯度凝胶中将变性样品分开,并用 SYPRO™ Ruby 染料染色以获得蛋白质条带样式。与帕妥珠单抗样品一起,凝胶上包括分子量标准品和 SYPRO™ Ruby 染料灵敏度标准品 (2ng/道和 8ng/道牛血清清蛋白 (BSA))。

[0247] 肽质量指纹是一种用于蛋白质鉴定的分析技术。对凝胶加载 10 μ g 商业性参照标准批次 anti2C4907-2 和运行 5。将通过 SDS-PAGE 分开的所有条带通过胰蛋白酶切割成肽。用 BRUKER™ 基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱术 (MALDI-TOF MS) 精确测量各肽的绝对质量。使用肽质量列表通过搜索蛋白质序列来鉴定蛋白质。通过肽质量指纹鉴定非还原和还原帕妥珠单抗二者中所有观察到的条带。

[0248] 通过生物测定法的效力:帕妥珠单抗效力方法通过测量帕妥珠单抗抑制人 HER2 表达性乳腺癌细胞系增殖的能力来评估它的效力。在一种典型测定法中,对 96 孔微量滴定板接种乳腺癌细胞并在增湿温箱中温育。温育后,去除培养基,并将不同浓度的帕妥珠单抗参照标准,测定法对照,和样品添加至板。然后将板温育,并使用氧化还原染料 ALAMARBLUE® 间接量化可存活细胞的相对数目。使用 530nm 的激发和 590nm 的发射测量荧光。ALAMARBLUE® 在它的氧化状态是蓝色的且不发荧光,但是被细胞的细胞

内环境还原成高度发荧光的粉色形式 (Page 等人, Int. J. Oncol. 3 :473-476 (1993))。颜色和荧光的变化与可存活细胞的数目成正比。将以相对荧光单位 (RFU) 表述的结果针对帕妥珠单抗浓度作图, 并使用平行线程序来评估帕妥珠单抗样品相对于参照标准的抗增殖活性。

[0249] 结果

[0250] 二硫键的指派: 帕妥珠单抗中有 32 个半胱氨酸, 形成 16 个二硫键, 其中 4 个是链间, 12 个是链内连接。然而, 由于该分子的多聚体性质, 只有 9 个独特二硫键。用胰蛋白酶消化天然蛋白质以实现所有二硫化物连接肽的释放。图 7 中显示各帕妥珠单抗批次的层析概况。商业性参照标准批次 anti2C4907-2 的消化物的反相 LC-MS 分析产生所有预期二硫化物连接肽对 (表 2)。

[0251] 表 2: 通过 LC-MS 鉴定的二硫化物连接的肽对

[0252]

预期 ^a	二硫化物连接	发现	预期质量 (Da) ^b	观察质量 (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 Cys231=Cys231 ^c	T19H=T19H	5455.78	5455.79
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-T20L ^d	1261.49	1261.49
T2L=T7L	Cys23=Cys88	T2L=T7L	5393.48	5393.48
T11L=T18L	Cys134=Cys194	T11L=T18L	3556.75	3556.75

[0253] 注意: 等号 (=) 代表二硫键。

[0254] H = 重链; L = 轻链; LC-MS = 高效液体层析质谱术; T = 胰蛋白酶肽。

[0255] ^a见图 9 和 10。

[0256] ^b单同位素质量 (MH⁺)。

[0257] ^c推断二硫化物。T19H 二聚体指派不包括 Cys228 = Cys228 和 Cys231 = Cys231 二硫化物的验证。

[0258] ^d这种二硫化物连接对的存在已经经由使用不切割 T19L 和 T20L 的备选酶 Lys-C 得到确认。

[0259] 通过鉴定来自二硫化物还原后肽对的预期肽进一步确认鉴定的肽 (图 8 及图 9 和 10 中的扩展视图)。重链肽 T19H 的二聚体 (T19H = T19H) 鉴定为含有两个二硫键; 推断

出 Cys228 = Cys228 和 Cys231 = Cys231 对的鉴定。通过 LC-MS 检测到一个二硫化物对, T18H = T20L, 但是接近空隙体积洗脱, 而且在紫外线 (UV) 层析图上不能作为独特峰鉴定。这个二硫化物对的存在得到 Lys-C 消化物的 LC-MS 分析的进一步确认, 其中观察到肽 T18H = T19L-T20L。没有找到意料之外的连接。一个二硫键是部分未配对的, 如下文讨论的。

[0260] 游离氢硫基分析: 正确折叠的帕妥珠单抗中的所有半胱氨酸残基应当参与二硫键。使用 Ellman 氏测定法 (Ellman, G., Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77 (1959)) (一种用于测量肽和蛋白质的游离氢硫基含量的方法) 来测定帕妥珠单抗中是否存在反应性未修饰 (游离) 硫醇。对所有材料评估游离硫醇 (未配对半胱氨酸残基) 含量, 表 3 中汇总结果。

[0261] 表 3: 游离硫醇含量, 通过 Ellman 氏测定法

[0262]

批次名称	摩尔游离硫醇每摩尔帕妥珠单抗
anti2C4-900-1	0.06
anti2C4907-2	0.15
运行 1	0.28
运行 3	0.16
运行 4	0.17
运行 5	0.16
运行 6	0.16
运行 7	0.14

[0263] 注意: 在 8M 脲存在下通过 Ellman 氏测定法测定游离硫醇水平。

[0264] 在分析的所有批次中均观察到大约 0.1-0.3 摩尔游离硫醇每摩尔帕妥珠单抗。在 8M 脲缺失下, 在测试的所有材料中游离硫醇水平低于量化限度 (QL; 大约 0.1 摩尔游离硫醇每摩尔蛋白质), 指示在非变性条件下帕妥珠单抗分子中存在的游离硫醇 (即未配对半胱氨酸) 是埋藏的, Ellman 氏试剂不可及的。

[0265] CpB 和木瓜蛋白酶消化后通过 HIC 的帕妥珠单抗材料的分析揭示 Fc 和 Fab 峰之间一个另外峰, 其鉴定为含有 Cys23 和 Cys88 处的未配对半胱氨酸残基的 Fab 变体 (图 11 和 12, 标记为游离硫醇 Fab)。此鉴定通过 LC-MS 胰蛋白酶肽作图得到确认, 其中在 NEM 存在下对样品进行变性, 之后进行还原和胰蛋白酶消化。在各帕妥珠单抗批次间测量使用木瓜蛋白酶 HIC 方法的游离硫醇 Fab 变体的程度, 发现与使用当前的工艺是一致的 (表 4)。

[0266] 表 4: Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸 Fab 变体的相对量, 如通过木瓜蛋白酶 HIC 测定或计算完整抗体变体

[0267]

批次名称	百分比 未配对半胱氨酸Fab变体	百分比 完整抗体变体*
anti2C4-900-1	9.4	17.9
anti2C4907-2	12.7	23.8
运行1	13.2	24.6
运行3	13.3	24.9
运行4	13.5	25.2
运行5	13.3	24.9
运行6	12.9	24.2
运行7	13.2	24.6

[0268] 注意：通过未配对半胱氨酸 Fab 峰面积除以未配对半胱氨酸 Fab+Fab 的峰面积获得百分比未配对半胱氨酸 Fab 峰。

[0269] *如下文所述计算。

[0270] 通过木瓜蛋白酶 HIC 测定法,使用商业性工艺生成的材料的值范围为自 12.7%至 13.5%,而参照标准批次 2C4-900-1(I/II 期)的值略微较低,为 9.4%。

[0271] 来自木瓜蛋白酶 HIC 的 % Fab 变体转换成估算 %完整抗体变体:含有未配对半胱氨酸的 Fab 片段的相对量可用于计算异二聚体或同二聚体形式的未配对半胱氨酸变体的相对分布。如果木瓜蛋白酶 HIC 测定法显示 10% (或 x%) 来自帕妥珠单抗的 Fab 片段含有 Cys23/Cys88 处的未配对半胱氨酸,那么应当自每 50 个帕妥珠单抗分子释放 10 个含有未配对半胱氨酸的 Fab 片段,因为木瓜蛋白酶消化 50 个抗体应当产生 100 个 Fab 片段。假设这 10 个 Fab 片段来自 10 个不同帕妥珠单抗分子,那么含有一个具有 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的 Fab 的帕妥珠单抗的相对量为大约 20%,即 50 个帕妥珠单抗分子中的 10 个 (或 2x%)。更精确地,如果考虑具有两个含有 Cys23/Cys88 未配对半胱氨酸的 Fab 的帕妥珠单抗的可能性,那么帕妥珠单抗异二聚体未配对半胱氨酸变体的相对量应当为 $2 \times 10\% \times 90\% = 18\%$ (或 $2 \times x\% \times [100-x]\%$)。另外,同二聚体未配对半胱氨酸变体帕妥珠单抗的相对量应当处于 $10\% \times 10\% = 1\%$ (或 $x\% \times x\%$)。在这种情况下,含有 2 个任一 Fab 上没有未配对半胱氨酸的 Fab 的帕妥珠单抗的相对量应当处于 $90\% \times 90\% = 81\%$ (或 $[100-x]\% \times [100-x]\%$)。

[0272] 另外,可通过 HIC 直接量化野生型同二聚体 (无未配对半胱氨酸) 和异二聚体 (一个 Fab 上有未配对半胱氨酸)。完整抗体的 HIC 将帕妥珠单抗分开成两个主峰 (图 13),它们通过 LC-MS 胰蛋白酶肽作图鉴定为野生型同二聚体 (无游离硫醇) 和异二聚体 (一个 Fab 上有游离硫醇对)。还收集次要前肩峰,并通过木瓜蛋白酶 HIC 表征为主要是同二聚体 (全部两个 Fab 上的游离硫醇对,大约 40%) 和具有 Fc 氧化的帕妥珠单抗。使用完整抗体的 HIC,对于使用当前工艺生成的材料,帕妥珠单抗估算含有大约 17% -18% 异二聚体,而使用 I/II 期工艺的为 13% (表 5)。不受任一理论束缚,有可能的是通过商业性工艺生成的未配对半胱氨酸变体的量升高 (相对于 I/II 期工艺) 可源自蛋白质 (即 VL 域) 折叠速

率比硫醇氧化（二硫化物形成）速率更快发生，如此在变体中诱捕游离半胱氨酸。

[0273] 表 5：完整未配对半胱氨酸变体的相对量，如通过完整帕妥珠单抗的 HIC 测定的。

[0274]

批次名称	峰		
	野生型 同二聚体 (%)	未配对半胱氨酸 异二聚体 (%)	部分富集的未配对 半胱氨酸同二聚体 (%)
anti2C4-900-1	84.7	13.4	1.9
anti2C4907-2	78.9	18.2	2.9
运行1	78.4	18.4	3.2
运行3	79.1	17.6	3.2
运行4	79.3	17.3	3.4
运行5	79.1	17.4	3.5
运行6	79.7	17.2	3.1
运行7	79.3	17.3	3.4

[0275] 注意：通过各个峰面积除以所有三个峰的总峰面积获得百分比相对峰。

[0276] 既然通过 HIC 观察到帕妥珠单抗的轻链上的 Cys23/Cys88 处的一对未配对半胱氨酸，那么在抗增殖测定法测试未配对半胱氨酸变体每种的纯化级分。纯化含有未配对半胱氨酸的 Fab，并估算具有降低的效力（估算效力为相对于天然 Fab 的～50%）（表 6）。

[0277] 表 6：未配对半胱氨酸 Fab 变体的抗增殖

[0278]

帕妥珠单抗样品和条件	均值%活性 (n = 2)	%差异
天然 Fab	100	N/A
未配对半胱氨酸 - Fab	50 ^a	67

[0279] 注意：相对于天然 Fab 报告百分比活性。

[0280] ^a估算效力值。剂量响应曲线是不平行的，而且较低的平台没有会聚。

[0281] 另外，通过 HIC 分离出三种完整形式（野生型同二聚体，含有游离硫醇的异二聚体，和含有未配对半胱氨酸的同二聚体）并用抗增殖效力测定法测试。见表 7。

[0282] 表 7：全长帕妥珠单抗未配对半胱氨酸变体级分的抗增殖活性

[0283]

帕妥珠单抗样品和条件	抗增殖	
	均值%活性 (n = 3)	CV (%)
起始材料	110	11
异二聚体	112	7
野生型同二聚体	104	15
含有未配对半胱氨酸的同二聚体 ^a	90	15

[0284] 注意：相对于帕妥珠单抗参照标准（批次 anti2C4907-2）报告百分比活性。

[0285] ^a该级分含有大约 40% 含有未配对半胱氨酸的同二聚体和 60% 异二聚体或野生型同二聚体混合物。

[0286] 这些数据证明以商业性规模制造的组合物中存在帕妥珠单抗的一种未配对半胱氨酸变体。这个实施例中的 HIC 方法（评估 Fab 片段或完整抗体）或下文实施例 3 中的肽作图是可用于评估帕妥珠单抗组合物中未配对半胱氨酸变体的存在和数量的测定法。

[0287] 实施例 2：无岩藻糖基化帕妥珠单抗组合物及其表征

[0288] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 是细胞介导的免疫的一个方面，效应器细胞通过它积极裂解已经结合抗原特异性抗体的靶细胞。帕妥珠单抗在用 HER23+ 细胞测试时展现 ADCC 活性，但是用 HER21+ 细胞观察到很少的活性（图 14）。

[0289] 使用毛细管电泳测量帕妥珠单抗 I 期和 III 期参照标准中无岩藻糖基化的水平。与具有较低 G0-F (0.8%) 的 I 期参照标准相比，帕妥珠单抗 III 期参照标准中较高水平的无岩藻糖基化材料 (G0-F = 2.2%) 与观察到的较高的 ADCC 活性相关（图 15）。还制备并测试一种酶促脱糖基化帕妥珠单抗，显示无对 Fc γ RIIIa 的结合和无 ADCC 活性（表 8）。

[0290] 表 8：脱糖基化帕妥珠单抗的生物学活性

[0291]

帕妥珠单抗 样品和条件	均值%活性 (n = 3)				
	抗增殖	HER2结合	Fc γ RIIIa结合	ADCC	FcRn结合
对照	90	105	106	101	85
脱糖基化	87	94	无活性	无活性	72

[0292] 注意：相对于帕妥珠单抗参照标准（批次 anti2C4907-2）报告百分比活性。

[0293] ADCC = 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0294] 这些数据显示测量 G0-F（无岩藻糖基化）帕妥珠单抗是一种用于量化帕妥珠单抗的 ADCC 活性的有效手段。量化无岩藻糖基化的实验如下。

[0295] 通过毛细管电泳 (CE) 进行的寡糖分析：使用蛋白 A 固相提取亲和尖 (PHYTIPS™) 和一种自动化液体操作系统纯化帕妥珠单抗样品 (250–500 μ g)。使用 12mM 盐酸, pH 2.0 自蛋白 A 树脂洗脱帕妥珠单抗样品，并使用 10 μ L 50mM 琥珀酸钠中和。将所得样品与 2.5U/mL PNGase F 一起于 37°C 温育 15 小时。通过将溶液于 95°C 加热 5 分钟来沉淀蛋白质，并通过离心去除。将含有释放的寡糖的上清液溶液真空干燥。将释放的聚糖用含有氰基硼氢

钠的 15% 乙酸溶液中的 8-氨基苄-1, 2, 6-三磺酸 (APTS) 于 55℃ 衍生化 2 小时。使用氩离子激光 (488nm 激发, 520nm 发射) 和 N-CHO 包被的毛细管 (50 μ m $\times$ 50cm), 用配备有荧光检测模块的毛细管电泳 (CE) 系统实施对衍生化的聚糖的分析。运行缓冲液为 40mM ϵ -氨基-n-己酸 / 乙酸, pH 4.5, 0.2% 羟丙基甲基纤维素 (HPMC)。通过 0.5psi 的压力将样品注入毛细管中。于 20kV 实施分开, 并将毛细管温度维持于 20℃。

[0296] 帕妥珠单抗在该分子的 Fc 部分的 CH2 域中在 Asn299 处含有 N-连接的寡糖位点。用 PNGase F 处理并用 APTS 标记后, 使用 CE 对每个批次测定在这个位点处发现的中性寡糖的相对分布。

[0297] 图 16 中显示来自释放的, 衍生化的寡糖的 CE 分析的电泳图, 图 17 中是扩展视图概况。表 9 中对分析的材料汇总帕妥珠单抗中寡糖的相对量。

[0298] 表 9: 帕妥珠单抗中寡糖结构的分布 (百分比峰面积)

[0299]

批次名称	G0-F	G0-GlcNAc	Man5	G0	G1 ^a	G2
anti2C4-900-1	0.8	2.7	1.2	72.1	20.4	2.0
anti2C4907-2	2.2	0.8	0.3	63.6	27.6	3.0
运行 1	2.5	1.6	0.2	62.4	29.1	3.4
运行 3	1.7	1.2	0.3	70.3	23.4	2.2
运行 4	1.8	1.8	0.3	75.4	18.3	1.4
运行 5	1.4	1.0	0.4	71.8	22.4	2.1
运行 6	1.1	1.0	0.2	73.3	21.3	1.9
运行 7	1.2	0.8	0.2	69.7	24.5	2.5

[0300] 注意: 由于舍入, 加起来的总 % 可能不是正好 100%。另外, 总百分比峰面积中可能已经包括次要种类 (<0.5%), 但是这个表中没有报告。

[0301] ^a两种 G1 异构体的和 (见图 17)。

[0302] 具有 G0 结构的寡糖是所有材料中占优势的种类 (62% -75%)。与当前的参照标准批次 anti2C4907-2 和运行 1 (62% -64%) 相比, G0 糖型在运行 3-7 和先前的参照标准批次 2C4-900-1 中略微更加丰富 (70% -75%)。作为两个峰观察到 G1 糖型, 对应于末端半乳糖在双触角结构的任一支上的两种异构体。组合这两个峰的面积以确定 G1 糖型的相对量。对于所有材料, G1 和 G2 糖型分别占释放的寡糖的大约 18% -29% 和 1% -3%。在电泳图中还观察到自其它寡糖结构产生的峰 (均以 3% 或更少存在)。这些结构包括 G0-F (缺乏核心岩藻糖的 G0), G0-GlcNAc (缺乏一个 GlcNAc 的 G0), Man5, 和其它次要糖型 (Ma 和 Nashabeh, Anal. Chem. 71 :5185-92(1999))。帕妥珠单抗上的寡糖结构与在 CHO 衍生单抗 (Ma 和 Nashabeh, 同上) 和天然发生人免疫球蛋白 (Flynn 等人, Mol. Immunol. 47 :

2074-82(2010)) 中找到的那些一致。

[0303] 实施例 3 :用于评估未配对半胱氨酸变体的肽作图和 RP-HPLC

[0304] 材料 : 实验中使用的材料和装置包括 :3-[N- 吗啉代] 丙磺酸 (MOPS ; Sigma-Aldrich), N- 乙基马来酰亚胺 (d0-NEM ; Thermo Scientific, Rockford, IL), N- 乙基马来酰亚胺 (d5-NEM ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), L- 半胱氨酸 (Sigma-Aldrich), 胰蛋白酶 (Promega, Madison, WI), 三氟乙酸 (TFA ; Fisher, Fair Lawn, NJ), 乙腈 (ACN, Burdick&Jackson, Muskegon, MI)。不经进一步纯化,以收到的那样使用所有化学品和试剂。

[0305] 抗体的差异 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM) 标记 : 差异 NEM 标记方法容许抗体中早就存在的游离硫醇用 d0-NEM 标记且剩余二硫桥用 d5-NEM 还原和标记。对于初始 d0-NEM 标记, 将 100 μ L 抗体 (3mg/mL) 与 400 μ L 含有 6.25mM d0-NEM 的变性缓冲液 (7.5M GdnHCl, pH 5) 温和混合并于 37°C 温育 2 小时。将 20 μ L 半胱氨酸 (125mM) 添加至样品并于 37°C 温育 15 分钟以灭活剩余 d0-NEM。为了还原抗体中的剩余二硫桥, 将 10 μ L TCEP (0.5M) 添加至样品并于 37°C 温育 30 分钟。然后将 70 μ L d5-NEM (171mM) 添加至样品并于 37°C 温育 2 小时以标记通过还原二硫桥产生的游离硫醇。使用 NAP-5 柱对 0.5mL 差异 NEM 标记样品进行缓冲液交换, 并用 0.6mL MOPS 缓冲液 (20mM MOPS, 0.5mM TCEP, pH 7) 洗脱。

[0306] 抗体的肽图分析 : 将差异 NEM 标记样品用胰蛋白酶以 1:50 (w/w) 胰蛋白酶 : 抗体比于 37°C 消化 2 小时。用 10% TFA 淬灭消化。使用 Agilent 1200HPLC 系统 (Agilent, Palo Alto, CA) 将胰蛋白酶消化的差异 NEM 标记样品分开。采用 300 $\text{\AA}$ 孔径的 Jupiter C18 柱 (250x 2mm, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA) 进行样品的层析分开。注射体积为 95 μ L, 且柱温度为 55°C。流动相 A 为水中的 0.1% TFA 且流动相 B 为 90% ACN (v/v) 中的 0.08% TFA。初始条件设置于 100% 流动相 A 并保持样品注射后的头 3 分钟。流动相 B 在接下来的 20 分钟里提高至 10%, 然后进一步提高至 40% 直至 160 分钟和 100% 直至 162 分钟, 均在线性梯度上。流动相 B 保持于 100% 直至 170 分钟。将柱以 100% 流动相 A 再平衡直至 195 分钟。流速保持于 0.28mL/min。

[0307] 将来自 HPLC 的流出液直接连接至以阳离子模式运转的 LTQORBITRAP™ 质谱仪的电喷射离子化源。喷射电压为 4.5kV, 且毛细管温度为 300°C。以数据依赖性方式运转质谱仪, 从而在 MS 和 MS/MS 模式之间自动转换。在分辨率设置为 m/z 400 处 R = 60,000 的 FT-Orbitrap 中自 m/z 300 至 m/z 2000 获取调查全扫描 MS 谱。以 35% 的标准化碰撞能量及 30ms 的活化时间和 2.5m/z 单位的分离宽度使用碰撞诱导解离 (CID) 在线性离子阱中将五个最强的离子片段化。启用动态排除 (DE) 功能以减少数据冗余和容许选择低强度离子进行数据依赖性 MS/MS 扫描。动态排除参数如下 : 重复持续时间为 30 秒, 排除表大小为 500, 排除持续时间为 90 秒, 低排除质量宽度为 0.76, 高排除质量宽度为 1.56, 和重复计数为 2。使用 XCALIBUR™ 软件实施数据分析。

[0308] 使用上文所述方法分析当前的帕妥珠单抗参照标准批次 anti2C4907-2。发现 10.9% 的 T2L 肽 (通过胰蛋白酶消化生成且含有 Cys23) 和 8.3% 的 T7L 肽 s (通过胰蛋白酶消化生成且含有 Cys88) 标记有 d0-NEM。因为在这个实验中只有未配对半胱氨酸标记有 d0-NEM, 所以这些结果提示 anti2C4907-2 中大约 10% 的 Cys23 和 Cys88 不是通过二硫键连接的 (即 10% 未配对半胱氨酸变体)。使用一种与上文所述相似的计算方法将百分比未配

对半胱氨酸 Fab 变体转换成百分比未配对半胱氨酸完整变体,估算出 anti2C4907-2 中 18% 的帕妥珠单抗分子是异二聚体未配对半胱氨酸变体,1% 的帕妥珠单抗分子是同二聚体未配对半胱氨酸变体,而 81% 是野生型同二聚体形式(无未配对半胱氨酸)。这些结果与来自 Fab 片段或完整帕妥珠单抗任一的 HIC 分析的结果大体一致。

[0309] 有限内切蛋白酶 Lys-C 消化生成 Fab :经由有限 Lys-C 消化规程生成 MAbA 的 Fab 片段。简言之,将 MAb A(1mg/ml) 与 Lys-C 酶以 1:400 比在 100mM Tris, pH 7.6 中混合,然后将混合物于 37°C 温育 30 分钟。用 pH 5.5, 350mM 乙酸钠和 8M 盐酸胍中的 NEM 标记反应混合物。用下文所述 RP-HPLC 方法分析消化物。

[0310] RP-HPLC 条件 :在配备有二元梯度泵,自动取样器,温度控制柱隔室,和二极管阵列检测仪的 AGILENT 1200™ HPLC 系统 (Palo Alto, CA, USA) 上实施 RP-HPLC 分析。该系统包括以 75°C 和 1ml/min 运行的 Pursuit 3 联苯反相柱 (150x 4.6mm, 3 μm, Varian, Lake Forest, CA, USA)。使用 280nm 处的吸光度监测分开。流动相由水中的 0.1% TFA (流动相 A) 和 ACN 中的 0.09% TFA (流动相 B) 组成。38 分钟方法始于自 32% 至 36% 流动相 B 的 3 分钟梯度,接着是至 42% 流动相 B 的 18 分钟线性梯度。将柱以 95% 流动相 B 清洗 5 分钟并以 32% 流动相 B 平衡 10 分钟。

[0311] 通过有限 Lys-C 消化生成的游离硫醇 Fab 的 RP-HPLC 分析 (图 18) 指示游离硫醇 Fab 为 13% 左右,与实施例 1 中的 HIC 一致。NEM 标记的游离硫醇 Fab 变得更加疏水,因此与游离硫醇 Fab 相比更晚洗脱 (图 18) 且进一步确认游离硫醇的存在。还可见图 19,其中肽作图确认游离硫醇 Fab。

[0312] 实施例 4 :通过 CE-LIF 进行的无岩藻糖基化量化

[0313] 这个实施例描述经过完全验证的用于量化无岩藻糖基化帕妥珠单抗变体的毛细管电泳-激光诱导荧光 (CE-LIF) 测定法。对上文实施例 2 中公开的方法的修饰包括 :无机器人样品制备,无蛋白 A 纯化步骤 (确保样品间一致的蛋白质浓度),和电泳参数 (缓冲剂赋形剂浓度) 的变化。

[0314] 在该测定法中,将帕妥珠单抗样品使用配制缓冲液稀释至 10mg/mL,并缓冲液交换入肽-N-聚糖酶 F (PNGase F) 消化物缓冲液中。然后用 PNGase F 酶促释放天冬酰胺连接的寡糖。随后用 8-氨基苣 -1, 3, 6-三磺酸 (APTS) (一种带负电荷的荧光团) 衍生化释放的聚糖。APTS 给所有聚糖提供三个负电荷,这容许它们进行快速电泳分析。使用经过包被的毛细管 (这降低电渗流) 通过 CE 分析含有过量衍生化试剂和 APTS 聚糖缀合物的混合物。以激发波长 488nm 和发射带通滤光器 520nm 使用氩离子激光用激光诱导荧光系统监测分开。

[0315] 使用该测定法,图 21 中显示相关图 (correlation plot)。使用该相关图 ($\% ADCC = 30.133 + 12.439x$, 其中 $x = \% G0-F$) 和 ADCC 范围 40-135%,帕妥珠单抗的最终规格对应于 0.9-4.1% G0-F。

[0316] 如此,使用这种经过验证的 CE-LIF 测定法,有可能评估帕妥珠单抗组合物以确认就 ADCC 而言的生物学活性在期望范围内 (40-135% ADCC 活性 = 0.9-4.1% G0-F)。

[0317] 实施例 5 :帕妥珠单抗高分子量种类 (HMWS),低分子量种类 (LMWS) 及其表征

[0318] 通过 SE-HPLC 和 CE-SDS 分析帕妥珠单抗以测定高分子量种类 (HMWS) (通常是二聚体) 和低分子量种类 (LMWS) 的量。HMWS 在稀释后没有差异,提示聚集体是不可解离的。

分析性超速离心 (AUC) 和 SE-HPLC 结果之间就 HMWS 量化而言有较好的一致性,显示没有大小排阻层析遗漏或低估主要 HMWS 的证据。

[0319] 材料和方法

[0320] 测试的帕妥珠单抗组合物:这个实施例描述当前的帕妥珠单抗参照标准批次 anti2C4907-2 和运行 1(代表 III 期临床材料)和五个 III 期/商业性批次(运行 3-7)的表征,均是以 12,000 升 (L) 规模使用商业性工艺生成的。

[0321] 分离的 HMWS:为了制备代表性的 HMWS 用于生物学表征,将来自运行 3 的一个帕妥珠单抗批次注射到制备性 HPLC 系统上,其使用制备性 SE-HPLC 柱 (TSK G3000SW, 21.5mm x 600mm) 和 4.5mL/min 的与上文所述相同的等度流动相。对高分子量种类进行级分收集,随后缓冲液交换入配制缓冲液中。HMWS 通过随后的 SE-HPLC 分析显示是 70% 纯的,其余主要是主峰。还收集主峰,显示是 100% 纯的。

[0322] 分离的 LMWS:为了制备分离的 LMWS,如上,用木瓜蛋白酶消化来自运行 3 的一个批次号,并使用制备性 HPLC 进行级分收集。占优势的形式通过完整 ESI-MS 分析验证是 Fc 和 Fab。LMWS 通过随后的分析性 SE-HPLC 显示是 99% 纯的。还使用木瓜蛋白酶处理制备分离的 Fab 变体,并通过制备性 IE-HPLC 收集。Fab 变体通过随后的分析性 SE-HPLC 显示是 100% 纯的。

[0323] SE-HPLC:用流动相 (0.2M 磷酸钾, pH 6.2, 0.25M 氯化钠) 将帕妥珠单抗的等分试样稀释至 10mg/mL。在等度洗脱的 TSK G3000SWXL 柱 (7.8mm x 300mm) 上将样品分开。流速为 0.5mL/min,且柱温为环境温度。于 280nm 监测洗脱概况。为了通过多角度光散射 (MALS) 进行的检测,顺序使用与 WYATT DAWN HELEO™ MALS 检测仪 (使用 658nm 激光,17 台检测器) 和 WYATT OPTILAB™ Rex 折射率检测仪在线连接的两个柱将帕妥珠单抗样品分开。

[0324] CE-SDS:用 5-羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚氨基酯 (一种荧光染料) 衍生化每个帕妥珠单抗批次。使用 NAP-5 柱去除游离染料后,通过添加 40mM 碘乙酰胺并于 70℃ 加热 5 分钟来制备非还原样品。为了分析还原样品,将衍生化帕妥珠单抗与十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 1M DTT 混合至终浓度 1% SDS(v/v)。然后将样品于 70℃ 加热 20 分钟。在使用 50 μm 内径 x 31.2cm 熔融石英毛细管的 CE 系统上分析制备的样品,贯穿分析维持于 20℃。通过 10kV40 秒电动注射将样品导入毛细管中。以反极性 (阴性至阳性) 模式以恒定电压 15kV 进行分开,使用 CE-SDS 运行缓冲液作为筛分介质。使用于 488nm 运转的氩离子激光进行荧光激发,于 560nm 监测所得发射信号。

[0325] 结果和讨论

[0326] SE-HPLC 提供关于天然蛋白质的分子大小分布的定量信息。图 25 中显示各帕妥珠单抗批次的 SE-HPLC 概况,而图 26 中显示各概况的扩展视图。表 10 中列出大小排阻峰的相对峰面积分布。

[0327] 表 10:帕妥珠单抗的相对大小分布,通过大小排阻层析

[0328]

批次名称	峰		
	HMWS (%)	主峰 (%)	LMWS (%)
anti2C4-900-1	0.1	99.8	0.1
anti2C4907-2 ^a	0.2	99.8	0.0

[0329]

运行1	0.2	99.8	0.0
运行3	0.2	99.8	0.0
运行4	0.1	99.8	0.0
运行5	0.2	99.8	0.0
运行6	0.2	99.8	0.0
运行7	0.2	99.8	0.0

[0330] 注意：由于舍入，加起来的总百分比可能不是正好 100%。

[0331] HMWS = 高分子量种类；LMWS = 低分子量种类。

[0332] ^a自参照标准 anti2C4907-2 获得的值。

[0333] 对于所有材料，在主峰中洗脱的帕妥珠单抗的比例超过 99%。高分子量种类 (HMWS) 的量范围为自 0.1% 至 0.2%，而低分子量种类 (LMWS) 为 ≤ 0.1%。所有批次展示相似的层析概况。纯化的 HMWS 级分（包括二聚体和更高聚集体）显示具有相对于参照标准批次 anti2C4907-2 的 46% 效力。

[0334] 对保持于 30℃ 的未掺水和稀释的样品二者实施 SE-HPLC 以对帕妥珠单抗 HMWS 检查可能源自稀释和 / 或延长暴露于升高的室温的快和慢解离聚集体二者。在稀释和 / 或加热的参照标准批次 anti2C4907-2 中没有看到 HMWS 含量与对照相比的减少。

[0335] 对参照标准批次 anti2C4907-2 实施的 SE-HPLC 分开组合 MALS 确认 SE-HPLC 主峰是单体，分子量大约 150kDa。

[0336] 使用沉降速度模式中的 AUC 来表征帕妥珠单抗样品中存在的 HMWS。沉降速度是一种不依赖于大小排阻层析，在固体柱基质缺失下测量样品中 HMWS 的水平的技术。对具有渐增水平的 HMWS 的帕妥珠单抗样品实施 AUC 以确定 SE-HPLC 是否能够一致的检测所有主要帕妥珠单抗 HMWS，这通过将通过沉降速度测定的聚集体的水平和种类与通过 SE-HPLC 测定的那些比较来进行。通过沉降速度表征范围为自 0.2% 至 7.2% 总 HMWS（通过 SE-HPLC 测定）的五份样品，在表 11 和图 27 中标记为 A-E。

[0337] 这些样品由一份代表性帕妥珠单抗成品药批次（标记为 A）和四份 HMWS 富集的样品组成。选择 HMWS 富集的样品代表多种降解机制（暴露于光，暴露于酸性 pH，和纯化的 IE-HPLC 碱性变体）。

[0338] SE-HPLC 对样品 A, B, C 和 E 显示一个 HMWS 主峰，而对样品 D 显示两个 HMWS 峰（图 27）。对于样品 A, B, C 和 E，AUC 显示仅一个沉降系数为约 9.1S 的 HMWS 峰。在样品 D 中，AUC 显示两个沉降系数为约 9.1S 和 10.8S 的 HMWS 峰。通过 AUC 检测的 HMWS 与 SE-HPLC 结

果一致 ;两种方法均在样品 D 中显示一种主要降解产物,较小水平的更大 HMWS。

[0339] 表 11 中呈现这些样品来自两种方法的定量结果的比较。

[0340] 表 11 :AUC 和 SE-HPLC 结果的比较

[0341]

样品	% HMWS (总)	
	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

[0342] 注意 1 :样品 A 由一个代表性帕妥珠单抗成品药批次组成,样品 B 由以 1.2 毫勒克斯小时进行光暴露的一个帕妥珠单抗批次组成,样品 C 由以 3.6 毫勒克斯小时进行光暴露的一个帕妥珠单抗批次组成,样品 D 由于 pH 3.2 进行酸处理的一个帕妥珠单抗批次组成,而样品 E 由来自 IE-HPLC 的纯化的碱性变体组成。

[0343] 注意 2 :相应的 SE-HPLC 层析图见图 27。

[0344] AUC = 分析性超速离心 ;HMWS = 高分子量种类 ;RSD = 相对标准偏差 ;SE-HPLC = 大小排阻高效液体层析。

[0345] ^a样品 A 和 B 具有低于 AUC 技术的量化限度的 HMWS 水平。

[0346] 对于样品 C, D, 和 E,通过两种技术测量的百分比 HMWS 有较好的一致性。样品 A 和 B 中存在的低水平的 HMWS 阻止通过具有 3.7% 的估算量化限度的 AUC(Gabrielson 和 Arthur,Methods 54 :83-91(2011)) 对该种类的精确量化。SE-HPLC 和 AUC 之间百分比 HMWS 的表观分歧反映这一点 (表 11)。在一系列 HMWS 水平之间评估相关性。相关系数 (Lin,L., Biometrics 45 :255-68(1989)) 计算为 0.97 (n = 5),指示 AUC 和 SE-HPLC 之间对于 HMWS 量化较好的一致性 (图 28)。

[0347] 这些结果确认 SE-HPLC 在对帕妥珠单抗测量 HMWS 方面是稳健的。

[0348] SE-HPLC 能够检测和通过 AUC 精确量化观察到的所有 HMWS 种类。

[0349] 通过 SE-HPLC, SDS-PAGE, 和 CE-SDS 分析的基于大小的异质性在各批次间是一致的。SE-HPLC 测定法对测试的所有批次显示相似水平的 HMWS(0.1% -0.2%) 和 LMWS(0.0% -0.1%)。通过 SDS-PAGE 分析对还原和非还原样品产生的条带样式是一致的,就像通过 CE-SDS 生成的电泳概况。

[0350] 在一个实施方案中,通过 SE-HPLC 评估的主要种类帕妥珠单抗和 HMWS 变体和 LMWS 变体的量如下 :

[0351] ≥ 96% 主峰,例如 ≥ 96.7% 主峰,例如 ≥ 97.3% 主峰,例如 ≥ 97.4% 主峰。

[0352] ≤ 2% HMWS,例如 ≤ 1.7% HMWS,例如 ≤ 1.5% HMWS,例如 ≤ 1.4% HMWS,例如 ≤ 0.8% HMWS。

[0353] ≤ 2% LMWS,例如 ≤ 1.6% LMWS,例如 ≤ 1.2% LMWS,例如 ≤ 0.6% LMWS。

[0354] 通过 SE-HPLC 纯化的帕妥珠单抗 HMWS 和 LMWS 级分均展现与主峰和有完全效力的对照相比降低的抗增殖活性。除显示更低 FcRn 结合的 LMWS 外,所有大小变体显示与对照相比相当的 HER2 结合活性和 FcRn 结合活性。

[0355] 既然 LMWS 样品含有 2/3Fab 片段和 1/3Fc 片段,那么预期较低的抗增殖和 FcRn 结合活性。HMWS 显示较高的 Fc γ RIIIa(CD16)V158 结合活性,但是较低的 ADCC 活性。LMWS 显示较低的 Fc γ RIIIa(CD16)V158 结合活性,而且对这种变体没有观察到 ADCC 活性(表 12)。

[0356] 表 12 :帕妥珠单抗主峰, HMWS, 和 LMWS 的生物学活性

[0357]

帕妥珠单抗 样品和条件	均值%活性 (n = 3)				
	抗增殖	HER2结合	Fc γ RIIIa结合	ADCC	FcRn结合
对照	103	108	91 ^b	80 ^b	80
主峰	104	96	96	79	87
HMWS	46	82	522	38	73
LMWS	12 ^a	73 ^a	23 ^a	无活性	7 ^a

[0358] 注意 :相对于帕妥珠单抗参照标准 (批次 anti2C4907-2) 报告的百分比活性。ADCC = 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 ;HMWS = 高分子量种类 ;LMWS = 低分子量种类。

[0359] ^a LMWS 样品由 2/3Fab 和 1/3Fc 片段组成。显示的值反映基于分子量 (Fab = 47644Da, Fc = 52800Da, 和全长抗体 = 148088Da) 的 nM/nM 调整。

[0360] ^b帕妥珠单抗参照标准 (批次 anti2C4907-2) 具有 2.2% 的 G0-F 水平,而对照样品具有 1.7% 的 G0-F。结果尚未校正无岩藻糖基化材料水平的差异。

[0361] 毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) :CE-SDS 及激光诱导荧光 (LIF) 检测分析是一种高灵敏度测定法,提供在变性条件下定量评估蛋白质的分子大小分布的手段。在非还原样品的 CE-SDS 分析 (图 29) 中,帕妥珠单抗像由 96% -98% 总峰面积组成的主要峰及代表 LMWS 和 HMWS 的次要峰一样迁移。对于测试的所有材料,通过这种技术测定的 HMWS 的量为 0.6%。其余种类像 LMWS 一样迁移,如图 30 (扩展视图) 中显示的。样品加热诱导的片段化随烷基化而最小化 (Salas Solano 等人, Anal. Chem. 78 :6583-6594 (2006))。表 13 中列出通过 CE-SDS 分开的种类的相对分布。

[0362] 表 13 :非还原帕妥珠单抗的相对分布,通过 CE-SDS (百分比峰面积)

[0363]

批次名称	峰							
	1	2	3	4	5	6	主要	HMWS
anti2C4-900-1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.9	97.8	0.6
anti2C4907-2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	1.9	96.5	0.6
运行1	0.1	0.3	0.1	0.4	0.2	1.7	96.7	0.6
运行3	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.0	0.6
运行4	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.1	0.6
运行5	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	2.0	96.4	0.6
运行6	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.2	96.2	0.6
运行7	0.1	0.4	0.0	0.2	0.2	2.1	96.3	0.6

[0364] 注意：由于舍入，加起来的总%可能不是正好 100%。

[0365] CE-SDS = 毛细管电泳十二烷基硫酸钠；HMWS = 高分子量种类。

[0366] 观察到一种轻微差异，其中峰 6 自参照标准批次 anti2C4-900-1 (I/II 期工艺) 中的 0.9% 升高至参照标准批次 anti2C4907-2, 运行 1, 和运行 3-7 的 1.7% -2.3%。

[0367] 在一个实施方案中，通过 NR-CE-SDS 分开或分离的帕妥珠单抗主峰（排除 LMWS 和 HMWS）为自约 95% 至约 99%，例如自约 96.0% 至约 97.8%。任选地，HMWS 的量为 $\leq 1\%$ ，例如 $\leq 0.6\%$ ，而 LMWS 的量为 $\leq 4\%$ ，例如 $\leq 3.4\%$ ，如通过 CE-SDS 分开或分离的。

[0368] 实施例 6：帕妥珠单抗片段化的检测和量化

[0369] 这个实施例的目的是为帕妥珠单抗片段的检测评估大小排阻层析 (SE-HPLC)，还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (R-CE-SDS)，和非还原 CE-SDS (NR-CE-SDS) 方法。

[0370] 材料和方法

[0371] 下文汇总这项研究中评估的样品。这些包括已经进行可能导致片段化升高的各种加压条件的帕妥珠单抗样品。

[0372] • 参照标准 (2C4907-2)

[0373] • 热加压 (42 天, 40°C)

[0374] • 酸处理 (pH 3.2, 1 天, 40°C)

[0375] • 加速稳定性 (30 天, 40°C, 然后贮藏于大约 5°C)

[0376] • 实时成品药 (DP) 稳定性 (T = 0 和 T = 548 天且贮藏于大约 5°C) 和相应原料药 (DS)

[0377] 以下述可报告值如上文实施例 5 所述进行 SE-HPLC：LMWS, 主峰, HMWS, 和所有其它超出量化限度 (LOQ) 的显著峰。

[0378] 以下述可报告值依照上文实施例 5 进行还原 CE-SDS (R-CE-SDS)：峰 1, LC, 峰 2, 峰 3, NGHC, HC, 峰 5, 不完全还原, 和其它超出 LOQ 的显著峰。

[0379] 如上文实施例 5 所述进行非还原 CE-SDS (NR-CE-SDS)，其中通过自 SDS 络合步骤消除二硫苏糖醇 (DTT)，样品制备排除抗体还原步骤以容许非还原分析。

[0380] 图 31A-B, 图 32A-B, 和图 33A-B 分别为, 以及表 14, 15, 和 16 中分别呈现通过

SE-HPLC, NR-CE-SDS, 和 R-CE-SDS 获得的定性结果。

[0381] 峰鉴定基于 Hunt&Nashabeh, Analytical Chemistry 71:2390-2397(1999); 和 Ma&Nashabeh, Chromatographia Supplement 53:S75-S89(2001)。对于 NR-CE-SDS 分析, 通常包括峰 2 之后的一个小峰, 在数据报告期间作为峰 2 的一部分。对于这项研究, 作为峰 2a 分开报告这个小峰以区别该片段与轻链 (LC)。

[0382] 表 14 :SE-HPLC 定量数据 (%峰面积)

[0383]

	HMWS (%)	主峰 (%)	LMWS (%)
2C4907-2	0.18	99.77	0.04
热	0.40	98.96	0.64
酸处理	7.09	92.65	0.26
加速稳定性	0.26	99.23	0.51
DP 稳定性	0.19	99.68	0.13

[0384] 表 15 :NR-CE-SDS 定量数据 (% CPA)

[0385]

	峰1	峰2 (LC)	峰2a	峰3 (Fab)	峰4 (HL)	峰5 (HH/desFab)	峰6 (HHL)	主峰	HMWS
2C4907-2	0.12	0.29	0.05	0.07	0.35	0.18	1.90	96.32	0.73
热	0.42	0.70	0.09	0.61	0.52	1.36	3.62	91.99	0.71
酸处理	0.15	0.37	0.17	0.35	0.45	0.66	3.19	93.42	1.25
加速稳定性	0.35	0.59	0.09	0.48	0.44	1.07	3.25	92.90	0.84
DP稳定性	0.22	0.37	0.06	0.20	0.33	0.43	2.53	95.27	0.60

[0386] LC = 轻链, HC = 重链, L = 轻, H = 重

[0387] 表 16 :R-CE-SDS 定量数据 (% CPA)

[0388]

	峰 1	LC	峰 2	峰 3	NGHC	HC	峰 5	不完全还原
2C4907-2	0.31	25.30	0.92	2.44	2.81	66.82	0.48	0.91

热	0.54	26.16	1.12	3.13	2.81	64.54	0.27	1.43
酸处理	0.38	25.04	5.58°	2.77	2.41	62.91	0.19	0.71
加速稳定性	0.51	25.01	0.98	2.99	3.16	66.10	0.25	1.03
DP 定性	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

[0389] NGHC = 非糖基化重链, HC = 重链

[0390] 数据评估: 比较有关片段的百分比峰面积 (或百分比校正峰面积, % CPA, 用于 CE-SDS) 以确定 CE-SDS 方法是否与 SE-HPLC 相比提供非冗余信息。有关片段包括具有未知结构的峰, 或已知含有自切割多肽链衍生的产物的那些。这些片段不同于抗体产品中存在的和通过 CE-SDS 通常观察到的可解离的未成二硫键的重和 / 或轻链片段。片段峰必须与其它峰解析开以实现灵敏的检测和精确的量化。

[0391] 检测小片段的能力: 在 R-CE-SDS 和 NR-CE-SDS 分析二者中均能观察到小片段, 而且在两种测定法均命名为峰 1。这些峰保留相同的总体形状和迁移时间, 而且在两种测定法中在加压条件下相似地增大。因此, 峰 1 推测在两种测定法中含有相同种类。两种 CE-SDS 测定法均能够检测小片段, 如表 17 中记录的。

[0392] 检测通过酸水解 (酸剪切) 生成的片段的能力: 延长的酸暴露条件能生成片段, 特别是在 Asp-Pro 序列 (帕妥珠单抗重链残基 272-273) 处, 如酸处理样品的质谱分析所支持的, 其显示 29039Da (HC 1-272) 和 21513Da (具有 G0 聚糖的 HC 273-448) 处的质量。这些形式的理论质量分别为 29031Da 和 21510Da。基于这些形式的预期迁移时间, 在酸处理样品的还原 CE-SDS 分析中能清楚地看到一个对应的峰 (峰 2, 图 34), 但是在非还原测定法中是在低得多的水平 (较低信号) 检测到的。可以假定在 NR-CE-SDS 测定法中, 峰 2 片段推测是二硫化物连接的, 并因此未检测到。既然酸处理样品中通过 R-CE-SDS 检测到的峰 2 水平 (5.58%) 超出对此样品通过 SE-HPLC 检测到的总 LMWS (0.26%), 那么可以得出结论, SE-HPLC 也不足以检测这些形式。因此, 还原 CE-SDS 测定法是本文中呈现的唯一能够检测因酸水解而生成的片段化的测定法, 如表 17 中记录的。

[0393] 检测 Fab/DesFab 片段的能力: 通过 SE-HPLC 检测的 LMWS 和来自非还原 CE-SDS 测定法的峰 3 之间有较好的线性相关性 ($r^2 = 0.97$) (图 35)。经由用酶促生成的 Fab 进行的共洗脱研究, LMWS 鉴定为含有 Fab 片段。类似地, 经由分别用酶促生成的 Fab 和 DesFab 进行的共迁移研究 (Ma&Nashabeh, 同上), 鉴定 NR-CE-SDS 测定法中的峰 3 和峰 5。生成 Fab 形式的重链切割产生 desFab 峰, 所以推测它相对于 Fab 片段处于等价摩尔数量 (对应于 2:1 质量比), 如此, 关于这种形式的信息也能通过 SE-HPLC 间接获得, 如表 17 中记录的。

[0394] 表 17: 通过 SE-HPLC, NR-CE-SDS, 和 R-CE-SDS 检测片段的能力

[0395]

片段	SE-HPLC	NR-CE-SDS	R-CE-SDS
小片段 CE-SDS 峰 1	未知	是	是

酸剪切 (R-CE-SDS 峰 2)	否	否	是
Fab/DesFab	是 / (间接)	是	否

[0396] 还原 CE-SDS 峰 3 :R-CE-SDS 峰 3 对于帕妥珠单抗是独特的,而且尚未在其它抗体的 CE-SDS 分析中观察到。扩展表征结果支持如下结论,即峰 3 不是产品变体或杂质,而是对帕妥珠单抗特异性的方法诱导人造物,由可解离形式的 LC-LC 二聚体组成。采用多种技术来表征峰 3。

[0397] 通过配有 UV 和 LIF 检测的 R-CE-SDS 观察到峰 3,提示它不是染料标记或样品制备人造物。

[0398] 在通过 R-CE-SDS 分析时,纯化的帕妥珠单抗轻链级分产生具有为 LC 理论大小大约 2 倍的表观 MW 的峰 3。

[0399] 在电泳条件包括较高毛细管温度时没有观察到峰 3,而且在这些条件下没有观察到其它共迁移片段。

[0400] 单氨基酸突变的研究鉴定出 LC CDR1 和 CDR2 中与 LC-LC 二聚体形成有关的三个氨基酸残基。当这三个残基任一用另一种氨基酸替换时,峰 3 完全解离且不再通过还原 CE-SDS 观察到。

[0401] SDS-PAGE 分析偶联 MALDI-TOF 蛋白质质量指纹 (PMF) 确认帕妥珠单抗中不存在宿主细胞蛋白质,也没有以通过 CE-SDS 观察到的水平检测到类似条带。

[0402] 总之,这些结果支持峰 3 的鉴定是对帕妥珠单抗特异性的,方法诱导的 LC-LC 二聚体。

[0403] 讨论

[0404] 对自这项研究获得的数据的评估指示:

[0405] (1) 关于片段的检测, NR-CE-SDS 与 SE-HPLC 相比确实提供非冗余信息。

[0406] (2) 通过 NR-CE-SDS 方法获得的非冗余片段化信息 (与 SE-HPLC 相比) 也能使用 R-CE-SDS 方法获得。

[0407] 如表 16 中显示的,还原测定法检测源自原料药制造期间可发生的低 pH 暴露的切割产物。表 18 含有对帕妥珠单抗参照标准,III 期材料 (n = 3) 和使用商业性制造工艺生成的批次 (n = 39) 的还原 CE-SDS 峰 1 和峰 2 获得的值。使用 3.2 的 k 值为峰 1 和峰 2 计算 95/99 容许区间 (TI),并呈现于表 18。峰 1 的 95/99 容许区间为 0.0 至 0.4% CPA。峰 2 的 95/99 容许区间为 0.3 至 0.9% CPA。

[0408] 表 18 :测试的 43 批次的 R-CE-SDS 定量数据 (% CPA)

[0409]

n	批次	峰 1 (% CPA)	峰 2 (% CPA)
1	anti2C4907-2	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

[0410]

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

[0411]

40	VV0049	0.20	0.69
41	VV0050	0.18	0.49
42	VV0051	0.16	0.63
43	VV0052	0.18	0.60

[0412]

均值	0.21	0.62
标准偏差	0.06	0.09
最小	0.13	0.47
最大	0.41	0.92
N	43	43
K	3.2	3.2
下TI	0.02	0.33
上TI	0.40	0.91

[0413] 本文中对原料药释放选择峰 $1 \leq 0.5\%$ 和峰 $2 \leq 1.0\%$ 的最终接受标准。

[0414] 因为帕妥珠单抗原料药是冷冻贮藏的,所以对 DS 稳定性会预期无变化。另外,基于在 $T = 0$ 和 $T548d$ 二者对成品药获得的 R-CE-SDS 数据 (表 19),对任何命名种类没有观察到显著变化。

[0415] 表 19 :DP 稳定性样品的 R-CE-SDS 定量数据 (% CPA)

[0416]

	峰1	LC	峰2	峰3	NGHC	HC	峰5	不完全还原
DS释放	0.25	26.72	0.51	2.27	2.76	66.66	0.27	0.56
DP稳定性 T=0	0.13	26.45	0.54	2.78	2.78	66.53	0.30	0.49
DP稳定性 T=548d	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

[0417] NGHC = 非糖基化重链, HC = 重链

[0001]

序列表

<110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.)

L·A·热纳罗

Y-H·高

张永华

<120> 帕妥珠单抗变体及其评估

<130> P5584R1-W0

<141> 2014-04-15

<150> US 61/812,603

<151> 2013-04-16

<160> 24

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15

Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly
				20					25					30

Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr
				35					40					45

Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly
				50					55					60

Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln
				65					70					75

Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
				80					85					90

Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr
				95					100					105

Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu
				110					115					120

Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg
				125					130					135

Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile
				140					145					150

Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn
				155					160					165

Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser
				170					175					180

Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg
				185					190					195

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro
1				5					10					15

Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0002]

	20		25		30
Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly					
	35		40		45
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp					
	50		55		60
Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly					
	65		70		75
Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp					
	80		85		90
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val					
	95		100		105
Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro					
	110		115		120
Cys Ala Arg Val					

<210> 3
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3					
Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val					
1	5		10		15
Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe					
	20		25		30
Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala					
	35		40		45
Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu					
	50		55		60
Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro					
	65		70		75
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile					
	80		85		90
Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln					
	95		100		105
Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu					
	110		115		120
Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe					
	125		130		135
Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln					
	140		145		150
Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly					
	155		160		165
Glu Gly Leu Ala					

<210> 4
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 4					
Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro					
1	5		10		15

[0003]

```

Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
      20                      25                      30
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
      35                      40                      45
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
      50                      55                      60
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
      65                      70                      75
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
      80                      85                      90
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
      95                      100                     105
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
      110                     115                     120
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
      125                     130                     135
Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
      140

```

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

```

<400> 5
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
  1                      5                      10                      15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
      20                      25                      30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
      35                      40                      45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
      50                      55                      60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
      65                      70                      75
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      80                      85                      90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
      95                      100                     105
Ile Lys

```

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

```

<400> 6
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
  1                      5                      10                      15
Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
      20                      25                      30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
      35                      40                      45

```

[0004]

```

Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50                      55                      60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
65                      70                      75
Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
80                      85                      90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95                      100                     105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110                     115

```

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1         5         10        15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20        25        30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35        40        45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50        55        60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65        70        75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80        85        90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95       100       105
Ile Lys

```

<210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1         5         10        15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20        25        30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35        40        45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50        55        60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65        70        75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

```

[0005]

	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr			
	95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	110	115	
<210> 9			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 序列是合成的			
<400> 9			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val			
1 5 10 15			
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser			
20 25 30			
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys			
35 40 45			
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
50 55 60			
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
65 70 75			
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
80 85 90			
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
95 100 105			
Ile Lys			
<210> 10			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 序列是合成的			
<400> 10			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1 5 10 15			
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
20 25 30			
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
35 40 45			
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr			
50 55 60			
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
65 70 75			
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
80 85 90			
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu			
95 100 105			
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
110 115			

[0006]

<210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 11
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 12
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

[0007]

Glu Trp Val Ala Asp	Val Asn Pro Asn Ser	Gly Gly Ser Ile Tyr	
50	55	60	
Asn Gln Arg Phe Lys	Gly Arg Phe Thr Leu	Ser Val Asp Arg Ser	
65	70	75	
Lys Asn Thr Leu Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	
80	85	90	
Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Asn Leu	Gly Pro Ser Phe Tyr	
95	100	105	
Phe Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser Ala	
110	115	120	
Ser Thr Lys Gly Pro	Ser Val Phe Pro Leu	Ala Pro Ser Ser Lys	
125	130	135	
Ser Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu Gly	Cys Leu Val Lys Asp	
140	145	150	
Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu	
155	160	165	
Thr Ser Gly Val His	Thr Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser Gly	
170	175	180	
Leu Tyr Ser Leu Ser	Ser Val Val Thr Val	Pro Ser Ser Ser Leu	
185	190	195	
Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val Asn	His Lys Pro Ser Asn	
200	205	210	
Thr Lys Val Asp Lys	Lys Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr	
215	220	225	
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly Gly Pro	
230	235	240	
Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile	
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His	
260	265	270	
Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu	
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser	
290	295	300	
Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	
305	310	315	
Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	
320	325	330	
Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro	
335	340	345	
Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met	
350	355	360	
Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly Phe Tyr	
365	370	375	
Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu	
380	385	390	
Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser	
395	400	405	
Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln	

[0008]

410	415	420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
425	430	435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列是合成的

 <400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

 Arg Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

[0009]

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys	20	25	30
Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45
Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr	50	55	60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser	65	70	75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr	95	100	105
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	110	115	120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	125	130	135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys	140	145	150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375

[0010]

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 380 385 390
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 395 400 405
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 410 415 420
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 425 430 435
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 15
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
 20 25 30
 Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
 50 55 60
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 95 100 105
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 110 115 120
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 125 130 135
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 140 145 150
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 155 160 165
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 170 175 180
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 185 190 195
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 200 205 210
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 16
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly
1	5	10 15
Gly Ser Leu Arg Leu	Ser Cys Ala Ala Ser	Gly Phe Thr Phe Thr
20	25	30
Asp Tyr Thr Met Asp	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly Leu
35	40	45
Glu Trp Val Ala Asp	Val Asn Pro Asn Ser	Gly Gly Ser Ile Tyr
50	55	60
Asn Gln Arg Phe Lys	Gly Arg Phe Thr Leu	Ser Val Asp Arg Ser
65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Asn Leu	Gly Pro Ser Phe Tyr
95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser Ala
110	115	120
Ser Thr Lys Gly Pro	Ser Val Phe Pro Leu	Ala Pro Ser Ser Lys
125	130	135
Ser Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu Gly	Cys Leu Val Lys Asp
140	145	150
Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu
155	160	165
Thr Ser Gly Val His	Thr Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser Gly
170	175	180
Leu Tyr Ser Leu Ser	Ser Val Val Thr Val	Pro Ser Ser Ser Leu
185	190	195
Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val Asn	His Lys Pro Ser Asn
200	205	210
Thr Lys Val Asp Lys	Lys Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr
215	220	225
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly Gly Pro
230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu
275	280	285
Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu
320	325	330
Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro
335	340	345

[0012]

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的
 <220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> Xaa 优选为 D 或 S

<400> 17
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 5 10

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 18
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 19
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

[0013]

<400> 20
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> Xaa 优选为 R 或 L

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa 优选为 Y 或 E

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa 优选为 T 或 S

<400> 21
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 22
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 23
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp
5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 24
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
5

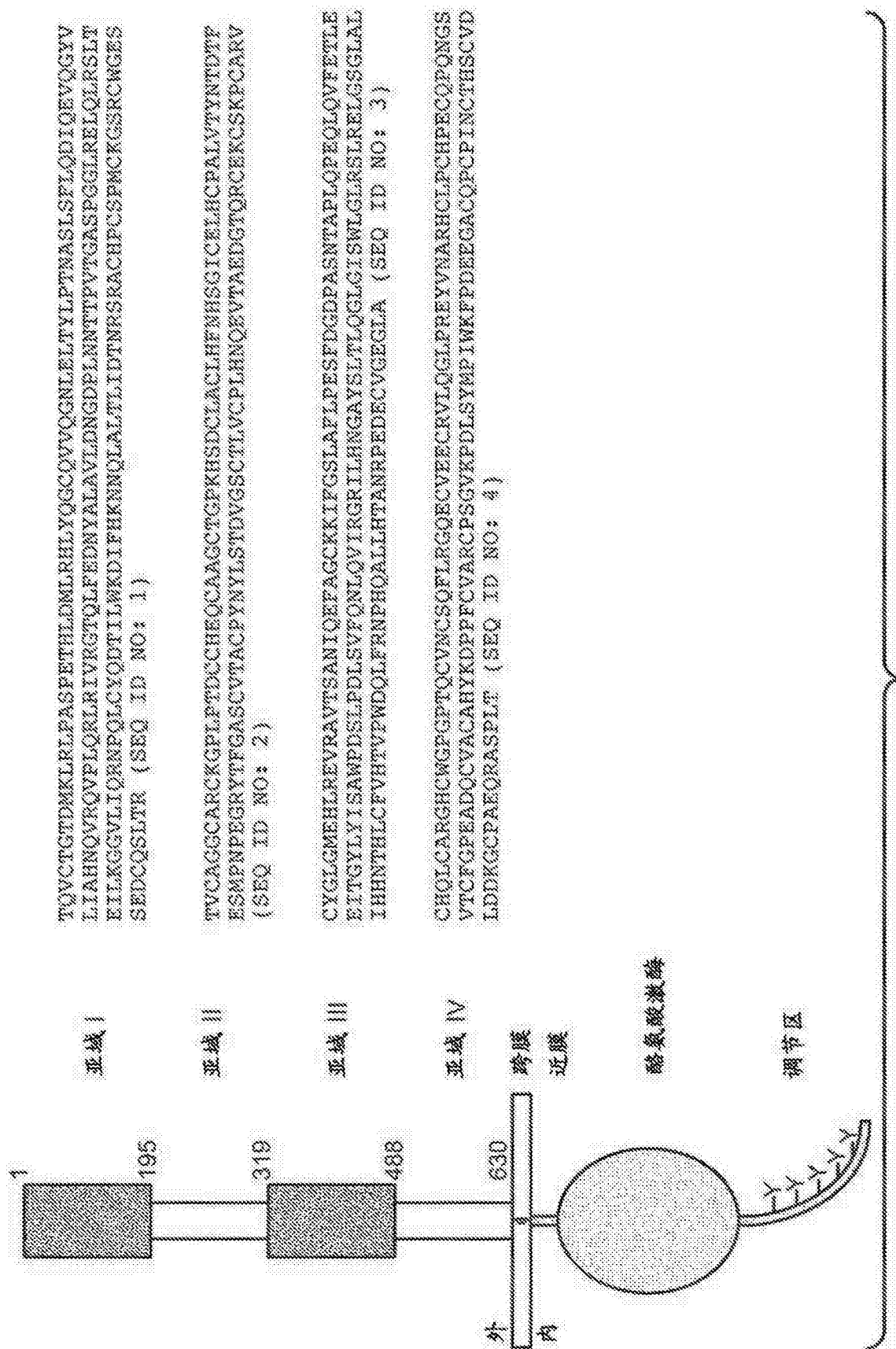


图 1

可变区

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQR	P
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPFSSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPFSSLSASVGDRVTITC	[RASQSI SNYLA]	WYQQK	P
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)		
	* *	*	*	
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:7)		
	*** *			
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:9)		

图 2A

可变量

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYM]	WVKQS	
	** ** *	** *	*	**
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFTDYM]	WVRQA	
		** *	*	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAAS [GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVD	SSRIVYM	
	* * *	*** *	*****	*
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDR	SKNTLYL	
	*****	***	*	*
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN	SKNTLYL	

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:6)
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:8)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:10)

图 2B

帕妥珠单抗轻链的氨基酸序列

1	10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRTGVPS						
70	80	90	100	110	120	
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP						
130	140	150	160	170	180	
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLT						
190	200	210				
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC						

(SEQ ID NO: 11)

图 3A

帕妥珠单抗重链的氨基酸序列

1 10 20 30 40 50 60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIIY
70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSSA
130 140 150 160 170 180
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190 200 210 220 230 240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
250 260 270 280 290 300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310 320 330 340 350 360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370 380 390 400 410 420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430 440 448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

图 3B

曲妥珠单抗轻链

1	15	30	45
D	I	Q	M
T	Q	S	P
S	S	L	S
A	S	V	G
D	R	V	T
I	T	C	R
A	S	Q	D
V	N	T	A
V	A	W	Y
Q	Q	K	P
G	K	A	P
K			
46	60	75	90
L	L	I	Y
S	A	S	F
L	Y	S	G
V	P	S	R
F	S	G	S
R	S	G	T
D	F	T	L
T	I	S	S
L	Q	P	E
D	F	A	T
Y	C	Q	Q
91	105	120	135
H	Y	T	T
P	P	F	G
Q	G	T	K
V	E	I	K
R	T	V	A
A	P	S	V
F	I	F	P
P	S	D	E
Q	L	K	S
G	T	A	S
V	C	L	
136	150	165	180
L	N	N	F
Y	P	R	E
A	K	V	Q
W	K	V	D
N	A	L	Q
S	G	N	S
Q	E	S	V
T	E	Q	D
S	K	D	S
T	Y	S	L
S	S	T	L
T			
181	195	210	214
L	S	K	A
D	Y	E	K
H	K	V	Y
A	C	E	V
T	H	Q	G
L	S	S	P
V	T	K	S
F	N	R	G
E	C		

(SEQ ID NO: 13)

图 4A

曲安珠单抗重链

```

1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNISKDTYIHWVQRQAPGKGL 45
46  EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
91  TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSSVFP LAPSS 135
136  KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
181  GLYSSLSSVTVPSSSLGTTQTYICNVNHHKPSNTKKVDKKVEPKSCDK 225
226  THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS 270
271  HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSS271TYRVVSVLTVLHQD 315
316  WLNQKEVKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRPEPQVYTLPPSREE 360
361  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTPPVLDSDG 405
406  SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMH406EALHNHYTQKSLSLSPG 449

```

(SEQ ID NO: 14)

图 4B

帕妥珠单抗可变轻链

```

1  V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F C Q Q T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D W A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (SEQ ID NO: 15) 217

```

图 5A

袖袋珠单抗可变重链

```

1      15      30      45
E V Q L V E S G G G L V Q P G C S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L

48      60      75      90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F 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

91      105     120     135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K

136     150     165     180
S T S G G T A A L G C L V K D Y F 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

181     195     210     225
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 K V E P K S C D K T

226     240     255     270
H T C P P C P A P E L L G C P S V F L F P P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V D V S H

271     285     300     315
E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W

316     330     345     360
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E H

361     375     390     405
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S W G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S

406     420     435     449
F P L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

```

(SEQ ID NO: 16)

图 5B

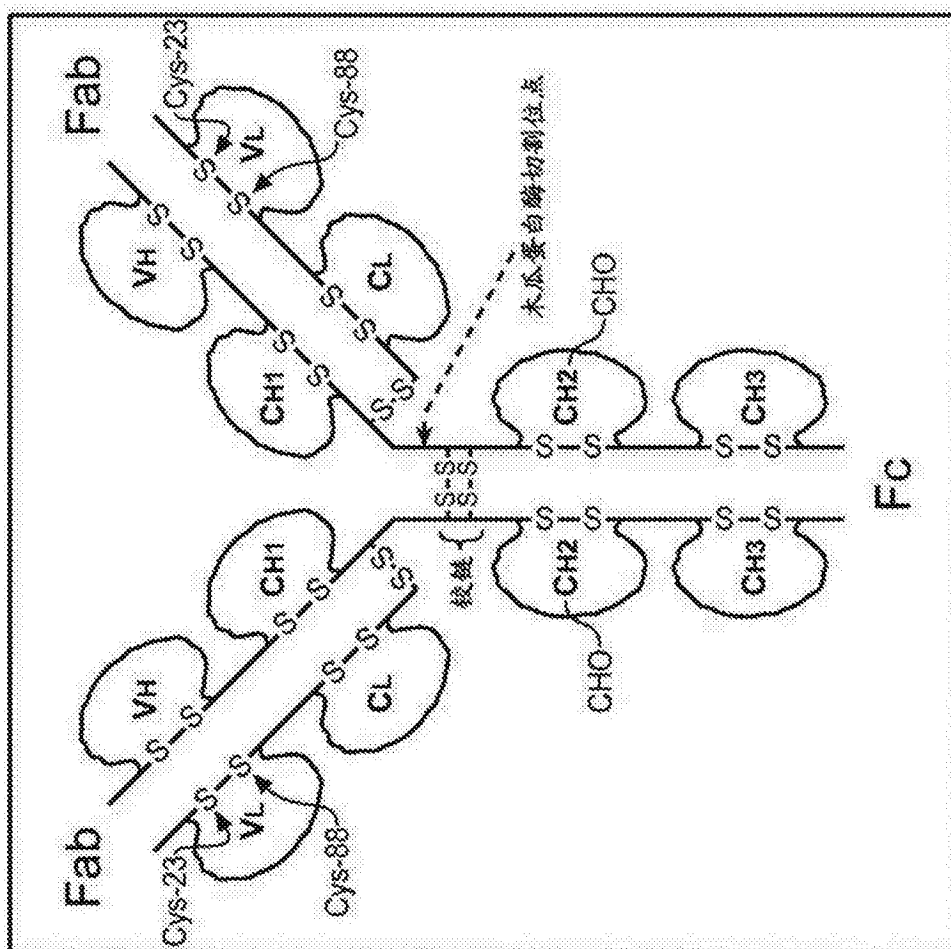


图 6

帕妥珠单抗的非还原 (天然) 胰蛋白酶肽图

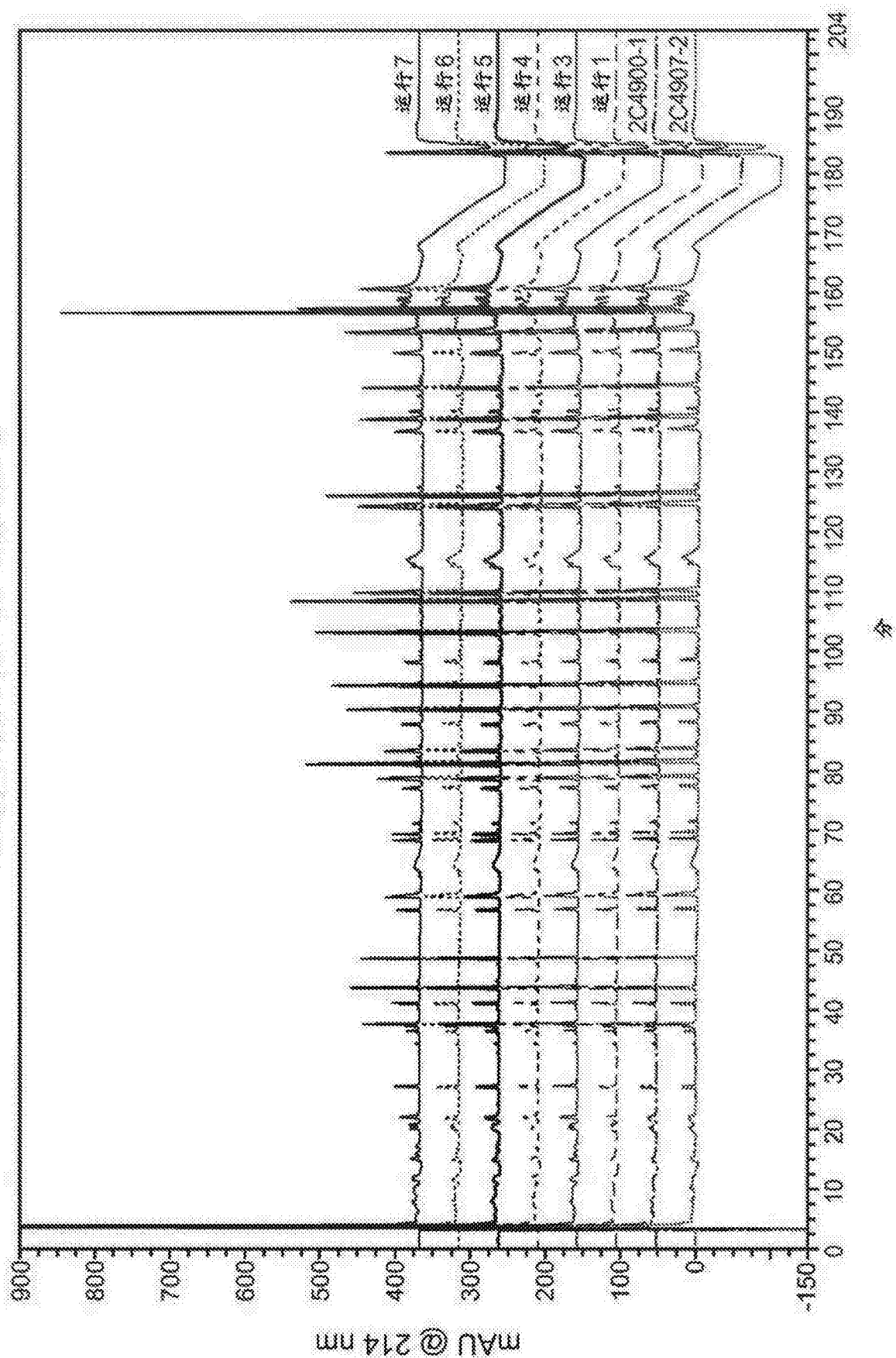


图 7

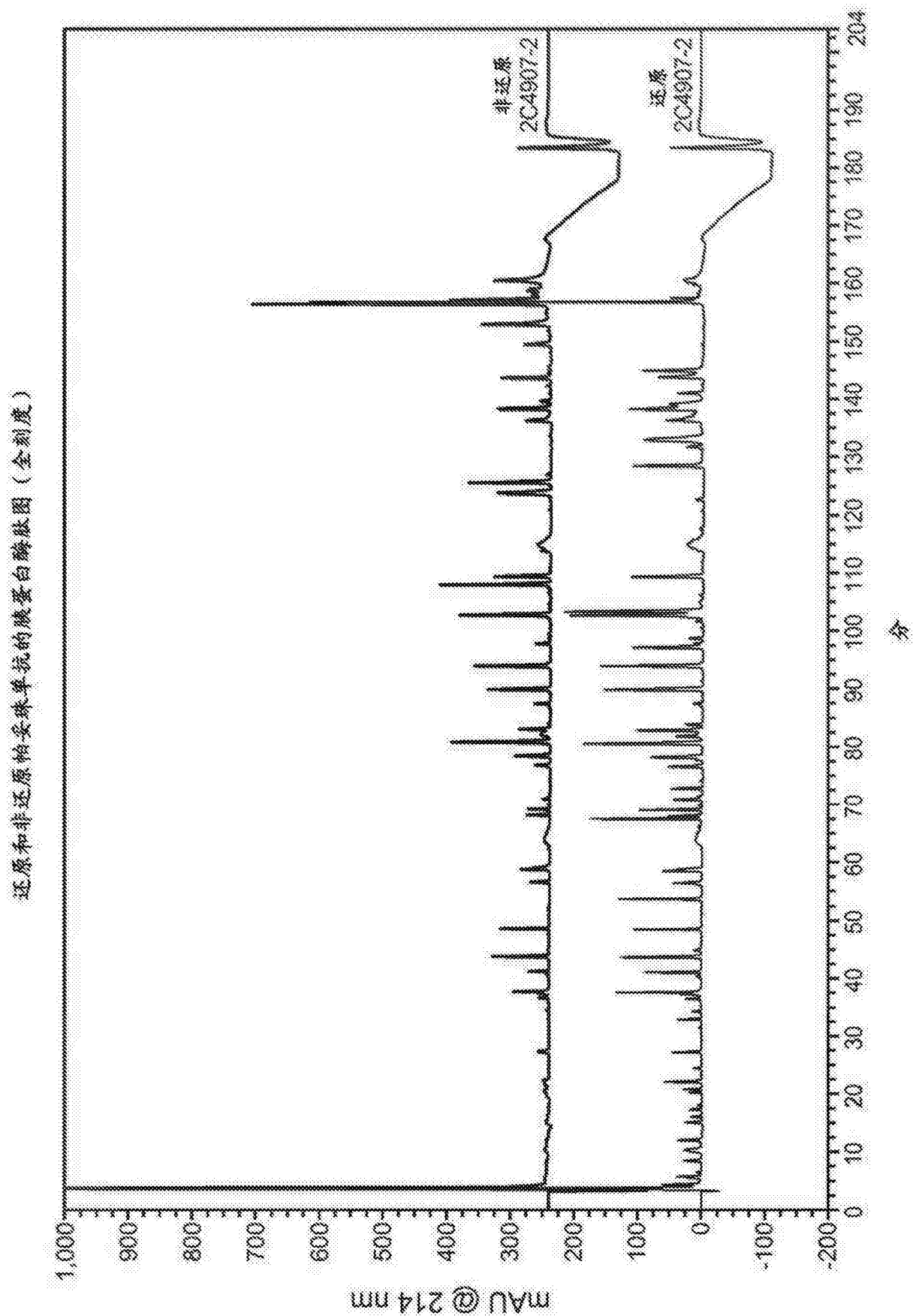


图 8

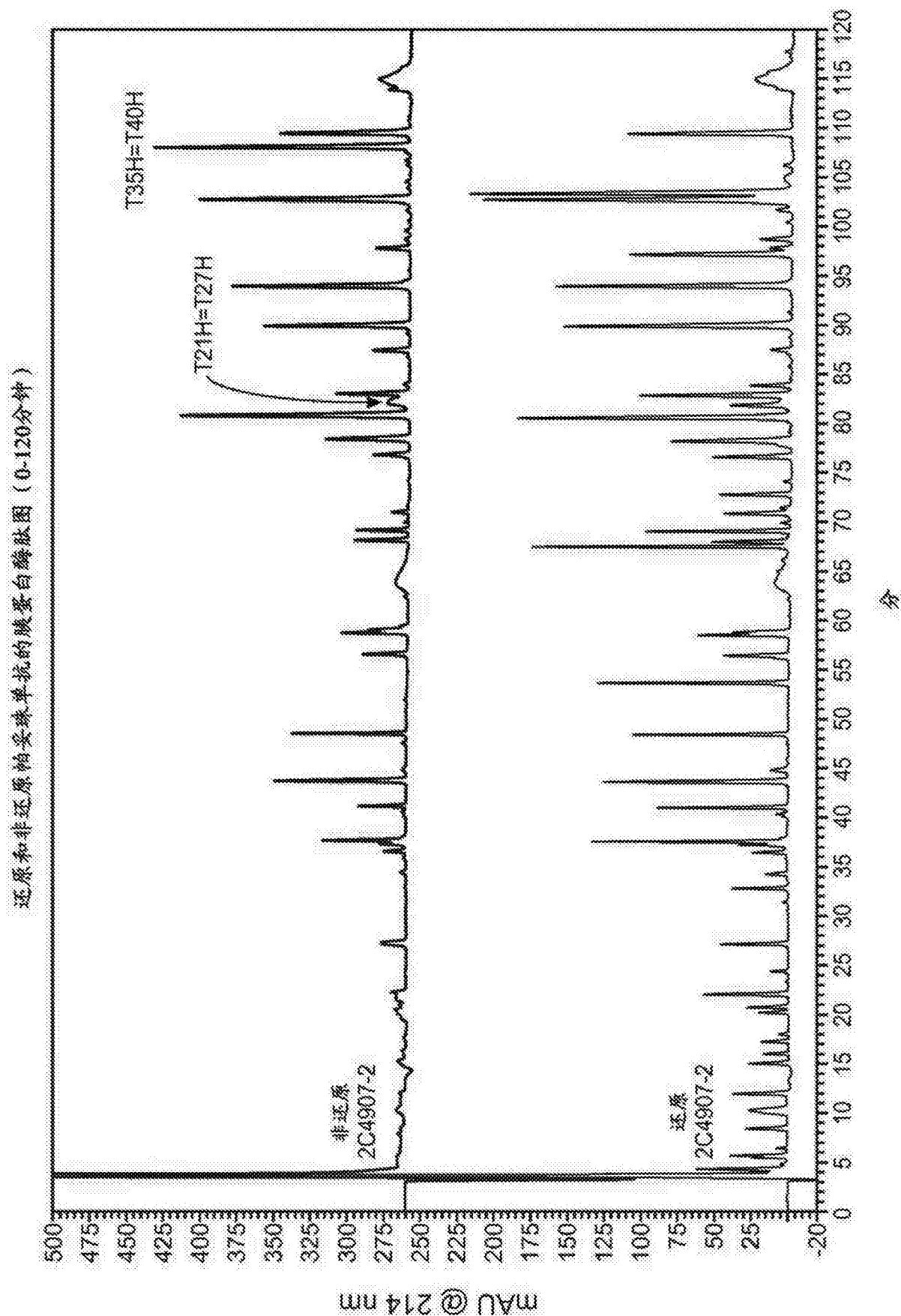


图 9

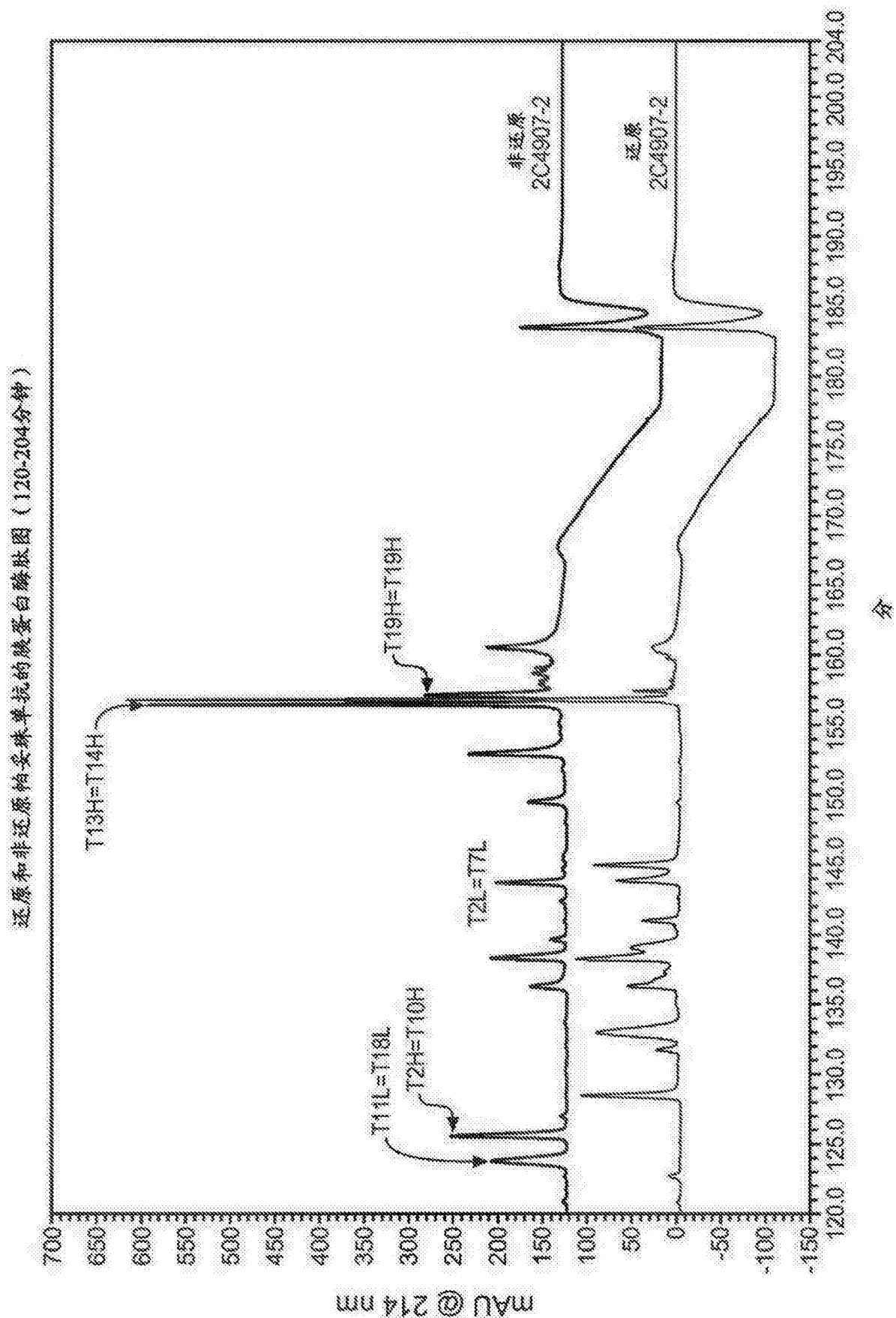


图 10

木瓜蛋白酶消化的帕妥珠单抗的HIC分析

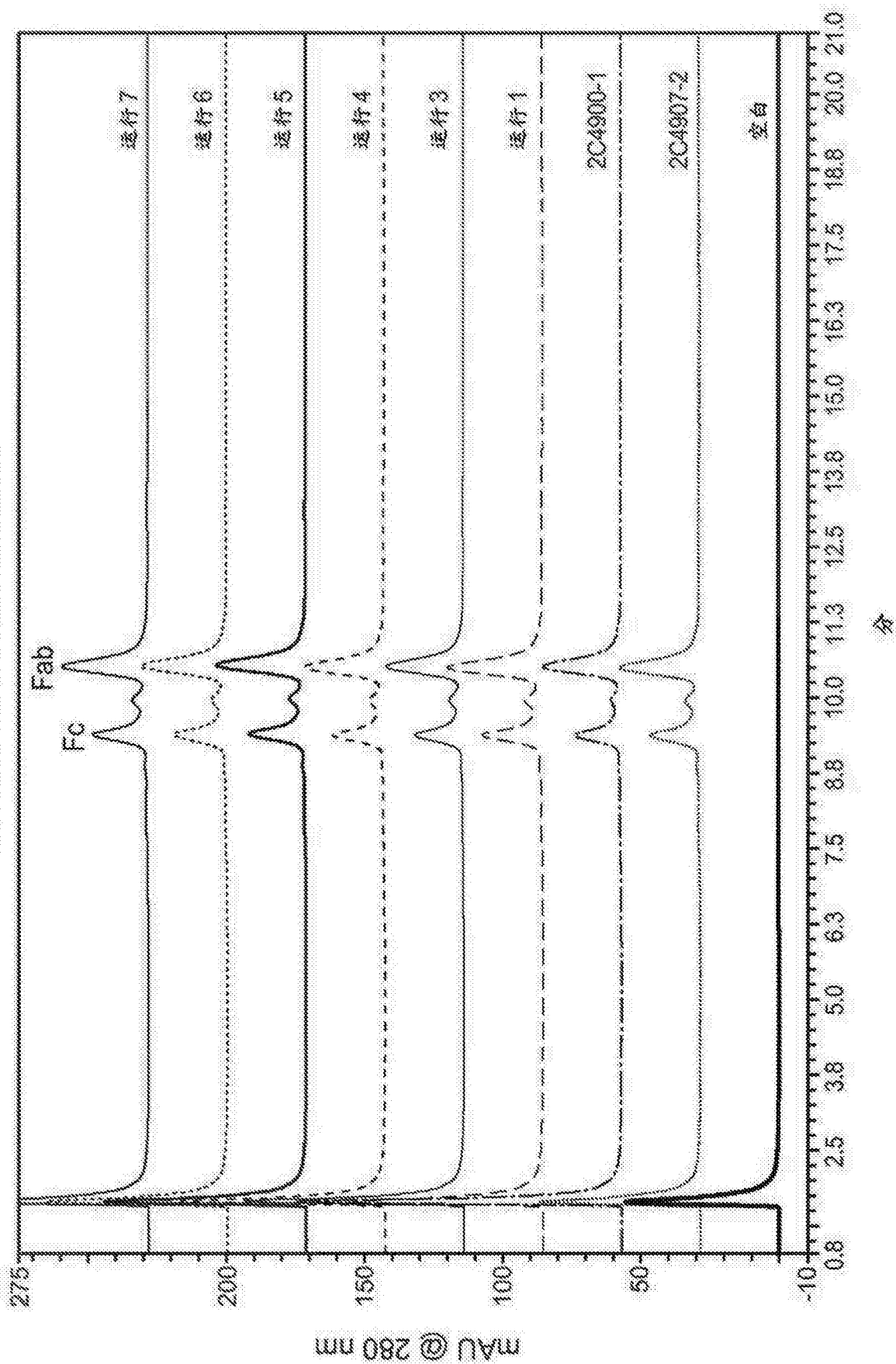


图 11

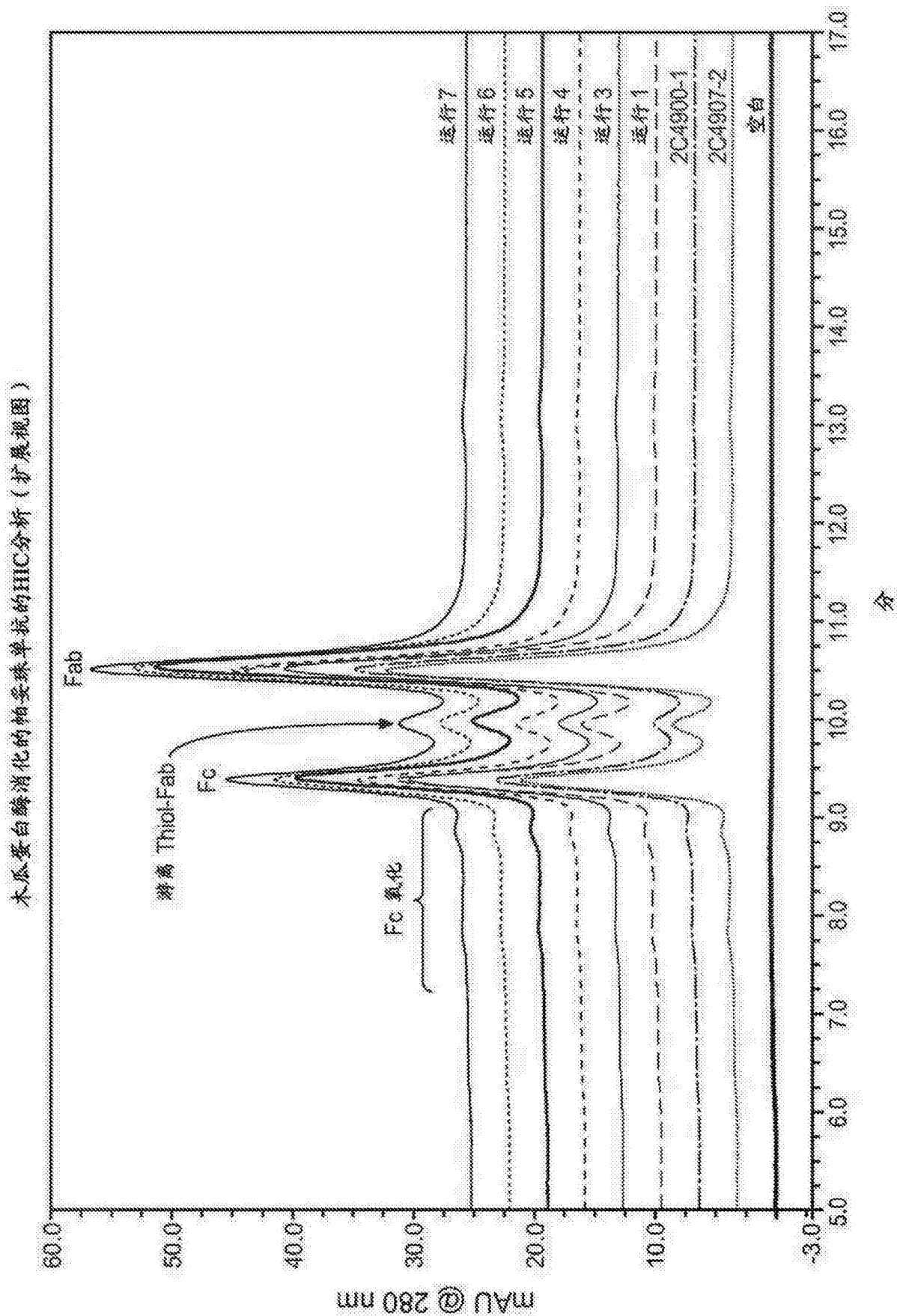


图 12

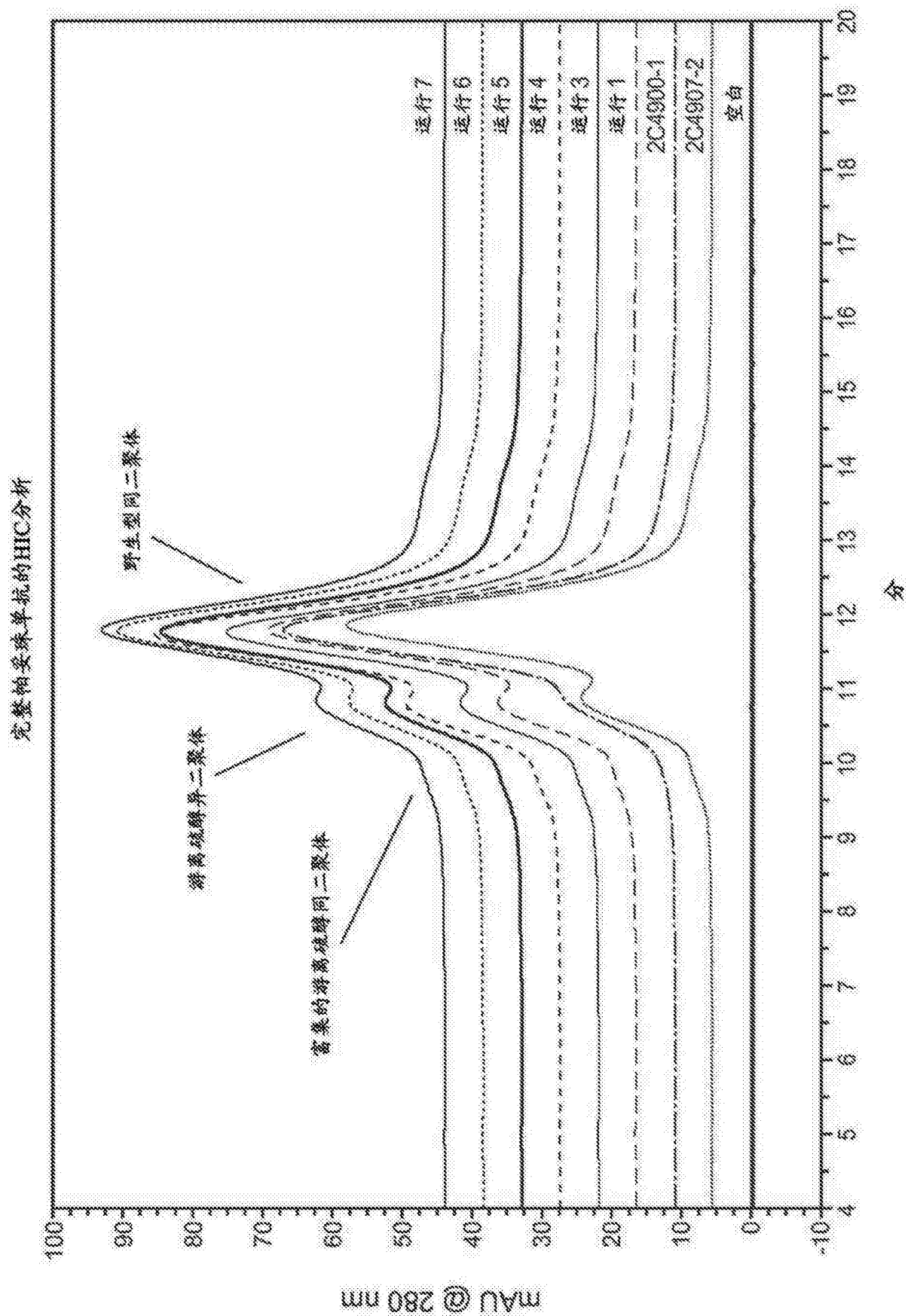


图 13

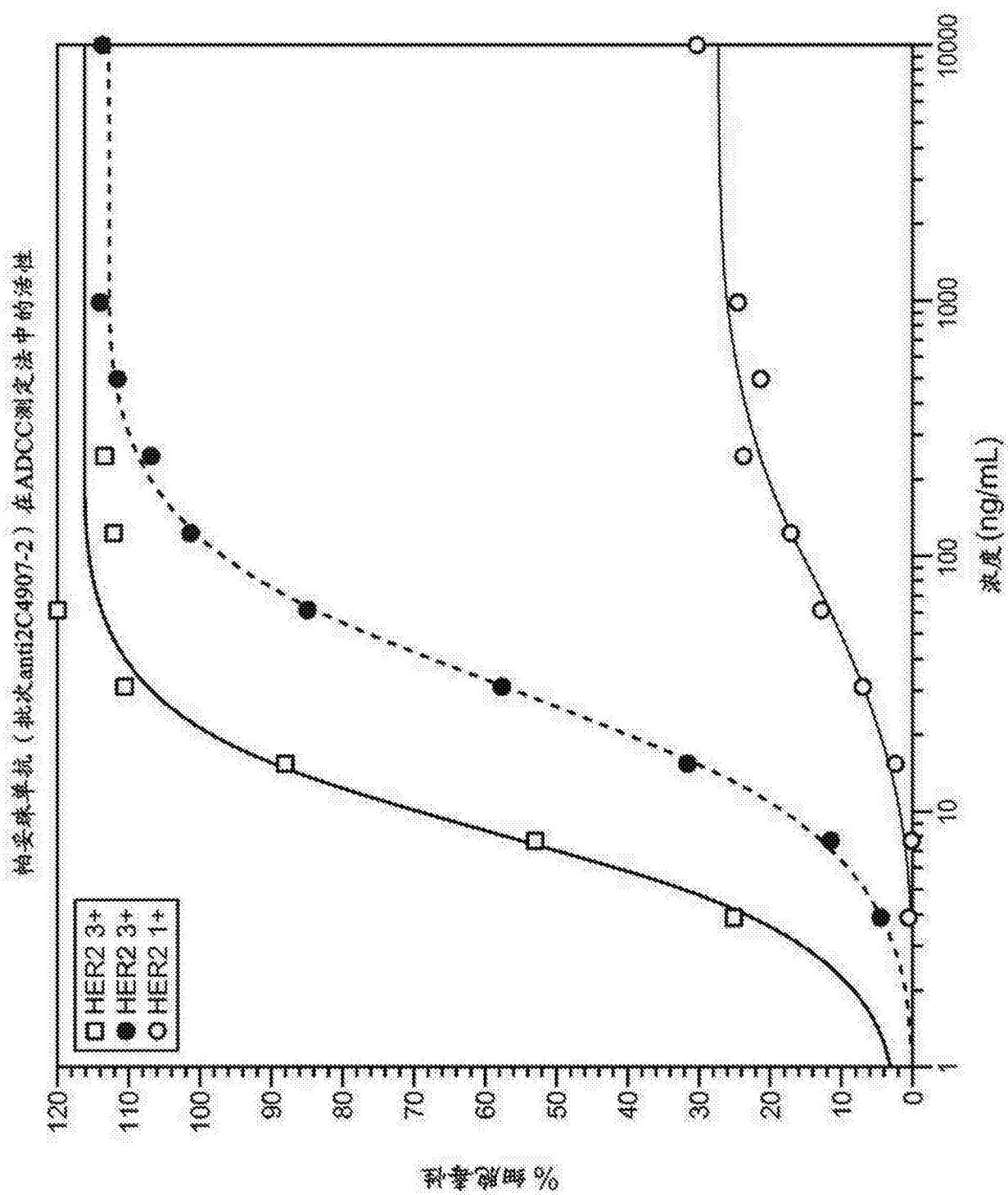


图 14

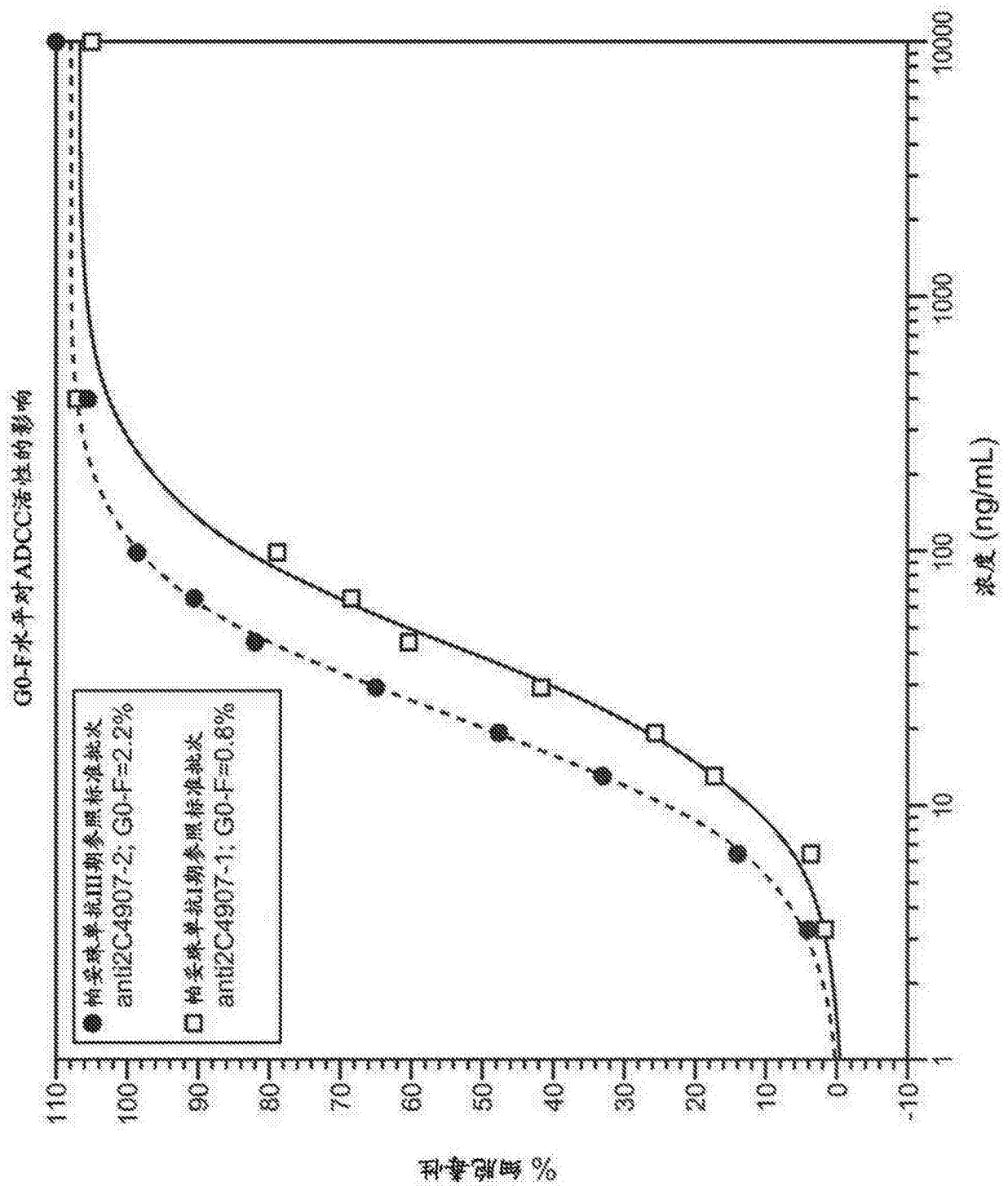


图 15

自帕妥珠单抗释放的N连接的寡糖的毛细管电泳分析

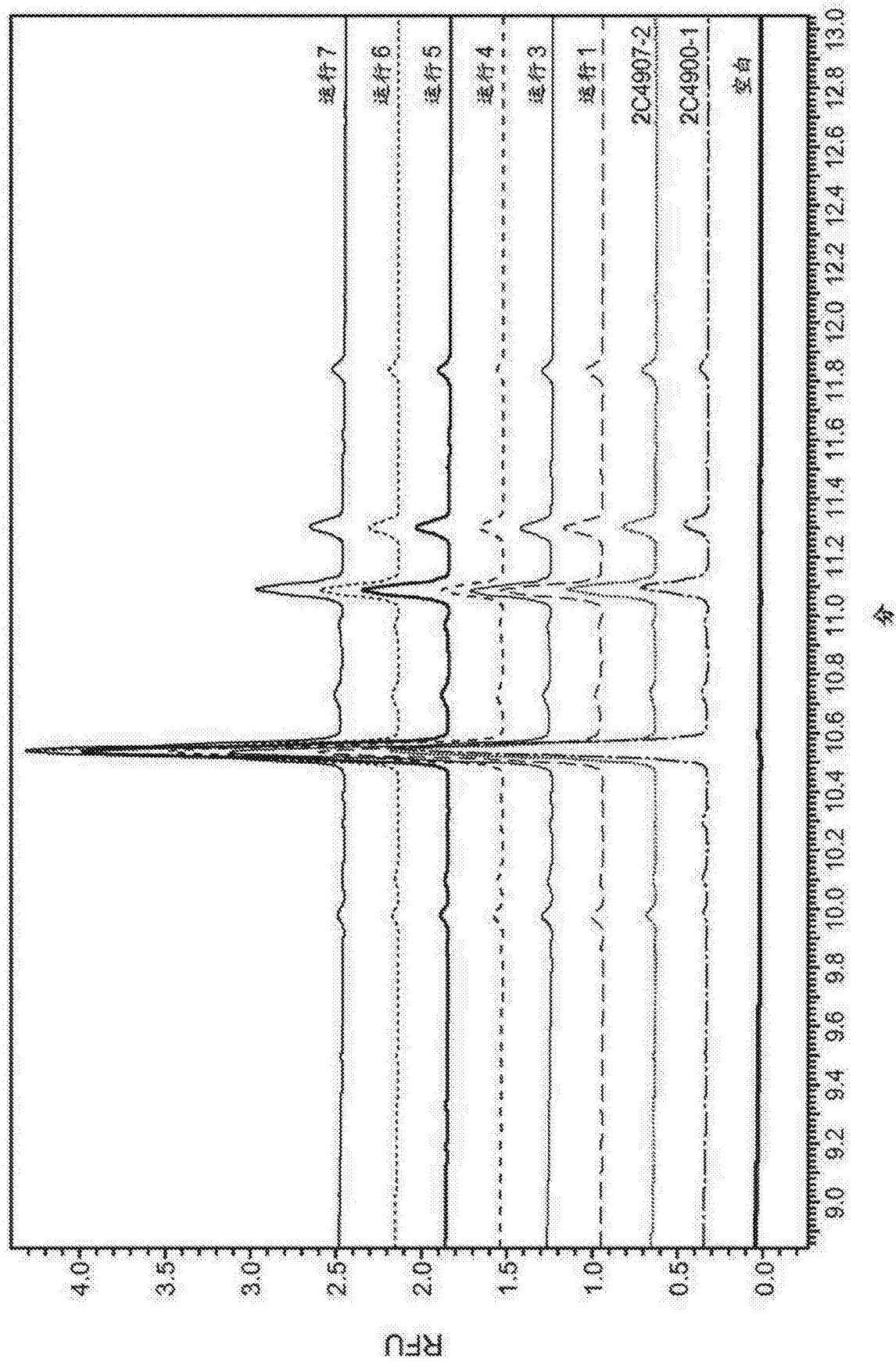
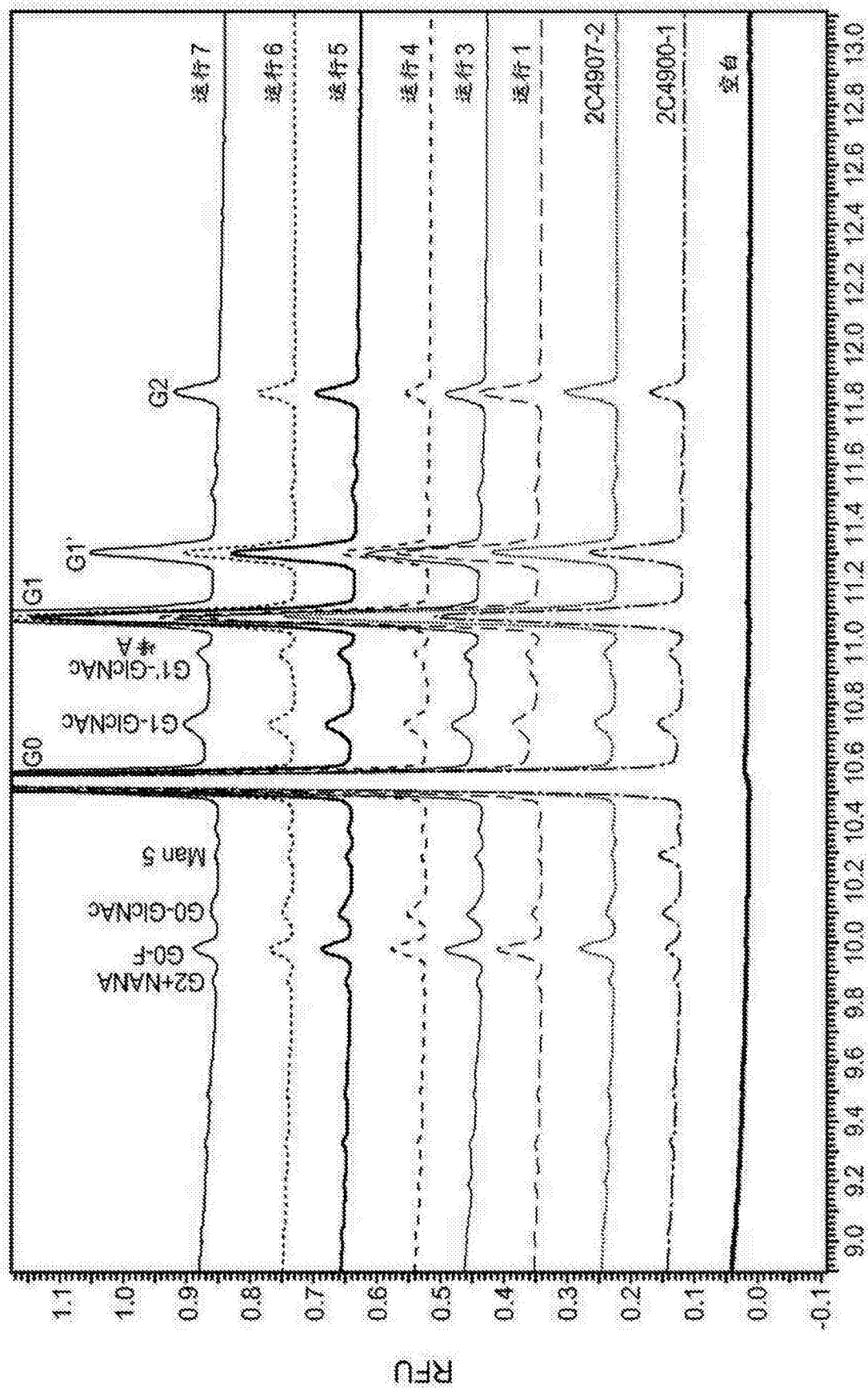


图 16

自抽妥珠单抗释放的N连接的寡糖的毛细管电泳分析 (扩增视图)



分

图 17

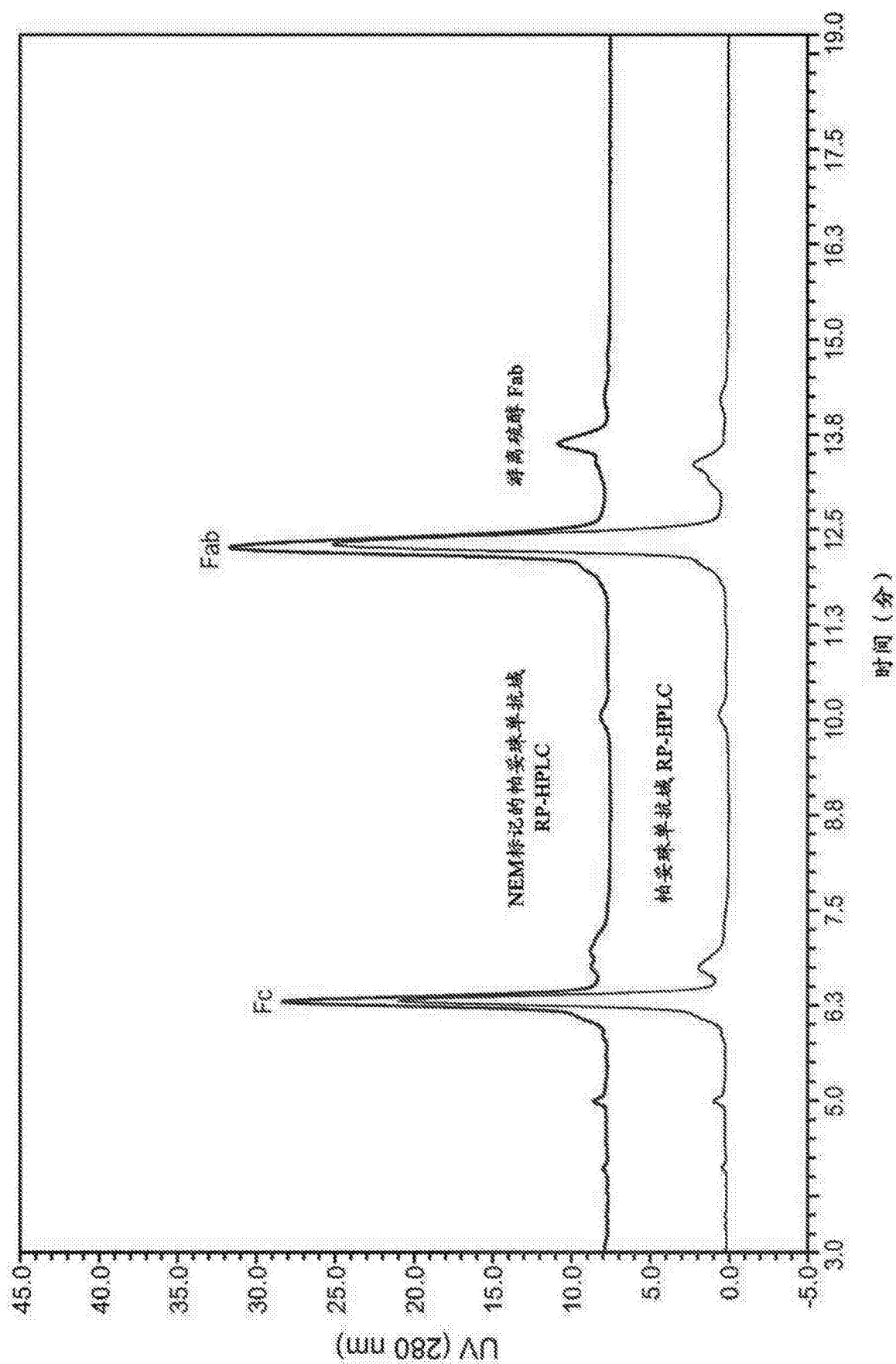


图 18

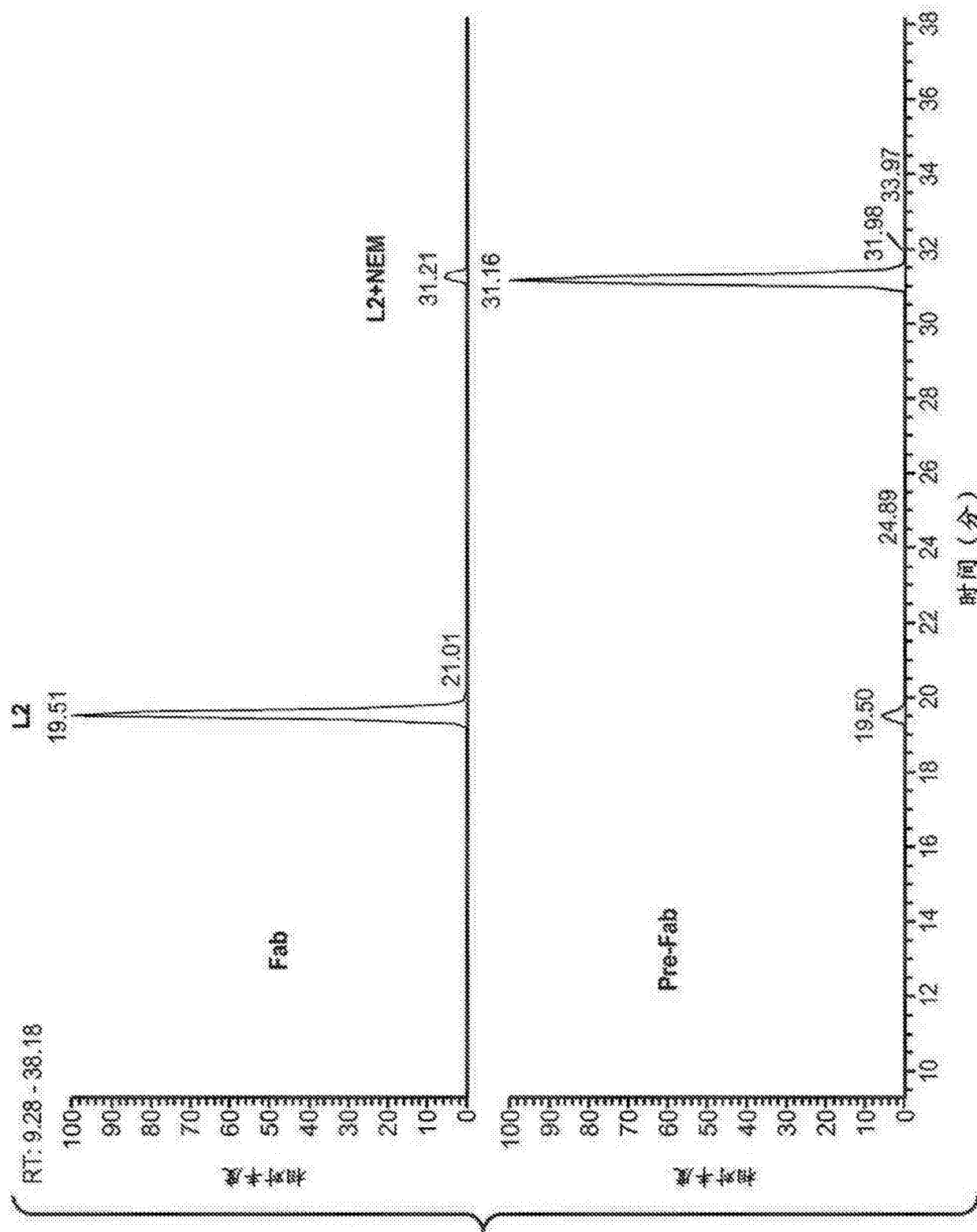


图 19

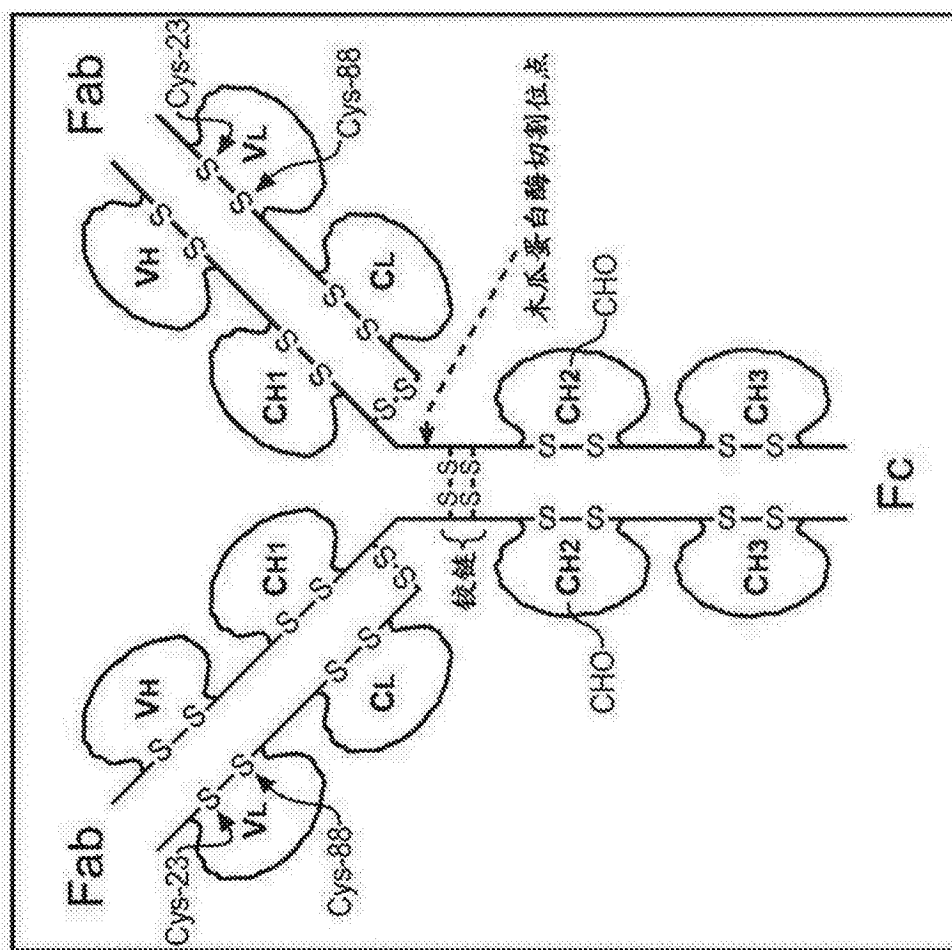


图 20A

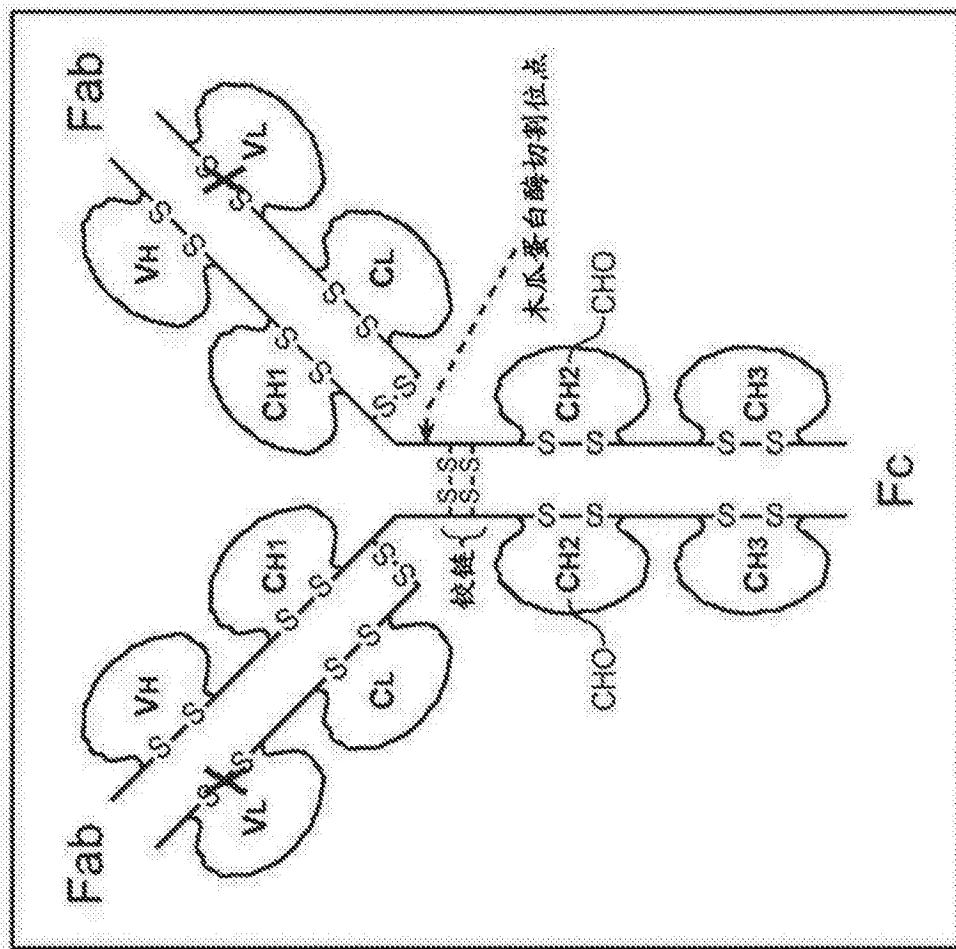


图 20C

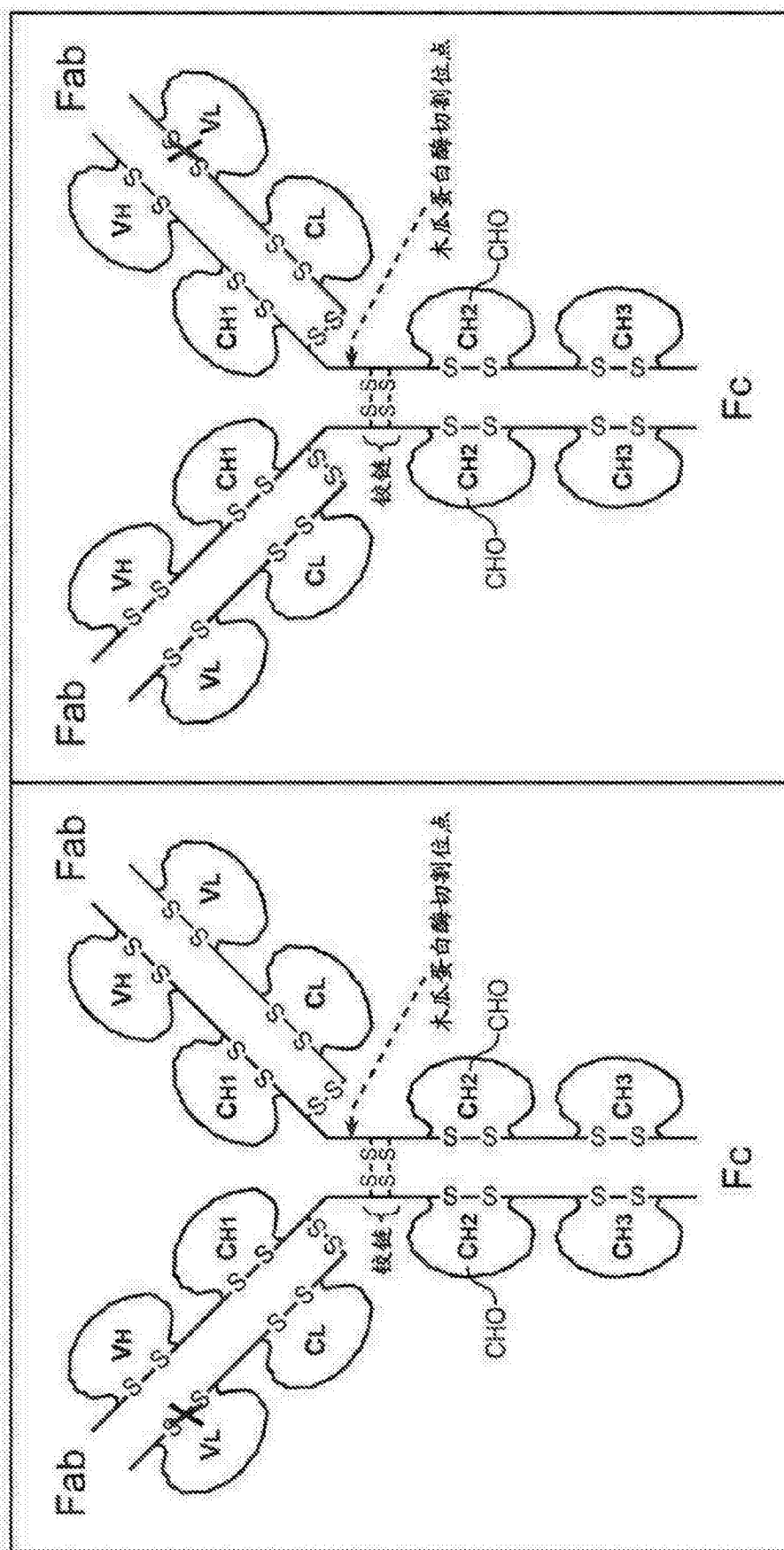


图 20B

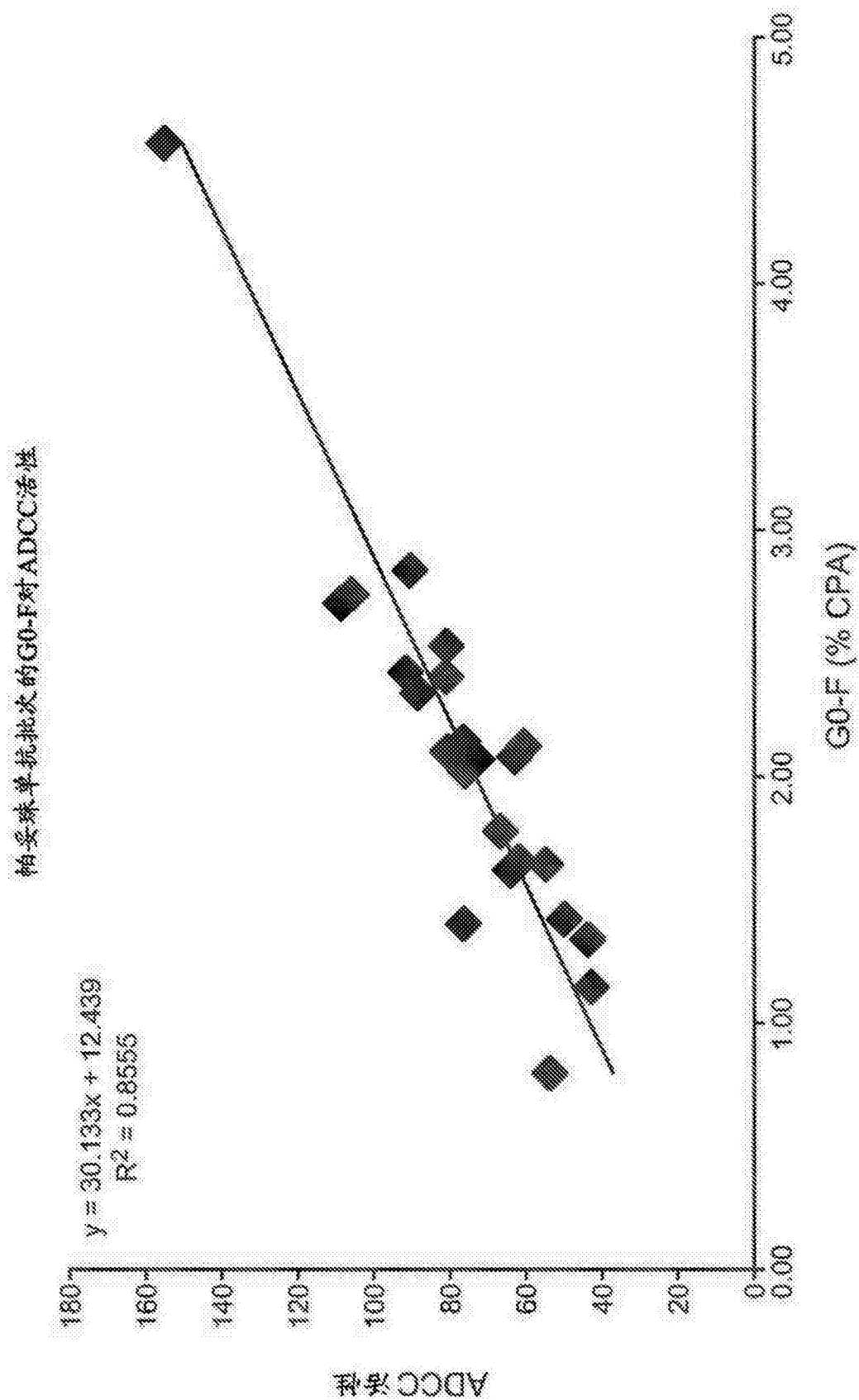


图 21

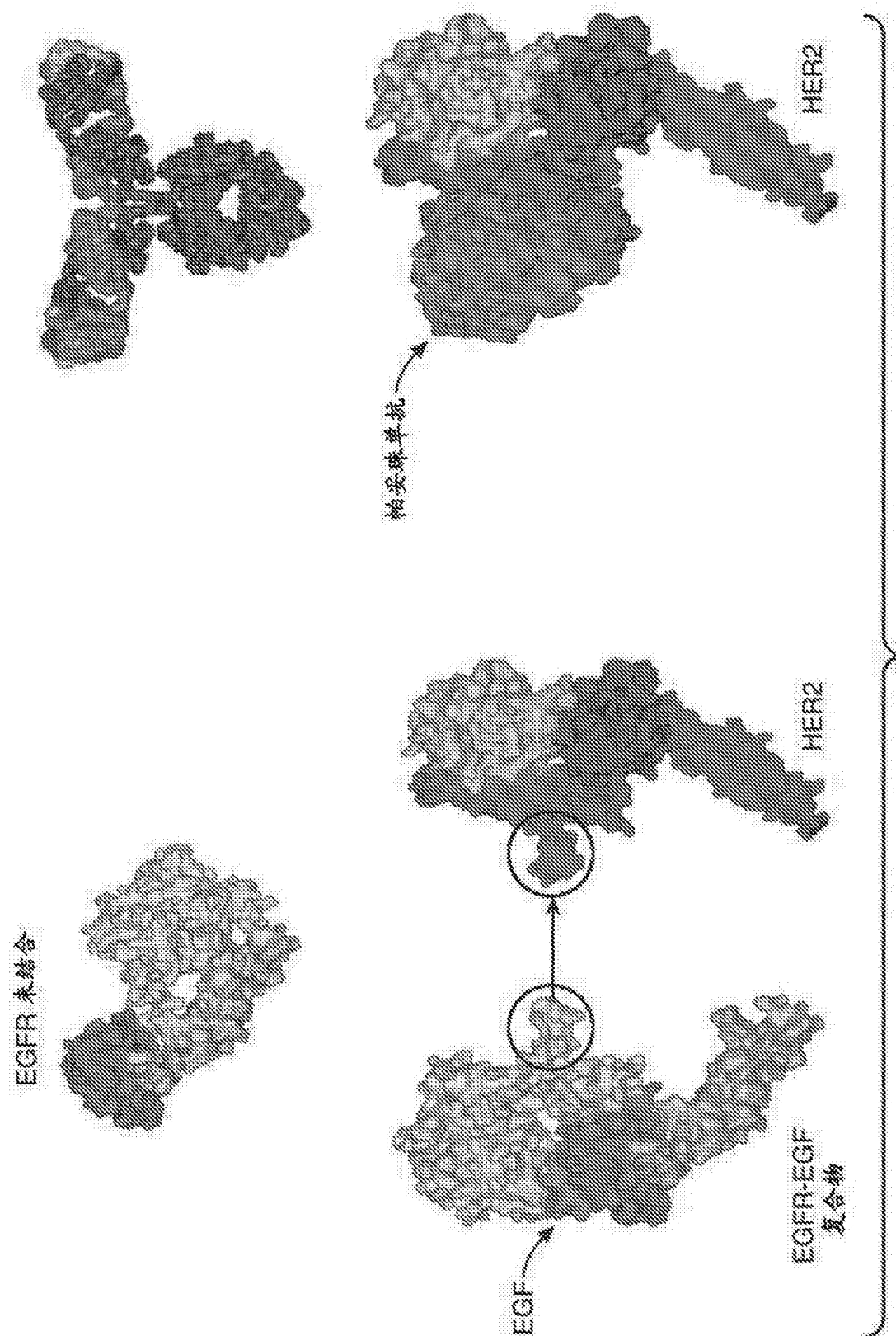


图 22

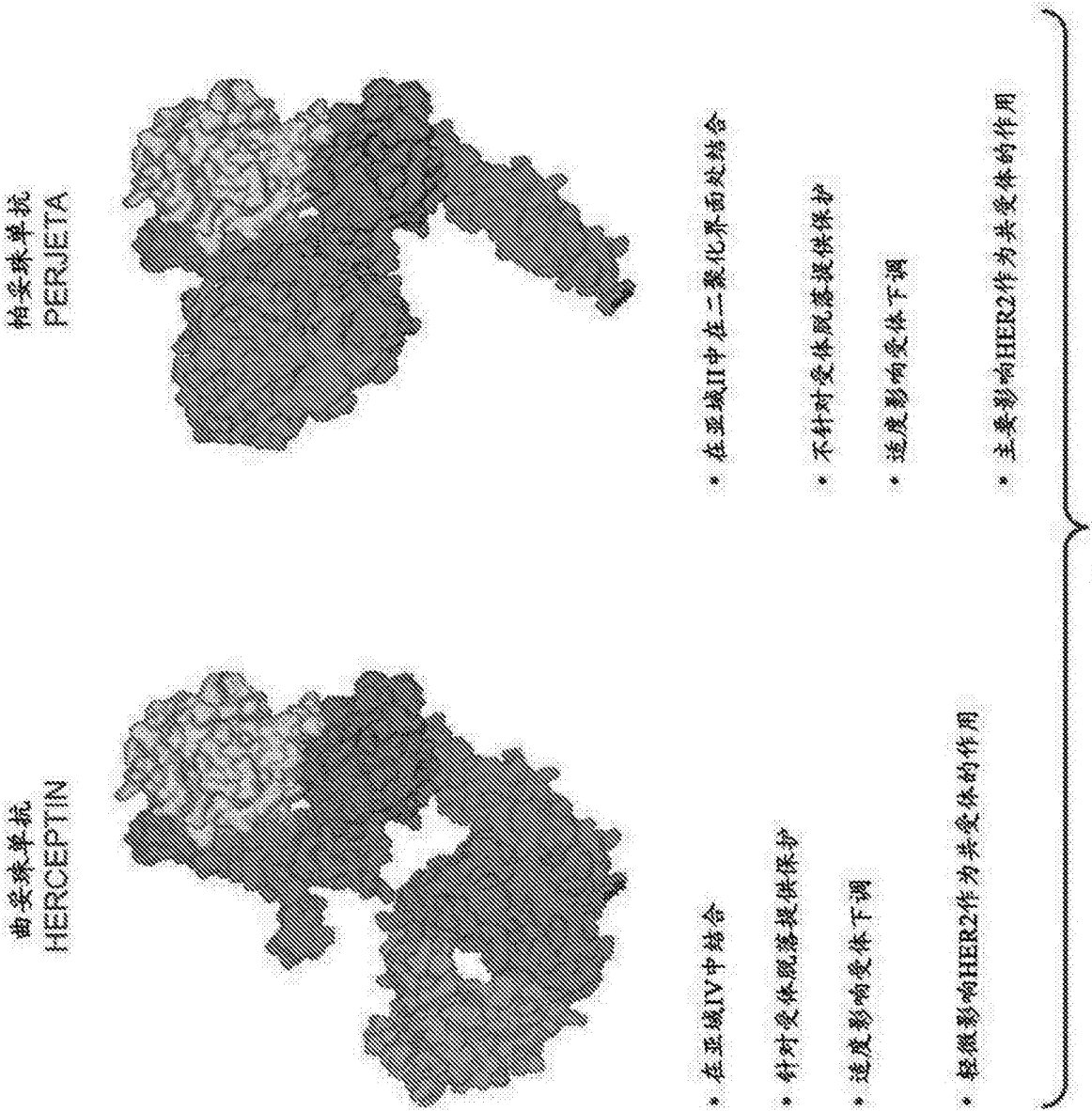


图 23

附着于IgG1的寡糖结构

结构	缩写	质量
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\cdot$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \begin{array}{c} \left\{ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\cdot \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{I} \end{array}$	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\cdot$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\cdot$	Man6	1398

图 24A

附着于IgG1的寡糖结构

结构	缩写	质量
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\begin{cases} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{cases} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-6)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G2	1788

这幅图中显示的质量对应于(M+Na)⁺值。

图 24B

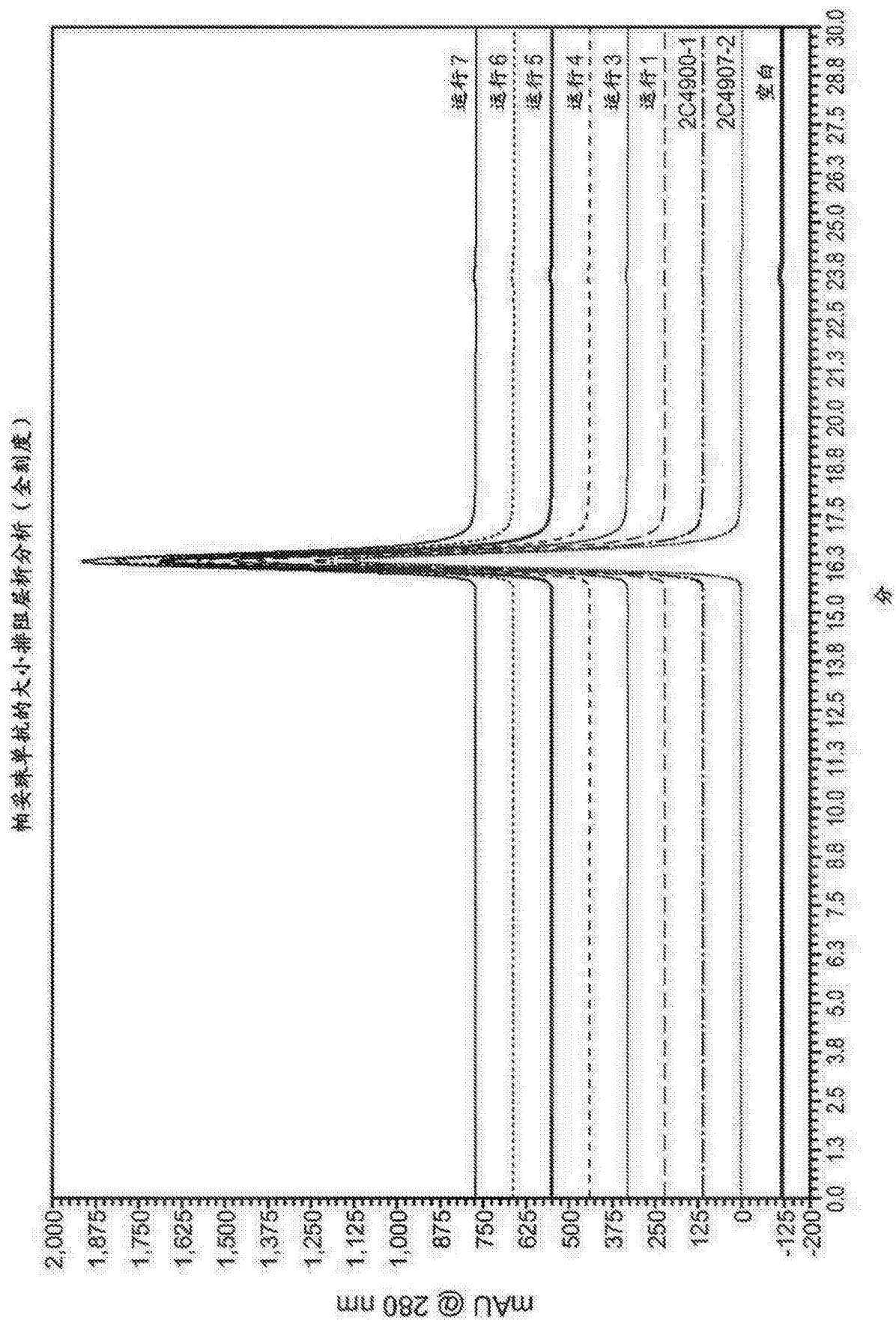


图 25

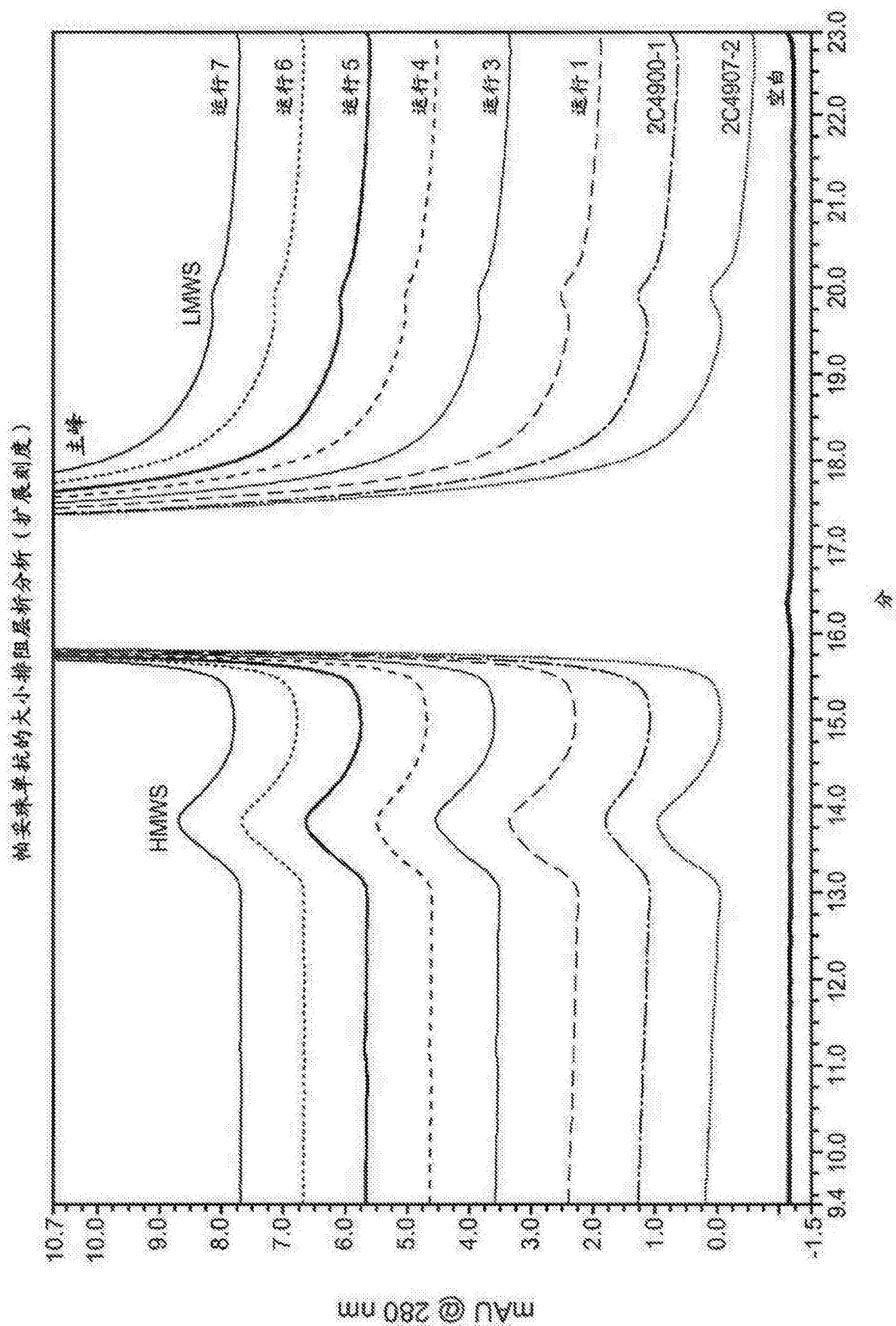


图 26

HMWS增多的帕妥珠单抗样品的SE-HPLC分析

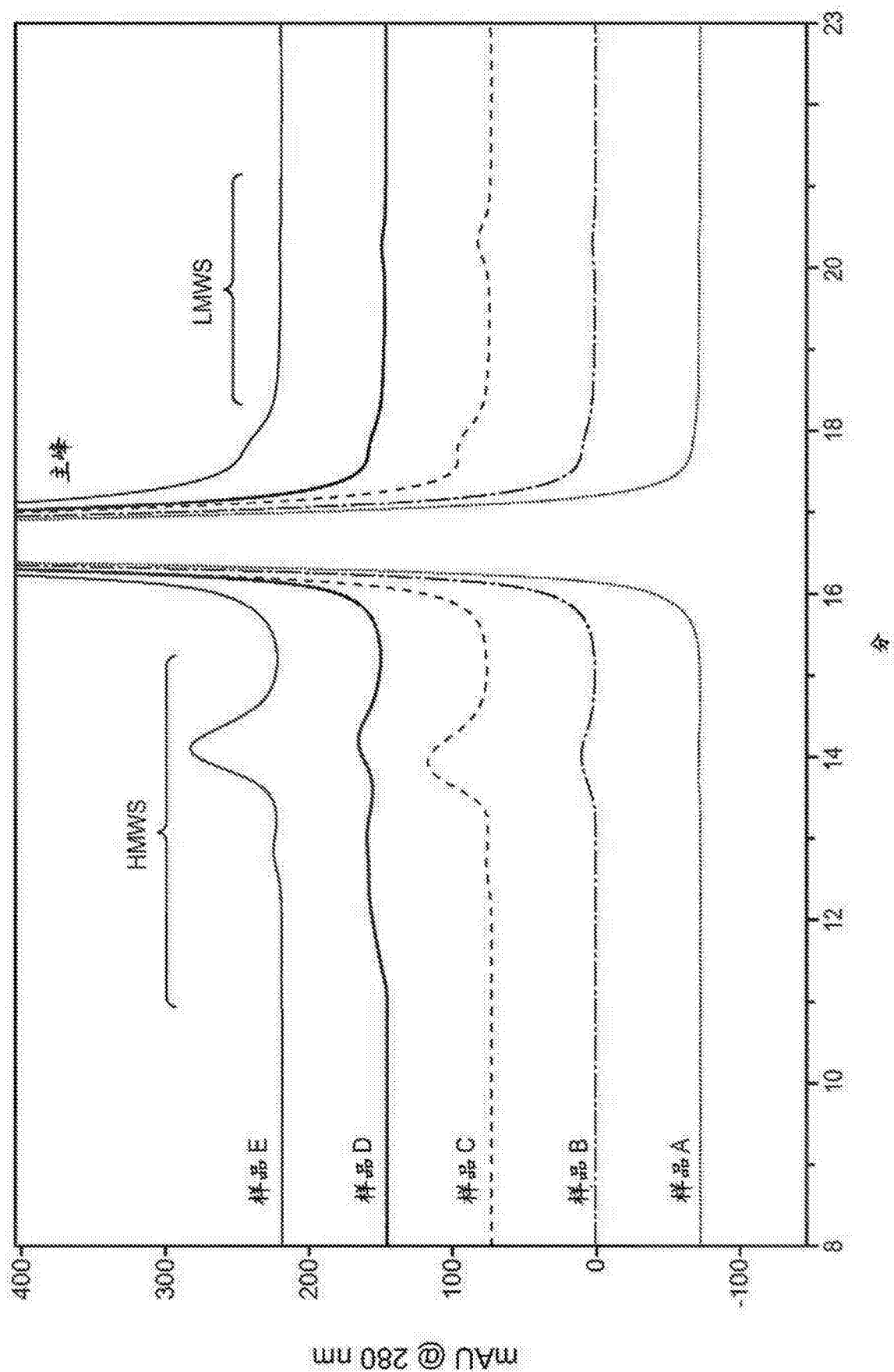


图 27

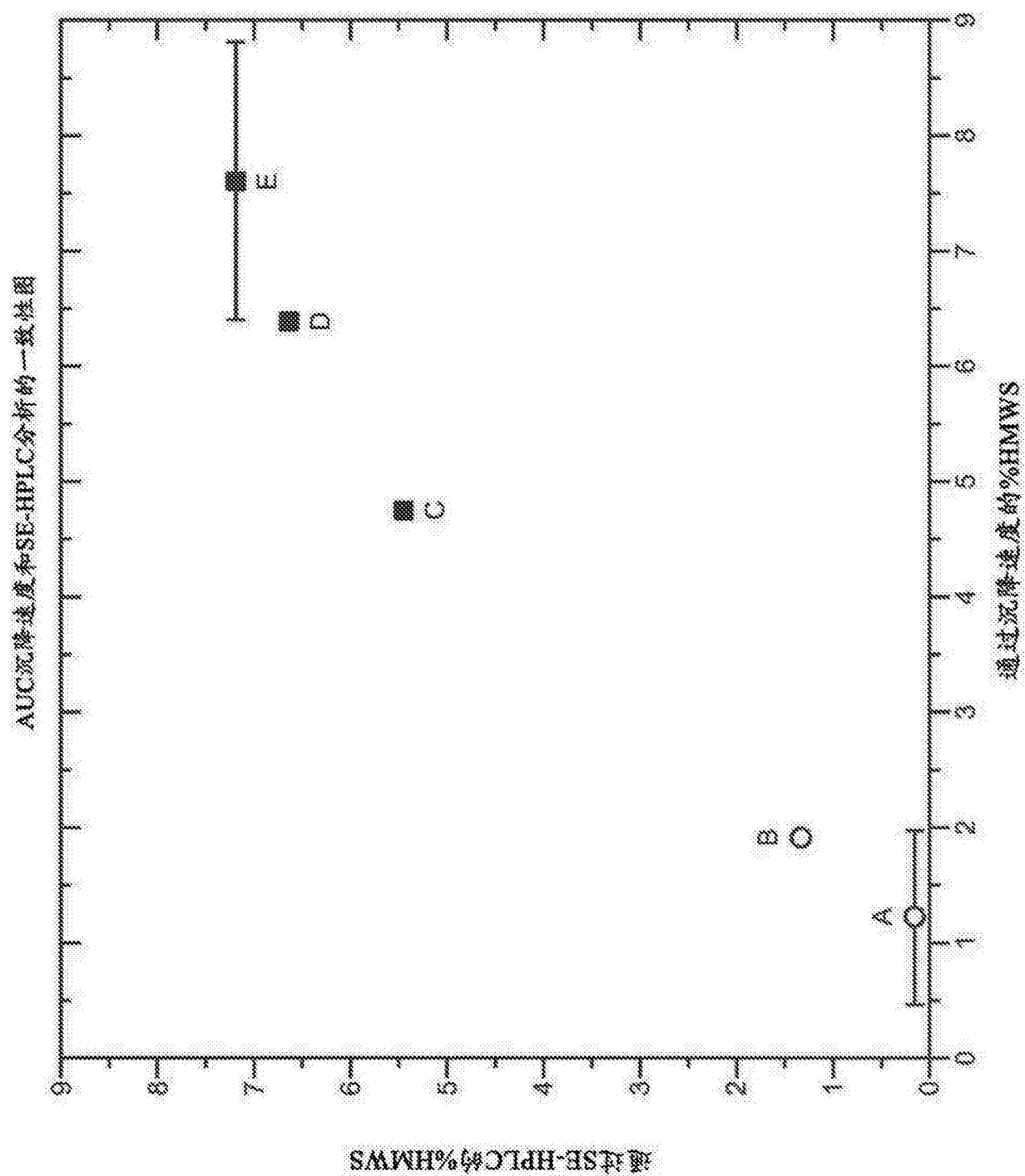


图 28

非还原帕安珠单抗的毛细管电泳十二烷基硫酸钠分析及激光诱导荧光检测

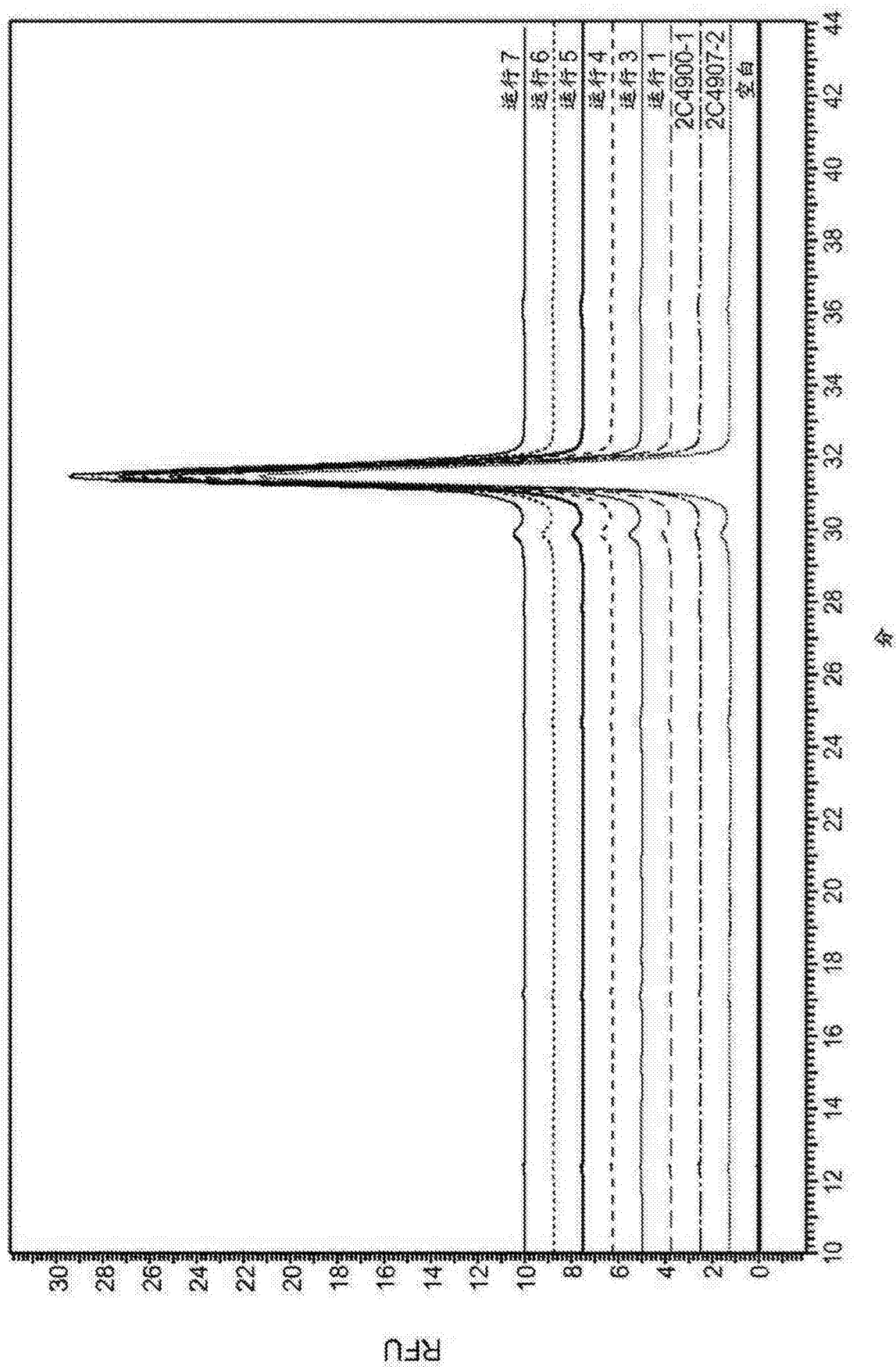


图 29

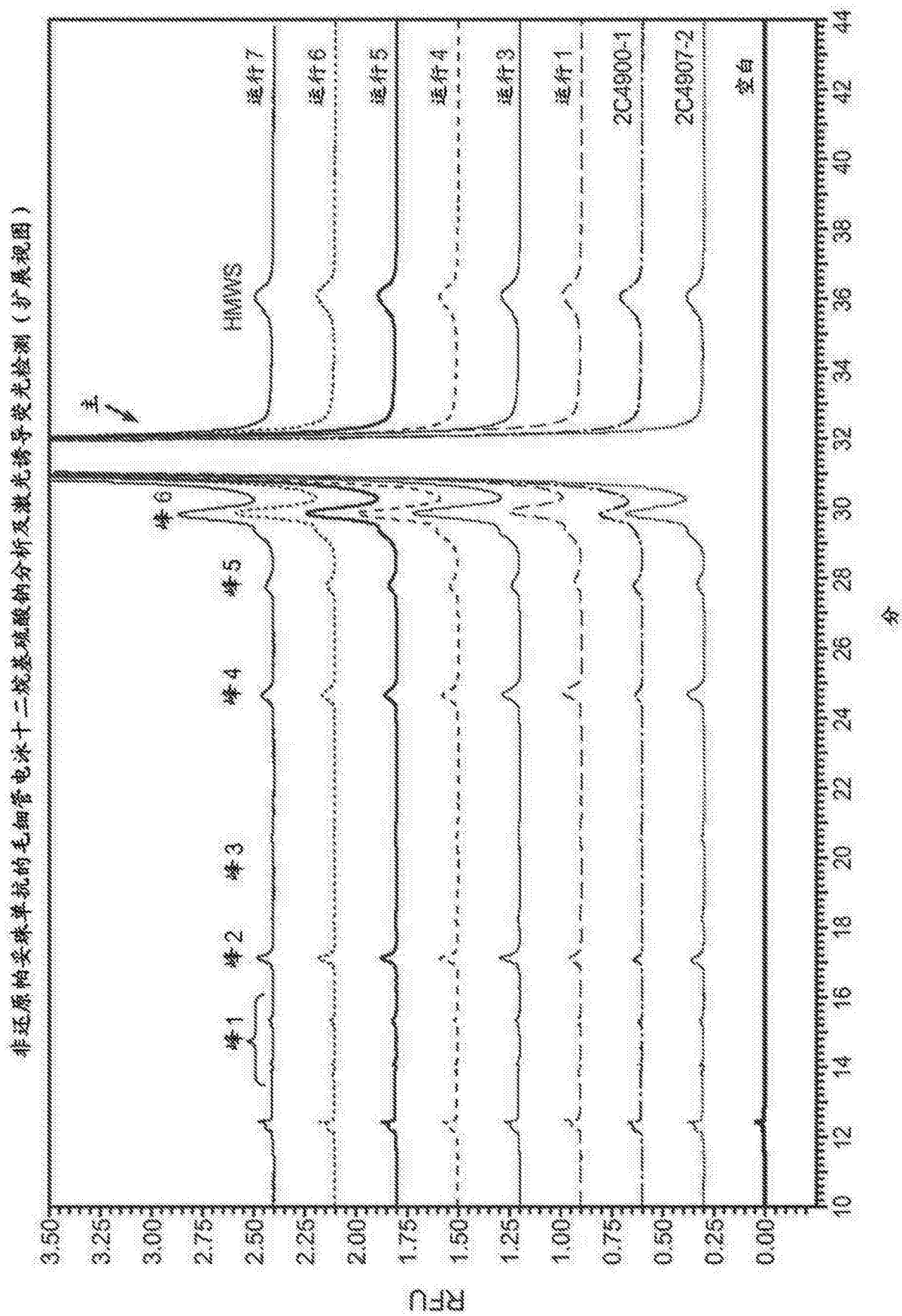


图 30

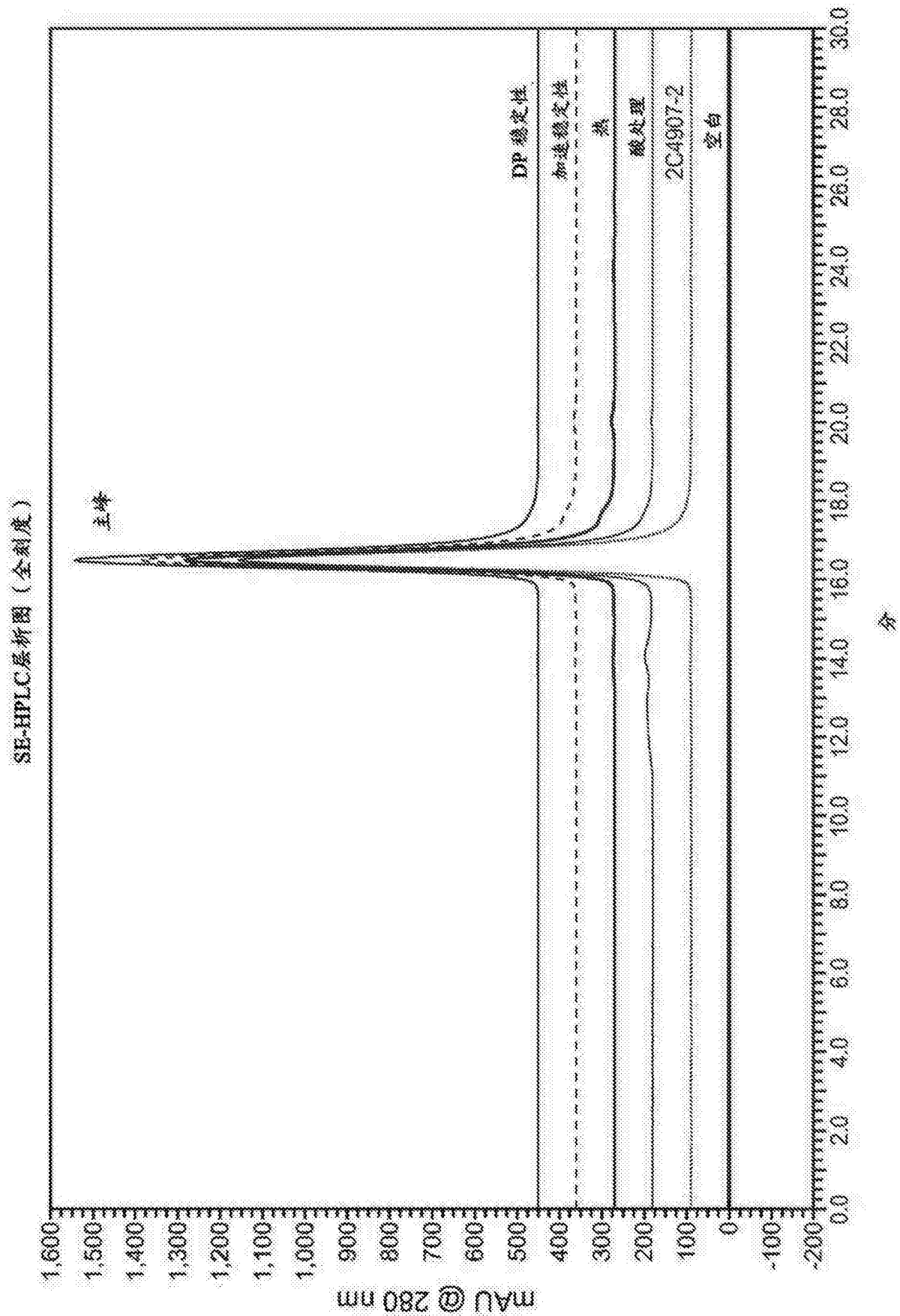


图 31A

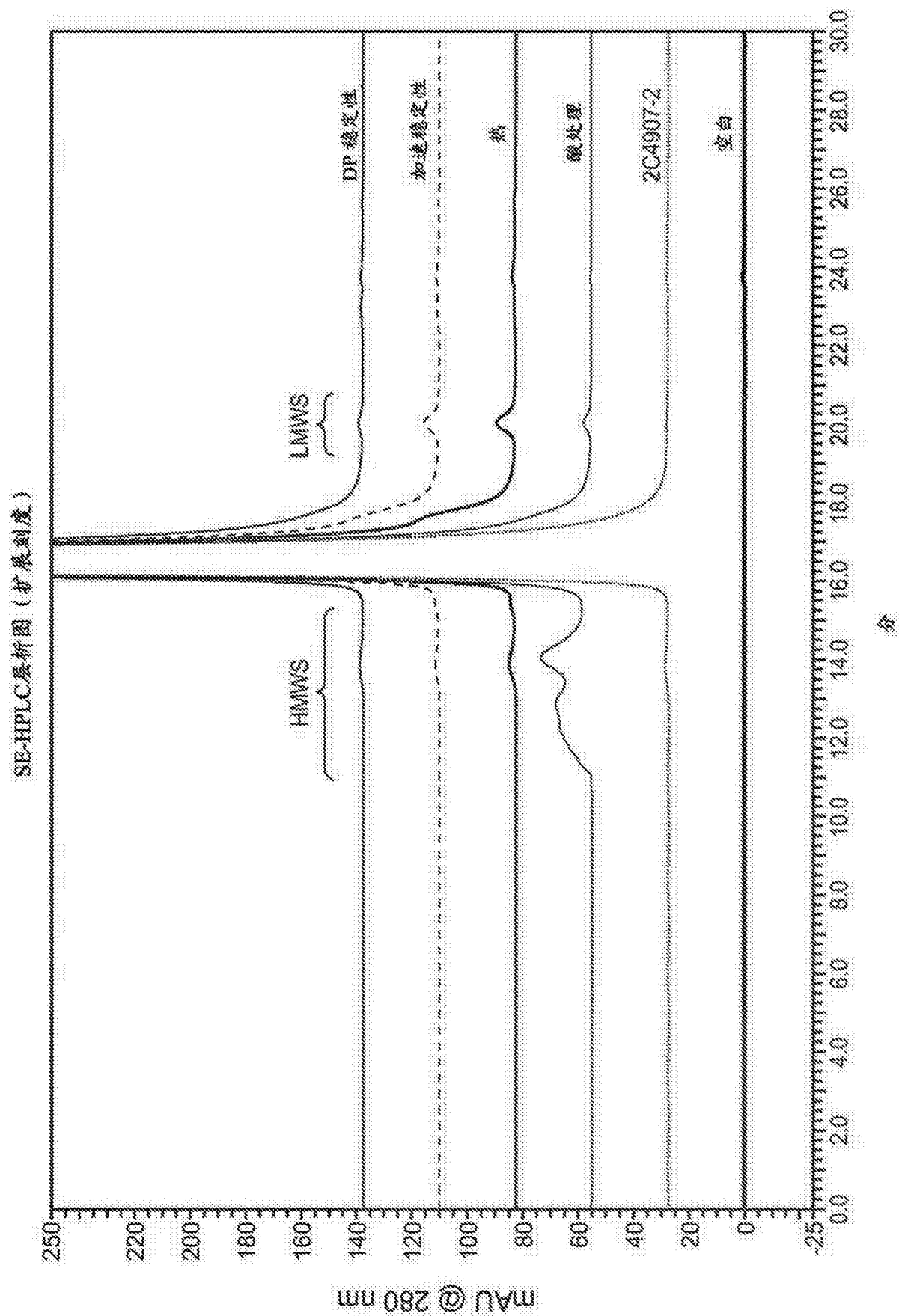


图 31B

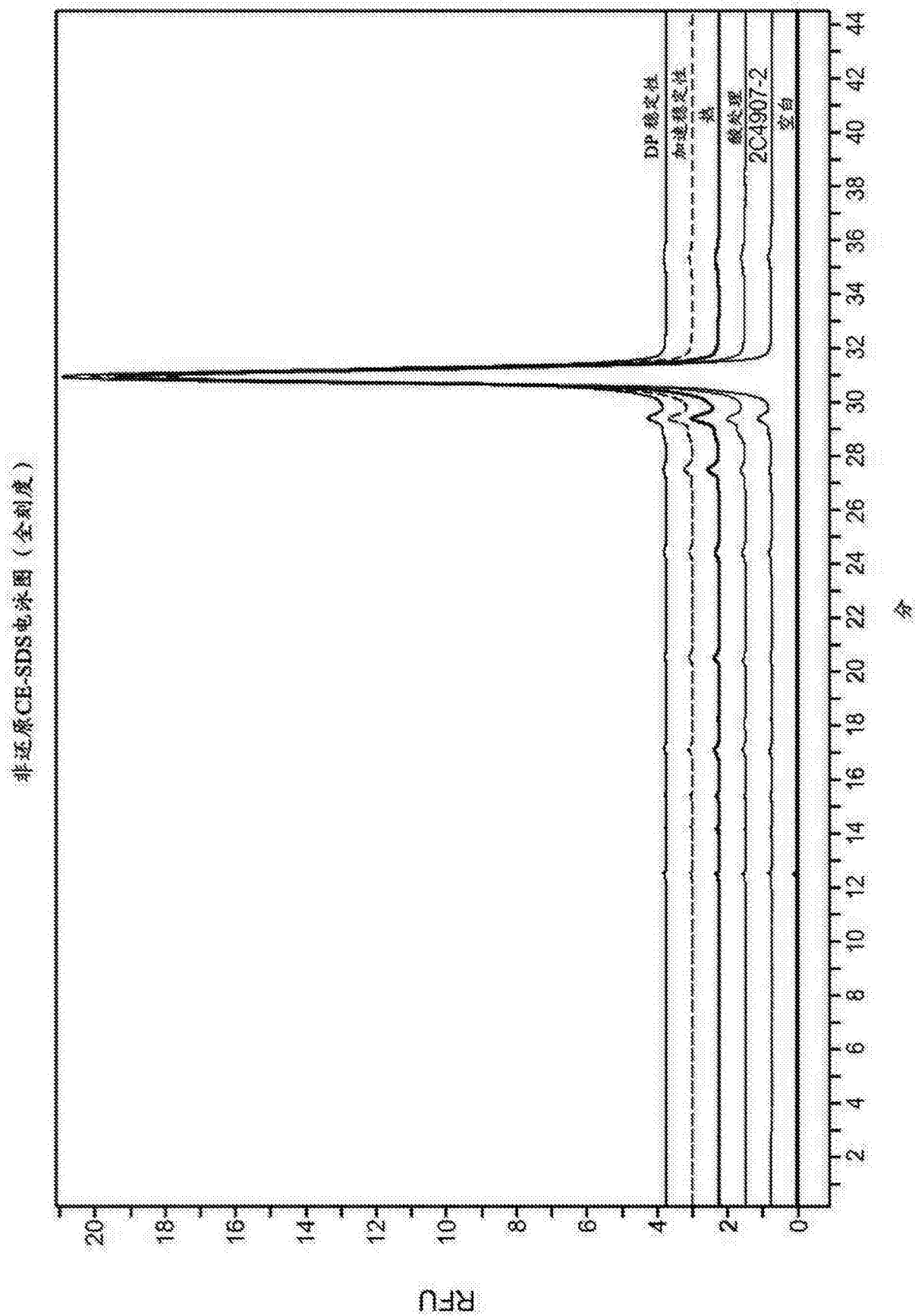


图 32A

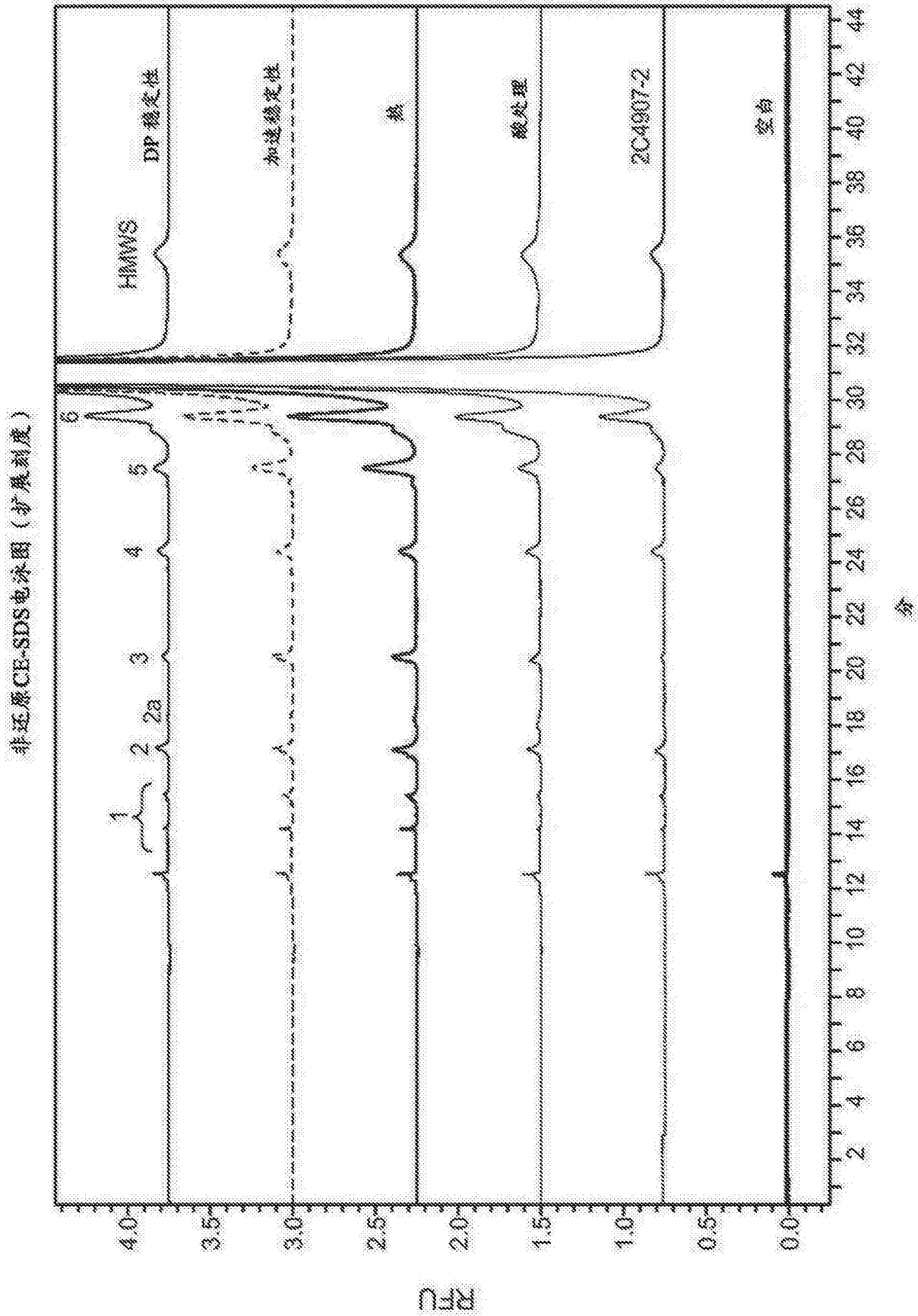


图 32B

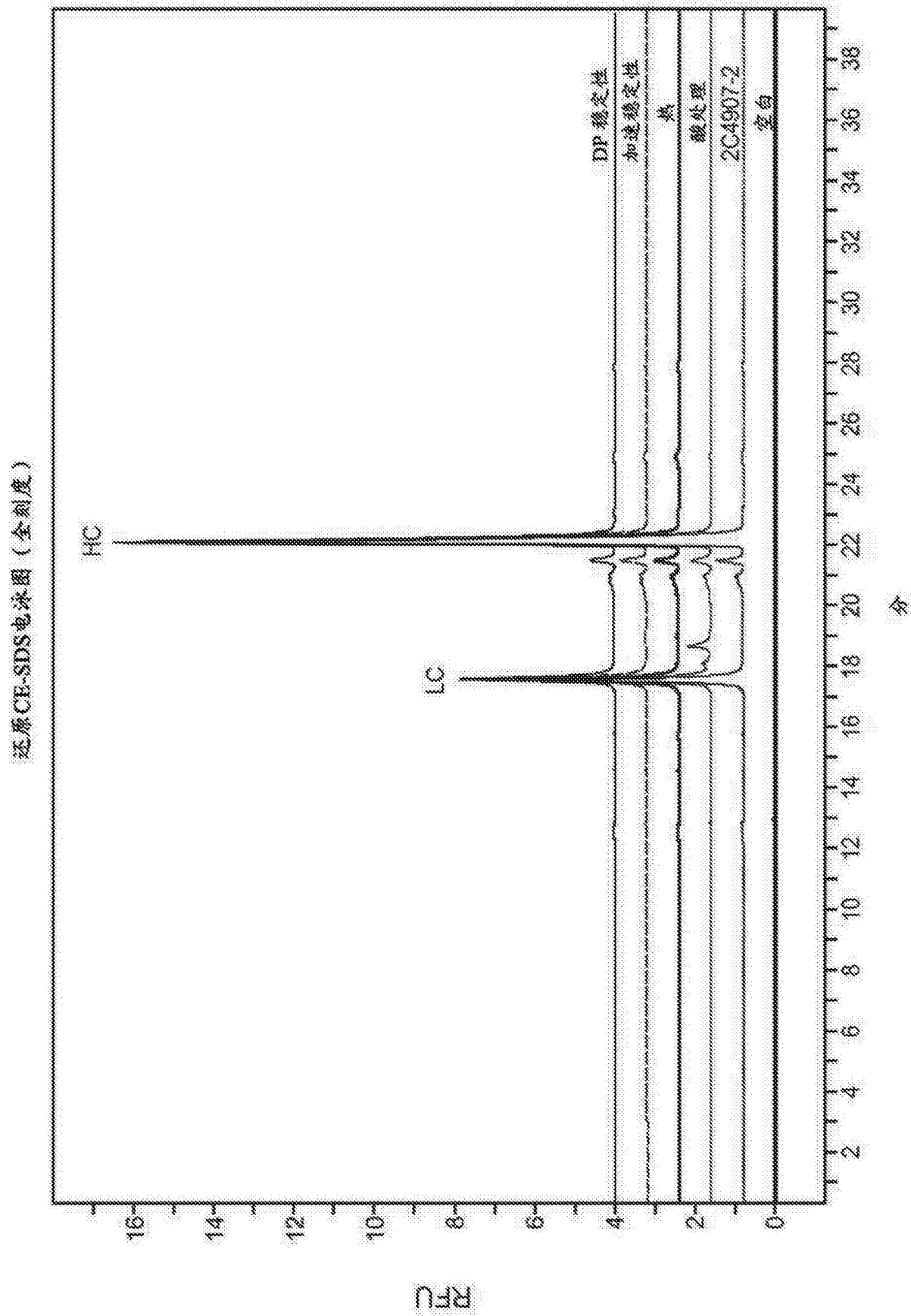


图 33A

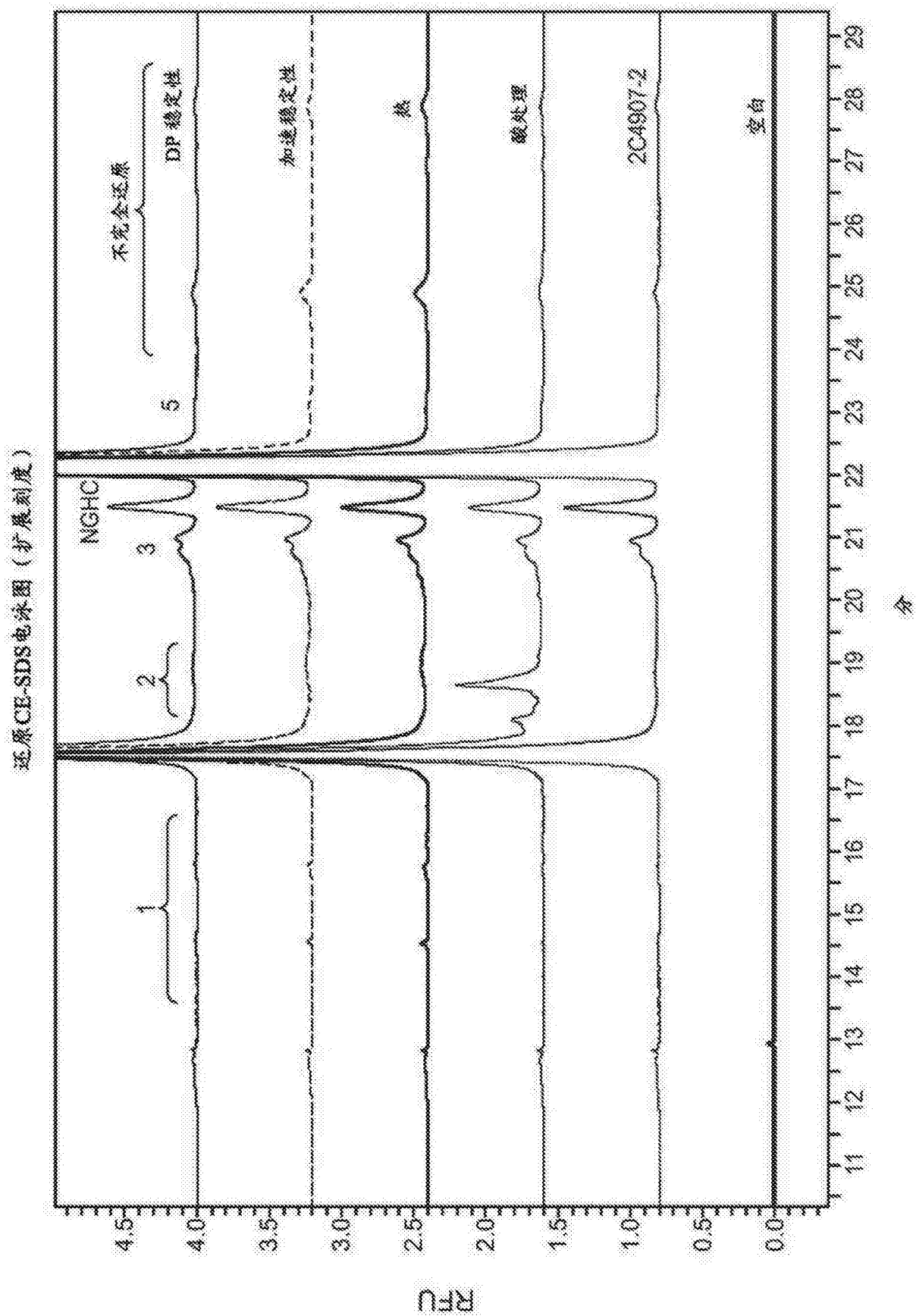


图 33B

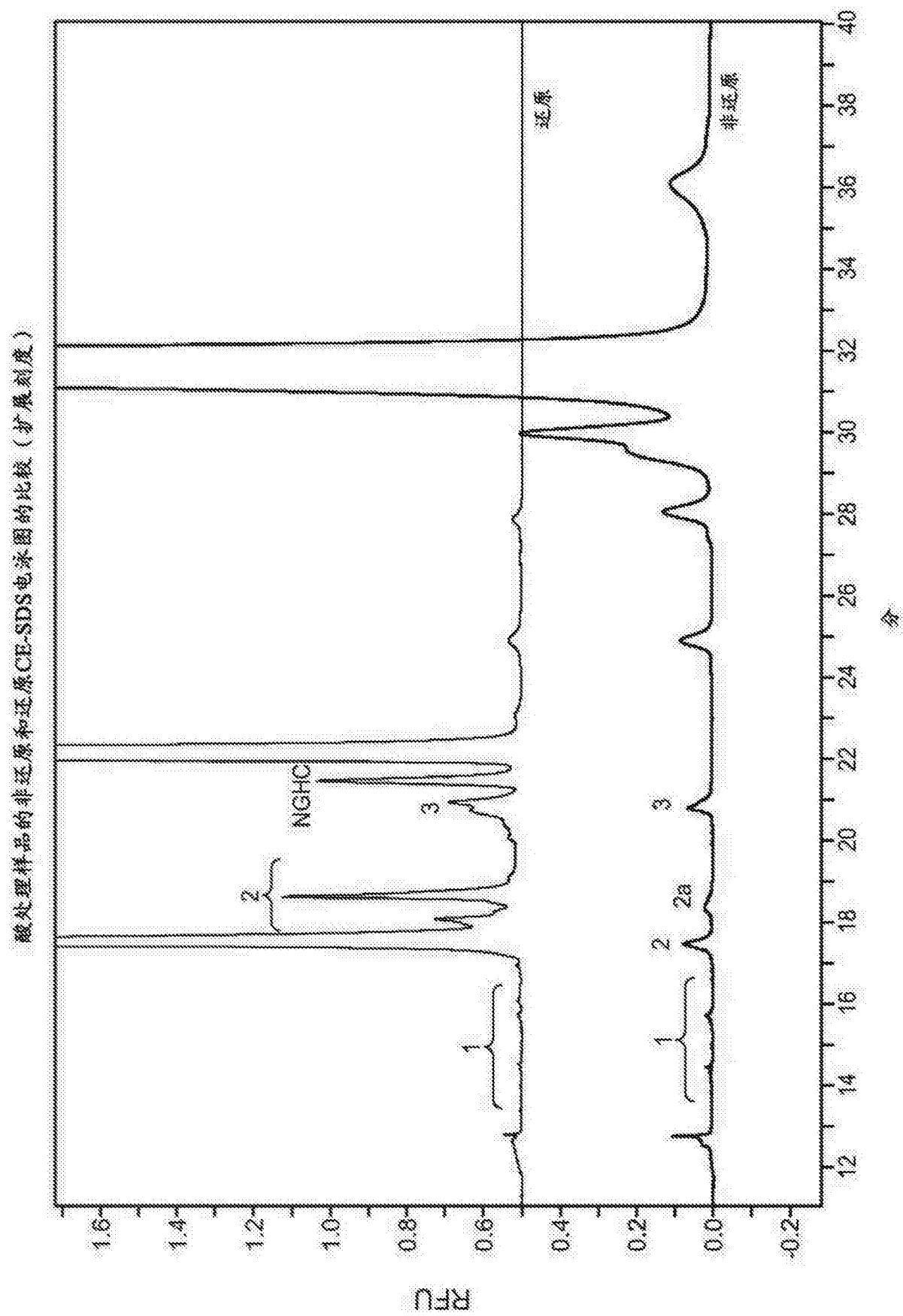


图 34

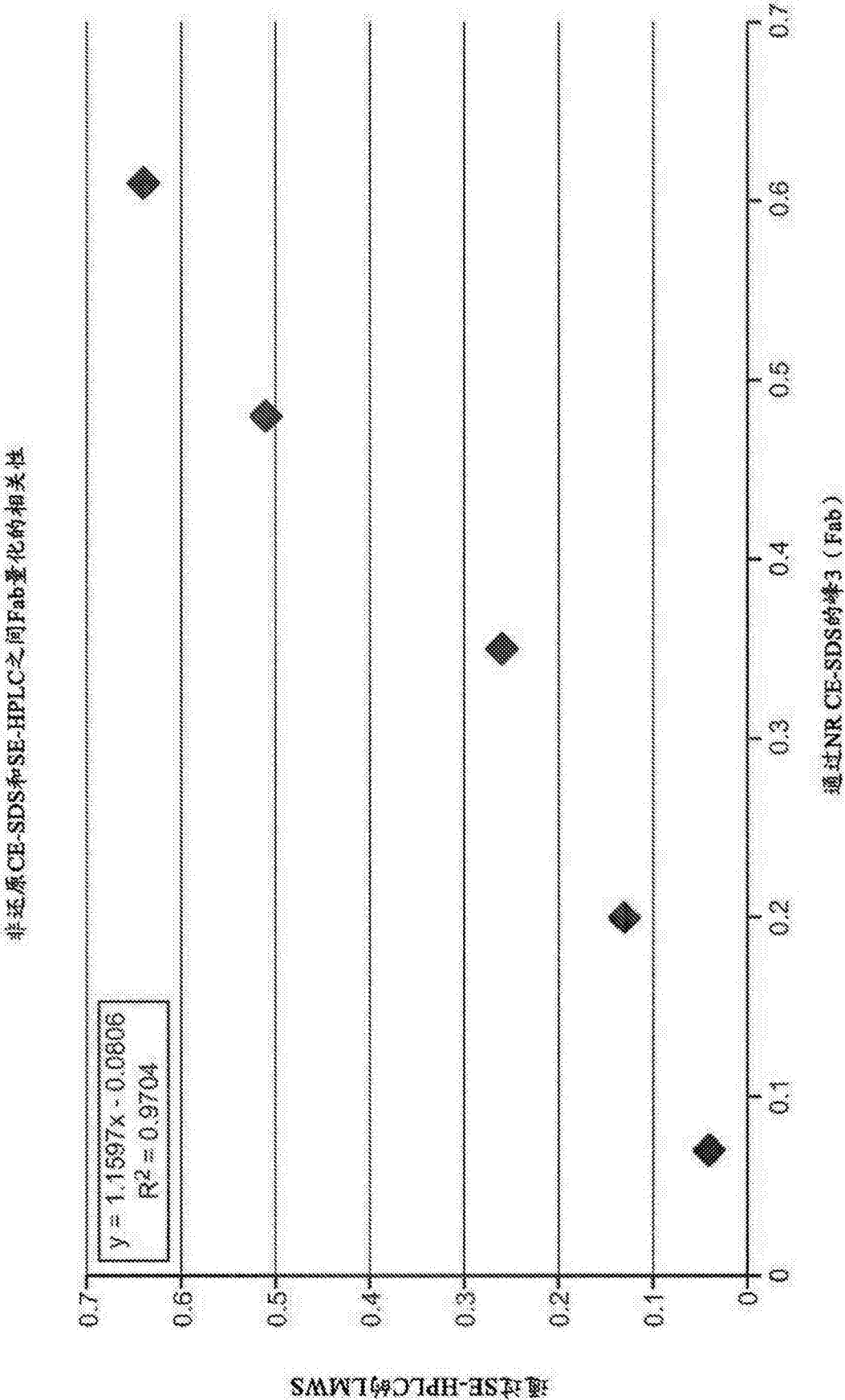


图 35