



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0085942
(43) 공개일자 2020년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7019835(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년04월15일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2015-7032283
원출원일자(국제) 2014년04월15일
심사청구일자 2019년04월09일

(85) 번역문제출일자 2020년07월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/034200

(87) 국제공개번호 WO 2014/172371
국제공개일자 2014년10월23일

(30) 우선권주장
61/812,603 2013년04월16일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 임크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자
겐나로, 린 에이.
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 임크. 내
카오, 응-호시양
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 임크. 내
장, 용화
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 임크. 내

(74) 대리인
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 페르투주맙 변이체 및 그의 평가

(57) 요 약

본 출원은 페르투주맙의 변이체를 개시한다. 특히, 이는 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체, 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체, 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)을 개시한다. 본 출원은 또한 단리된 변이체, 조성물, 제약 조성물, 및 변이체를 포함하는 제품, 및 변이체 및 그의 조성물을 제조 및 특성화하는 방법을 개시한다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

G01N 27/44747 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

페르투주맙 및 그의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 포함하며, 여기서 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체는 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체가 페르투주맙의 하나의 경쇄 가변 도메인에만 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 이종이량체 변이체인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체가 페르투주맙의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 동종이량체 변이체인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 페르투주맙 및 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체가 각각 서열 7 및 8의 경쇄 가변 및 중쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 페르투주맙 및 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체가 각각 서열 11 또는 15의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 12 또는 16의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 비푸코실화된 변이체, 저분자량 종 (LMWS), 고분자량 종 (HMWS), 당화된 변이체, 디슬피드 환원된 변이체, 비-환원성 변이체, 탈아미드화된 변이체, 시알릴화된 변이체, VHS-변이체, C-말단 리신 변이체, 메티오닌-산화된 변이체, G1 글리코실화 변이체, G2 글리코실화 변이체 및 비-글리코실화된 중쇄 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 페르투주맙의 1종 이상의 추가의 변이체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, Fab 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에, 조성물 중의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 양이 약 25% 이하인 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 무손상 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에, 조성물 중의 동종이량체 변이체의 양이 4.9% 이하인 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서, 무손상 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에, 조성물 중의 이종이량체 변이체의 양이 약 13% 내지 약 18%인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, Fab 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에, 분석 검정을 거쳐 조성물 중의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 양이 약 25% 이하로 확인된 조성물.

청구항 11

페르투주맙, 및 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 포함하며, 여기서 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 0.9 내지 4.1%인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 비푸코실화된 변이체의 양이 조성물의 2% 초과인 조성물.

청구항 13

페르투주맙, 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)의 혼합물을 포함하며, 여기서 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC)에 의해 결정시에, LMWS의 양은 1.6% 이하이고, HMWS의 양은 1.7% 이하인 조성물.

청구항 14

페르투주맙, 피크 1 및 피크 2의 혼합물을 포함하며, 여기서 환원 모세관 전기영동 소듐 도네실 슬페이트 (R-CE-SDS) 검정에 의해 측정시에, 피크 1의 양은 0.5% 이하이고, 피크 2의 양은 1.0% 이하인 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항, 제8항, 제9항 및 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물 및 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 따른 제약 조성물을 내부에 갖는 용기, 및 암 환자를 치료하기 위해 상기 제약 조성물을 사용하는 것을 사용자에게 지시하는 처방 정보를 갖는 패키지 삽입물을 포함하는 제품.

청구항 17

제1항 내지 제3항, 제8항, 제9항 및 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 암을 갖는 환자를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 암이 유방암, 위암, 난소암, HER2-양성 암 또는 낮은 HER3 암인 것인 제약 조성물.

청구항 19

(1) 조성물 중의, 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 양을 측정하거나; (2) 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙의 양을 측정하거나; 또는 (3) 조성물 중의 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 또는 고분자량 종 (HMWS)의 양을 측정하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 평가 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, (1), (2) 및 (3) 중 2 또는 3가지를 포함하는 방법.

청구항 21

조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙 변이체의 양을 측정하여 조성물의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성을 결정하고, 비푸코실화된 페르투주맙의 양이 약 0.9% 내지 약 4.1%의 범위임을 확인하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 생물학적 활성의 평가 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 모세관 전기영동-레이저-유도 형광법 (CE-LIF)을 이용하여 비푸코실화된 페르투주맙의 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 23

(1) 페르투주맙 및 1종 이상의 그의 변이체를 포함하는 조성물을 제조하고, (2) 이와 같이 제조된 조성물을 분석 검정하여 조성물 중의 변이체(들)의 양을 평가하는 것을 포함하며, 여기서 변이체(들)는 (i) 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; (ii) 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체; (iii) 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS); 또는 (iv) 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS)을 포함하는 것인 조성물의 제조 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, (1)이 재조합 차이니스 햄스터 난소 (CHO)로부터 페르투주맙 및 변이체(들)를 제조 규모로 발현시키고, 조성물을 정제하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

(a) 페르투주맙의 하나의 경쇄 가변 도메인에만 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 이종이량체 변이체인, 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; (b) 페르투주맙의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 동종이량체 변이체인, 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; (c) 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체; (d) 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS); 또는 (e) 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS)을 포함하는, 페르투주맙의 단리된 변이체.

청구항 26

환원 모세관 전기영동 소듐 도데실 슬레이트 (R-CE-SDS) 검정에 의해 조성물 중의 피크 1 및 피크 2의 양을 측정하고, 피크 1의 양이 5% 이하이고, 피크 2의 양이 1.0% 이하임을 확인하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 단편화의 평가 방법.

청구항 27

(1) 페르투주맙 및 1종 이상의 그의 단편을 포함하는 조성물을 제조하고, (2) 이와 같이 제조된 조성물을 분석 검정하여 조성물 중의 피크 1 및 피크 2의 양을 평가하는 것을 포함하는 조성물의 제조 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 37 CFR § 1.53(b) 하에 출원된 본 비-가출원은 그 전문이 참고로 도입되는 2013년 4월 16일에 출원된 미국 가출원 제61/812,603호의 35 USC § 119(e) 하의 우선권을 주장한다.

서열 목록

[0003] 본 출원은 EFS-웹을 통해 제출되고, 그 전문이 본원에 참고로 도입되는 서열 목록을 함유한다. 2014년 4월 8일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P5584R1-W0_SeqList.txt로 명명되고, 크기가 31,363 바이트이다.

기술 분야

[0005] 본 발명은 페르투주맙 (Pertuzumab)의 변이체에 관한 것이다. 특히, 이는 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체, 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체, 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단리된 변이체, 조성물, 제약 조성물, 및 변이체를 포함하는 제품, 및 변이체 및 그의 조성물을 제조 및 특성화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 페르투주맙 (페르제타(PERJETA)®) (rhuMAb 2C4로도 지칭됨)은 "HER 이량체화 억제제"로 지칭되는 제제의 라인에서 그의 부류의 첫번째 모노클로날 항체 (MAb)이다. 이는 HER2에 결합함으로써 HER2와 다른 HER 수용체의 이량체화를 억제하고, 이에 따라 종양 성장을 억제한다. 페르투주맙은 2012년 6월 8일에 HER2-양성 전이성 유방암의 치료에 대해 미국 식품 의약국 (US FDA)의 승인을 받았다.

[0007] 미국 특허 제7,862,817호 (아담스 (Adams) 등)에는 인간화 2C4 버전 574로 지칭되는 2C4 항체 또는 재조합 인간화 모노클로날 항체 2C4 (rhuMAb 2C4)의 인간화 변이체가 기재되어 있다. 항체는 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 세포의 도메인 (ECD)에서 서브도메인 II에 결합하였다. rhuMAb 2C4 항체는 실험실 규모에서 제조되었으며, HER2에 결합하고, MDA-175 세포 (1+ 수준에서 HER2를 발현함) 및 마우스 내로 이식된 MCF7 이종이식편의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 문헌 [Adams et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 55(6):717-727 (2006)]을 참조한다.

[0008] 미국 특허 제6,339,142호 (블랭크 (Blank) 및 바시 (Basey))에는 항-HER2 항체 및 1종 이상의 그의 산성 변이체의 혼합물을 포함하며, 산성 변이체(들)의 양이 약 25% 미만인 HER2 항체 조성물이 기재되어 있다. 인간화 모노클로날 항체 4D5 변이체 8 (humMAb4D5-8 또는 트라스투주맙 (Trastuzumab))은 예시적 HER2 항체이다.

[0009] 미국 특허 제7,560,111호, 미국 특허 제7,879,325호 및 미국 특허 제8,241,630호 (카오 (Kao) 등)에는 항체의 하나 또는 둘 다의 경쇄 상에 아미노 말단 리더 연장 (VHS-)을 포함하는 페르투주맙의 변이체 (rhuMAb 2C4), 소위 "VHS-변이체"가 기재되어 있다. 참조 물질 (I상), 로트 S9802A (II상) 및 400 L 규모 공정 전개 물질을 천연 조건에서 엘만 (Ellman) 분석을 이용하여 유리 티울에 대해 시험했을 때, 유리 티울 수준은 시험된 모든 물질에서 검출 한계 미만이었다. 시험된 조성물 중의 페르투주맙의 1 내지 2%는 모세관 전기영동 (CE)에 의해 측정된 바와 같이 비푸코실화되었다 (G0-F). 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등)의 표 5를 참조한다.

[0010] WO 2009/099829 (해리스 (Harris) 등)에는 탈아미드화된 변이체, 당화된 변이체, 디슬피드 환원된 변이체, 비-환원성 변이체 및 시알릴화된 변이체를 포함하는 페르투주맙의 산성 변이체가 기재되어 있다. 변이체는 하기로 개시된 바와 같이 특성화되었다.

[0011] [표 1]

[0012] WO 2009/099829 (해리스 등)의 산성 변이체

산성 변이체의 특성화 방법		
방법	검출된 변이체	변이체 명칭
CEX +/- 시알리다제 처리	6% 시알릴화됨	시알릴화된 변이체
환원된 CE-SDS	1.5% 불완전하게 환원됨	비-환원성 변이체
비-환원된 CE-SDS	6% 환원된 디슬피드	디슬피드 환원된 변이체
보로네이트 크로마토그래피	3.5% 당화됨 (고차)	당화된 변이체
펩티드 맵	탈아미드화됨	탈아미드화된 변이체

[0013]

[0014] CEX = 양이온 교환. CE-SDS = 소듐 도데실 슬레이트를 사용한 모세관 전기영동.

[0015] WO 2009/099829 (해리스 등)에서 디슬피드 환원된 변이체를 특성화하는 데 사용된 실험 방법인 무손상 항체의 비-환원 CE-SDS는, 쇄-내 디슬피드 결합보다는 환원된 쇄-간 디슬피드 결합을 평가하였다.

[0016] 문헌 [Zhang et al. *Anal. Chem.* 84(16):7112-7123 (2012)]은 그의 중쇄 가변 (VH 도메인)에 쌍형성되지 않은 시스테인 (Cys22 및 Cys96)을 갖는 재조합 항체 (mAb A)를 보고하고 있다. 쌍형성되지 않은 시스테인은 CD20에 대한 항체의 결합에 유의한 영향을 주지 않는 것으로 밝혀졌으며, 쌍형성되지 않은 시스테인을 갖는 mAb A는 효능 검정 (보체-의존성 세포독성, CDC, 검정)에서 완전히 활성화되었다.

[0017] WO 2009/009523 (카오 등)에는 CD20에 결합하는 오크레클리주맙 (rhuMAb 2H7) 항체의 재조합 생성 동안의 쇄-간 디슬피드 결합 환원의 방지가 개시되어 있다.

[0018] 문헌 [Harris, R. *Dev. Biol.* (Basel, Switzerland) 122: 117-127 (2005)]은 인간화 항-IgE 항체인 오말리주맙의 중쇄 가변 (VH) 도메인에서의 쌍형성되지 않은 시스테인 (Cys22 및 Cys96)을 개시하였다. 쌍형성되지 않은 시스테인 형태는 유의하게 보다 낮은 효능을 가졌다.

발명의 내용

[0019] 본원의 실험 데이터는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체, 비푸코실화된 변이체, 저분자량 종 (LMWS) 및 고분자량 종 (HMWS)을 포함하는, 페르투주맙의 변이체 형태에 관한 것이다. 이들 변이체를 확인, 특성화 및 정량화하는 수단은 페르투주맙 약물 조성물에 대한 제조 및 품질 제어 방법에 있어서 유용하다.

[0020] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 페르투주맙 및 그의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 포함하며, 여기서 쌍

형성되지 않은 시스테인 변이체는 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 것인 조성물에 관한 것이다. 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체는 이종이량체 변이체(페르투주맙의 하나의 경쇄 가변 도메인에만 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함함) 및/또는 동종이량체 변이체(페르투주맙의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함함)를 포함한다.

[0021] 조성물은 임의로 1종 이상의 페르투주맙의 추가의 변이체, 예컨대 비푸코실화된 변이체, 저분자량 종 (LMWS) 변이체, 고분자량 종 (HMWS) 변이체, 당화된 변이체, 디슬피드 환원된 변이체, 비-환원성 변이체, 탈아미드화된 변이체, 시알릴화된 변이체, VHS-변이체, C-말단 리신 변이체, 메티오닌-산화된 변이체, G1 글리코실화 변이체, G2 글리코실화 변이체 및 비-글리코실화된 중쇄 변이체를 추가로 포함한다.

[0022] 본 발명은 또한 페르투주맙, 및 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 포함하며, 여기서 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 0.9 내지 4.1%인 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 페르투주맙, 및 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 포함하며, 여기서 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 2% 초과인 조성물에 관한 것이다. 이 실시양태에 따르면, 비푸코실화된 변이체의 양은 미국 특허 제7,560,111호, 미국 특허 제7,879,325호 및 미국 특허 제8,241,630호 (카오 등)에서 보고된 것보다 많다.

[0023] 추가의 측면에서, 본 발명은 페르투주맙, 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)의 혼합물을 포함하며, 여기서 LMWS의 양은 1.6% 이하이고, HMWS의 양은 1.7% 이하인 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은 또한 페르투주맙, 피크 1 및 피크 2의 혼합물을 포함하며, 여기서 환원 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (R-CE-SDS) 검정에 의해 결정시에, 피크 1의 양은 0.5% 이하이고, 피크 2의 양은 1.0% 이하인 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 추가의 측면은 본원의 조성물을 사용 또는 포함하는 제약 조성물, 제품, 및 암 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

[0026] 추가의 측면에서, 본 발명은 (1) 조성물 중의, 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 양을 측정하고/거나; (2) 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙의 양을 측정하고/거나; (3) 조성물 중의 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 또는 고분자량 종 (HMWS)의 양을 측정하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 평가 방법에 관한 것이다.

[0027] 추가의 측면에서, 본 발명은 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙 변이체의 양을 측정하여 조성물의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성을 결정하고, 비푸코실화된 페르투주맙의 양이 약 0.9% 내지 약 4.1%의 범위임을 확인하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 생물학적 활성의 평가 방법에 관한 것이다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (1) 페르투주맙 및 1종 이상의 그의 변이체를 포함하는 조성물을 제조하고, (2) 이와 같이 제조된 조성물을 분석 검정하여 조성물 중의 변이체(들)의 양을 평가하는 것을 포함하며, 여기서 변이체(들)는 (i) 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; 및/또는 (ii) 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체; 및/또는 (iii) 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS); 및/또는 (iv) 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS); 및/또는 (v) 페르투주맙의 피크 1 단편(들); 및/또는 (vi) 페르투주맙의 피크 2 단편(들)을 포함하는 것인 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 페르투주맙의 하나의 경쇄 가변 도메인에만 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 이종이량체 변이체인, 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; 및/또는 (b) 페르투주맙의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 동종이량체 변이체인, 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체; 및/또는 (c) 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체; 및/또는 (d) 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS); 및/또는 (e) 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS); 및/또는 (f) 페르투주맙의 피크 1 단편(들); 및/또는 (g) 페르투주맙의 피크 2 단편(들)을 포함하는, 페르투주맙의 단리된 변이체에 관한 것이다.

[0030] 추가의 측면에서, 본 발명은 환원 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (R-CE-SDS) 검정에 의해 조성물 중의 피크 1 및 피크 2의 양을 측정하고, 피크 1의 양이 5% 이하이고, 피크 2의 양이 1.0% 이하임을 확인하는 것을

포함하는, 페르투주맙 조성물의 단편화의 평가 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 HER2 단백질 구조, 및 그의 세포외 도메인의 서브도메인 I 내지 IV (각각 서열 1 내지 4)에 대한 아미노산 서열의 개요를 제공한다.

도 2a 및 2b는 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 경쇄 가변 (VL) (도 2a) 및 중쇄 가변 (VH) (도 2b) 도메인 (각각 서열 5 및 6); 변이체 574/페르투주맙의 VL 및 VH 도메인 (각각 서열 7 및 8); 및 인간 VL 및 VH 컨센서스 프레임워크 (hum κ1, 경쇄 카파 하위군 I; humIII, 중쇄 하위군 III) (각각 서열 9 및 10)의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 별표는 페르투주맙 및 뮤린 모노클로날 항체 2C4의 가변 도메인 사이, 또는 페르투주맙 및 인간 프레임워크의 가변 도메인 사이의 차이를 확인시킨다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 괄호 안에 있다.

도 3a 및 3b는 페르투주맙 경쇄 (도 3a; 서열 11) 및 중쇄 (도 3b; 서열 12)의 아미노산 서열을 나타낸다. CDR은 볼드체로 나타낸다. 경쇄 및 중쇄의 계산된 분자량은 23,526.22 Da 및 49,216.56 Da (환원된 형태의 시스테인)이다. 탄수화물 모이어티는 중쇄의 Asn 299에 부착된다.

도 4a 및 4b는 각각 트拉斯투주맙 경쇄 (도 4a; 서열 13) 및 중쇄 (도 4b; 서열 14)의 아미노산 서열을 나타낸다. 경쇄 가변 및 중쇄 가변 도메인의 경계는 화살표로 표시된다.

도 5a 및 5b는 각각 변이체 페르투주맙 경쇄 서열 (도 5a; 서열 15) 및 변이체 페르투주맙 중쇄 서열 (도 5b; 서열 16)을 나타낸다.

도 6은 각각의 경쇄 가변 (VL) 도메인에 Cys23/Cys88 쇠-간 디숤파드 결합을 포함하는, 그의 4개의 쇠-간 및 12개의 쇠-내 디숤파드 결합을 포함하는 페르투주맙 (주요 종)의 구조를 나타낸다. 표시된 도메인은: VL = 경쇄 가변 도메인; VH = 중쇄 가변 도메인; CL = 경쇄 불변 도메인; CH1 = 중쇄 불변 도메인 1; CH2 = 중쇄 불변 도메인 2; CH3 = 중쇄 불변 도메인 3이다.

도 7은 페르투주맙의 비-환원된 (천연) 트립신 웨პ티드 맵을 나타낸다.

도 8은 환원된 및 비-환원된 페르투주맙의 트립신 웨პ티드 맵 (전체 규모)을 나타낸다.

도 9는 환원된 및 비-환원된 페르투주맙의 트립신 웨პ티드 맵 (0 내지 120분)을 나타낸다.

도 10은 환원된 및 비-환원된 페르투주맙의 트립신 웨პ티드 맵 (120 내지 204분)을 나타낸다.

도 11은 파파인-소화된 페르투주맙의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 분석을 나타낸다.

도 12는 파파인-소화된 페르투주맙의 HIC 분석 (확대도)을 나타낸다.

도 13은 무손상 페르투주맙의 HIC 분석을 나타낸다. 풍부화된 유리 티올 동종이량체 (둘 다의 경쇄 상에 유리 티올), 유리 티올 이종이량체 (하나의 경쇄 상에 유리 티올) 및 야생형 동종이량체 (주요 종 항체)를 포함하는 피크가 나타나 있다.

도 14는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 검정에서의 페르투주맙 (배치 항2C4907-2)의 활성을 나타낸다.

도 15는 ADCC 활성에 대한 G0-F 수준의 영향을 나타낸다. 시험된 샘플은 III상 페르투주맙 (G0-F = 2.2%) 및 I상 페르투주맙 (G0-F = 0.8%)이었다.

도 16은 페르투주맙으로부터 방출된 N-연결된 올리고사카라이드의 모세관 전기영동 분석을 나타낸다.

도 17은 페르투주맙으로부터 방출된 N-연결된 올리고사카라이드의 모세관 전기영동 분석 (확대도)을 나타낸다. 주: G1 올리고사카라이드는 말단 갈락토스 잔기가 α 1-6 분지 또는 α 1-3 분지에 부착된 2가지 이성질체 형태 (G1 및 G1'로 표지됨)를 갖는다.

도 18은 페르투주맙 Fab 및 Fc (제한된 Lys-C 소화) 분리를 위한 역상-고성능 액체 크로마토그래피 (HP-HPLC)를 나타낸다. 제한된 Lys-C 소화된 페르투주맙, 및 그 후 N-에틸말레이이미드 (NEM)로 처리된 제한된 Lys-C 소화된 페르투주맙이 나타나 있다.

도 19는 페르투주맙 유리 티올 Fab가 그의 경쇄에 유리 Cys23 및 Cys88을 함유함을 확인하는 웨პ티드 맵핑을 나타낸다. 유리 티올을 함유하는 Fab로부터의 L2 웨პ티드는 NEM에 의해 표지되며, 따라서 웨პ티드 맵 분석에서 이동되었다.

도 20은 주요 종 또는 야생형 IgG1 (도 20a), Cys23/Cys88 이종이량체 변이체 (도 20b), 및 Cys23/Cys88 동종 이량체 변이체 (도 20c)를 개략적으로 나타낸다.

도 21은 본원의 실시예 4에서의 검정을 이용한 페르투주맙 배치에 대한 % G0-F 대 ADCC 활성을 나타낸다.

도 22는 페르투주맙이 HER2의 이종이량체성 결합 부위에 결합하여, 활성화된 EGFR 또는 HER3과의 이종이량체화를 방지한다는 것을 개략적으로 나타낸다.

도 23은 트라스투주맙 (HER2 ECD의 막근접 도메인 부근의 서브도메인 IV에 결합함) 및 페르투주맙 (HER2 ECD의 서브도메인 II에 결합함)의 활성을 비교한다.

도 24a 및 24b는 IgG 항체에 부착된 올리고사카라이드 구조를 나타낸다.

도 25는 페르투주맙의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 분석 (전체 규모)을 나타낸다.

도 26은 페르투주맙의 SEC 분석 (확대 규모)을 나타낸다. 피크는 주요 피크 (주요 종 항체), 고분자량 종 (HMWS) 및 저분자량 종 (LMWS)을 포함한다.

도 27은 페르투주맙 샘플의 크기 배제-고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC)를 나타낸다. 샘플 A는 대표적인 페르투주맙 약물 생성물 배치이다. 샘플 B는 1.2 mlux 시간으로 광 노출 처리된 페르투주맙 배치이다. 샘플 C는 3.6 mlux 시간으로 광 노출 처리된 페르투주맙 배치이다. 샘플 D는 pH 3.2로 산 처리된 페르투주맙 배치이다. 샘플 E는 이온 교환-HPLC (IE-HPLC)로부터의 정제된 염기성 변이체이다.

도 28은 분석용 초원심분리 (AUC) 침강 속도 및 SE-HPLC 분석의 일치 플롯을 나타낸다. 오차 막대는 n=3 측정으로부터의 2개의 표준 편차를 나타낸다. 다른 모든 데이터 점은 단일 결정을 나타낸다. 원은 AUC의 검출 수준 미만의 HMWS 수준을 갖는 샘플을 나타낸다.

도 29는 비-환원된 페르투주맙의 레이저-유도 형광 (LIF) 검출을 이용한 모세관 전기영동 소룹 도테실 솔레이트 분석 (CE-SDS)을 나타낸다.

도 30은 비-환원된 (NR) 페르투주맙의 CE-SDS-LIF (확대도)를 나타낸다.

도 31a 및 31b는 실시예 6에 대한 SE-HPLC 크로마토그램: 전체 규모 (도 31a) 및 확대 규모 (도 31b)를 나타낸다.

도 32a 및 32b는 실시예 6에 대한 비-환원 CE-SDS (NR-CE-SDS) 일렉트로페로그램: 전체 규모 (도 32a) 및 확대 규모 (도 32b)를 나타낸다.

도 33a 및 33b는 실시예 6에 대한 환원 CE-SDS (R-CE-SDS) 일렉트로페로그램: 전체 규모 (도 33a) 및 확대 규모 (도 33b)를 나타낸다.

도 34는 산 처리된 샘플에 대한 NR-CE-SDS 및 R-CE-SDS 일렉트로페로그램의 비교 (확대 규모)를 제공한다.

도 35는 NR-CE-SDS 및 SE-HPLC 사이의 Fab 정량화의 상관관계를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

[0032] 본원에서 "쌍형성된 시스테인"은 항체와 같은 단백질에서 디슬피드 결합을 형성하는 2개의 시스테인 잔기를 지칭한다. 이러한 디슬피드 결합은 쇄-간 디슬피드 결합 (예를 들어 항체의 중쇄 및 경쇄 사이, 또는 항체의 2개의 중쇄 사이의 디슬피드 결합), 또는 쇄-내 디슬피드 결합 (예를 들어 항체의 경쇄내 또는 항체의 중쇄내)일 수 있다. 대부분의 IgG1 항체는 4개의 쇄-간 디슬피드 결합 및 12개의 쇄-내 디슬피드 결합을 포함한다. 도 6 을 참조한다.

[0033] "쌍형성되지 않은 시스테인 변이체"는 하나 이상의 쌍형성된 시스테인이 디슬피드 결합된 상태가 아닌 단백질의 변이체 (예를 들어 페르투주맙과 같은 항체)이다. 이러한 쌍형성되지 않은 시스테인은 디슬피드 결합을 형성하기 위해 쌍형성되지 않았을 수 있거나 (예를 들어 단백질이 그의 삼차 구조 내로 원래 폴딩된 경우), 또는 디슬피드 결합을 형성하지만 나중에 (예를 들어 제조 동안 또는 저장시) 깨어질 수 있다. 쌍형성되지 않은 시스테인은 때로 유리 티올 또는 유리 술프히드릴로 지칭된다. 한 실시양태에서, 쌍형성되지 않은 시스테인은 쇄-내 디슬피드 결합으로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 쌍형성되지 않은 시스테인은 경쇄, 예를 들어 항체의 경쇄

가변 도메인에 있다. 한 실시양태에서, 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체는 Cys23/Cys88 변이체이다.

[0035] "Cys23/Cys88" 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체는 항체의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 시스테인 잔기 23 및 88에서 분자-내 디술피드 결합이 결핍되어 있다. 본원의 도 20b 및 c를 참조한다.

[0036] "동종이량체 변이체"는 항체의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에서 Cys23/Cys88 디술피드 결합이 결핍되어 있다. 본원의 도 20c를 참조한다.

[0037] "이종이량체 변이체"는 항체의 하나의 경쇄 가변 도메인에서 하나의 Cys23/Cys88 디술피드 결합만이 결핍되어 있다. 본원의 도 20b를 참조한다.

[0038] "비푸코실화된 변이체"는 코어 올리고사카라이드 구조에서, 하나 또는 둘 다의 중쇄의 잔기 Asn299에 부착된 올리고사카라이드 구조의 하나 또는 둘 다가 푸코스가 결핍된, 예를 들어 Fuc α (1->6)가 결핍된 항체의 글리코실화 변이체이다.

[0039] 페르투주맙의 "저분자량 종" 또는 "LMWS"는 주요 종 또는 무손상 페르투주맙의 분자량 미만의 분자량을 갖는 (예를 들어 무손상 페르투주맙은 그의 웨티드 쇄만을 측정할 때 약 145,197 Da의 분자량을 가짐) 페르투주맙의 단편을 포함한다. LMWS는 예를 들어 실시예 5에서와 같이 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC) 및/또는 소듐 도네실 술페이트를 사용한 비-환원 모세관 전기영동 (CE-SDS)에 의해 검출될 수 있다. 한 실시양태에서, LMWS는 CE-SDS에 의해 수득된 바와 같은 "피크 6"을 포함하거나, 이것으로 이루어진다 (예를 들어, 실시예 5를 참조한다).

[0040] "고분자량 종" 또는 "HMWS"는 주요 종 또는 무손상 페르투주맙의 분자량 초과의 분자량을 갖는 (예를 들어 무손상 페르투주맙은 그의 웨티드 쇄만을 측정할 때 약 145,197 Da의 분자량을 가짐) 페르투주맙의 제조물을 포함한다. HMWS는 예를 들어 실시예 5에서와 같이 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC) 및/또는 소듐 도네실 술페이트를 사용한 비-환원 모세관 전기영동 (CE-SDS) 검정에 의해 검출될 수 있다.

[0041] 본원에서 "피크 1"은 페르투주맙 경쇄 (LC)보다 작은 크기의 페르투주맙 단편(들)을 지칭한다. 피크 1 단편(들)은 CE-SDS 검정, 바람직하게는 환원 CE-SDS (R-CE-SDS) 검정에 의해 주요 종 페르투주맙으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 본원의 도 33b, 표 16 및 표 18을 참조한다. 바람직하게는, 페르투주맙 조성물 중의 피크 1의 양은 0.5% 이하이다. 임의로, R-CE-SDS 검정은 실시예 6에 기재된 바와 같이 수행되며, 보정된 피크 면적 (CPA)은 조성물 중 % 피크 1을 제공한다.

[0042] 본원에서 "피크 2"는 페르투주맙 경쇄 (LC)보다 크고 페르투주맙 비-글리코실화된 중쇄 (NGHC)보다 작은 크기의 페르투주맙 단편(들)을 지칭한다. 피크 2는 CE-SDS, 바람직하게는 환원 (R-CE-SDS) 검정에 의해 주요 종 페르투주맙으로부터 분리될 수 있다. 피크 2는 본원의 실시예 6에서 설명된 바와 같은 R-CE-SDS 검정 동안 나타날 수 있는 피크 3을 제외한다. 예를 들어, 본원의 도 33b, 표 16 및 표 18을 참조한다. 바람직하게는, 페르투주맙 조성물 중의 피크 2의 양은 1.0% 이하이다. 임의로, R-CE-SDS 검정은 실시예 6에 기재된 바와 같이 수행되며, 보정된 피크 면적 (CPA)은 조성물 중 % 피크 2를 제공한다.

[0043] "단편화"는 폴리펩티드 쇄 절단, 예를 들어 페르투주맙 경쇄 및/또는 중쇄의 절단을 지칭한다. 이는 예를 들어 NR-CE-SDS 분석 동안 비-공유 회합된 폴리펩티드 쇄의 해리를 포함하지 않는다.

[0044] "분석 검정"은 조성물 중의 분석물 (예를 들어 항체 변이체)의 존재 또는 양을 정성적으로 평가하고/거나 정량적으로 측정하는 검정이다. 검정으로 처리된 조성물은 제약 조성물을 포함하는 정제된 조성물일 수 있다.

[0045] "Fab 소수성 상호작용 크로마토그래피 검정" 또는 "Fab HIC 검정"은 (파파인 효소를 사용하여) 조성물 중의 항체의 단편 (예를 들어 Fab 단편)을 생성하고, 주요 종 페르투주맙으로부터 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 분리하기 위해 이와 같이 생성된 항체 단편을 HIC에 적용하는 것을 포함한다. 예시적인 이러한 검정은 본원의 실시예 1에 개시되어 있다.

[0046] "HER 수용체"는 HER 수용체 부류에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이며, EGFR, HER2, HER3 및 HER4 수용체를 포함한다. HER 수용체는 일반적으로 HER 리간드에 결합하고/거나 또 다른 HER 수용체 분자와 이량체화될 수 있는 세포외 도메인; 친지성 막획단 도메인; 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 몇몇 티로신 잔기를 갖는 카르복실-말단 신호화 도메인을 포함할 것이다.

[0047] 표현 "HER2"는 예를 들어 문헌 [Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985)] 및 [Yamamoto *et al.* *Nature* 319:230-234 (1986)]에 기재된 인간 HER2 단백질 (진뱅크 (Genebank) 수탁 번호 X03363)을 지칭한다.

- [0048] 본원에서, "HER2 세포의 도메인" 또는 "HER2 ECD"는 그의 단편을 포함하는, 세포 막에 고정되거나, 순환하는 세포의 외부인 HER2의 도메인을 지칭한다. HER2의 아미노산 서열은 도 1에 나타나 있다. 한 실시양태에서, HER2의 세포외 도메인은 4개의 도메인: "서브도메인 I" (약 1 내지 195개의 아미노산 잔기; 서열 1), "서브도메인 II" (약 196 내지 319개의 아미노산 잔기; 서열 2), "서브도메인 III" (약 320 내지 488개의 아미노산 잔기; 서열 3), 및 "서브도메인 IV" (약 489 내지 630개의 아미노산 잔기; 서열 4) (신호 펩티드가 없는 잔기 네버링)를 포함할 수 있다. 문헌 [Garrett *et al.* *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003)], [Cho *et al.* *Nature* 421: 756-760 (2003)], [Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)], 및 [Plowman *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993)], 및 본원의 도 1을 참조한다.
- [0049] 본원에서 "HER 이량체"는 적어도 2개의 HER 수용체를 포함하는 비공유 회합된 이량체이다. 이러한 복합체는 2개 이상의 HER 수용체를 빌현하는 세포가 HER 리간드에 노출되는 경우 형성될 수 있으며, 예를 들어 문헌 [Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)]에 기재된 바와 같이 면역침전법에 의해 단리하고, SDS-PAGE에 의해 분석할 수 있다. 시토카인 수용체 서브유닛 (예를 들어 gp130)과 같은 다른 단백질은 이량체와 회합될 수 있다. 바람직하게는, HER 이량체는 HER2를 포함한다.
- [0050] 본원에서 "HER 이종이량체"는 적어도 2개의 상이한 HER 수용체를 포함하는 비공유 회합된 이종이량체, 예컨대 EGFR-HER2, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이종이량체이다.
- [0051] "HER 활성화"는 임의의 1종 이상의 HER 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, HER 활성화는 신호 전달 (예를 들어 HER 수용체 또는 기질 폴리펩티드에서의 HER 수용체 인산화 티로신 잔기의 세포내 키나제 도메인에 의해 유발된 것)을 초래한다. HER 활성화는 관심의 HER 수용체를 포함하는 HER 이량체에 결합하는 HER 리간드에 의해 매개될 수 있다. HER 이량체에 결합하는 HER 리간드는 이량체에서 1종 이상의 HER 수용체의 키나제 도메인을 활성화시킬 수 있으며, 그에 의해 1종 이상의 HER 수용체에서 티로신 잔기의 인산화 및/또는 추가의 기질 폴리펩티드(들), 예컨대 Akt 또는 MAPK 세포내 키나제에서 티로신 잔기의 인산화를 초래한다.
- [0052] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 용량을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이를 개질은 항체 성능을 더 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함할 것이며, 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 이뮤노글로불린의 그것에 상응하고, FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 또한 적어도 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것을 포함할 것이다. 추가의 상세사항에 대해서는, 문헌 [Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 인간화 HER2 항체는 구체적으로 트拉斯투주맙 및 인간화 2C4 항체, 예컨대 본원에 기재 및 정의된 바와 같은 폐르투주맙을 포함한다.
- [0053] 본원에서 "무손상 항체"는 2개의 항원 결합 영역, 및 Fc 영역을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 무손상 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, "무손상 폐르투주맙"은 그의 펩티드 쇄만을 측정할 때 약 145,197 Da의 분자량을 갖는다.
- [0054] 본원에서 사용될 경우 용어 "초가변 영역"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24 내지 34 (L1), 50 내지 56 (L2) 및 89 내지 97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인에서 31 내지 35 (H1), 50 내지 65 (H2) 및 95 내지 102 (H3); Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26 내지 32 (L1), 50 내지 52 (L2) 및 91 내지 96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인에서 26 내지 32 (H1), 53 내지 55 (H2) 및 96 내지 101 (H3); Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0055] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 한정하기 위해 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc

영역은 통상적으로 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터, 또는 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지 연장되도록 한정된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따라 잔기 449)은 예를 들어 항체의 제조 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 유전자조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K449 잔기가 제거된 항체 집단, K449 잔기가 전혀 제거되지 않은 항체 집단, 및 K449 잔기를 갖는 항체 및 갖지 않는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.

[0056] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 이뮤노글로불린 중쇄 중의 잔기의 넘버링은 명백하게 본원에 참고로 도입된 문헌 [Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 EU 인덱스의 것이다. "카바트 (Kabat)에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0057] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"으로는 C1q 결합; 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 들 수 있다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 결합 도메인 (예를 들어 항체 가변 도메인)과 조합되는 Fc 영역을 필요로 하며, 다양한 검정을 이용하여 평가될 수 있다.

[0058] "천연 서열 Fc 영역"은 천연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역, 및 그의 천연 발생 변이체를 포함한다.

[0059] "네이키드 항체"는 이종 분자, 예컨대 세포독성 모이어티 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체이다.

[0060] 본원에서 용어 "주요 종 항체" 또는 "야생형 항체"는 조성을 중의 양적으로 우세한 항체 분자인 조성을 중의 항체 아미노산 서열 구조를 지칭한다. 바람직하게는, 주요 종 항체는 HER2 항체, 예컨대 HER2의 서브도메인 II에 결합하는 항체, 트라스투주맙보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제하고/거나 HER2 상의 이종이량체성 결합 부위에 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 주요 종 항체는 CDR-H1 (서열 17 또는 23), CDR-H2 (서열 18), 및 CDR-H3 (서열 19), CDR-L1 (서열 20), CDR-L2 (서열 21 또는 24) 및 CDR-L3 (서열 22), 각각 서열 7 및 8에 VL 및 VH 아미노산 서열 (도 2a 내지 2b 참조), 및 임의로 서열 11 또는 15의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 12 또는 16의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것이다 (도 3a 내지 3b 및 5a 내지 5b를 참조함). 한 실시양태에서, 주요 종 항체는 페르투주맙이다.

[0061] "HER 이량체화를 억제하는" 항체는 HER 이량체 또는 이종이량체의 형성을 억제하거나 방해하는 항체이다. 한 실시양태에서, 이러한 항체는 그의 이종이량체성 결합 부위에서 HER2에 결합한다. 본원에서 가장 바람직한 이량체화 억제 항체는 페르투주맙이다.

[0062] HER2 상의 "이종이량체성 결합 부위"는 그것과 함께 이량체의 형성시 EGFR, HER3 또는 HER4의 세포의 도메인의 영역에 접촉하거나 계면화되는 HER2의 세포외 도메인의 영역을 지칭한다. 영역은 HER2의 서브도메인 II (서열 2)에서 발견된다. 문헌 [Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].

[0063] HER2의 "이종이량체성 결합 부위"에 결합하는 HER2 항체는 서브도메인 II (서열 2)의 잔기에 결합하며, 임의로 또한 HER2 세포외 도메인의 다른 도메인, 예컨대 서브도메인 I 및 III (서열 1 및 3)의 잔기에 결합하고, 적어도 어느 정도 HER2-EGFR, HER2-HER3 또는 HER2-HER4 이종이량체의 형성을 입체적으로 방해할 수 있다. 문헌 [Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)]은 HER2의 이종이량체성 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 설명하는 RCSB 단백질 데이터 뱅크에 기록된 (ID 코드 IS78) HER2-페르투주맙 결정 구조를 특성화한다.

[0064] HER2의 "서브도메인 II에 결합하는" 항체는 서브도메인 II (서열 2)의 잔기, 및 임의로 HER2의 다른 서브도메인 (들), 예컨대 서브도메인 I 및 III (각각 서열 1 및 3)의 잔기에 결합한다.

[0065] 본원의 목적상, 교환가능하게 사용되는 "페르투주맙" 및 "rhuMAb 2C4"는 각각 서열 7 및 8의 경쇄 가변 (VL) 및 중쇄 가변 (VH) 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다. 본원의 도 22 및 23은 페르투주맙의 예시적인 생물학적 기능을 설명한다. 페르투주맙이 무손상 항체인 경우, 이는 바람직하게는 IgG1 항체를 포함하며; 한 실시양태에서, 서열 11 또는 15의 경쇄 아미노산 서열, 및 서열 12 또는 16의 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 임의로 재조합 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 생성된다. 본원에서 용어 "페르투주맙" 및 "rhuMAb 2C4"는 미국 채택 명칭 (USAN) 또는 국제 일반 명칭 (INN): 페르투주맙을 갖는 약물의 바이오시밀러 또는 인텐디드 카피를 포괄한다.

[0066] 본원의 목적상, 교환가능하게 사용되는 "트라스투주맙" 및 "rhuMAb4D5"는 각각 서열 13 및 14내로부터의 경쇄

가변 (VL) 및 중쇄 가변 (VH) 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다 (도 4a 내지 4b를 참조함). 트拉斯투주맙이 무손상 항체인 경우, 이는 바람직하게는 IgG1 항체를 포함하며; 한 실시양태에서, 서열 13의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 14의 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 임의로 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 생성된다. 본원에서 용어 "트拉斯투주맙" 및 "rhuMAb4D5"는 미국 채택 명칭 (USAN) 또는 국제 일반 명칭 (INN): 트拉斯투주맙을 갖는 약물의 바이오시밀러 또는 인텐디드 카피를 포괄한다.

[0067] 본원에서 아미노산 서열 변이체 항체는 주요 종 항체와는 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 주요 종 항체와 적어도 약 70%의 상동성을 가질 것이며, 바람직하게는 이는 주요 종 항체와 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 상동성일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 주요 종 항체의 아미노산 서열 내의 또는 인접한 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 부가를 갖는다. 본원에서 아미노산 서열 변이체의 예로는 탈아미드화된 항체 변이체, 그의 1 또는 2개의 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장 (예를 들어 VHS-)을 갖는 항체, 그의 1 또는 2개의 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 갖는 항체 등을 들 수 있으며, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 대한 변이체의 조합을 포함한다.

[0068] 산성 변이체는 주요 종 항체보다 산성인 주요 종 항체의 변이체이다. 산성 변이체는 주요 종 항체에 비해 음전하를 얻거나 양전하를 잃는다. 이러한 산성 변이체는 전하에 따라 단백질을 분리하는 이온 교환 크로마토그래피와 같은 분리 방법론을 이용하여 분해될 수 있다. 주요 종 항체의 산성 변이체는 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 분리시 주요 피크보다 빨리 용리된다.

[0069] 디슬피드 환원된 변이체는 유리 티올 형태로 화학적으로 환원된 하나 이상의 쇄-간 디슬피드-결합된 시스테인 (들)을 갖는다. 이 변이체는 예를 들어 WO 2009/099829 (해리스 등)에 기재된 바와 같이 소듐 도데실 술페이트를 사용한 비-환원 모세관 전기영동 (CE-SDS)에 의해 모니터링될 수 있다.

[0070] 본원에서, 비-환원성 변이체 또는 "불완전하게 환원된 변이체"는 디티오트레이톨과 같은 환원제로 처리함으로써 중쇄 및 경쇄에 대해 화학적으로 환원되지 않을 수 있는 주요 종 항체의 변이체이다. 이러한 변이체는 조성물을 환원제로 처리하고, 생성된 조성물을 예를 들어 WO 2009/099829 (해리스 등)에 기재된 기술을 이용하여, 단백질 크기를 평가하는 방법론, 예컨대 소듐 도데실 술페이트를 사용한 모세관 전기영동 (CE-SDS)을 이용하여 평가함으로써 평가될 수 있다.

[0071] 본원에서 글리코실화 변이체 항체는 주요 종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티와는 상이한 그에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 글리코실화 변이체는 예를 들어 중쇄의 잔기 299에서 항체의 하나 또는 둘 다의 중쇄에 부착된 올리고사카라이드 구조를 갖는다. 한 실시양태에서, 주요 종 항체 (예를 들어 폐르투주맙)는 그의 Fc 영역에 부착된 우세한 올리고사카라이드로서 G0 올리고사카라이드를 포함한다. IgG1에 부착된 예시적인 올리고사카라이드 구조는 도 24a 내지 24b에 나타나 있다. 본원에서 글리코실화 변이체의 예로는 그의 Fc 영역에 부착된 G0 올리고사카라이드 구조 대신 G1 또는 G2 올리고사카라이드 구조를 갖는 항체인 비푸코실화된 변이체 ("G1 글리코실화 변이체" 또는 "G2 글리코실화 변이체"), 항체의 1 또는 2개의 중쇄에 탄수화물이 부착되지 않은 항체 ("비-글리코실화된 중쇄 변이체"), 시알릴화된 변이체 등 뿐만 아니라 이러한 글리코실화 변경의 조합을 들 수 있다. 예를 들어 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등)를 참조한다.

[0072] 항체가 Fc 영역을 가질 경우, 올리고사카라이드 구조는 예를 들어 잔기 299에서 항체의 1 또는 2개의 중쇄에 부착될 수 있다. 한 실시양태에서, G0은 우세한 올리고사카라이드 구조이며, 다른 올리고사카라이드 구조, 예컨대 G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 및 G2는 조성물에서 보다 적은 양으로 발견된다.

[0073] 달리 지시되지 않는다면, 본원에서 AG1 올리고사카라이드 구조는 G1(1-6) 및 G1(1-3) 구조를 포함한다.

[0074] 본원의 목적상, 시알릴화된 변이체는 그의 1 또는 2개의 중쇄에 부착된 하나 이상의 시알릴화된 탄수화물 모이어티를 포함하는 주요 종 항체의 변이체이다. 시알릴화된 변이체는 예를 들어 WO 2009/099829에 기재된 바와 같이 시알리다제 처리가 있는 또는 없는 조성물을 평가함으로써 (예를 들어 이온 교환 크로마토그래피에 의해) 확인될 수 있다.

[0075] 당화된 변이체는 당, 예컨대 글루코스가 예를 들어 그의 하나 또는 둘 다의 경쇄에 공유적으로 부착된 항체이다. 이 부가는 글루코스와 단백질 상의 리신 잔기의 반응에 의해 (예를 들어 세포 배양 배지에서) 일어날 수 있다. 당화된 변이체는 중쇄 또는 경쇄의 질량의 증가를 평가하는 환원된 항체의 질량 분광 분석에 의해 확인될 수 있다. 당화된 변이체는 또한 WO 2009/099829 (해리스 등)에 설명된 바와 같은 보로네이트 크로마토그래피에 의해 정량화될 수 있다.

- [0076] 탈아미드화된 항체는 그의 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 예를 들어 아스파르트산, 숙신아미드 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다. 탈아미드화된 항체의 예는 폐르투주맙의 1 또는 2개의 중쇄 상의 Asn-386 및 /또는 Asn-391이 탈아미드화된 폐르투주맙 변이체이다. 예를 들어 WO 2009/099829 (해리스 등)를 참조한다.
- [0077] 본원에서 아미노-말단 리더 연장 변이체는 주요 종 항체의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단에서 아미노-말단 리더 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는 주요 종 항체를 지칭한다. 예시적인 아미노-말단 리더 연장은 본원에서 "VHS-변이체"로 지정된, 항체 변이체의 하나 또는 둘 다의 경쇄에 존재하는 3개의 아미노산 잔기, VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다. 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등)를 참조한다.
- [0078] "C-말단 리신 변이체"는 그의 중쇄의 C-말단에 리신 (K) 잔기를 포함하는 변이체를 지칭한다. 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등)를 참조한다.
- [0079] "메티오닌-산화된 변이체"는 그 안에 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 포함하는 변이체, 예를 들어 산화된 Met-254를 지칭한다. 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등)를 참조한다.
- [0080] 용어 "암"은 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭한다. 본원에서 암의 예로는 유방암 (예를 들어 전이성 유방암), 위 (또는 위장) 암, 난소암, 원발성 복막암 및 자궁관암을 들 수 있다. 본원에서 암의 예로는 HER2-양성 암 및 낮은 HER3 암을 들 수 있다.
- [0081] "HER 발현, 증폭 또는 활성화를 나타내는" 암 또는 생물학적 샘플은 진단 시험에서 HER 수용체를 발현 (과발현을 포함함)하고/거나, 증폭된 HER 유전자를 갖고/거나, 다르게는 HER 수용체의 활성화 또는 인산화를 발휘하는 것이다.
- [0082] "HER2-양성" 암은 HER2의 정상적인 수준보다 높은 수준을 갖는 암 세포를 포함한다. HER2-양성 암의 예로는 HER2-양성 유방암 및 HER2-양성 위암을 들 수 있다. HER2-양성 암을 확인하는 방법으로는 HER2 단백질을 측정하는 검정, 예컨대 면역조직화학 검정 (IHC), HER2-코딩 핵산을 측정하는 검정, 예컨대 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월에 공개된 WO98/45479을 참조함) 및 발색 계내 혼성화 (CISH; 예를 들어 문헌 [Tanner et al., *Am. J. Pathol.* 157(5): 1467-1472 (2000)]; [Bella et al., *J. Clin. Oncol.* 26: (May 20 suppl; abstr 22147) (2008)]을 참조함)를 포함하는 계내 혼성화 (ISH), 서던 블로팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예컨대 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR); 쉐드 (shed) 항원 (예를 들어 HER2 ECD) 검정 (예를 들어, 1990년 6월 12일에 허여된 미국 특허 제4,933,294호; 및 1995년 3월 28일에 허여된 미국 특허 제5,401,638호를 참조함); 및 생체내 검정을 들 수 있다. 임의로, HER2-양성 암은 2+ 또는 3+의 면역조직화학 (IHC) 스코어 및/또는 2.0 이상의 계내 혼성화 (ISH) 증폭 비율을 갖는다.
- [0083] "낮은 HER3" 암은 HER3의 정상적인 수준보다 낮은 수준을 갖는 암 세포를 포함한다. 낮은 HER3 암의 예로는 난소, 원발성 복막 및 자궁관 암종을 들 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7,981,418호 (암러 (Amler) 등)를 참조한다. 한 실시양태에서, 낮은 HER3은 HER3 mRNA 발현 수준 (코바스 (COBAS) z480® 기기 상에서 qRT-PCR에 의해 평가시에 2.81 이하의 농도 비율)에 기초하여 측정된다.
- [0084] "에피토프 2C4"는 항체 2C4가 결합하는 HER2의 세포외 도메인 내의 영역이다. 필수적으로 2C4 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 검정을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 HER2에의 2C4의 결합을 약 50% 이상까지 차단한다. 대안적으로, 에피토프 맵핑을 수행하여 항체가 필수적으로 HER2의 2C4 에피토프에 결합하는지 여부를 평가할 수 있다. 에피토프 2C4는 HER2의 세포외 도메인 내의 서브도메인 II (서열 2)로부터의 잔기를 포함한다. 2C4 및 폐르투주맙은 서브도메인 I, II 및 III (각각 서열 1, 2 및 3)의 연접부에서 HER2의 세포외 도메인에 결합한다. 문헌 [Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)].
- [0085] "치료"는 치료적 치치 및 방지적 (prophylactic) 또는 예방적 (preventative) 조치 둘 다를 지칭한다. 치료가 필요한 대상체는 이미 암을 갖는 대상체, 및 암이 예방되어야 할 대상체를 포함한다. 따라서, 본원에서 치료되어야 할 환자는 암을 갖는 것으로 진단되었을 수 있거나, 또는 암에 대한 소인이 있거나 암에 걸리기 쉬울 수 있다.
- [0086] 용어 "유효량"은 환자에서 암을 치료하는 데 유효한 약물의 양을 지칭한다. 약물의 유효량은 암 세포의 수를 줄이고/거나; 종양 크기를 줄이고/거나; 주변 기관으로 암 세포 침투를 억제 (즉, 어느 정도 감속, 바람직하게는 정지)하고/거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 감속, 바람직하게는 정지)하고/거나; 종양 성장을 어느

정도 억제하고/거나; 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화할 수 있다. 약물이 성장을 방지하고/거나 존재하는 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도까지, 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 유효량은 무진행 생존을 연장하고/거나 (예를 들어 고형 종양에 대한 반응 평가 범주 (Response Evaluation Criteria for Solid Tumors), RECIST, 또는 CA-125 변화에 의해 측정됨), 목적하는 반응 (부분적 반응, PR 또는 완전한 반응, CR을 포함함)을 초래하고/거나, 전체 생존 시간을 증가시키고/거나, 암의 하나 이상의 증상을 개선 (예를 들어 FOSI에 의해 평가됨) 할 수 있다.

- [0087] 본원에서 치료제의 "고정" 또는 "균일" 용량은 환자의 체중 (WT) 또는 체표면적 (BSA)에 관계 없이 인간 환자에게 투여되는 용량을 지칭한다. 따라서, 고정 또는 균일 용량은 mg/kg 용량 또는 mg/m² 용량으로 제공되지 않고, 오히려 치료제의 절대량으로서 제공된다.
- [0088] "용기"는 제약 조성을 또는 조성을 보유하거나 함유하는 데 사용될 수 있는 물건이다. 본원에서 용기의 예로는 바이알, 시린지, 정맥내 백 등을 들 수 있다.
- [0089] "정맥내 백" 또는 "IV 백"은 환자의 정맥을 통해 투여될 수 있는 용액을 보유할 수 있는 백이다. 한 실시양태에서, 용액은 염수 용액 (예를 들어 약 0.9% 또는 약 0.45% NaCl)이다. 임의로, IV 백은 폴리올레핀 또는 폴리비닐 클로라이드로 형성된다.
- [0090] "바이알"은 액체 또는 동결건조된 제조물을 보유하는 데 적합한 용기이다. 한 실시양태에서, 바이알은 단일-사용 바이알, 예를 들어 스토퍼를 갖는 20-cc 단일-사용 바이알이다.
- [0091] "패키지 삽입물"은 미국 식품 의약국 (FDA) 또는 다른 규제 기관의 명령에 의해 모든 처방 약물의 패키지 내부에 넣어야 하는 리플렛이다. 리플렛은 일반적으로 약물에 대한 상표, 그의 일반명, 및 그의 작용 메커니즘을 포함하고; 그의 지시, 사용금지사유, 경고, 예방책, 부작용 및 투여 형태를 설명하고; 권장 용량, 시간 및 투여 경로에 대한 지시를 포함한다.
- [0092] "제약 조성을"은 제약상 활성 약물 (예를 들어 본원에 개시된 것과 같은 페르투주맙 및 변이체 형태) 및 인간 환자에게 안전하게 투여될 수 있는 1종 이상의 "제약상 활성 부형제" (예를 들어 완충제, 안정화제, 장성 개질제, 보존제, 계면활성제 등)를 포함하는 조성을이다. 이러한 조성을 예를 들어 액체 또는 동결건조될 수 있다.
- [0093] "재조합" 단백질은 유전학적으로 개질된 숙주 세포, 예컨대 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 숙주 세포에 의해 생성된 것이다.
- [0094] "제조 규모"는 FDA 또는 다른 규제 기관에 의해 승인된 상업적 공정을 이용하여, 상업적 규모, 예를 들어 12,000 리터 (L) 이상으로 단백질 약물 (예를 들어 항체)을 생산하는 것을 지칭한다.
- [0095] "정제"는 하나 이상의 정제 단계, 예컨대 단백질 A 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 등을 지칭한다.
- [0096] "단리된" 변이체는 하나 이상의 정제 또는 분석 절차에 의해 주요 종 또는 야생형 항체로부터 분리된 변이체를 지칭한다. 이러한 단리된 변이체는 그의 생물학적 활성 및/또는 효능에 대해 평가될 수 있다.
- [0097] **II. 항체 조성을**
- [0098] (i) 주요 종 항체
- [0099] 본원에서 항체 조성을은 HER2에 결합하는 항체 (HER2 항체), 임의로 인간화 HER2 항체를 포함한다. 본원에서 인간화 항체는 예를 들어 인간 종체 가변 도메인 내로 혼입된 비인간 초가변 영역 잔기를 포함하며, 문헌 [Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 설명된 가변 도메인 넘버링 시스템을 이용하여 69H, 71H 및 73H으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 프레임워크 영역 (FR) 치환을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 위치 69H, 71H 및 73H의 2개 또는 모두에 FR 치환을 포함한다.
- [0100] 본원에서 예시적인 관심의 인간화 항체는 VH CDR 잔기:
- [0101] - GFTFTDYTMX (서열 17) (여기서, X는 바람직하게는 D 또는 S임), 예를 들어 CDR-H1에 대해 GFTFTDYTM (서열 23);
- [0102] - CDR-H2에 대해 DVNPNSGGSIYNQRFKG (서열 18); 및/또는

- [0103] - CDR-H3에 대해 NLGPSFYFDY (서열 19)를 포함하며, 이는 임의로 그들 CDR 잔기의 아미노산 개질을 포함하고, 예를 들어 개질은 본질적으로 항체의 친화도를 유지 또는 개선한다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항체 변이체는 상기 중쇄 가변 CDR 서열에 약 1 내지 약 7 또는 약 5개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 하기 기재된 바와 같이 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다.
- [0104] 인간화 항체는 예를 들어 선행 문단에서의 중쇄 가변 도메인 CDR 잔기 외에 VL CDR 잔기:
- [0105] - CDR-L1에 대해 KASQDV SIGVA (서열 20);
- [0106] - SASYX¹X²X³ (여기서, X¹은 바람직하게는 R 또는 L이고, X²는 바람직하게는 Y 또는 E이고, X³은 바람직하게는 T 또는 S임 (서열 21)), 예를 들어 CDR-L2에 대해 SASYRYT (서열 24); 및/또는
- [0107] - CDR-L3에 대해 QQYYIYPYT (서열 22)를 포함할 수 있다.
- [0108] 이러한 인간화 항체는 임의로 상기 CDR 잔기의 아미노산 개질을 포함하며, 개질은 본질적으로 항체의 친화도를 유지 또는 개선한다. 예를 들어, 관심의 항체 변이체는 상기 경쇄 가변 CDR 서열에 약 1 내지 약 7 또는 약 5 개의 아미노산 치환을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다.
- [0109] 본 출원은 또한 HER2에 결합하는 친화도 성숙된 항체를 고려한다. 모 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체, 예를 들어 각각 서열 7 및 8의 경쇄 가변 및/또는 중쇄 가변 서열을 포함하는 (즉, 페르투주맙의 VL 및/또는 VH를 포함하는) 것일 수 있다. 페르투주맙의 친화도 성숙된 변이체는 바람직하게는 뮤린 2C4 또는 페르투주맙보다 우수한 친화도 (예를 들어 HER2 ECD ELISA를 이용하여 평가시에, 예를 들어 약 2 또는 약 4배 내지 약 100배 또는 약 1000배 개선된 친화도)로 HER2 수용체에 결합한다. 예시적인 치환을 위한 중쇄 가변 CDR 잔기로는 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 또는 2개 이상 (예를 들어 이들 잔기의 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)의 조합을 들 수 있다. 변경을 위한 경쇄 가변 CDR 잔기의 예로는 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 또는 2개 이상 (예를 들어 이들 잔기의 2 내지 3, 4, 5 또는 약 10개 이하)의 조합을 들 수 있다.
- [0110] 다양한 형태의 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체가 있다. 대안적으로, 인간화 항체 또는 친화도 성숙된 항체는 무순상 항체, 예컨대 무순상 IgG1 항체일 수 있다.
- [0111] 바람직하게는, HER2 항체 (주요 종 HER2 항체 및 그의 항체 변이체 중 하나 또는 둘 다)는 HER2의 서브도메인 II에 결합하고/거나, 트라스투주맙보다 더 효과적으로 HER 이량체화를 억제하고/거나, HER2의 이종이량체성 결합 부위에 결합하는 것이다. 주요 종 항체의 본원에서 바람직한 실시양태는 서열 3 및 4에 경쇄 가변 및 중쇄 가변 아미노산 서열을 포함하고, 가장 바람직하게는 서열 11 또는 15의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 12 또는 16의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것이다.
- [0112] (ii) 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체
- [0113] 본원에서 실시예 1 및 3은 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 기재한다. 이러한 변이체의 단리, 특성화 및 정량화를 위한 분석 검정은 쇄-내 디슬피드 결합 (쇄-간 디슬피드 결합과는 별개로서)을 특이적으로 평가하는 검정, 예를 들어 실시예 1에서와 같은 항체 단편의 (예를 들어 Fab 단편의) 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 분석, 실시예 1에서와 같은 무순상 항체의 HIC, 실시예 3에서와 같은 차등적으로 태깅된 항체의 웹티드 맵핑 분석, 및/또는 본원의 실시예 3 및 문헌 [Zhang et al. *Anal. Chem.* 84(16):7112-7123 (2012)]에서와 같은 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)를 포함한다.
- [0114] 일반적으로 페르투주맙의 우세한 형태는 그의 2개의 Fab 도메인의 VL 도메인 둘 다에서 Cys23과 Cys88 사이에 디슬피드 결합을 포함한다. 도 6을 참조한다.
- [0115] 본원에서 하나의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체인 이종이량체 변이체는 그의 2개의 Fab 영역의 단지 하나의 경쇄 가변 (VL) 도메인에서 Cys23/Cys88 디슬피드 결합이 결핍된다. 도 20b를 참조한다. 이는 우세한 쌍형성 되지 않은 시스테인 변이체인 것으로 결정되었다.
- [0116] 본원에서 추가의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체인 동종이량체 변이체는 그의 Fab 영역의 둘 다에서 Cys23/Cys88 디슬피드 결합이 결핍된다. 도 20c를 참조한다.
- [0117] 한 실시양태에서, 조성물 중의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체 (동종이량체 및 이종이량체 변이체를 포함함)의 양은 예를 들어 Fab 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에 약 25% 이하이다.

- [0118] 한 실시양태에서, 조성물 중의 동종이량체 변이체의 양은 무손상 항체의 HIC에 의해 결정시에 4.9% 이하이다.
- [0119] 한 실시양태에서, 조성물 중의 이종이량체 변이체의 양은 예를 들어 무손상 항체의 HIC에 의해 결정시에 약 13% 내지 약 18%이다.
- [0120] 조성물은 임의로 하기 기재된 바와 같은 1종 이상의 추가의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0121] 본 발명은 또한 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 페르투주맙의 단리된 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체에 관한 것이다. 이러한 단리된 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체는 이종이량체 변이체 및/또는 동종이량체 변이체를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 이러한 변이체는 HIC 또는 다른 정제 방법을 이용하여 단리될 수 있으며, 하기 실시예 1에서와 같은 효능 검정 (HER2-양성 유방암 세포를 사용함)와 같은 생물학적 검정으로 처리될 수 있다.
- [0122] (iii) 비푸코실화된 변이체
- [0123] 본원에서 실시예 2 및 4는 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 기재하며, 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙의 피센트에 기초하여 ADCC 활성을 측정하는 방법을 실증한다.
- [0124] 한 실시양태에서, 본 발명은 페르투주맙, 및 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 포함하며, 여기서 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 2% 초과인 조성물에 관한 것이다. 예를 들어, 하기 표 9의 항2C4907-2 및 구동 1을 참조한다.
- [0125] 대안적인 실시양태에서, 본 발명은 페르투주맙, 및 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체를 포함하며, 여기서 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 0.9 내지 4.1%인 조성물에 관한 것이다. 이 비푸코실화된 변이체의 양은 예를 들어 실시예 4에서의 입증된 CE-LIF 검정을 이용하여 정량화될 수 있다.
- [0126] 임의로, 조성물은 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체 (선행 섹션에 기재된 바와 같은 이종이량체 및/또는 동종이량체) 및/또는 하기 기재되는 추가의 변이체를 추가로 포함한다.
- [0127] (iv) LMWS 및 HMWS
- [0128] 본 발명은 또한 단리된 형태의 또는 변이체(들) 및 주요 종 항체를 포함하는 조성물 중의 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및/또는 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)에 관한 것이다. LMWS 및 HMWS는 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC) 및/또는 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (CE-SDS)를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술을 이용하여 단리, 특성화 및 정량화될 수 있다.
- [0129] SE-HPLC 검정 (예를 들어 실시예 5에서와 같음)를 이용한, 조성물 중의 주요 종 페르투주맙 및 HMWS 또는 LMWS의 양은 하기와 같을 수 있다:
- [0130] 주요 피크: \geq 약 96%, 예를 들어, \geq 약 96.7%, \geq 약 97.3%, 예를 들어, \geq 약 97.4%.
- [0131] HMWS: \leq 약 2%, 예를 들어, \leq 약 1.7%, 예를 들어, \leq 약 1.5%, 예를 들어 \leq 약 1.4%, 예를 들어 \leq 약 0.8%.
- [0132] LMWS: \leq 약 2%, 예를 들어, \leq 약 1.6%, 예를 들어, \leq 약 1.2%, 예를 들어 \leq 약 0.6%.
- [0133] NR-CE-SDS 검정 (예를 들어 실시예 5에서와 같음)를 이용한, 조성물 중의 주요 종 페르투주맙 및 HMWS 또는 LMWS의 양은 하기와 같을 수 있다:
- [0134] 주요 피크: \geq 약 95%, 예를 들어, \geq 약 96.0%, 예를 들어, \geq 약 97.8%.
- [0135] HMWS: \leq 약 1%, 예를 들어 \leq 약 0.6%.
- [0136] LMWS: \leq 약 4%, 예를 들어 \leq 약 3.4%.
- [0137] 예를 들어, CE-SDS에 의해 측정된 바와 같은 주요 피크 또는 주요 종 페르투주맙 (LMWS 및 HMWS를 제외함)의 양은 약 95% 내지 약 99%, 예를 들어 약 96.0% 내지 약 97.8%, 예를 들어 약 95.3% 내지 약 97.3% 주요 피크일 수 있다.
- [0138] 임의로, LMWS는 NR-CE-SDS (예를 들어 실시예 5를 참조함)에 의해 얻어진 바와 같은 "피크 6"을 포함하거나 이로 이루어진다. 이러한 피크 6은 조성물의 약 0.9% 내지 약 2.3%, 예를 들어 약 2% 내지 약 2.3%인 것으로 측정될 수 있다.

[0139] (v) 페르투주맙의 피크 1 및 피크 2 단편

[0140] 본 발명은 또한 분리된 또는 단리된 형태의 또는 단편(들) 및 주요 종 항체를 포함하는 조성물 중의 페르투주맙의 피크 1 단편(들) 및/또는 피크 2 단편(들)에 관한 것이다. 피크 1 및 피크 2는 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC), 및/또는 R-CE-SDS 및 NR-CE-SDS를 포함하는 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (CE-SDS)를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술을 이용하여 단리, 특성화 및 정량화될 수 있다. 한 실시양태에서, 피크 1 및 피크 2는 예를 들어 실시예 5 및 6에 기재된 바와 같이 R-CE-SDS에 의해 분리 및/또는 분석되고, 보정된 피크 면적 (CPA)은 조성물 중의 % 피크 1 또는 피크 2를 제공한다.

[0141] R-CE-SDS 검정 (예를 들어 실시예 5 및 6에서와 같음)를 이용한, 조성물 중의 피크 1의 양은 5% 이하 (예를 들어 0.13% 내지 0.41% CPA)이고, 조성물 중의 피크 2의 양은 1.0% 이하 (예를 들어 0.47% 내지 0.74% CPA)이다.

[0142] (vi) 추가의 변이체

[0143] 본원에서 조성물은 임의로 미국 특허 제7,560,111호 (카오 등) 및/또는 WO 2009/099829 (해리스 등)에 기재된 것과 같은 페르투주맙의 추가의 변이체를 포함한다.

[0144] 이러한 추가의 변이체의 예로는 당화된 변이체, 디술피드 환원된 변이체, 비-환원성 변이체, 탈아미드화된 변이체, 시알릴화된 변이체, VHS-변이체, C-말단 리신 변이체, 메티오닌-산화된 변이체, 비푸코실화된 변이체, G1 글리코실화 변이체, G2 글리코실화 변이체 및 비-글리코실화된 중쇄 변이체 중 임의의 1종 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0145] 예를 들어, 조성물은 산성 변이체 (WO 2009/099829, 해리스 등)를 포함할 수 있으며, 조성물 중의 산성 변이체는 당화된 변이체, 탈아미드화된 변이체, 디술피드 환원된 변이체, 시알릴화된 변이체 및 비-환원성 변이체 중 1, 2, 3, 4 또는 5개를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 조성물 중의 모든 산성 변이체의 총량은 약 25% 미만이다. 한 실시양태에서, 당화된 변이체, 탈아미드화된 변이체, 디술피드 환원된 변이체, 시알릴화된 변이체 및 비-환원성 변이체는 조성물 중의 산성 변이체의 적어도 약 75% 내지 80%를 구성한다.

[0146] 산성 변이체는 다양한 방법에 의해 평가될 수 있으나, 바람직하게는 이러한 방법은 조성물이 IEC 전, 후 및/또는 동안 시알리다제로 처리되는 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) (예를 들어 시알릴화된 변이체를 평가함), 환원 CE-SDS (예를 들어 디술피드 환원된 변이체를 평가함), 비-환원 CE-SDS (예를 들어 비-환원성 변이체를 평가함), 보로네이트 크로마토그래피 (예를 들어 당화된 변이체를 평가함), 및 펩티드 맵핑 (예를 들어 탈아미드화된 변이체를 평가함) 중 1, 2, 3, 4 또는 5개를 포함한다.

[0147] 조성물은 임의로 아미노-말단 리더 연장 변이체를 포함한다. 바람직하게는, 아미노-말단 리더 연장은 항체 변이체의 경쇄 상 (예를 들어 항체 변이체의 1 또는 2개의 경쇄 상)에 있다. 본원에서 항체 변이체는 그의 임의의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 아미노-말단 리더 연장은 항체의 1 또는 2개의 경쇄 상에 있다. 아미노-말단 리더 연장은 바람직하게는 VHS-를 포함하거나 이로 이루어진다 (즉, VHS-변이체). 조성물 중의 아미노-말단 리더 연장의 존재는 N-말단 서열 분석, 전하 이종성에 대한 검정 (예를 들어, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동), 질량 분광법 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 분석 기술에 의해 검출될 수 있다. 조성물 중의 항체 변이체의 양은 일반적으로 변이체를 검출하는 데 사용되는 임의의 검정 (바람직하게는 양이온 교환 분석)의 검출 하한을 구성하는 양 내지 주요 종 항체의 양 미만의 양의 범위이다. 일반적으로, 조성물 중의 항체 분자의 약 20% 이하 (예를 들어 약 1% 내지 약 15%, 예를 들어 5% 내지 약 15%, 바람직하게는 약 8% 내지 약 12%)는 아미노-말단 리더 연장을 포함한다. 이러한 퍼센트 양은 바람직하게는 양이온 교환 분석을 이용하여 측정된다.

[0148] 주요 종 항체 및/또는 변이체의 추가의 아미노산 서열 변경이 고려되며, 이는 그의 하나 또는 둘 다의 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 포함하는 항체 (이러한 항체 변이체는 약 1% 내지 약 20%의 양으로 존재할 수 있음), 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 갖는 항체 (예를 들어, 산화된 Met-254를 포함하는 페르투주맙) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0149] 또한, 상기 논의된 비푸코실화된 변이체 및 시알릴화된 변이체 외에, 주요 종 항체 또는 변이체는 추가의 글리코실화 변이체를 포함할 수 있으며, 그의 비-제한적 예로는 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고사카라이드 구조를 포함하는 항체, 1 또는 2개의 비-글리코실화된 중쇄를 포함하는 항체 등을 들 수 있다.

[0150] III. 제조 및 분석 방법

- [0151] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, (1) 조성물 중의, 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 측정하고/거나, (2) 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙의 양을 측정하고/거나, (3) 조성물 중의 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS)의 양을 측정하고/거나, (4) 조성물 중의 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS)의 양을 측정하는 것 중 1, 2, 3 또는 4가지를 포함하는 페르투주맙 조성물의 평가 방법이 제공된다. 임의로, 모든 4가지의 분석 검정은 페르투주맙 및 그의 변이체를 포함하는 조성물에 대해 수행된다.
- [0152] 본 발명은 또한 (1) 페르투주맙 및 1종 이상의 그의 변이체를 포함하는 조성물을 제조하고, (2) 이와 같이 제조된 조성물을 하나 이상의 분석 검정(들)에 적용하여 조성물 중의 변이체(들)의 양을 평가하는 것을 포함하는 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 분석 검정(들)은 (i) 페르투주맙의 하나 또는 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체, 및/또는 (ii) 페르투주맙의 하나의 경쇄 가변 도메인에만 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 이종이량체 변이체, 및/또는 (iii) 페르투주맙의 둘 다의 경쇄 가변 도메인에 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 동종이량체 변이체, 및/또는 (iv) 페르투주맙의 비푸코실화된 변이체, 및/또는 (v) 페르투주맙의 고분자량 종 (HMWS), 및/또는 (vi) 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS), 및/또는 (vii) 페르투주맙의 피크 1 단편(들), 및/또는 (viii) 페르투주맙의 피크 2 단편(들) 중 임의의 하나 이상의 양을 평가 및 정량화할 수 있다. 따라서, 이를 변이체 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개가 분석될 수 있다.
- [0153] 임의로, 분석 검정은 이종이량체 및/또는 동종이량체 변이체를 포함하는 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 평가, 정량화 또는 단리한다. 예를 들어, 분석 검정은 항체 단편 (예를 들어 Fab 단편) 또는 무손상 항체 (예를 들어 실시예 1을 참조함)의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 펩티드 맵핑 분석 (예를 들어 실시예 3을 참조함), 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) (예를 들어 실시예 3을 참조함)를 포함할 수 있다.
- [0154] 한 실시양태에서, 조성물 중의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체 (이종이량체 및/또는 동종이량체 변이체)의 양은 Fab 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에 약 25% 이하이다.
- [0155] 한 실시양태에서, 조성물 중의 동종이량체 변이체의 양은 무손상 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에 4.9% 이하이다.
- [0156] 한 실시양태에서, 조성물 중의 이종이량체 변이체의 양은 무손상 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 결정시에 약 13% 내지 약 18%이다.
- [0157] 임의로, 분석 검정은 비푸코실화된 변이체를 평가, 정량화 또는 단리한다. 비푸코실화의 양은 조성물의 생물학적 활성, 예를 들어 ADCC를 측정 또는 정량화하는 데 사용될 수 있다.
- [0158] 또한, 상기 방법은 조성물 중의 비푸코실화된 페르투주맙 변이체의 양을 측정하여 조성물의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성을 측정하고, 비푸코실화된 페르투주맙의 양이 약 0.9% 내지 약 4.1%의 범위임을 확인하는 것을 포함하는, 페르투주맙 조성물의 생물학적 활성의 평가를 포함한다. 예를 들어, 상기 방법은 모세관 전기영동-레이저-유도 형광법 (CE-LIF)을 이용하여 비푸코실화된 페르투주맙의 양을 측정하는 것을 포함한다.
- [0159] 임의로, 비푸코실화를 평가하기 위한 분석 검정은 모세관 전기영동-레이저-유도 형광법 (CE-LIF)을 포함하는 모세관 전기영동 (CE)이며, 하기 실시예 2 및 4를 참조한다. 비푸코실화된 변이체의 양은 임의로 조성물의 약 0.9 내지 약 4.1%이다 (예를 들어 실시예 4에서의 CE-LIF에 의해 측정된 바와 같음). 한 실시양태에서, 비푸코실화된 변이체의 양은 조성물의 2% 초과이다 (예를 들어 실시예 4에서의 CE-LIF에 의해 측정된 바와 같음).
- [0160] 임의로, 분석 검정은 페르투주맙의 저분자량 종 (LMWS) 및/또는 고분자량 종 (HMWS)을 평가, 정량화 또는 단리한다. 예시적인 검정으로는 SE-HPLC 및/또는 CE-SDS를 들 수 있다 (예를 들어 하기 실시예 5를 참조함).
- [0161] 한 실시양태에서, 분석 검정은 SE-HPLC를 포함하여 (예를 들어 실시예 5에서와 같음), 이와 같이 분석된 조성물 중의 주요 종 페르투주맙, HMWS 또는 LMWS의 양은 하기인 것으로 측정된다:
- [0162] 주요 피크: \geq 약 96%, 예를 들어, \geq 약 96.7%, \geq 약 97.3%, 예를 들어, \geq 약 97.4%.
- [0163] HMWS: \leq 약 2%, 예를 들어, \leq 약 1.7%, 예를 들어, \leq 약 1.5%, 예를 들어 \leq 약 1.4%, 예를 들어 \leq 약 0.8%.
- [0164] LMWS: \leq 약 2%, 예를 들어, \leq 약 1.6%, 예를 들어, \leq 약 1.2%, 예를 들어 \leq 약 0.6%.

- [0165] 한 실시양태에서, 분석 검정은 CE-SDS를 포함하며 (예를 들어 실시예 5에서와 같음), 이와 같이 분석된 조성물 중의 주요 종 폐르투주맙 및 HMWS 또는 LMWS 폐르투주맙의 양은 하기인 것으로 측정된다:
- [0166] 주요 피크: ≥ 약 95%, 예를 들어, ≥ 약 96.0%, 예를 들어, ≥ 약 97.8%.
- [0167] HMWS: ≤ 약 1%, 예를 들어 ≤ 약 0.6%.
- [0168] LMWS: ≤ 약 4%, 예를 들어 ≤ 약 3.4%.
- [0169] 한 실시양태에서, 조성물은 NR-CE-SDS에 의해 평가되며, 주요 피크 또는 주요 종 폐르투주맙 (LMWS 및 HMWS를 제외함)의 양은 이와 같이 분석된 조성물의 약 95% 내지 약 99%, 예를 들어, 약 96.0% 내지 약 97.8%, 예를 들어 약 95.3% 내지 약 97.3%인 것으로 밝혀진다.
- [0170] 한 실시양태에서, 조성물 중의 "피크 6"의 양은 CE-SDS에 의해 평가되며 (예를 들어 실시예 5를 참조함), 피크 6 LMWS의 양은 이와 같이 분석된 조성물의 약 0.9% 내지 약 2.3%, 예를 들어 약 2% 내지 약 2.3%인 것으로 결정된다.
- [0171] 한 실시양태에서, 조성물 중의 피크 1 및/또는 피크 2의 양은 R-CE-SDS에 의해 평가되며 (예를 들어 실시예 5 및 6을 참조함), 피크 1의 양은 5% 이하 (예를 들어 0.13% 내지 0.41% CPA)인 것으로 측정되고, 피크 2의 양은 1.0% 이하 (예를 들어 0.47% 내지 0.74% CPA)인 것으로 측정된다.
- [0172] 상기 방법은 임의로 정제된 조성물을 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제와 조합하여 제약 조성물을 제조하는 것을 추가로 포함한다. 또한, 제약 조성물은 제품을 제조하기 위해 패키지 삽입물 (예를 들어 암을 치료하기 위하여 제약 조성물을 사용하는 것을 그의 사용자에게 지시하는 처방 정보)과 함께 패키징된 용기 내로 넣어질 수 있다.
- [0173] **IV. 제약 조성물**
- [0174] 폐르투주맙 및 그의 변이체를 포함하는 제약 조성물은 일반적으로 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로, 바람직한 정도의 순도를 갖는 조성물을 임의의 제약상 허용되는 부형제 (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 저장용으로 제조된다. 항체 결정이 또한 고려된다 (미국 특허 출원 2002/0136719를 참조함). 제약상 허용되는 부형제는 채용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며, 완충제, 예컨대 히스티딘 아세테이트; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 칼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예컨대 나트륨; 금속 치체 (예를 들어 Zn-단백질 치체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 (예를 들어 폴리소르베이트 20 또는 80), 플루로닉스 (PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 들 수 있다.
- [0175] 동결건조된 항체 제제는 미국 특허 제6,267,958호, 미국 특허 제6,685,940호 및 미국 특허 제6,821,515호에 기재되어 있으며, 이들은 명백히 본원에 참고로 도입된다. 예시적인 트라스투주맙 제약 조성물은 440 mg 트라스투주맙, 400 mg α, α-트레할로스 데히드레이트, 9.9 mg L-히스티딘-HCl, 6.4 mg L-히스티딘 및 1.8 mg 폴리소르베이트 20을 포함하는, 정맥내 (IV) 투여를 위한 멀균성, 백색 내지 담황색 보존제-무함유 동결건조된 분말이다. 보존제로서 1.1% 벤질 알코올을 함유하는 정균 주사용수 (BWF) 20 mL의 재구성은 pH 대략 6.0의 21 mg/mL 트라스투주맙을 함유하는 다중-용량 용액을 생성한다.
- [0176] 치료 용도를 위한 예시적인 폐르투주맙 제약 조성물은 pH 6.0의 20 mM 히스티딘 아세테이트, 120 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 중 30 mg/mL 폐르투주맙을 포함한다. 대안적인 폐르투주맙 제제는 pH 6.0의 25 mg/mL 폐르투주맙, 10 mM 히스티딘-HCl 완충제, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0177] 생체내 투여에 사용되는 제약 조성물은 무균성이어야 한다. 이는 무균 여과막을 통해 여과함으로써 용이하게 달성된다.
- [0178] **V. 치료적 적용 및 용도**
- [0179] 본원에서 조성물은 암, 예컨대 HER2-양성 유방암, 예를 들어 전이성 또는 국소 재발성, 절제불가능한 유방암을 치료하는 데 사용될 수 있고, 신생 IV기 질환은 면역조직화학 (IHC) 3+ 및/또는 형광 계내 혼성화 (FISH) 증폭 비율 2.0 이상으로서 정의된다. 임의로, 집단 내의 환자는 선행 치료를 받지 않았거나 보조 요법 후에 재발하

였고/거나, 기준선에서 50% 이상의 좌심실 박출률 (LVEF)을 갖고/거나, 0 또는 1의 동부 종양학 협력 그룹 (Eastern Cooperative Oncology Group) 활동 상태 (ECOG PS)를 갖는다.

[0180] 대안적인 실시양태에서, 조성물은 예를 들어 트라스투주맙, 및 안트라시클린-기재 화학요법 또는 카르보플라틴-기재 화학요법을 포함하는 화학요법과 조합으로 초기-단계 HER2-양성 유방암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 화학요법은 예를 들어 5-FU, 에피루비신 및 시클로포스파미드 (FEC)를 포함하는 안트라시클린-기재 화학요법을 포함한다. 대안적인 실시양태에서, 화학요법은 예를 들어 탁산 (예를 들어 도세타셀 (Docetaxel)), 헤르셉틴 (HERCEPTIN)®/트라스투주맙 (예를 들어 TCH 요법)에 추가로 카르보플라틴 (Carboplatin)을 포함하는 카르보플라틴-기재 화학요법을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 안트라시클린-기재 화학요법 또는 카르보플라틴-기재 화학요법과 동시에 투여되며, 예를 들어 페르투주맙, 트라스투주맙 및 화학요법은 3주 주기로 투여되고, 페르투주맙, 트라스투주맙 및 화학요법은 각 주기의 제1일에 투여된다. 본원에서 고려되는 초기-단계 HER2-양성 유방암 요법은 신보조 및 보조 요법을 포함한다.

[0181] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 임의로 트라스투주맙 및 화학요법, 예컨대 플라틴 (예를 들어 시스플라틴) 및/ 또는 플루오로푸리미딘 (예를 들어 카페시타빈 및/또는 5-플루오로우라실 (5-FU))과 조합으로 HER2-양성 위암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0182] 대안적인 실시양태에서, 조성물은 임의로 트라스투주맙 및 비노렐빈과 조합으로 HER2-양성 유방암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 실시양태에 따른 유방암은 임의로 전이성 또는 국소 진행성이다. 임의로, 환자는 전이성 설정에서 이전에 전신성 비-호르몬 항암 요법을 받지 않았다.

[0183] 또 다른 측면에서, 조성물은 조성물, 트라스투주맙 및 아로마타제 억제제 (예를 들어 아나스트라졸 또는 레트로졸)을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서의 HER2-양성 유방암을 치료하는 데 사용된다. 본 실시양태에 따르면, 유방암은 호르몬 수용체-양성 유방암, 예컨대 에스트로겐 수용체 (ER)-양성 및/또는 프로게스테론 수용체 (PgR)-양성 유방암을 포함하는 진행성 유방암이다. 임의로, 환자는 전이성 설정에서 이전에 전신성 비호르몬 항암 요법을 받지 않았다. 이 치료 방법은 임의로 유도 화학요법 (예를 들어 탁산을 포함함)을 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0184] 추가의 측면에서, 조성물은 낫은 HER3 암, 예컨대 난소암, 원발성 복막 또는 자궁관 암을 치료하는 데 사용된다. 예를 들어, 미국 특허 제7,981,418호 (암러 등) 및 미국 특허 공개 US-2006-0013819-A1 (켈시, 에스. (Kelsey, S.))을 참조한다.

[0185] 항체 및 화학요법 치료는 공지된 방법에 따라 인간 환자에게 투여된다. 특정 투여 스케줄 및 제제는 본원의 실시예에 기재되어 있다.

[0186] 본 발명의 특정 실시양태에 따르면, 대략 840 mg (부하 용량)의 페르투주맙이 투여된 후, 대략 420 mg (유지 용량(들))의 하나 이상의 용량의 페르투주맙이 투여된다. 유지 용량은 바람직하게는 임상적 진행성 질환 또는 다른 어려운 독성까지 총 적어도 2회 용량에 대해 약 매 3주, 예를 들어 6 내지 20회 용량으로 투여된다. 보다 많은 치료 주기를 포함하는 보다 긴 치료 기간이 또한 고려된다.

[0187] 암이 위암인 또 다른 특정 실시양태에 따르면, 페르투주맙은 모든 치료 주기에 대해 840 mg의 용량으로 투여된다.

VI. 제품

[0189] 본원에서 제품의 한 실시양태는 본원의 조성물 또는 제약 조성물을 함유하는 용기, 예컨대 바이알, 시린지 또는 정맥내 (IV) 백을 포함한다. 임의로, 제품은 본원의 선행 섹션에 따른 조성물을 사용하는 방법을 기재하는 처방 정보를 갖는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다.

VII. 생물학적 물질의 기탁

[0191] 하기 하이브리도마 세포주는 미국 20110-2209 베지니아주 마나사스 유니버시티 불러바드 10801 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁되었다:

항체 명칭	ATCC 번호	기탁일
4D5	ATCC CRL 10463	1990년 5월 24일
2C4	ATCC HB-12697	1999년 4월 8일

[0192]

- [0193] 본 발명의 추가의 상세사항은 하기 비-제한적 실시예에 의해 설명된다. 본 명세서의 모든 인용문헌의 개시내용은 명백하게 본원에 참고로 도입된다.
- [0194] 실시예 1
- [0195] 페르투주맙의 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체 및 그의 특성화
- [0196] 페르투주맙은 인간 IgG1(κ) 프레임워크에 기재하는 인간화 모노클로날 항체 (MAb)이다. 재조합 항체는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 생성되며, 쇄-간 및 쇄-내 디솔피드 결합을 갖는 2개의 중쇄 (각각 449개의 아미노산 잔기) 및 2개의 경쇄 (각각 214개의 아미노산 잔기)를 포함한다. 페르투주맙의 경쇄 및 중쇄 서열은 각각 도 3a 및 3b에 나타나 있다. 무손상 페르투주맙의 계산된 분자량은 145,197 Da (중쇄 C-말단 리신 잔기 없이 단지 웨티드 쇄만)이다.
- [0197] 각각의 중쇄의 CH2 도메인은 또한 Asn299에 단일의 보존된 글리코실화 부위를 갖는다.
- [0198] 페르투주맙은 경쇄 (12개 아미노산 차이) 및 중쇄 (29개 아미노산 차이)의 상보성 결정 영역 (CDR)에 있어서, 및 그것이 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (p185^{HER2}) 상의 상이한 에피토프에 결합한다는 점에서, 트라스투주맙 (헤르셉틴®)과 상이하다. 인간 표피 세포 상의 HER2 수용체에의 페르투주맙이 결합은 HER2가 HER 수용체 부류 (EGFR, HER3, HER4를 포함함)의 다른 일원과 복합체를 형성하는 것 및 HER2 동종이량체를 형성하는 것을 방지한다. 복합체 형성을 차단함으로써, 페르투주맙은 각각 세포 종식 및 생존의 억제를 초래하는 2개의 주요 신호 경로인 미토겐-활성화된 단백질 (MAP) 키나제 및 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K)를 통한 리간드-개시된 세포 내 신호전달을 억제한다.
- [0199] 본 실시예는 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체: 항체의 하나 또는 둘 다의 경쇄에 쌍형성되지 않은 시스테인을 포함하는 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 확인 및 특성화에 관한 것이다.
- [0200] 유리 술프히드릴을 엘만 (Ellman) 시약을 사용하여 측정하였으며, 단백질 몰 당 0.1 내지 0.3 몰의 반응성 유리 술프히드릴 함량을 나타내었다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 분석 및 웨티드 맵 분석은 하나 또는 둘 다의 경쇄 상의 Cys23 및 Cys88에서 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기를 나타내었다. 파파인 HIC를 이용하여, 이를 부위에 유리 술프히드릴을 함유하는 Fab 변이체의 수준은 상업적 제조 공정을 이용하여 제조된 페르투주맙 물질에서 12.7% 내지 13.5%인 것으로 밝혀졌다. 무손상 항체의 HIC 분석은 2개의 주요 형태가 78% 내지 85% 야생형 페르투주맙 및 13.4% 내지 18.4% 페르투주맙 이종이량체 (하나의 아암에 쌍형성되지 않은 시스테인 쌍)를 지시하였다.
- [0201] 물질 및 방법
- [0202] **시험된 조성물:** 본 실시예는 모두 상업적 공정을 이용하여 12,000 리터 (L) 규모로 제조된, III상 임상 물질을 나타내는 현행 페르투주맙 참조 표준물 배치 항2C4907-2 및 구동 1, 및 5개의 III상/시판 배치 (구동 3 내지 7)의 특성화를 기재한다. 또한, I/II상 임상 물질의 대표인 선형 참조 표준물 배치 항2C4-900-1과의 비교가 이루어진다.
- [0203] 시험된 조성물은 pH 6.0의 20 mM L-히스티딘 아세테이트, 120 mM 수크로스 및 0.02% (w/v) 폴리소르베이트 20 중 30 mg/mL로 시판 제제로 제제화된 약물 물질 배치였다. 배치 항2C4-900-1은 pH 6.0의 10 mM L-히스티딘 클로라이드, 240 mM 수크로스 및 0.02% (w/v) 폴리소르베이트 20 중 25 mg/mL로 임상 개발의 초기에 제제화되었다.
- [0204] **비-환원된 웨티드 맵 분석 및 질량 분광법에 의한 디솔피드 결합 분석:** 비-환원 조건 하에서 페르투주맙을 변성시키고, 임의의 매설된 유리 술프히드릴기를 알킬화하기 위해, 제제 완충제 중 대략 0.5 mg의 페르투주맙을 변성 완충제 (8 M GdHCl, 10 mM N-에틸말레이미드 (NEM), 0.1 M 아세트산나트륨으로 이루어짐, pH 5.0)와 혼합한 후, 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 용액을 NAP-5 컬럼을 사용하여 600 μL의 0.1 M 트리스 (Tris), 1 mM CaCl₂ (pH 7.0)으로 완충제 교환하였다. 아세토니트릴 (ACN)을 각 샘플에 첨가하여 10%의 농도를 달성하였다. 트립신 소화를 1:10 (w/w)의 효소 대 기질 비율로 37°C에서 16시간 동안 수행하였다. 생성된 웨티드를 아황산첨가분해 트립신 맵에 대해 하기 기재된 방법을 이용하여 RP-HPLC에 의해 분리하였다.
- [0205] **아황산첨가분해 트립신 웨티드 맵:** 페르투주맙 웨티드 맵을 생성하기 위해, 단백질을 시스테인 잔기의 환원 및 아황산첨가분해 후 트립신으로 소화시켰다. 페르투주맙의 분취액 (1 mg)을 시스테인 잔기의 환원 및 아황산첨가분해를 위해 360 mM 트리스-HCl (pH 8.6), 6 M 구아니딘 히드로클로라이드 (GdHCl), 2 mM 에틸렌디아민테트라

아세트산 (EDTA), 13 mM 아황산나트륨 및 38 mM 소듐 테트라티오네이트에 첨가하였다. 샘플을 37°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 아황산첨가분해된 샘플을 PD-10 컬럼 상에 부하하고, 10 mM 트리스, 0.1 mM CaCl₂ (pH 8.3)로 용리하였다. 완충제 교환 후, 10% 옥틸-B-글루코시드 용액 20 μL 및 1 mg/mL 트립신 20 μL를 첨가하였다. 샘플을 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 소화 반응을 10% 트리플루오로아세트산 (TFA) 25 μL로 켐칭하였다. 생성된 웨프티드를 조르박스 (Zorbax) 300SB-C8 컬럼 (4.6 mm × 150 mm)을 이용한 RP-HPLC에 의해 분리하였다. 웨프티드를 57분에서 0% 내지 17% 용매 B, 149분에서 32% 용매 B, 162분에서 45% 용매 B, 및 173분에서 95% 용매 B로의 선형 구배를 갖는 초기 조건에서 5분 유지 후 분리하였다. 179분에서, 컬럼을 100% 용매 A에서 25분 동안, 204분의 총 구동 시간 동안 재조정하였다. 용매 A는 물 중 0.1% TFA로 이루어지고, 용매 B는 아세토니트릴 중 0.08% TFA로 이루어졌다. 컬럼을 37°C에서 유지하고, 0.5 mL/분의 유속으로 용리하였다. 용리 프로파일을 214 nm 및 280 nm에서 모니터링하였다. 트립신 웨프티드의 질량을 LTQ 오르비트랩 (ORBITRAP)TM 질량 분광계를 사용한 분리된 소화 혼합물의 액체 크로마토그래피-질량 분광 (LC-MS) 분석에 의해 측정하였다.

[0206]

엘만 분석에 의한 유리 슬프히드릴 함량: 페르투주맙 샘플을 반응 완충제 (100 mM 인산칼륨, 1 mM EDTA, 8 M 우레아, pH 8)로 완충제 교환하고, 표준 곡선 범위 내의 유리 티올 농도를 초래하는 농도로 조정하였다. 디토오니트로벤젠 (DTNB) (10 mM)의 용액 및 시스테인 표준 곡선 (0 및 100 μM 사이의 8개 점)을 반응 완충제 중에서 제조하였다. 96-웰 플레이트 상에서, 샘플 또는 표준물 165 μL를 3중 웰에 첨가하였다. 반응을 DTNB 10 μL의 첨가에 의해 개시한 후, 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 스펙트라맥스 (SPECTRAMAX) M²® 플레이트 판독기를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리 티올의 농도를 표준 곡선으로부터 얻어진 선형 방정식을 이용하여 계산하였다. 단백질의 농도를 분광광도계로부터 얻어진 280 nm에서의 흡광도를 이용하여 결정하였다. 유리 티올은 페르투주맙의 몰 당 유리 티올의 몰로서 보고된다.

[0207]

파파인 HIC: 파파인-소화된 페르투주맙 샘플에 대해, 카르복시웨프티다제 B (CpB)로 C-말단 리신을 제거한 후, 샘플을 파파인으로 소화시켰다. Fab 및 Fc 도메인을 폴리프로필 아스파르타미드 (PolyPropyl Aspartamide) 컬럼 (4.6 mm × 100 mm, 1500 Å, 3 μm)을 사용한 HIC에 의해 분리하였다. 용매 A는 1.6 M 황산암모늄, 20 mM 인산칼륨 (pH 6.05)으로 이루어지고, 용매 B는 20 mM 인산칼륨 (pH 6.05)으로 이루어졌다. 분석물을 0% 내지 18% 용매 B의 구배로 3 내지 6분 동안, 24% 용매 B로 21분에서 분리하였다. 컬럼을 25°C에서 0.8 mL/분의 유속으로 유지하였다. 용리 프로파일을 280 nm에서 모니터링하였다.

[0208]

무손상 항체의 HIC: 무손상 페르투주맙 샘플을 폴리프로필 아스파르타미드 컬럼 (9.4 mm × 100 mm, 1500 Å, 3 μm)을 사용한 HIC에 의해 분리하였다. 용매 A는 1.0 M 황산암모늄, 20 mM 인산칼륨 (pH 6.05)으로 이루어지고, 용매 B는 20 mM 인산칼륨 (pH 6.05)으로 이루어졌다. 분석물을 12% 용매 B로 25분 동안 등용매적으로 분리하였다. 컬럼을 30°C에서 2 mL/분의 유속으로 유지하였다. 용리 프로파일을 280 nm에서 모니터링하였다.

[0209]

웨프티드 질량 평거프린팅을 이용한 SDS-PAGE: 환원된 및 비-환원된 페르투주맙 샘플 둘 다를 소듐 도데실 슬레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분석하였다. 샘플 (5 μg)을 SDS-PAGE 샘플 완충제의 존재 하에서 5 내지 10분 동안 60 ± 2°C에서 비-환원된 샘플에 대해 아이오도아세트아미드와 함께 가열함으로써 변성시켰다. 샘플을 80 mM 디티오트레이탈 (DTT)의 존재 하에서 15 내지 20분 동안 60°C ± 2°C에서 환원시켰다. 변성된 샘플을 4% 내지 20% 폴리아크릴아미드 구배 겔에서 분리하고, 사이프로 (SYPRO)TM 루비 염료로 염색하여 단백질 밴딩 패턴을 얻었다. 페르투주맙 샘플과 함께, 분자량 표준물 및 사이프로TM 루비-염색 민감성 표준물 (2 ng/레인 및 8 ng/레인 소 혈청 알부민 (BSA))이 겔 상에 포함되었다.

[0210]

웨프티드 질량 평거프린팅은 단백질 확인을 위한 분석 기술이다. 겔을 10 μg의 시판 참조 표준물 배치 항 2C4907-2 및 구동 5로 부하하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 모든 밴드를 트립신에 의해 웨프티드로 절단하였다. 웨프티드의 절대 질량은 브루커 (BRUKER)TM 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화-비행 시간 질량 분광법 (MALDI-TOF MS)으로 정확하게 측정된다. 웨프티드 질량 목록을 사용하여 단백질 서열을 조사함으로써 단백질을 확인하였다. 비-환원된 및 환원된 페르투주맙 둘 다의 모든 관찰된 밴드를 웨프티드 질량 평거프린팅에 의해 확인하였다.

[0211]

바이오검정에 의한 효능: 페르투주맙 효능 방법은 인간 HER2-발현 유방암 세포주의 증식을 억제하는 그의 능력을 측정함으로써 페르투주맙의 효능을 평가한다. 전형적인 검정에서, 96-웰 미세역가판(들)을 유방암 세포로 시팅하고, 가습된 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 배지를 제거하고, 다양한 농도의 페르투주맙 참조 표준물, 검정 대조군 및 샘플(들)을 플레이트(들)에 첨가하였다. 그 후, 플레이트(들)를 인큐베이션하고, 생존 세포의 상대 수를 산화환원 염료 알라마르블루 (ALAMARBLUE)[®]를 사용하여 간접적으로

정량화하였다. 형광을 530 nm의 여기 및 590 nm의 방출을 이용하여 측정하였다. 알라마르블루®는 그의 산화된 상태에서 청색 및 비형광성이지만, 세포의 세포내 환경에 의해 매우 형광성이 분홍색 형태로 환원된다 (Page et al. *Int. J. Oncol.* 3: 473-476 (1993)). 색 및 형광의 변화는 생존 세포의 수에 비례한다. 상대 형광 단위 (RFU)로 표현되는 결과를 페르투주맙 농도에 대해 플롯팅하고, 평행선 프로그램을 사용하여 참조 표준물에 대한 페르투주맙 샘플의 항-증식 활성을 추정하였다.

[0212] 결과

디슬피드 결합의 할당: 페르투주맙에는 32개의 시스테인이 있으며, 이는 16개의 디슬피드 결합을 형성하고, 이 중 4개는 쇄-간 연결이고, 12개는 쇄-내 연결이다. 그러나, 분자의 다중결합적 성질 때문에, 단지 9개의 개별 디슬피드 결합만이 있다. 천연 단백질을 트립신으로 소화시켜 모든 디슬피드-연결된 펩티드의 방출을 달성하였다. 페르투주맙 배치에 대한 크로마토그래피 파일은 도 7에 나타나 있다. 시판 참조 표준물 배치 항 2C4907-2의 소화물의 역상 LC-MS 분석으로 모든 예상되는 디슬피드-연결된 펩티드-쌍을 얻었다 (표 2).

[표 2]

LC-MS에 의해 확인된 디슬피드-연결된 펩티드-쌍

예상치 ^a	디슬피드 연결	실측치	예상된 질량 (Da) ^b	관측된 질량 (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

[0216]

[0217] 주: 등호 (=)는 디슬피드 결합을 나타낸다.

[0218] H = 중쇄; L = 경쇄; LC-MS = 고성능 액체 크로마토그래피 질량 분광법; T = 트립신 펩티드.

[0219] ^a 도 9 및 10을 참조한다.

[0220] ^b 단일동위원소 질량 (MH^+).

[0221] ^c 디슬피드가 추론된다. T19H 이량체 할당은 Cys228=Cys228 및 Cys231=Cys231 디슬피드의 확인을 포함하지 않는다.

[0222] ^d이 디슬피드-연결된 쌍의 존재는 T19L 및 T20L을 절단하지 않는 대안적인 효소 Lys-C의 사용을 통해 확인되었다.

[0223] 확인된 펩티드는 또한 디슬피드의 환원시 펩티드-쌍으로부터 예상되는 펩티드의 확인에 의해 확인되었다 (도 8, 확대도는 도 9 및 10). 중쇄 펩티드 T19H의 이량체 (T19H=T19H)를 2개의 디슬피드 결합을 함유하는 것으로서 확인하였고, Cys228=Cys228 및 Cys231=Cys231 쌍의 확인이 추론된다. 하나의 디슬피드 쌍 T18H=T20L은 LC-MS에 의해 검출되지만, 공극 부피에 가깝게 용리되고, 자외선 (UV) 크로마토그램 상의 별개의 피크로서 확인할 수 없었다. 이 디슬피드 쌍의 존재는 또한 Lys-C 소화물의 LC-MS 분석에 의해 확인되었고, 펩티드 T18H-T19L-T20L이 관찰되었다. 예상되지 않은 연결은 발견되지 않았다. 하나의 디슬피드 결합은 하기 논의된 바와 같이 부분적으로 쌍형성되지 않은 것이다.

[0224] **유리 술프히드릴 분석:** 적절하게 풀딩된 페르투주맙의 모든 시스테인 잔기는 디슬피드 결합에 포함되어야 한다. 펩티드 및 단백질의 유리 술프히드릴 함량을 측정하는 방법인 엘만 검정 (Ellman, G. *Arch. Biochem. Biophys.*

82: 70-77 (1959))를 이용하여, 반응성 비개질된 (유리) 티올이 페르투주맙에 존재하는지 여부를 측정하였다. 모든 물질을 유리 티올 (쌍형성되지 않은 시스테인 잔기)에 대해 평가하였으며, 결과는 표 3에 요약되어 있다.

[0225] [표 3]

[0226] 엘만 검정에 의한 유리 티올 함량

배치 명칭	페르투주맙의 몰 당 유리 티올의 몰
항 2C4-900-1	0.06
항 2C4907-2	0.15
구동 1	0.28
구동 3	0.16
구동 4	0.17
구동 5	0.16
구동 6	0.16
구동 7	0.14

[0227]

[0228] 주: 유리 티올 수준은 8 M 우레아의 존재 하에서 엘만 검정에 의해 측정하였다.

[0229]

페르투주맙의 몰 당 대략 0.1 내지 0.3 몰의 유리 티올이 분석된 모든 배치에서 관찰되었다. 8 M 우레아의 부재 하에서, 유리 티올 수준은 시험된 모든 물질에서 정량화 한계 (QL: 단백질 몰 당 유리 티올 대략 0.1 몰) 미만이었으며, 이는 페르투주맙 분자에 존재하는 유리 티올 (즉, 쌍형성되지 않은 시스테인)이 비-변성 조건 하에서 엘만 시약에 매립되고 접근불가능함을 나타낸다.

[0230]

CpB 및 파파인 소화 후의 HIC에 의한 페르투주맙 물질의 분석은 Cys23 및 Cys88에 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기를 함유하는 Fab 변이체로서 확인된 Fc 및 Fab 피크 사이에 추가의 피크를 나타내었다 (도 11 및 12, 유리-티올 Fab로서 표지됨). 이 확인은 샘플을 환원 및 트립신 소화 전에 NEM의 존재 하에서 변성시킨 LC-MS 트립신 펩티드 맵핑에 의해 확인되었다. 파파인 HIC 방법을 이용한 유리 티올 Fab 변이체의 정도를 페르투주맙 배치를 통해 측정하였고, 현행 공정을 이용하여 일정한 것으로 실측되었다 (표 4).

[0231] [표 4]

[0232]

파파인 HIC에 의해 결정된 바와 같은 Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 변이체 또는 계산된 무손상 항체 변이체의 상대량

배치 명칭	쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 변이체 퍼센트	무손상 항체 변이체 퍼센트*
항 2C4-900-1	9.4	17.9
항 2C4907-2	12.7	23.8
구동 1	13.2	24.6
구동 3	13.3	24.9
구동 4	13.5	25.2
구동 5	13.3	24.9
구동 6	12.9	24.2
구동 7	13.2	24.6

[0233]

[0234] 주: 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 피크 퍼센트는 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 피크 면적을 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab + Fab의 피크 면적으로 나눔으로써 얻었다.

[0235]

* 하기 기재된 바와 같이 계산됨

[0236]

파파인 HIC 검정에 의해, 상업적 공정을 이용하여 제조된 물질에 대한 값은 12.7% 내지 13.5%의 범위인 반면, 참조 표준물 배치 2C4-900-1 (I/II상)에 대한 값은 9.4%에서 약간 더 낮았다.

[0237]

파파인 HIC로부터의 % Fab 변이체를 추정된 % 무손상 항체 변이체로 전환: 쌍형성되지 않은 시스테인을 함유하는 Fab 단편의 상대량을 이용하여 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 이종이량체 또는 동종이량체 형태의 상대 분포를 계산할 수 있다. 파파인 HIC 검정이 페르투주맙으로부터의 Fab 단편의 10% (또는 x%)가 Cys23/Cys88에서 쌍형성되지 않은 시스테인을 함유함을 나타내는 경우, 파파인에 의한 50개의 항체의 소화가 100개의 Fab 단편을 생성해야 하기 때문에, 모든 50개의 페르투주맙 분자로부터 방출된 쌍형성되지 않은 시스테인을 함유하는 10개의 Fab 단편이 존재해야 한다. 이들 10개의 Fab 단편이 10개의 상이한 페르투주맙 분자로부터의 것이라고 가정하면, Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 갖는 하나의 Fab를 함유하는 페르투주맙의 상대량은 대략 20%, 즉 50개의 페르투주맙 분자 중에서 10개 (또는 2x%)이다. 보다 정확하게, Cys23/Cys88 쌍형성되지 않은 시스테인을 함유하는 2개의 Fab를 갖는 페르투주맙의 확률이 고려될 경우, 페르투주맙 이종이량체 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 상대량은 $2 \times 10\% \times 90\% = 18\%$ (또는 $2 \times x\% \times [100-x]\%$)이어야 한다. 또한, 페르투주맙 동종이량체 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 상대량은 $10\% \times 10\% = 1\%$ (또는 $x\% \times x\%$)이어야 한다. 이 경우, 어느 하나의 Fab 상에 쌍형성되지 않은 시스테인을 갖지 않는 2개의 Fab를 함유하는 페르투주맙의 상대량은 $90\% \times 90\% = 81\%$ (또는 $[100-x]\% \times [100-x]\%$)이어야 한다.

[0238]

또한, 야생형 동종이량체 (쌍형성되지 않은 시스테인이 없음) 및 이종이량체 (하나의 Fab 상에 쌍형성되지 않은 시스테인을 가짐)를 HIC에 의해 직접 정량화할 수 있다. 무손상 항체의 HIC는 페르투주맙을 2개의 주요 피크로 분리하며 (도 13), 이는 LC-MS 트립신 웨티드 맵핑에 의해 야생형 동종이량체 (유리 티올이 없음) 및 이종이량체 (하나의 Fab 상에 유리 티올 쌍을 가짐)로서 확인되었다. 부수 프론트 솔더 피크를 또한 수집하였고, 파파인 HIC에 의해 우세하게 동종이량체 (둘 다의 Fab 상에 유리 티올 쌍, 대략 40%) 및 Fc 산화를 갖는 페르투주맙으로서 특성화되었다. 무손상 항체의 HIC를 이용하여, 페르투주맙은 현행 공정을 이용하여 제조된 물질에 대해 대략 17% 내지 18% 이종이량체를 함유하고, I/II상 공정을 이용하여 13%로 추정되었다 (표 5). 임의의 하나의 이론에 구애되지는 않지만, 상업적 공정 (I/II상 공정에 비해)에 의해 제조된 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 증가된 양은 티올 산화 (디술피드 형성) 속도보다 빨리 일어나고 따라서 변이체에서 유리 시스테인을 포획하는 단백질 (즉, VL 도메인) 폴딩 속도로부터 초래될 수 있다.

[0239]

[표 5]

[0240]

무손상 페르투주맙의 HIC에 의해 결정된 바와 같은 무손상 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 상대량

배치 명칭	피크		
	야생형 동종이량체 (%)	쌍형성되지 않은 시스테인 이종이량체 (%)	쌍형성되지 않은 시스테인 동종이량체 (%)
항 2C4-900-1	84.7	13.4	1.9
항 2C4907-2	78.9	18.2	2.9
구동1	78.4	18.4	3.2
구동3	79.1	17.6	3.2
구동4	79.3	17.3	3.4
구동5	79.1	17.4	3.5
구동6	79.7	17.2	3.1
구동7	79.3	17.3	3.4

[0241]

주: 상대 피크 퍼센트는 개별 피크 면적을 모든 3개의 피크의 총 피크 면적으로 나눔으로써 얻었다.

[0242]

페르투주맙의 경쇄 상의 Cys23/Cys88에서 쌍형성되지 않은 시스테인 쌍이 HIC에 의해 관찰되었기 때문에, 각각의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 정제된 분획을 항-증식 검정에서 시험하였다. Fab를 함유하는 쌍형성되지 않은 시스테인을 정제하였고, 감소된 효능을 갖는 것으로 추정되었다 (천연 Fab에 비해 추정된 효능 약 50%) (표 6).

[0244]

[표 6]

[0245] 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 변이체의 항-증식

페르투주맙 샘플 및 조건	평균 % 활성 (n=2)	% 차이
천연 Fab	100	N/A
쌍형성되지 않은 시스테인-Fab	50 ^a	67

[0246] [0247] 주: 활성 퍼센트는 천연 Fab에 대해 보고하였다.

[0248] ^a 추정된 효능 값. 용량 반응 곡선은 평행하지 않으며, 하부 플래토는 만나지 않는다.

[0249] 또한, 3가지 무손상 형태 (야생형 동종이량체, 유리-티올 함유 이종이량체, 및 쌍형성되지 않은 시스테인 함유 동종이량체)를 HIC에 의해 단리하고, 항-증식 효능 검정으로 시험하였다. 표 7을 참조한다.

[0250] [표 7]

[0251] 전장 페르투주맙 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체 분획의 항-증식 활성

페르투주맙 샘플 및 조건	항-증식	
	평균 % 활성 (n = 3)	CV (%)
출발 물질	110	11
이종이량체	112	7
야생형 동종이량체	104	15
쌍형성되지 않은 시스테인-함유 동종이량체 ^a	90	15

[0252] [0253] 주: 활성 퍼센트는 페르투주맙 참조 표준물 (배치 항2C4907-2)에 대해 보고하였다.

[0254] ^a 분획은 대략 40% 쌍형성되지 않은 시스테인-함유 동종이량체 및 60% 이종이량체 또는 야생형 동종이량체 혼합물을 함유한다.

[0255] 이들 데이터는 페르투주맙의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체가 상업적 규모로 제조된 조성물에 존재함을 입증한다. 본 실시예에서 HIC 방법 (Fab 단편 또는 무손상 항체를 평가함) 또는 하기 실시예 3의 웨티드 맵핑은 페르투주맙 조성물 중의 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체의 존재 및 양을 평가하는 데 이용될 수 있는 검정이다.

[0256] 실시예 2

비푸코실화된 페르투주맙 조성물 및 그의 특성화

[0258] 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)은 이펙터 세포가 항원-특이적 항체에 결합된 표적 세포를 활성적으로 용해시키는 세포-매개된 면역의 측면이다. 페르투주맙은 HER2 3+ 세포로 시험된 경우 ADCC 활성을 나타내지만, HER2 1+ 세포로는 거의 활성이 관찰되지 않았다 (도 14).

[0259] 페르투주맙 I상 및 III상 참조 표준물에서의 비푸코실화의 수준을 모세관 전기영동을 이용하여 측정하였다. 페르투주맙 III상 참조 표준물에서의 비푸코실화된 물질의 보다 높은 수준 (G0-F = 2.2%)은 보다 낮은 G0-F (0.8%)를 갖는 I상 참조 표준물 (도 15)에 비해 관찰된 보다 높은 ADCC 활성과 상관된다. 효소적으로 탈글리코실화된 페르투주맙을 또한 제조하고, 시험하였으며, FcγRIIIa에의 결합이 없고 ADCC 활성이 없음을 나타내었다 (표 8).

[0260] [표 8]

[0261] 탈글리코실화된 페르투주맙의 생물학적 활성

페르투주맙 샘플 및 조건	평균 % 활성 (n = 3)				
	항-증식	HER2 결합	FcγRIIIa 결합	ADCC	FcRn 결합
대조군	90	105	106	101	85
탈글리코실화됨	87	94	활성 없음	활성 없음	72

- [0263] 주: 활성 퍼센트는 페르투주맙 참조 표준물 (배치 항2C4907-2)에 대해 보고하였다.
- [0264] ADCC = 항체-의존성 세포-매개 세포독성.
- [0265] 이들 데이터는 G0-F (비푸코실화된) 페르투주맙의 측정이 페르투주맙의 ADCC 활성을 정량화하기 위한 효과적인 수단임을 나타낸다. 비푸코실화를 정량화하기 위한 실험은 하기와 같다.
- [0266] **모세관 전기영동 (CE)에 의한 올리고사카라이드 분석:** 페르투주맙 샘플 (250 내지 500 μg)을 단백질 A 고체상 추출 친화도 텁 (파이티스 (PHYTIPS)TM) 및 자동화 액체 취급 시스템을 이용하여 정제하였다. 페르투주맙 샘플을 12 mM 염산 (pH 2.0)을 사용하여 단백질 A 수지로부터 용리하고, 50 mM 숙신산나트륨 10 μL 를 사용하여 중화시켰다. 생성된 샘플을 PNGase F 2.5 U/mL와 함께 37°C에서 15시간 동안 인큐베이션하였다. 용액을 95°C에서 5분 동안 가열함으로써 단백질을 침전시키고, 원심분리에 의해 제거하였다. 방출된 올리고사카라이드를 함유하는 상청 용액을 진공 건조시켰다. 방출된 글리칸을 소듐 시아노보로히드리드를 함유하는 15% 아세트산 용액 중 8-아미노페렌-1,2,6-트리솔운산 (APTS)로 55°C에서 2시간 동안 유도체화하였다. 유도체화된 글리칸의 분석을 아르곤-이온 레이저 (488 nm 여기, 520 nm 방출) 및 N-CHO 코팅된 모세관 (50 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$)을 사용하여 형광 검출 모듈이 구비된 모세관 전기영동 (CE) 시스템으로 수행하였다. 구동 원충제는 40 mM ϵ -아미노-n-카프로산/아세트산 (pH 4.5), 0.2% 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC)였다. 샘플을 0.5 psi의 압력에 의해 모세관 내로 주입하였다. 분리를 20 kV에서 수행하고, 모세관 온도를 20°C에서 유지하였다.
- [0267] 페르투주맙은 Asn299에서 분자의 Fc 부분의 C_h2 도메인에 N-연결된 올리고사카라이드 부위를 함유한다. 각각의 배치에 대해 이 부위에서 실측된 중성 올리고사카라이드의 상대 분포를 PNGase F로 처리하고 APTS로 표지한 후 CE를 이용하여 측정하였다.
- [0268] 방출된 유도체화된 올리고사카라이드의 CE 분석으로부터의 일렉트로페로그램을 도 16에 나타내고, 확대도 프로파일을 도 17에 나타낸다. 분석된 물질에 대한 페르투주맙 중의 올리고사카라이드의 상대량은 표 9에 요약되어 있다.
- [0269] [표 9]
- [0270] 페르투주맙 중의 올리고사카라이드 구조의 분포 (피크 면적 퍼센트)
- | 배치 명칭 | G0-F | G0-GlcNAc | Man5 | G0 | G1 ^a | G2 |
|------------|------|-----------|------|------|-----------------|-----|
| 항2C4-900-1 | 0.8 | 2.7 | 1.2 | 72.1 | 20.4 | 2.0 |
| 항2C4907-2 | 2.2 | 0.8 | 0.3 | 63.6 | 27.6 | 3.0 |
| 구동1 | 2.5 | 1.6 | 0.2 | 62.4 | 29.1 | 3.4 |
| 구동3 | 1.7 | 1.2 | 0.3 | 70.3 | 23.4 | 2.2 |
| 구동4 | 1.8 | 1.8 | 0.3 | 75.4 | 18.3 | 1.4 |
| 구동5 | 1.4 | 1.0 | 0.4 | 71.8 | 22.4 | 2.1 |
| 구동6 | 1.1 | 1.0 | 0.2 | 73.3 | 21.3 | 1.9 |
| 구동7 | 1.2 | 0.8 | 0.2 | 69.7 | 24.5 | 2.5 |
- [0271]
- [0272] 주: 총 %는 라운딩으로 인해 정확하게 100%로 첨가되지 않을 수 있다. 또한, 부수 총 (< 0.5%)은 총 피크 면적 퍼센트에 포함될 수 있지만, 이 표에서는 보고되지 않는다.
- [0273] ^a 2개의 G1 이성질체의 합계 (도 17을 참조함).
- [0274] G0 구조를 갖는 올리고사카라이드는 모든 물질에서 우세한 종이다 (62% 내지 75%). G0 글리코형은 현행 참조 표준물 배치 항2C4907-2 및 구동 1 (62% 내지 64%)에 비해 구동 3 내지 7 및 선행 참조 표준물 배치 2C4-900-1 (70% 내지 75%)에서 약간 더 풍부하였다. G1 글리코형은 이중안테나 구조의 어느 한쪽 가지 상에 말단 갈락토스를 갖는 2개의 이성질체에 상응하는 2개의 피크로서 관찰되었다. 이들 2개의 피크의 면적을 합하여 G1 글리코형의 상대량을 결정하였다. G1 및 G2 글리코형은 모든 물질에 대해 방출된 올리고사카라이드의 각각 대략 18% 내지 29% 및 1% 내지 3%를 설명한다. 다른 올리고사카라이드 구조로부터 발생한 피크는 또한 일렉트로페로그램에서 관찰되었다 (모두 3% 이하로 존재함). 이들 구조는 G0-F (코어 푸코스가 결핍된 G0), G0-GlcNAc (하나의 GlcNAc가 결핍된 G0), Man5, 및 다른 부수 글리코형을 포함한다 (Ma and Nashabeh *Anal Chem* 71:5185-92 (1999)). 페르투주맙 상의 올리고사카라이드 구조는 실측된 CHO-유래된 MAb (Ma and Nashabeh, 상기 문헌) 및 천연 발생 인간 이뮤노글로불린 (Flynn et al. *Mol Immunol* 47:2074-82 (2010))과 일치하였다.

[0275] 실시예 3[0276] 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체를 평가하기 위한 펩티드 맵핑 및 RP-HPLC

물질: 실험에 사용된 물질 및 장치는 3-[N-모르폴리노]프로판술Lon (MOPS; 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)), N-에틸말레이미드 (d0-NEM; 씨모 사이언티픽 (Thermo Scientific), 미국 일리노이주 록포드), N-에틸말레이미드 (d5-NEM; 캠브리지 이소토프 래버리토리즈 (Cambridge Isotope Laboratories), 미국 메사추세츠주 앤도버), L-시스테인 (시그마-알드리치), 트립신 (프로메가 (Promega), 미국 위스콘신주 매디슨), 트리플루오로아세트산 (TFA; 피셔 (Fisher), 미국 뉴저지주 페어 룬), 아세토니트릴 (ACN, 버딕 앤 잭슨 (Burdick & Jackson), 미국 미시간주 머스크곤)을 포함한다. 모든 화학물질 및 시약은 수령한 대로 추가의 정제 없이 사용하였다.

항체의 차등적 N-에틸말레이미드 (NEM) 표지화: 차등적 NEM 태깅 방법으로 항체에 이미 존재하는 유리 티올을 d0-NEM으로 태깅하고, 잔류의 디슬피드 브리지를 환원시키고, d5-NEM으로 태깅하였다. 초기 d0-NEM 태깅을 위해, 100 μ L 항체 (3 mg/mL)를 6.25 mM d0-NEM을 함유하는 400 μ L 변성 완충제 (7.5 M GdnHCl, pH 5)와 부드럽게 혼합하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 20 μ L 시스테인 (125 mM)을 샘플에 첨가하고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하여 잔류의 d0-NEM을 불활성화시켰다. 항체 중의 잔류의 디슬피드 브리지를 환원시키기 위해, 10 μ L TCEP (0.5 M)를 샘플에 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 70 μ L d5-NEM (171 mM)을 샘플에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하여 환원된 디슬피드 브리지에 의해 생성된 유리 티올을 태깅하였다. 0.5 mL의 차등적 NEM 태깅된 샘플을 NAP-5 컬럼을 사용하여 완충제 교환하고, 0.6 mL MOPS 완충제 (20 mM MOPS, 0.5 mM TCEP, pH 7)로 용리하였다.

항체의 펩티드 맵 분석: 차등적 NEM 태깅된 샘플을 트립신으로 1:50 (w/w) 트립신:항체 비율로 37°C에서 2시간 동안 소화시켰다. 소화물을 10% TFA로 켄칭하였다. 트립신 소화된 차등적 NEM 태깅된 샘플을 아질런트 (Agilent) 1200 HPLC 시스템 (아질런트, 미국 캘리포니아주 팔로 알토)을 이용하여 분리하였다. 300 Å 공극 크기를 갖는 주피터 (Jupiter) C18 컬럼 (250 x 2 mm, 5 μ m) (페노메넥스 (Phenomenex), 미국 캘리포니아주 토탄스)을 사용하여 샘플의 크로마토그래프 분리를 하였다. 주입 부피는 95 μ L였으며, 컬럼 온도는 55°C였다. 이동상 A는 물 중 0.1% TFA이고, 이동상 B는 90% ACN 중 0.08% TFA (v/v)였다. 초기 조건을 100% 이동상 A로 설정하고, 샘플 주입 후 최초 3분 동안 유지하였다. 모든 선형 구배에 걸쳐 이동상 B를 다음 20분에 걸쳐 10%로 증가시킨 후, 160분까지 40%, 162분까지 100%로 더 증가시켰다. 이동상 B를 170분까지 100%에서 유지하였다. 컬럼을 195분까지 100% 이동상 A로 재-평형화시켰다. 유속은 0.28 mL/분으로 유지하였다.

HPLC로부터의 용리액을 양성 이온 모드에서 작동하는 LTQ 오르비트랩™ 질량 분광계의 전기분사 이온화 공급원에 직접 연결시켰다. 분사 전압은 4.5 kV였고, 모세관 온도는 300°C였다. 질량 분광계는 MS 및 MS/MS 모드 사이에서 자동적으로 전환되는 데이터 의존적 방식으로 작동되었다. 측량 풀 스캔 MS 스펙트럼을 m/z 400에서 R = 60,000에 대해 설정된 해상도를 갖는 FT-오르비트랩에서 m/z 300 내지 m/z 2000으로 획득하였다. 5개의 가장 강한 이온을 30 ms의 활성화 시간 및 2.5 m/z 단위의 단리 폭을 갖는 35%의 정규화 충돌 에너지에서 충돌 유도 해리 (CID)를 이용하여 선형 이온 트랩에서 단편화하였다. 동적 배제 (DE) 함수는 데이터 중복을 감소시키고, 저-강도 이온이 데이터 의존적 MS/MS 스캔에 대해 선택되는 것을 가능하게 하였다. 동적 배제 파라미터는 하기와 같았다: 30초의 반복 기간, 500의 배제 리스트 크기, 90초의 배제 기간, 0.76의 낮은 배제 질량 폭, 1.56의 높은 배제 질량 폭, 및 2의 반복 카운트. 데이터 분석은 엑스칼리버 (XCALIBUR)™ 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0281] 현행 페르투주맙 참조 표준물 배치 항2C4907-2를 상기 기재된 방법을 이용하여 분석하였다. 10.9%의 T2L 펩티드 (트립신 소화에 의해 제조되고, Cys23을 함유함), 및 8.3%의 T7L 펩티드 (트립신 소화에 의해 제조되고, Cys88을 함유함)를 d0-NEM으로 태깅하였다. 이 실험에서 단지 쌍형성되지 않은 시스테인만이 d0-NEM으로 태깅되기 때문에, 이들 결과는 항2C4907-2 중의 대략 10%의 Cys23 및 Cys88이 디슬피드 결합에 의해 연결되지 않음을 암시한다 (즉, 10% 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체). 쌍형성되지 않은 시스테인 Fab 변이체 퍼센트를 퍼센트 쌍형성되지 않은 시스테인 무손상 변이체로 전환하는 상기 기재된 것과 유사한 계산 방법을 이용하여, 항2C4907-2 중의 18%의 페르투주맙 분자가 이종이량체 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체이고, 1%의 페르투주맙 분자가 동종이량체 쌍형성되지 않은 시스테인 변이체이고, 81%가 야생형 동종이량체 형태 (쌍형성되지 않은 시스테인이 없음)인 것으로 추정되었다. 이들 결과는 Fab 단편 또는 무손상 페르투주맙의 HIC 분석으로부터의 결과와 일관적으로 일치한다.

Fab를 생성하기 위한 제한된 엔도프로테이나제 Lys-C 소화: MAb A의 Fab 단편을 제한된 Lys-C 소화 절차를 통해 생성하였다. 간략하게, MAb A (1 mg/mL)를 100 mM 트리스 (pH 7.6) 중 1:400 비율로 Lys-C 효소와 혼합한 후,

혼합물을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 NEMin (pH 5.5), 350 mM 아세트산나트륨 및 8 M 구아니딘 HC1로 태깅하였다. 소화물을 하기 기재된 RP-HPLC 방법으로 분석하였다.

[0283] RP-HPLC 조건: RP-HPLC 분석을 이원 구배 펌프, 오토샘플러, 온도-제어된 컬럼 구획, 및 다이오드 어레이 검출기를 구비한 아질런트 1200™ HPLC 시스템 (미국 캘리포니아주 팔로 알토) 상에서 수행하였다. 시스템은 75°C 및 1 mL/분에서 구동한 퍼슈트 (Pursuit) 3 디페닐 역상 컬럼 (150 x 4.6 mm, 3 μm, 배리언 (Varian), 미국 캘리포니아주 레이크 포레스트)을 포함하였다. 분리를 280 nm에서의 흡광도를 이용하여 모니터링하였다. 이동상은 물 중 0.1% TFA (이동상 A) 및 ACN 중 0.09% TFA (이동상 B)로 이루어졌다. 38-분 방법은 32% 내지 36% 이동상 B의 3분 구배로 시작한 후, 42% 이동상 B에 대해 18분 선형 구배로 이어졌다. 컬럼을 95% 이동상 B에서 5분 동안 세척하고, 32% 이동상 B에서 10분 동안 평형화시켰다.

[0284] 제한된 Lys-C 소화에 의해 생성된 유리 티올 Fab의 RP-HPLC 분석 (도 18)은 실시예 1에서의 HIC와 일치하게 유리 티올 Fab가 약 13%임을 지시하였다. NEM 태깅된 유리 티올 Fab는 보다 소수성이 되었으며, 따라서 유리 티올 Fab에 비해 더 늦게 용리되었고 (도 18), 유리 티올의 존재를 추가로 확인시켰다. 또한 펩티드 맵핑이 유리 티올 Fab를 확인시키는 도 19를 참조한다.

[0285] 실시예 4

***CE-LIF에 의한 비푸코실화 정량화**

[0288] 본 실시예는 비푸코실화된 페르투주맙 변이체를 정량화하기 위한 완전히 입증된 모세관 전기영동-레이저-유도형광 (CE-LIF) 검정을 기재한다. 상기 실시예 2에 개시된 방법에 대한 변형은 로봇식 샘플 제조를 포함하지 않고, 샘플 중에서 일정한 단백질 농도를 보장하는 단백질 A 정제 단계를 포함하지 않고, 전기영동 파라미터 (완충제 부형제 농도)에 대한 변화를 포함한다.

[0289] 검정에서, 페르투주맙 샘플을 제제 완충제를 사용하여 10 mg/mL로 희석하고, 펩티드-N-글리카나제 F (PNGase F) 소화 완충제로 완충제 교환한다. 그 후, 아스파라긴-연결된 올리고사카라이드는 PNGase F와 함께 효소적으로 방출된다. 방출된 글리칸을 이어서 음으로 하전된 형광단인 8-아미노페렌-1,3,6-트리술폰산 (APTS)으로 유도체화한다. APTS는 그의 급속한 전기영동 분석을 허용하는 3가지 음전하를 갖는 모든 글리칸을 제공한다. 과량의 유도체화제 및 APTS-글리칸 접합체를 함유하는 혼합물을 전기삼투 유동을 감소시키는 코팅된 모세관을 사용한 CE에 의해 분석한다. 분리를 488 nm의 여기 과장 및 520 nm의 방출 밴드 통과 필터를 갖는 아르곤-이온 레이저를 사용한 레이저-유도 형광 시스템으로 모니터링한다.

[0290] 검정을 이용한 상관 플롯을 도 21에 나타낸다. 상관 플롯 ($\%ADCC = 30.133 + 12.439x$, 여기서 $x = \%G0-F$) 및 40 내지 135%의 ADCC 범위를 이용하여, 페르투주맙에 대한 최종 설명은 0.9 내지 4.1% G0-F에 상응한다.

[0291] 따라서, 이 입증된 CE-LIF 검정을 이용하여, ADCC의 관점에서 생물학적 활성이 바람직한 범위 (40 내지 135% ADCC 활성 = 0.9-4.1% G0-F) 내임을 확인하는 페르투주맙 조성물의 평가가 가능하다.

[0292] 실시예 5

페르투주맙 고분자량 종 (HMWS), 저분자량 종 (LMWS) 및 그의 특성화

[0294] 페르투주맙을 SE-HPLC 및 CE-SDS에 의해 분석하여 일반적으로 이량체인 고분자량 종 (HMWS) 및 저분자량 종 (LMWS)의 양을 측정하였다. 희석시 HMWS에 차이는 없었으며, 이는 응집체가 비-해리성임을 암시하였다. HMWS 정량화의 관점에서 분석용 초원심분리 (AUC) 및 SE-HPLC 결과 사이에 양호한 일치가 있었으며, 이는 주요 HMWS를 소실하거나 과소추정하는 크기-배제 크로마토그래피의 증거가 없음을 나타내었다.

[0295] 물질 및 방법

[0296] 시험된 페르투주맙 조성물: 본 실시예는 현행 페르투주맙 참조 표준물 배치 항2C4907-2 및 구동 1의 특성화를 기재하며, 이는 III상 임상적 물질, 및 모두 상업적 공정을 이용하여 12,000 리터 (L) 규모로 제조된 5개의 III 상/시판 배치 (구동 3 내지 7)를 나타낸다.

[0297] 단리된 HMWS: 생물학적 특성화에 사용되는 대표적인 HMWS를 제조하기 위해, 구동 3으로부터의 페르투주맙 배치를 정제용 SE-HPLC 컬럼 (TSK G3000SW, 21.5 mm × 600 mm) 및 상기 기재된 바와 같은 동일한 등용매 이동상을 이용하여 4.5 mL/분으로 정제용 HPLC 시스템 상으로 주입하였다. 고분자량 종을 분획 수집하고, 이어서 제제

완충제로 완충제 교환하였다. 후속의 SE-HPLC 분석에 의해 HMWS는 70% 순수한 것으로 나타났으며, 나머지는 우세하게 주요 피크였다. 주요 피크를 또한 수집하였으며, 100% 순수한 것으로 나타났다.

[0298] **단리된 LMWS:** 단리된 LMWS를 제조하기 위해, 구동 3으로부터의 배치 번호를 파파인으로 소화시키고, 상기와 같이 정제용 HPLC를 이용하여 분획 수집하였다. 무손상 ESI-MS 분석에 의해, 우세한 형태는 Fc 및 Fab인 것으로 입증되었다. 후속 분석용 SE-HPLC에 의해 LMWS는 99% 순수한 것으로 나타났다. 단리된 Fab 변이체를 또한 파파인 처리를 이용하여 제조하고, 정제용 IE-HPLC에 의해 수집하였다. 후속 분석용 SE-HPLC에 의해 Fab 변이체는 100% 순수한 것으로 나타났다.

[0299] **SE-HPLC:** 페르투주맙의 분취액을 이동상 (0.2 M 인산칼륨, pH 6.2, 0.25 M 염화칼륨)으로 10 mg/mL으로 희석하였다. 샘플을 등용매적으로 용리하는 TSK G3000SW_{XL} 컬럼 (7.8 mm × 300 mm) 상에서 분리하였다. 유속은 0.5 mL/분이었으며, 컬럼 온도는 주위 온도였다. 용리 프로파일을 280 nm에서 모니터링하였다. 각도 광 산란 (MALS)에 의한 검출을 위해, 페르투주맙 샘플을 와이어트 던 헬레오 (WYATT DAWN HELEO)TM MALS 검출기 (658 nm 레이저를 사용함, 17개 검출기) 및 와이어트 옵티랩 (WYATT OPTILAB)TM 렉스 굴절률 검출기에 차례로 인라인 연결된 2개의 컬럼을 사용하여 분리하였다.

[0300] **CE-SDS:** 각각의 페르투주맙 배치를 형광 염료인 5 카르복시테트라메틸로다민 숙신이미딜 에스테르로 유도체화하였다. NAP-5 컬럼을 사용하여 유리 염료를 제거한 후, 40 mM 아이오도아세트아미드를 첨가하고, 70°C에서 5분 동안 가열함으로써, 비-환원된 샘플을 제조하였다. 환원된 샘플의 분석을 위해, 유도체화된 페르투주맙을 최종 농도 1% SDS (v/v)로 소듐 도데실 술페이트 (SDS) 및 1 M DTT와 혼합하였다. 그 후, 샘플을 70°C에서 20분 동안 가열하였다. 제조된 샘플을 분석 전반에 걸쳐 20°C에서 유지된 50 m 내경 × 31.2 cm 융합된 실리카 모세관을 사용하는 CE 시스템 상에서 분석하였다. 샘플을 동전기적 주입에 의해 10 kV에서 40초 동안 모세관 내로 도입하였다. 체질 매질로서 CE-SDS 구동 완충제를 사용하여 역극성 (음성 내지 양성) 모드로 15 kV의 정전압에서 분리를 수행하였다. 488 nm에서 작동하는 아르곤 이온 레이저를 형광 여기를 위해 사용하고, 생성된 방출 신호를 560 nm에서 모니터링하였다.

결과 및 논의

[0302] SE-HPLC는 천연 단백질의 문자 크기 분포에 대한 정량적 정보를 제공한다. 페르투주맙 배치에 대한 SE-HPLC 프로파일은 도 25에 나타나 있으며, 프로파일의 확대도는 도 26에 나타나 있다. 크기-배제 피크의 상대 피크 면적 분포는 표 10에 열거되어 있다.

[표 10]

크기-배제 크로마토그래피에 의한 페르투주맙의 상대 크기 분포

배치 명칭	피크		
	HMWS (%)	주요 피크 (%)	LMWS (%)
항 2C4-900-1	0.1	99.8	0.1
항 2C4907-2 ^a	0.2	99.8	0.0
구동1	0.2	99.8	0.0
구동3	0.2	99.8	0.0
구동4	0.1	99.8	0.0
구동5	0.2	99.8	0.0
구동6	0.2	99.8	0.0
구동7	0.2	99.8	0.0

[0305]

[0306] 주: 총 피센트는 라운딩으로 인해 정확하게 100%로 첨가되지 않을 수 있다.

[0307] HMWS = 고분자량 종; LMWS = 저분자량 종.

[0308] ^a 참조 표준물 항2C4907-2로부터 얻어진 값.

[0309] 주요 피크에서 용리하는 페르투주맙의 비율은 모든 물질에 대해 99% 초과였다. 고분자량 종 (HMWS)의 양은 0.1% 내지 0.2%의 범위였고, 저분자량 종 (LMWS)은 0.1% 이하였다. 모든 배치는 유사한 크로마토그래피 프로파일을 나타내었다. 이양체 및 높은 응집체를 포함하는 정제된 HMWS 분획은 참조 표준물 배치 항2C4907-2에

비해 46% 효능을 갖는 것으로 나타났다.

[0310] SE-HPLC를 30°C에서 유지된 순수한 및 희석된 샘플 둘 다 상에서 수행하여 희석 및/또는 상승된 실온에의 연장된 노출로부터 초래될 수 있는 고속 및 저속-해리 응집체 둘 다에 대해 페르투주맙 HMWS를 검사하였다. 대조군과 비교할 때 희석된 및/또는 가열된 참조 표준물 배치 항2C4907-2의 HMWS 함량에서 감소가 나타나지 않았다.

[0311] 참조 표준물 배치 항2C4907-2 상에서 수행된 MALS와 조합된 SE-HPLC 분리는 SE-HPLC 주요 피크가 단량체이고, 대략 150 kDa의 분자량을 가짐을 확인시켰다.

[0312] 침강 속도 모드에서의 AUC를 이용하여 페르투주맙 샘플에 존재하는 HMWS를 특성화하였다. 침강 속도는 고체 컬럼 매트릭스의 부재 하에서 샘플 중의 HMWS의 수준을 측정하는 크기 배제 크로마토그래피로부터 독립적인 기술이다. AUC를 증가하는 수준의 HMWS를 갖는 페르투주맙 샘플 상에서 수행하여, 침강 속도에 의해 측정된 응집체의 수준 및 종을 SE-HPLC에 의해 측정된 것과 비교함으로써 SE-HPLC가 모든 주요 페르투주맙 HMWS를 일정하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하였다. 0.2% 내지 7.2% 총 HMWS (SE-HPLC에 의해 측정됨) 범위의 5개 샘플을 침강 속도에 의해 특성화하고, 표 11 및 도 27에 A 내지 E로 표지하였다.

[0313] 이들 샘플은 대표적인 페르투주맙 약물 생성물 배치 (A로 표지됨) 및 풍부화된 HMWS를 갖는 4개의 샘플로 이루어졌다. 풍부화된 HMWS를 갖는 샘플을 분해 메커니즘의 폭넓은 범위의 대표적인 것으로 선택하였다 (광에의 노출, 산성 pH에의 노출, 및 정제된 IE-HPLC 염기성 변이체).

[0314] SE-HPLC는 샘플 A, B, C 및 E에 대한 하나의 주요 HMWS 피크 및 샘플 D에 대한 2개의 HMWS 피크를 나타낸다 (도 27). 샘플 A, B, C 및 E에 대해, AUC는 약 9.1S의 침강 계수를 갖는 단지 하나의 HMWS 피크를 나타내었다. 샘플 D에서, AUC는 약 9.1S 및 10.8S의 침강 계수를 갖는 2개의 HMWS 피크를 나타내었다. AUC에 의해 검출된 HMWS는 SE-HPLC 결과와 일치하며, 둘 다의 방법은 샘플 D에서 하나의 주요 분해 생성물과, 보다 많은 HMWS의 부수 수준을 나타낸다.

[0315] 2가지 방법으로부터의 이들 샘플의 정량적 결과의 비교는 표 11에 제시되어 있다.

[0316] [표 11]

[0317] AUC 및 SE-HPLC 결과의 비교

샘플	% HMWS (총)	
	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

[0318]

[0319] 주 1: 샘플 A는 대표적인 페르투주맙 약물 생성물 배치로 이루어지고, 샘플 B는 1.2 mlux 시간으로 광 노출된 페르투주맙 배치로 이루어지고, 샘플 C는 3.6 mlux 시간으로 광 노출된 페르투주맙 배치로 이루어지고, 샘플 D는 pH 3.2에서 산 처리된 페르투주맙 배치로 이루어지고, 샘플 E는 IE-HPLC로부터 정제된 염기성 변이체로 이루어진다.

[0320] 주 2: 상응하는 SE-HPLC 크로마토그램에 대한 도 27을 참조한다.

[0321] AUC = 분석용 초원심분리; HMWS = 고분자량 종; RSD = 상대 표준 편차; SE-HPLC = 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피.

[0322] ^a 샘플 A 및 B는 AUC 기술의 정량화의 한계 미만인 HMWS 수준을 갖는다.

[0323] 샘플 C, D 및 E에 대해, 둘 다의 기술에 의해 측정된 HMWS 퍼센트에서 양호한 일치가 있다. 샘플 A 및 B에 존재하는 HMWS의 낮은 수준은 3.7%의 추정된 정량화 한계를 갖는 AUC에 의한 종의 정확한 정량화를 방지한다 (Gabrielson and Arthur, *Methods* 54:83-91 (2011)). 이는 SE-HPLC 및 AUC 사이의 HMWS 퍼센트에서의 명백한 불일치에 의해 반영된다 (표 11). HMWS 수준의 범위에 걸친 상관관계를 평가하였다. 상관 계수 (Lin, L, *Biometrics* 45:255-68 (1989))는 0.97 (n=5)인 것으로 계산되었으며, 이는 HMWS의 정량화에 대한 AUC 및 SE-HPLC 사이의 양호한 일치를 지시한다 (도 28).

- [0324] 이를 결과는 SE-HPLC가 페르투주맙에 대한 HMWS를 측정하는 데 있어서 양호함을 확인시킨다. SE-HPLC는 AUC에 의해 관찰된 모든 HMWS를 검출하고 정확하게 정량화할 수 있다.
- [0325] SE-HPLC, SDS-PAGE 및 CE-SDS에 의해 분석된 크기-기재 이종성은 배치 중에서 일치하였다. SE-HPLC 측정은 시험된 모든 배치에 대해 유사한 수준의 HMWS (0.1% 내지 0.2%) 및 LMWS (0.0% 내지 0.1%)를 나타내었다. 환원된 및 비-환원된 샘플에 대한 SDS-PAGE 분석에 의해 전개된 밴딩 패턴은 CE-SDS에 의해 생성된 전기영동 프로파일에서와 같이 일치하였다.
- [0326] 한 실시양태에서, SE-HPLC에 의해 평가된 바와 같은 주요 종 페르투주맙 및 HMWS 변이체 및 LMWS 변이체의 양은 하기와 같다:
- [0327] $\geq 96\%$ 주요 피크, 예를 들어, $\geq 96.7\%$ 주요 피크, 예를 들어, $\geq 97.3\%$ 주요 피크, 예를 들어, $\geq 97.4\%$ 주요 피크
- [0328] $\leq 2\%$ HMWS, 예를 들어, $\leq 1.7\%$ HMWS, 예를 들어, $\leq 1.5\%$ HMWS, 예를 들어, $\leq 1.4\%$ HMWS, 예를 들어 $\leq 0.8\%$ HMWS.
- [0329] $\leq 2\%$ LMWS, 예를 들어, $\leq 1.6\%$ LMWS, 예를 들어, $\leq 1.2\%$ LMWS, 예를 들어 $\leq 0.6\%$ LMWS.

[0331] *SE-HPLC에 의해 정제된 페르투주맙 HMWS 및 LMWS 분획 둘 다는 주요 피크 및 완전히 강한 대조군에 비해 감소된 항-증식 활성을 나타내었다. 보다 낮은 FcRn 결합을 나타낸 LMWS를 제외하고는 모든 크기 변이체는 대조군에 비해 필적할 만한 HER2 결합 활성 및 FcRn 결합 활성을 나타내었다. LMWS 샘플은 2/3 Fab 단편 및 1/3 Fc 단편을 함유하기 때문에, 보다 낮은 항증식 및 FcRn 결합 활성을 예상된 바와 같다. HMWS는 보다 높은 Fc RIIIA (CD16) V158 결합 활성을 나타내었지만, 보다 낮은 ADCC 활성을 나타내었다. LMWS는 보다 낮은 Fc RIIIA (CD16) V158 결합 활성을 나타내었고, ADCC 활성을 이 변이체에 대해 관찰되지 않았다 (표 12).

[0332] [표 12]

[0333] 페르투주맙 주요 피크, HMWS 및 LMWS의 생물학적 활성

페르투주맙 샘플 및 조건	평균 % 활성(n=3)				
	항-증식	HER2 결합	FcγRIIIa 결합	ADCC	FcRn 결합
대조군	103	108	91 ^b	80 ^b	80
주요 피크	104	96	96	79	87
HMWS	46	82	522	38	73
LMWS	12 ^a	73 ^a	23 ^a	활성 없음	7 ^a

[0334]

[0335] 주: 활성 퍼센트는 페르투주맙 참조 표준물 (배치 항2C4907-2)에 대해 보고하였다.

[0336] ADCC = 항체-의존성 세포-매개 세포독성; HMWS = 고분자량 종; LMWS = 저분자량 종

[0337] ^a LMWS 샘플은 2/3 Fab 및 1/3 Fc 단편으로 이루어진다. 나타낸 값은 분자량에 기초한 nM/nM 조정을 반영한다 (Fab = 47644 Da, Fc = 52800 Da, 및 전장 항체 = 148088 Da).

[0338] ^b 페르투주맙 참조 표준물 (배치 항2C4907-2)은 2.2%의 G0-F 수준을 갖는 반면, 대조군 샘플은 1.7%의 G0-F를 가졌다. 결과는 비푸코실화된 물질 수준에서의 차이에 대해 보정되지 않았다.

[0339] **보세관 전기영동 소듐 도데실 슬레이트 (CE-SDS):** 레이저-유도 형광 (LIF) 검출 분석을 이용한 CE-SDS는 변성 조건 하에서 단백질의 분자 크기 분포를 정량적으로 평가하는 수단을 제공하는 고-민감성 검정이다. 비-환원된 샘플의 CE-SDS (도 29)에서, 페르투주맙은 96% 내지 98%의 총 피크 면적과 LMWS 및 HMWS를 나타내는 부수 피크로 이루어진 우세한 피크로서 이동하였다. 이 기술에 의해 측정된 HMWS의 양은 시험된 모든 물질에 대해 0.6 %였다. 나머지 종은 도 30 (확대도)에 나타낸 바와 같이 LMWS로서 이동하였다. 샘플 가열-유도된 단편화는 알킬화로 최소화한다 (Salas-Solano et al. *Anal Chem* 78:6583-6594 (2006)). CE-SDS에 의해 분리된 종의 상대 분포는 표 13에 열거되어 있다.

[0340] [표 13]

[0341] CE-SDS에 의한 비-환원된 페르투주맙의 상대 분포 (피크 면적 퍼센트)

배치 명칭	피크						
	1	2	3	4	5	6	주요 HMWS
항 2C4-900-1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.9	97.8 0.6
항 2C4907-2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2	1.9	96.5 0.6
구동1	0.1	0.3	0.1	0.4	0.2	1.7	96.7 0.6
구동3	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.0 0.6
구동4	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.3	96.1 0.6
구동5	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	2.0	96.4 0.6
구동6	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	2.2	96.2 0.6
구동7	0.1	0.4	0.0	0.2	0.2	2.1	96.3 0.6

[0342]

[0343] 주: 총 %는 라운딩으로 인해 정확하게 100%로 첨가되지 않을 수 있다.

[0344] CE-SDS = 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트;

[0345] HMWS = 고분자량 종.

[0346] 피크 6이 참조 표준물 배치 항2C4-900-1 (I/II상 공정)에서 0.9%로부터 참조 표준물 배치 항2C4907-2, 구동 1 및 구동 3 내지 7에 대해 1.7% 내지 2.3%로 증가한 부수적 차이가 관찰되었다.

[0347] 한 실시양태에서, NR-CE-SDS에 의해 분리 또는 단리된 바로, 페르투주맙 주요 피크 (LMWS 및 HMWS를 제외함)는 약 95% 내지 약 99%, 예를 들어, 약 96.0% 내지 약 97.8%이다. 임의로, CE-SDS에 의해 분리 또는 단리된 바로, HMWS의 양은 1% 이하, 예를 들어 0.6% 이하이고, LMWS의 양은 4% 이하, 예를 들어 3.4% 이하이다.

실시예 6

페르투주맙 단편화의 검출 및 정량화

[0349] 본 실시예의 목적은 페르투주맙 단편의 검출을 위한 크기 배제 크로마토그래피 (SE-HPLC), 환원 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (R-CE-SDS) 및 비-환원 CE-SDS (NR-CE-SDS) 방법을 평가하는 것이었다.

물질 및 방법

[0350] 본 연구에서 평가된 샘플은 하기에 요약되어 있다. 이는 증가된 단편화를 초래할 수 있는 다양한 스트레스 조건으로 처리한 페르투주맙 샘플을 포함한다.

[0351] · 참조 표준물 (2C4907-2)

[0352] · 열적 스트레스 (42일, 40°C)

[0353] · 산 처리 (pH 3.2, 1일, 40°C)

[0354] · 가속화된 안정성 (40°C에서 30일 후 대략 5°C에서 저장함)

[0355] · 실시간 약물 생성물 (DP) 안정성 (T=0 및 T=548일 및 대략 5°C에서 저장함) 및 상응하는 약물 물질 (DS)

[0356] SE-HPLC를 상기 실시예 5에 기재된 바와 같이 하기 보고가능한 값으로 수행하였다: LMWS, 주요 피크, HMWS, 및 정량화 한계 (LOQ) 초과의 모든 다른 유의한 피크.

[0357] 환원 CE-SDS (R-CE-SDS)를 상기 실시예 5에 따라 보고가능한 값으로 수행하였다: 피크 1, LC, 피크 2, 피크 3, NGHC, HC, 피크 5, 불완전 환원 (Inc. Red.), 및 LOQ 초과의 다른 유의한 피크.

[0358] 비-환원 CE-SDS (NR-CE-SDS)를 상기 실시예 5에서와 같이, SDS 복합화 단계로부터 제거된 디티오프레이톨 (DT T)에 의한 비-환원 분석을 허용하는 항체 환원 단계를 제외한 샘플 제조로 수행하였다.

[0359] SE-HPLC, NR-CE-SDS 및 R-CE-SDS에 의해 얻어진 정성적 결과는 각각 도 31a 내지 31b, 도 32a 내지 32b 및 도 33a 내지 33b 및 각각 표 14, 15 및 16에 제시되어 있다.

[0360] 피크 확인은 문헌 [Hunt & Nashabeh Analytical Chemistry 71: 2390-2397 (1999)] 및 [Ma & Nashabeh

*Chromatographia Supplement 53: S75-S89 (2001)]*에 기초한다. NR-CE-SDS 분석을 위해, 피크 2 후의 작은 피크는 전형적으로 데이터 보고 동안 피크 2의 일부로서 포함된다. 이 연구를 위해, 이 작은 피크는 경쇄 (LC)로부터의 단편과 차별화시키기 위해 피크 2a로서 별개로 보고된다.

[0363] [표 14]

[0364] SE-HPLC 정량적 데이터 (% 피크 면적)

	HMWS (%)	주요 피크(%)	LMWS (%)
2C4907-2	0.18	99.77	0.04
열	0.40	98.96	0.64
산 처리	7.09	92.65	0.26
가속화된 안정성	0.26	99.23	0.51
DP 안정성	0.19	99.68	0.13

[0365]

[0366] [표 15]

[0367] NR-CE-SDS 정량적 데이터 (% CPA)

	피크 1	피크 2 (LC)	피크 2a	피크 3 (Fab)	피크 4 (HL)	피크 5 (HH/des Fab)	피크 6 (HHL)	주요 피크	HMWS
2C4907-2	0.12	0.29	0.05	0.07	0.35	0.18	1.90	96.32	0.73
열	0.42	0.70	0.09	0.61	0.52	1.36	3.62	91.99	0.71
산 처리	0.15	0.37	0.17	0.35	0.45	0.66	3.19	93.42	1.25
가속화된 안정성	0.35	0.59	0.09	0.48	0.44	1.07	3.25	92.90	0.84
DP 안정성	0.22	0.37	0.06	0.20	0.33	0.43	2.53	95.27	0.60

[0368]

[0369] LC = 경쇄, HC = 중쇄, L = 경, H = 중

[0370] [표 16]

[0371] R-CE-SDS 정량적 데이터 (% CPA)

	피크 1	LC	피크 2	피크 3	NGHC	HC	피크 5	Inc. Red.
2C4907-2	0.31	25.30	0.92	2.44	2.81	66.82	0.48	0.91
열	0.54	26.16	1.12	3.13	2.81	64.54	0.27	1.43
산 처리	0.38	25.04	5.58°	2.77	2.41	62.91	0.19	0.71
가속화된 안정성	0.51	25.01	0.98	2.99	3.16	66.10	0.25	1.03
DP 안정성	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

[0372] [0373] NGHC = 비-글리코실화된 중쇄, HC = 중쇄, Inc. Red. = 불완전 환원

[0374] **데이터 평가:** 관련된 단편의 피크 면적 퍼센트 (또는 보정된 피크 면적 퍼센트, %CPA, CE-SDS에 대해)을 비교하여 CE-SDS 방법 중 어느 것이 SE-HPLC에 비해 비-중복 정보를 제공하는지 여부를 결정하였다. 관련된 단편은 미지의 구조를 갖는 피크, 또는 폴리펩티드 쇄(들)의 절단으로부터 유래된 생성물을 함유하는 것으로 알려진 것을 포함한다. 이들 단편은 항체 생성물에 존재하며 CE-SDS에 의해 통상적으로 관찰되는 해리가능한 비-디슬피드 결합된 중쇄 및/또는 경쇄 단편과는 별개이다. 단편 피크는 민감한 검출 및 정확한 정량화를 가능하게 하기 위해 다른 피크로부터 분해되어야 한다.

[0375] **작은 단편을 검출하는 능력:** 작은 단편은 R-CE-SDS 및 NR-CE-SDS 분석 둘 다에서 관찰될 수 있으며, 둘 다의 검정에서 피크 1으로서 명명된다. 이들 피크는 동일한 일반적 형태 및 이동 시간을 보유하며, 둘 다의 검정에서 스트레스 조건 하에서 유사하게 증가한다. 따라서, 피크 1은 둘 다의 검정에서 동일한 종을 함유하는 것으로

추정된다. 둘 다의 CE-SDS 검정은 표 17에서 주목된 바와 같이 작은 단편을 검출할 수 있다.

[0376] 산 가수분해 (산 클립)에 의해 생성된 단편을 검출하는 능력: 산 조건에의 연장된 노출은 29039 Da (HC 1 내지 272) 및 21513 Da (G0 글리칸을 갖는 HC 273 내지 448)에서 질량을 나타내는 산-처리된 샘플의 질량 분광 분석에 의해 보고된 바와 같이, 특히 Asp-Pro 서열 (페르투주맙 중쇄 잔기 272 내지 273)에서 단편을 생성할 수 있다. 이들 형태에 대한 이론적 질량은 각각 29031 Da 및 21510 Da이다. 이들 형태의 예상된 이동 시간에 기초하여, 상응하는 피크는 산-처리된 샘플의 환원 CE-SDS 분석에서 명백하게 보여질 수 있지만 (피크 2, 도 34), 비-환원 검정에서는 훨씬 적은 수준 (보다 적은 신호)으로 검출된다. NR-CE-SDS 검정에서 피크 2 단편은 아마도 디설피드 연결되며, 따라서 검출되지 않는다고 상정될 수 있다. 산-처리된 샘플에서 R-CE-SDS에 의해 검출된 피크 2의 수준 (5.58%)은 이 샘플에 대해 SE-HPLC에 의해 검출된 총 LMWS (0.26%)를 초과하기 때문에, SE-HPLC는 또한 이들 형태의 검출에 불충분한 것으로 결론화될 수 있다. 따라서, 환원 CE-SDS 검정은 표 17에서 주목된 바와 같이 산 가수분해의 결과로서 생성된 단편화를 검출할 수 있는 본원에서 제시된 유일한 검정이다.

[0377] Fab/DesFab 단편을 검출하는 능력: SE-HPLC에 의해 검출된 바와 같은 LMWS 및 비-환원 CE-SDS 검정으로부터의 피크 3 사이에는 양호한 선형 상관관계 ($r^2 = 0.97$)가 있다 (도 35). LMWS는 효소적으로 생성된 Fab를 사용한 공-용리 연구를 통해 Fab 단편을 함유하는 것으로 확인되었다. 유사하게, NR-CE-SDS 검정에서 피크 3 및 피크 5는 각각 효소적으로 생성된 Fab 및 DesFab를 사용한 공-이동 연구를 통해 확인되었다 (Ma & Nashabeh, 상기 문헌). desFab 피크는 Fab 형태를 생성하는 중쇄 절단으로부터 일어나므로, Fab 단편에 비해 동등한 몰 양인 것으로 추정되며 (2:1 질량 비율에 상응함), 따라서 이 형태에 대한 정보는 또한 표 17에서 주목된 바와 같이 SE-HPLC에 의해 간접적으로 얻어질 수 있다.

[표 17]

SE-HPLC, NR-CE-SDS 및 R-CE-SDS에 의한 단편에 대한 검출 능력

단편	SE-HPLC	NR-CE-SDS	R-CE-SDS
작은 단편	알려지지 않음	있음	있음
CE-SDS 피크 1			
산 클립 (R-CE-SDS 피크 2)	없음	없음	있음
Fab / DesFab	있음/(간접적)	있음	없음

[0380]

[0381] 환원 CE-SDS 피크 3: R-CE-SDS 피크 3은 페르투주맙에 대해 고유하며, 다른 항체의 CE-SDS 분석에서는 관찰되지 않았다. 확대된 특성화 결과는 피크 3이 생성물 변이체 또는 불순물이 아니라 오히려 LC-LC 이량체의 해리 가능한 형태로 이루어진 페르투주맙에 특이적인 방법-유도된 인공물이라는 결론을 지지한다. 다수의 기술을 채용하여 피크 3을 특성화하였다.

[0382] 피크 3은 UV 및 LIF 검출을 사용한 R-CE-SDS에 의해 관찰되며, 이는 그것이 염료-표지 또는 샘플 제조 인공물이 아님을 암시한다.

[0383] R-CE-SDS에 의한 분석시, 정제된 페르투주맙 경쇄 분획은 LC의 이론적 크기의 대략 2배의 명시 MW를 갖는 피크 3을 생성한다.

[0384] 피크 3은 전기영동 조건이 보다 높은 모세관 온도를 포함하는 경우 관찰되지 않으며, 다른 공-이동 단편은 이들 조건 하에서 관찰되지 않는다.

[0385] 단일 아미노산 돌연변이를 포함하는 연구는 LC-LC 이량체 형성과 상관되는 LC CDR1 및 CDR2에서 3개의 아미노산 잔기를 확인하였다. 임의의 이들 3개의 잔기가 또 다른 아미노산에 의해 대체될 경우, 피크 3은 완전히 해리되고, 환원 CE-SDS에 의해 더이상 관찰되지 않는다.

[0386] MALDI-TOF 단백질 질량 평거프린팅 (PMF)과 결합된 SDS-PAGE 분석은 숙주 세포 단백질이 페르투주맙에 존재하지 않고, CE-SDS에 의해 관찰된 수준에서 유사한 밴드가 검출되지 않음을 확인시켰다.

[0387] 집합적으로 취해진 이들 결과는 페르투주맙에 특이적인 방법-유도된 LC-LC 이량체로서 피크 3의 확인을 지지한다.

[0388] 논의

[0389] 이 연구로부터 얻어진 데이터의 평가는 하기를 지시한다:

[0390] (1) NR-CE-SDS는 단편의 검출을 위한 SE-HPLC에 비해 비-중복 정보를 제공한다.

[0391] (2) NR-CE-SDS 방법 (SE-HPLC에 비해)에 의해 얻어진 비-중복 단편화 정보는 또한 R-CE-SDS 방법을 이용하여 얻어질 수 있다.

[0392] 표 16에 나타난 바와 같이, 환원 검정은 약물 물질 제조 동안 일어날 수 있는 낮은 pH 노출로부터 초래되는 절단 생성물을 검출하였다. 표 18은 페르투주맙 참조 표준물에 대한 환원 CE-SDS 피크 1 및 피크 2, III상 물질 ($n=3$), 및 상업적 제조 공정을 이용하여 제조된 배치 ($n=39$)에 대해 얻어진 값을 함유한다. 95/99 허용 구간 (TI)을 3.2의 k 값을 사용하여 피크 1 및 피크 2에 대해 계산하였으며, 표 18에 제시되어 있다. 피크 1에 대한 95/99 허용 구간은 0.0 내지 0.4 %CPA이다. 피크 2에 대한 95/99 허용 구간은 0.3 내지 0.9 %CPA이다.

[0393] [표 18]

[0394] 시험된 43개의 배치에 대한 R-CE-SDS 정량적 데이터 (% CPA)

n	배치	피크 1 (% CPA)	피크 2 (% CPA)
1	향 2C4907-2	0.31	0.92
2	SSF0001	0.25	0.63
3	SSF0002	0.20	0.62
4	SSF0003	0.27	0.60
5	VV0002	0.27	0.47
6	VV0003	0.28	0.49
7	VV0004	0.25	0.51
8	VV0005	0.41	0.55
9	VV0006	0.27	0.50
10	VV0007	0.29	0.50
11	VV0008	0.30	0.53
12	VV0009	0.26	0.54
13	VV0013	0.19	0.54
14	VV0018	0.17	0.56
15	VV0020	0.17	0.58
16	VV0021	0.18	0.62
17	VV0023	0.14	0.62
18	VV0024	0.13	0.64
19	VV0025	0.18	0.69
20	VV0026	0.13	0.58
21	VV0028	0.17	0.60
22	VV0029	0.18	0.61
23	VV0031	0.18	0.65
24	VV0032	0.16	0.69
25	VV0033	0.18	0.69
26	VV0034	0.18	0.67
27	VV0035	0.17	0.59
28	VV0036	0.17	0.67
29	VV0037	0.19	0.74
30	VV0038	0.19	0.71
31	VV0039	0.19	0.73
32	VV0040	0.19	0.70
33	VV0041	0.18	0.72
34	VV0042	0.19	0.73
35	VV0043	0.19	0.61
36	VV0044	0.20	0.67
37	VV0046	0.20	0.62
38	VV0047	0.22	0.66
39	VV0048	0.22	0.63
40	VV0049	0.20	0.69
41	VV0050	0.18	0.49
42	VV0051	0.16	0.63
43	VV0052	0.18	0.60
	평균	0.21	0.62
	표준 편차	0.06	0.09
	최소	0.13	0.47
	최대	0.41	0.92
	N	43	43
	K	3.2	3.2
	하부 TI	0.02	0.33
	상부 TI	0.40	0.91

[0395]

[0396] 약물 물질 방출에 대한 피크 1 \leq 0.5% 및 피크 2 \leq 1.0%의 최종 허용 기준이 본원에서 선택된다.

[0397]

페르투주맙 약물 물질을 동결 저장하기 때문에, DS 안정성에 대한 예상되는 변화는 없을 것이다. 또한, T=0 및 T548d 둘 다에서 약물 생성물에 대해 얻어진 R-CE-SDS 데이터에 기초하여 (표 19), 임의의 지정된 종에 대해 유의한 변화는 관찰되지 않는다.

[0398]

[표 19]

[0399] DP 안정성 샘플에 대한 R-CE-SDS 정량적 데이터 (% CPA)

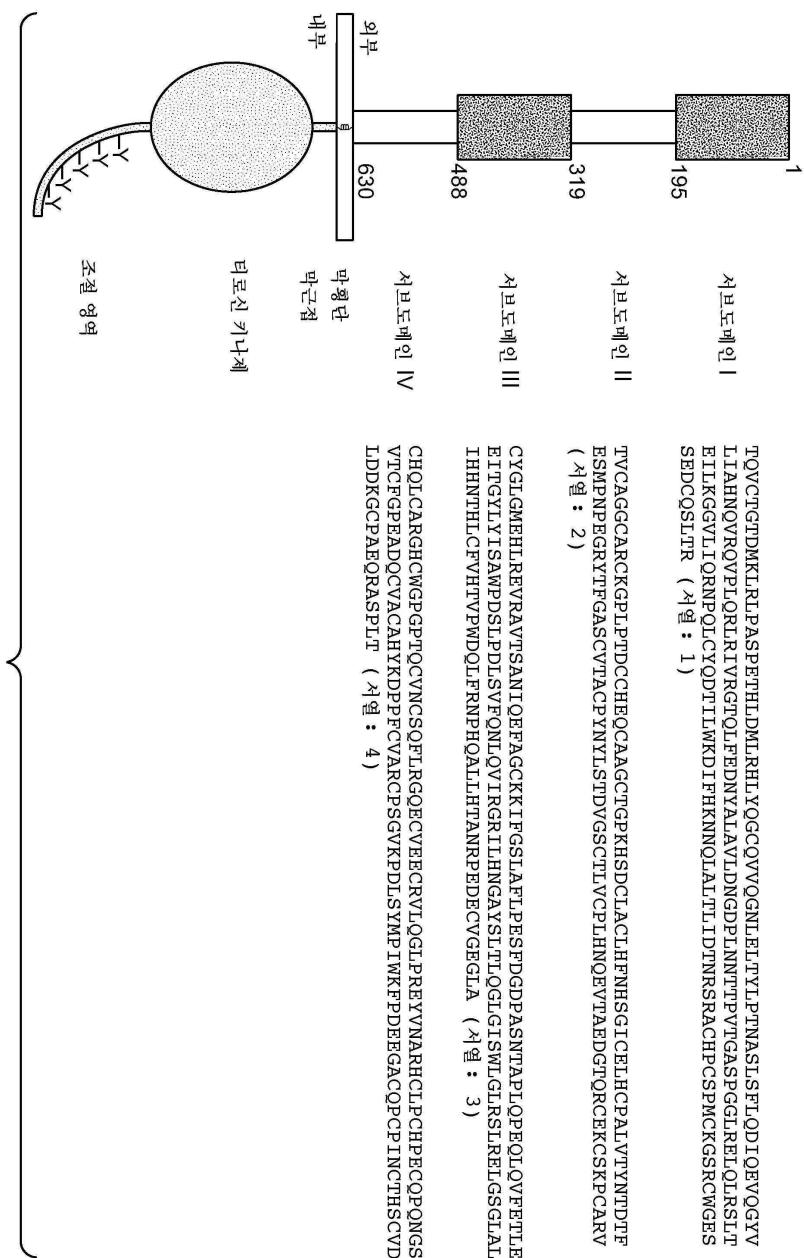
	파크 1	LC	파크 2	파크 3	NGHC	HC	파크 5	Inc. Red.
DS 방출	0.25	26.72	0.51	2.27	2.76	66.66	0.27	0.56
DP 안정성 T=0	0.13	26.45	0.54	2.78	2.78	66.53	0.30	0.49
DP 안정성 T=548d	0.19	26.34	0.69	3.21	2.83	65.93	0.24	0.57

[0400]

[0401] NGHC = β-글리코실화된 중쇄, HC = 중쇄, Inc. Red. = 불완전 환원

도면

도면1



도면2a

경쇄 가변

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQRP	*
	** * * * *	*		
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQKP	
		*	** * *	
hum kI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQSISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	0	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTI SSVQA		
	**	*	*	
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSLQP		
	*	*****		
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (서열:5)		
	*	*	*	
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (서열:7)		
	***	*		
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (서열:9)		

도면2b

중쇄 가변

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTM D]	WVKQS	
	** * * * * *** *		*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTM D]	WVRQA	
		*** *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	*	***	*** *	***** *
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	*****	***	***	*
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLT FEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(서열:6)
	***	**		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTLVTVSS	(서열:8)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTLVTVSS	(서열:10)

도면3a

페르투주맙 경쇄에 대한 아미노산 서열

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK**A**S**Q**D**V**S**I**G**V**A**W**Y**Q**Q**K**P**G**K**A**P**K**L**L**I**Y**S**A**S**Y**R**Y**T**G**V**P**
 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**Q****O****Y****Y****I****I****P****Y****T****F****G****Q****G****T****K****V****E****I****K****R****T****V****A****A****P****S****V****F****I****F****P**
 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 190 | 200 | 210 |
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 : 11)

도면3b

페르투주맙 중쇄에 대한 아미노산 서열

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**G****F****T****F****T****D****Y****T****M****D****W****V****R****Q****A****P****G****K****G****L****E****W****V****A****D****V****N****P****N****S****G****S****I****Y**
 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
 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****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****A**
 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
 STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPVLQSSG
 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
 LYSLSSVVTVPPSSLGQTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 | 440 | 448 |
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 : 12)

도면4a

트라스투주맙 경쇄

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 Y C Q Q
 91 105 120 135
 H Y T T P P T 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 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 (서열: 13)

도면4b

트라스투주맙 증쇄

1 15 30 45
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L
 ↗ 46 60 75 90
 E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D
 91 105 120 135
 T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M 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
 ↙ 136 150 165 180
 K 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
 181 195 210 225
 G 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
 226 240 255 270
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
 271 285 300 315
 H 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
 316 330 345 360
 W 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
 361 375 390 405
 M 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 N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
 406 420 435 449
 S F F 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
 (서열: 14)

도면5a

페르투주맙 면이체 경쇄

1 15 30 45
 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
 46 60 75 90
 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
 91 105 120 135
 C Q Q Y Y I Y P Y T 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
 136 150 165 180
 V C L 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
 181 195 210 217
 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 (서열: 15)

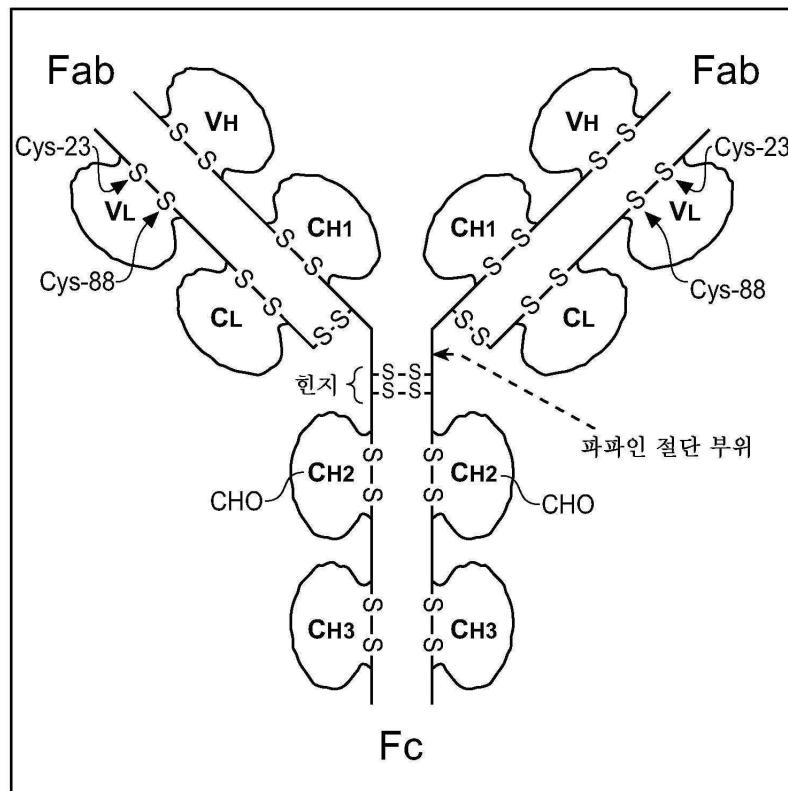
도면5b

페르투주맙 변이체 중쇄

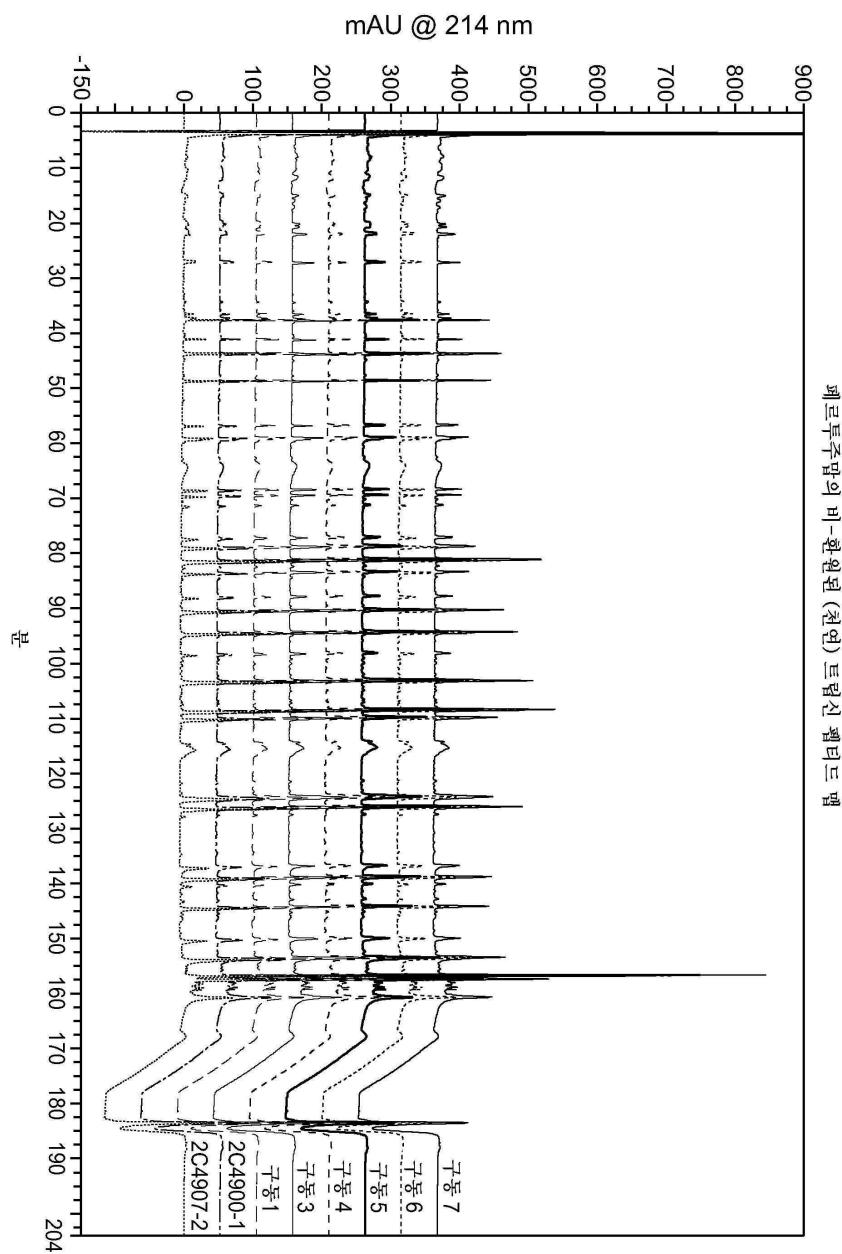
1	15	30	45
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L			
46	60	75	90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D			
91	105	120	135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P 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 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 M			
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 N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S			
406	420	435	449
F F 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			

(서열: 16)

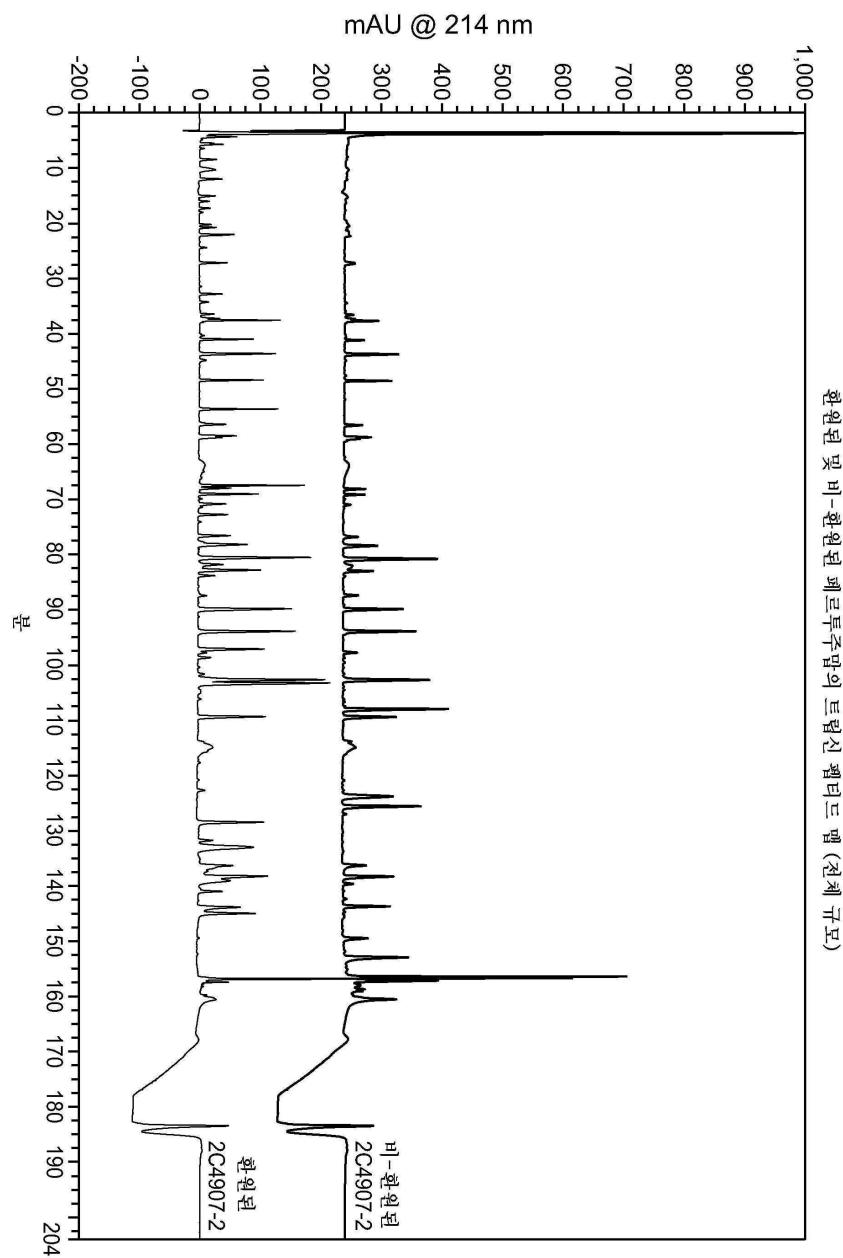
도면6



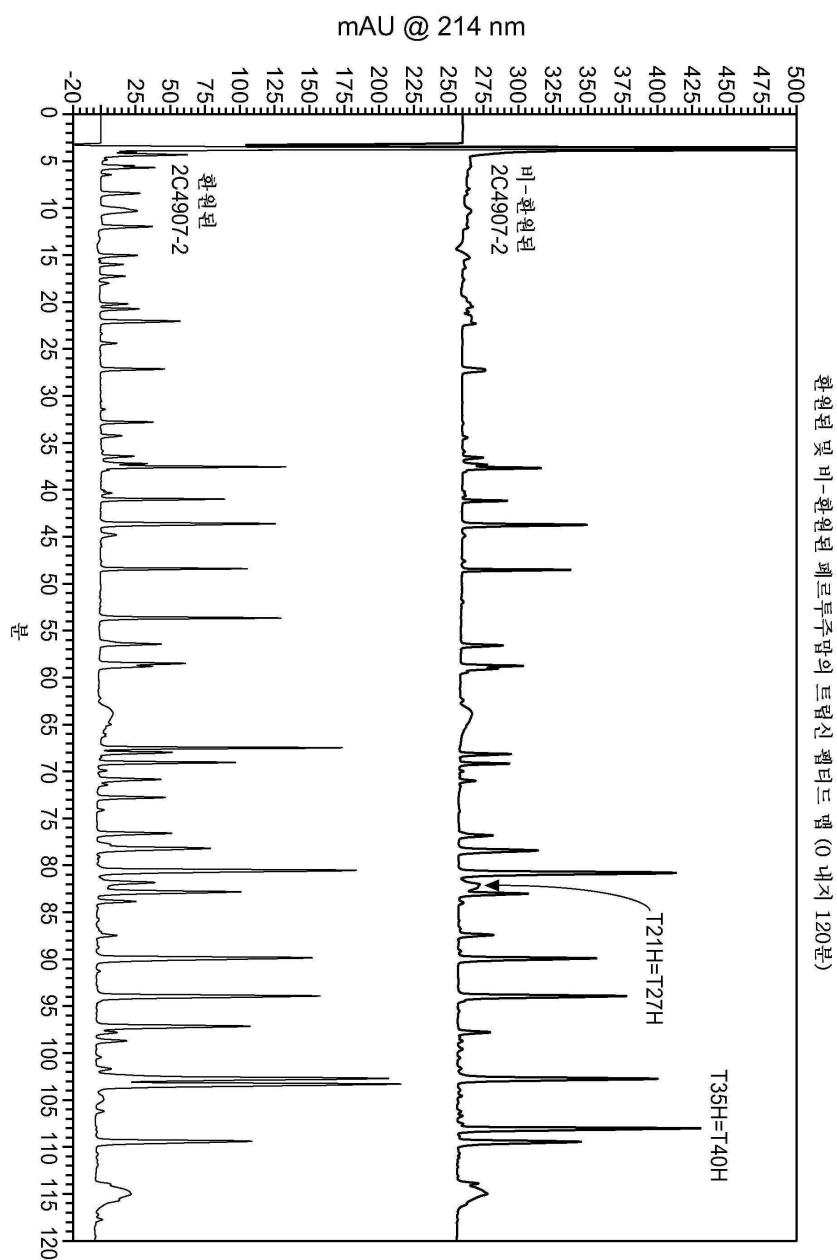
도면7



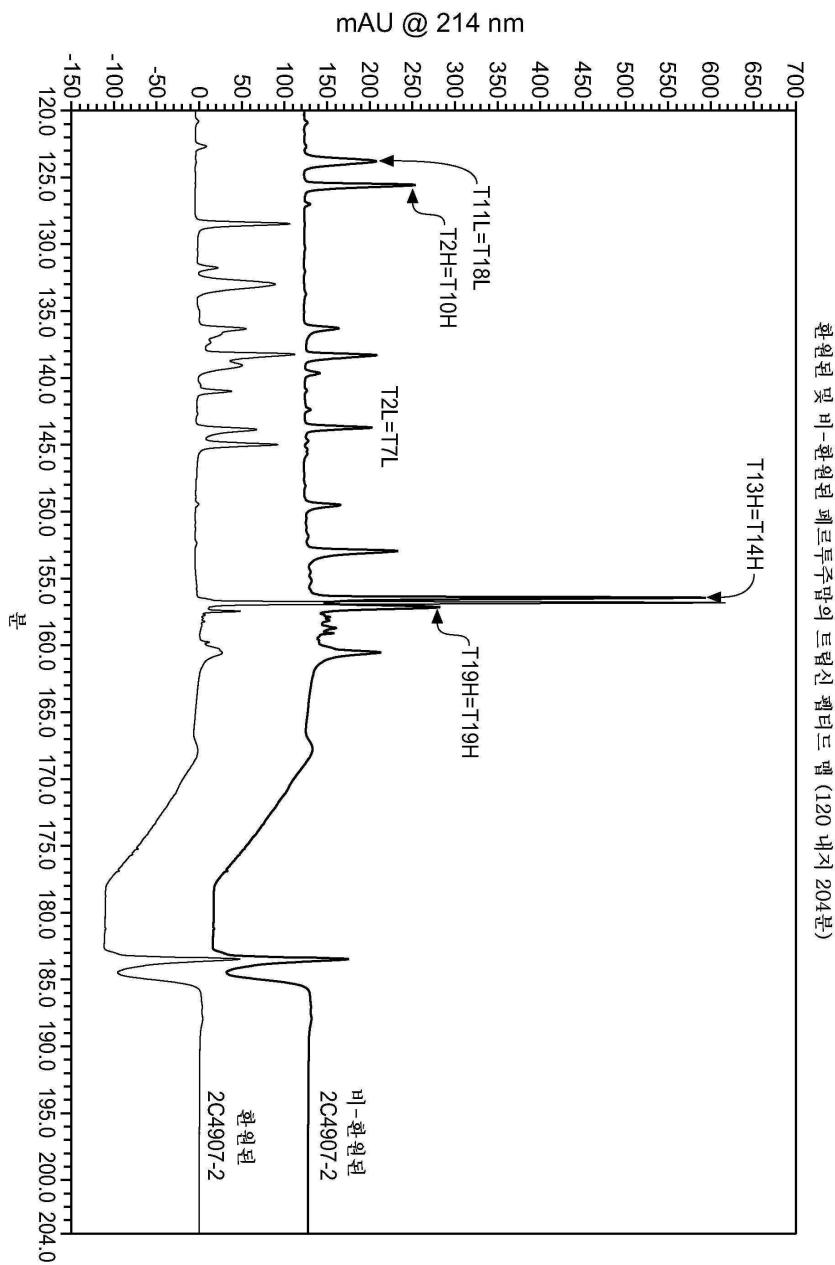
도면8



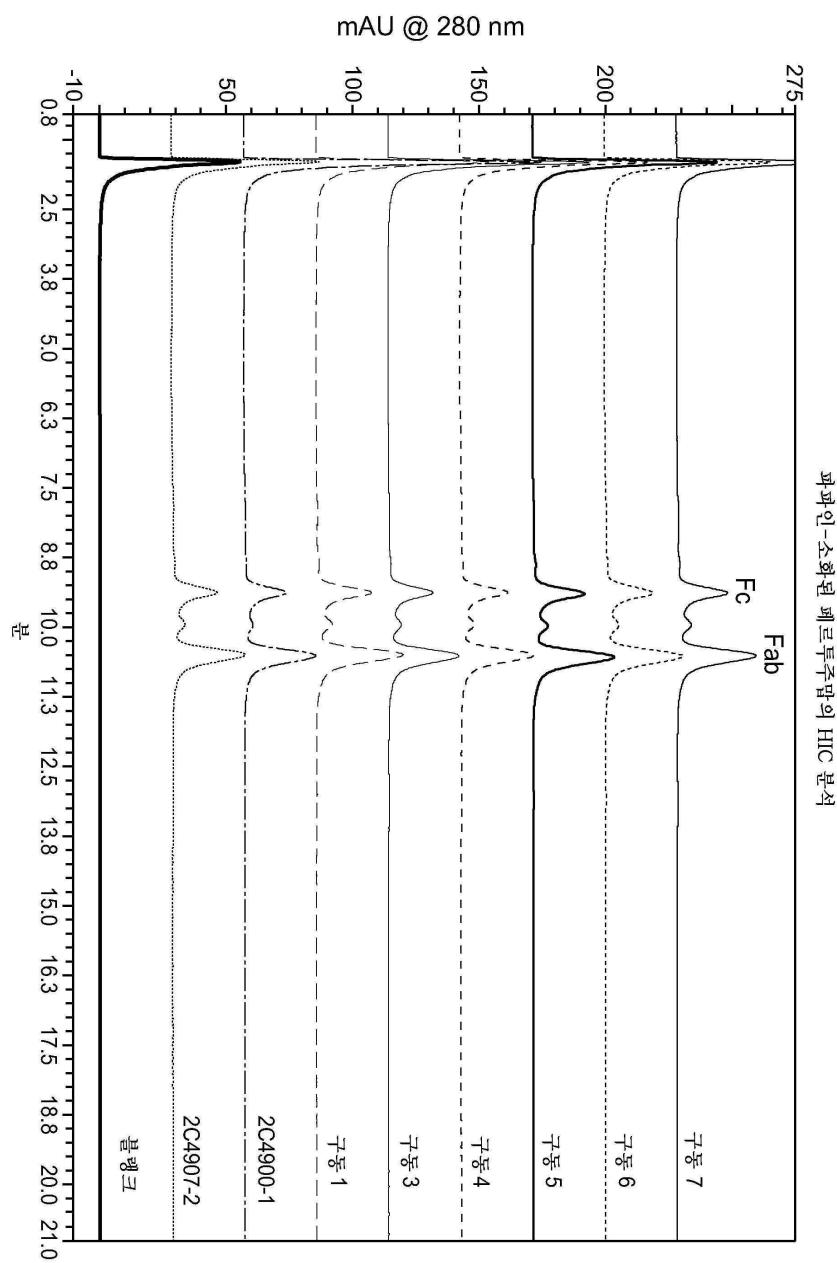
도면9



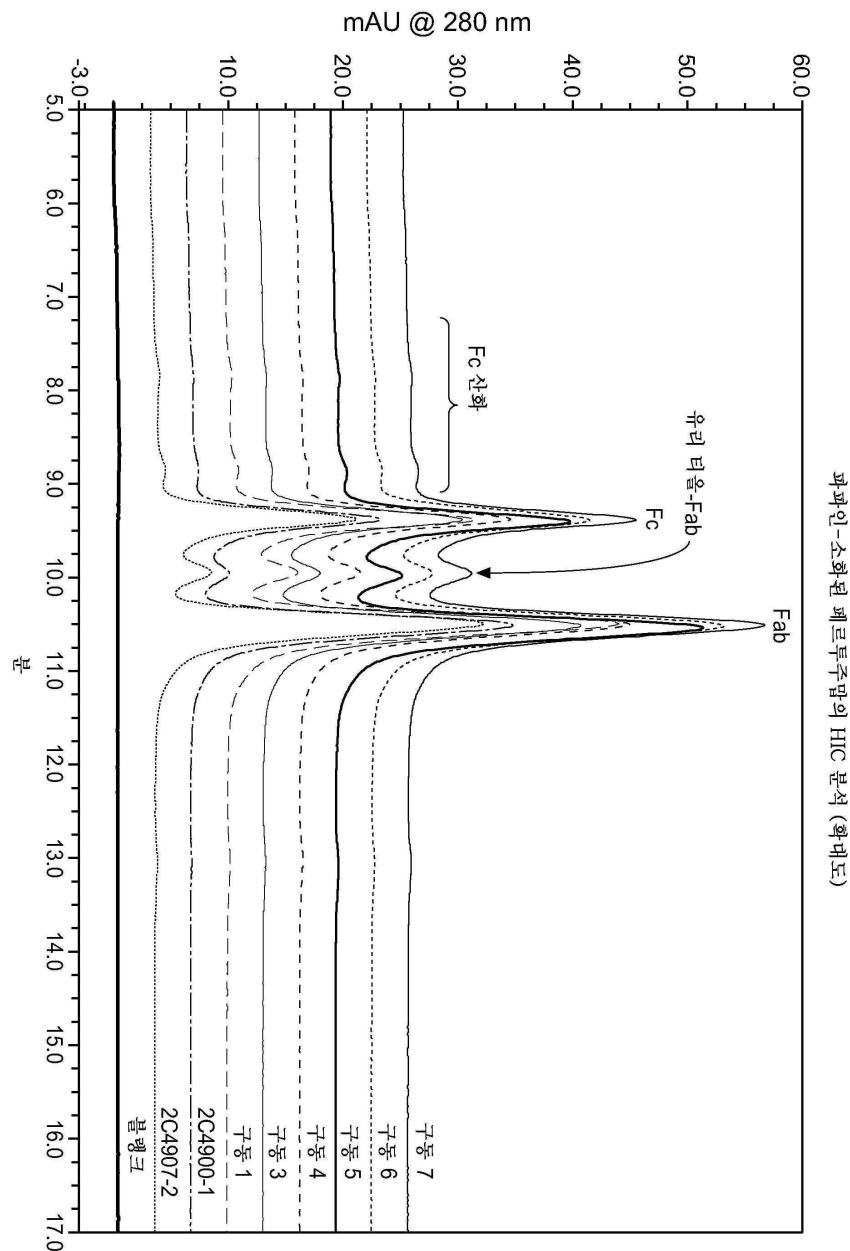
도면10



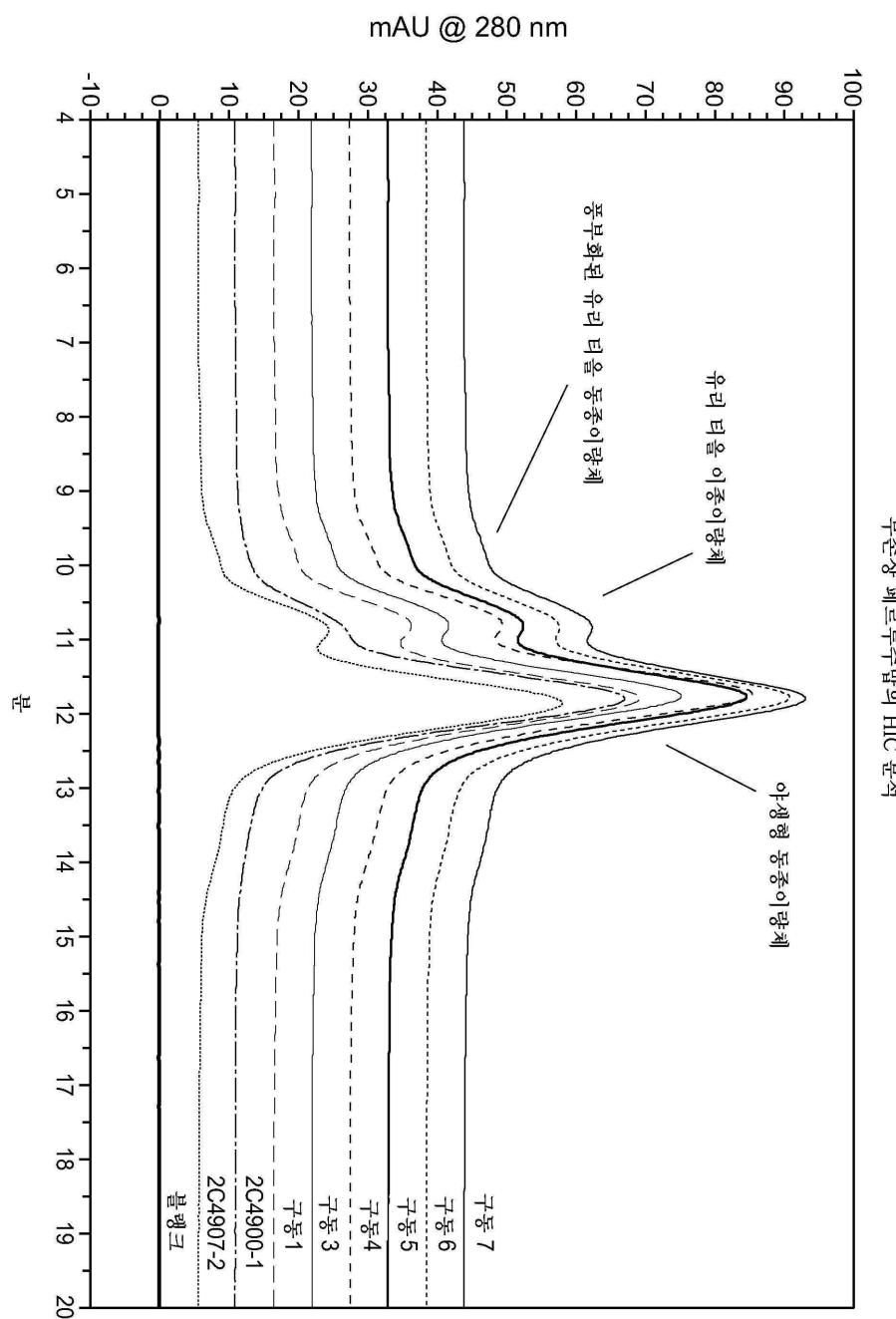
도면11



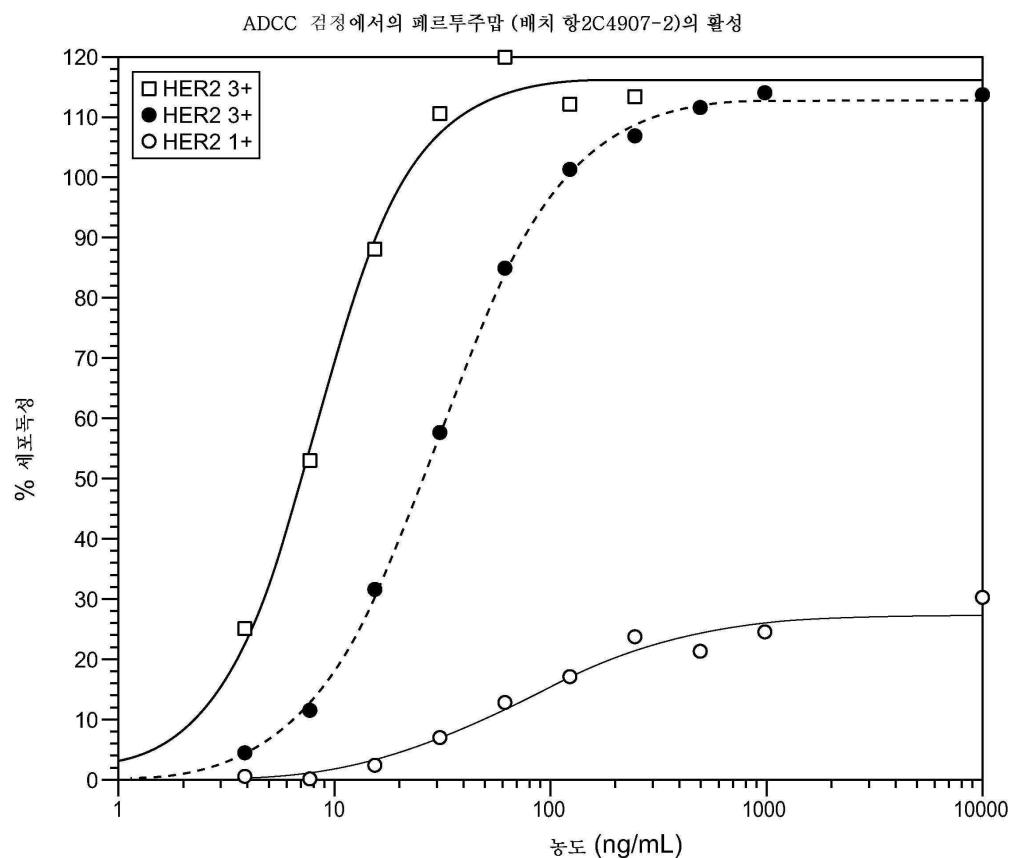
도면12



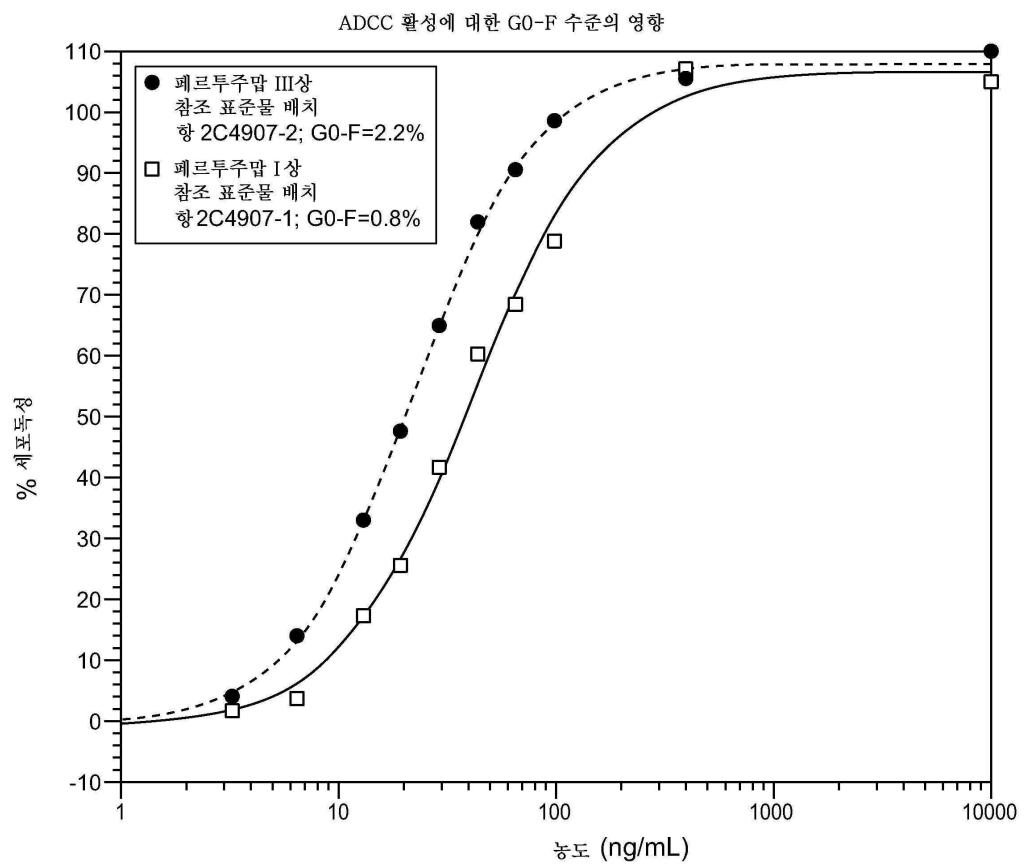
도면13



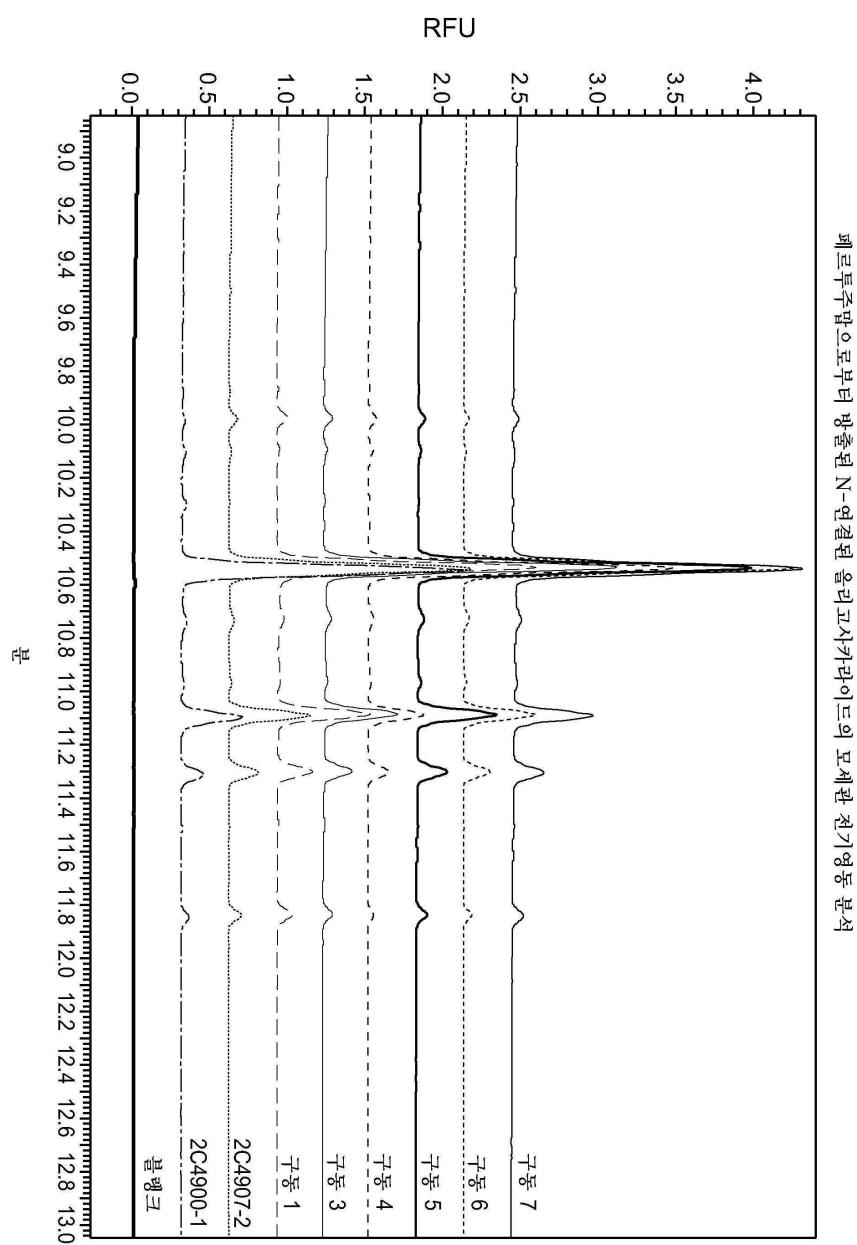
도면14



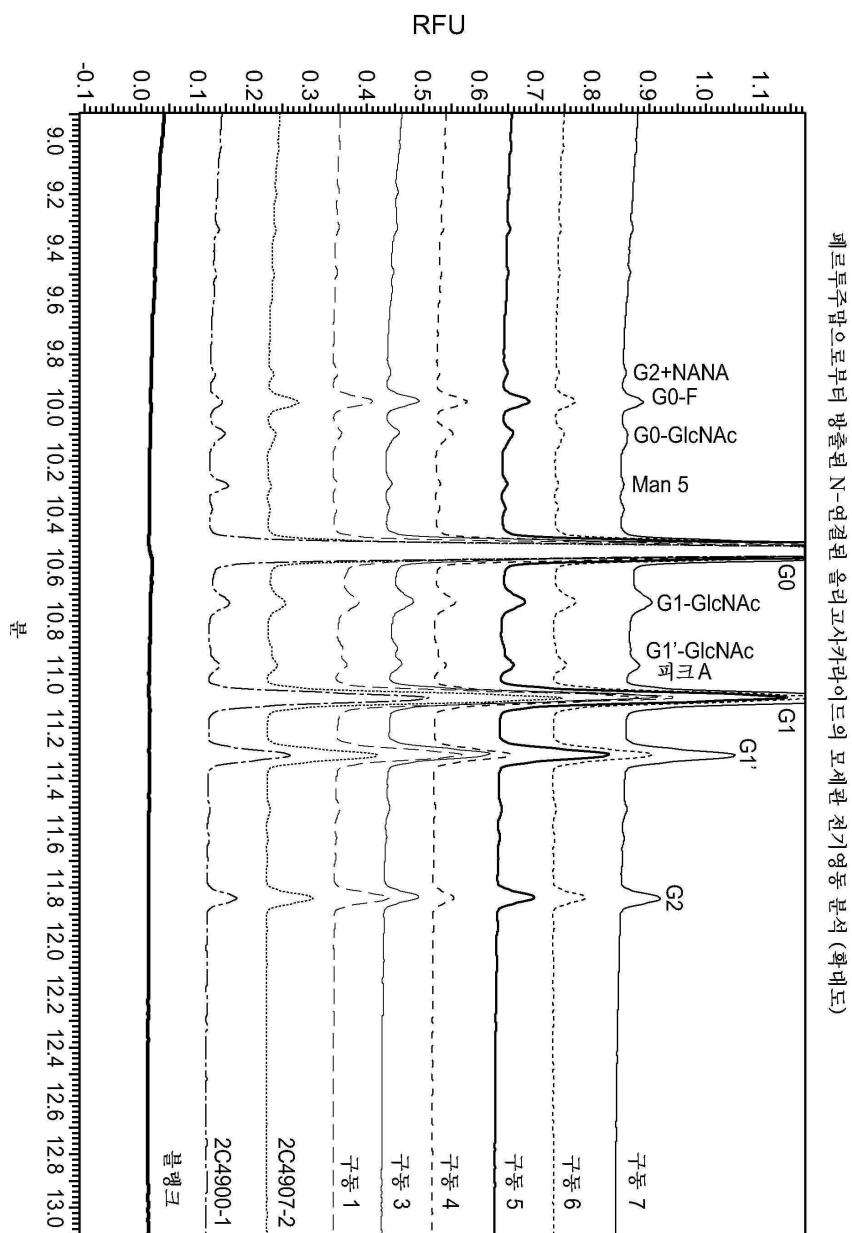
도면15



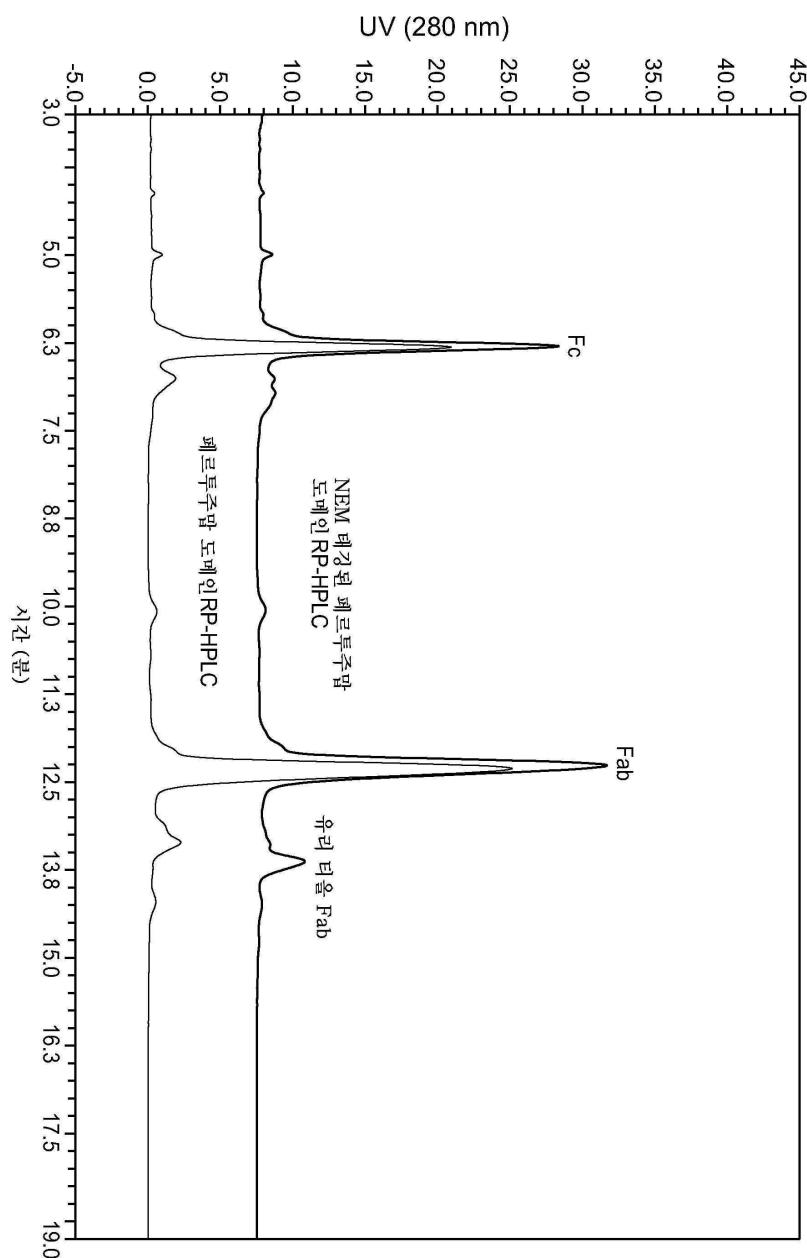
도면16



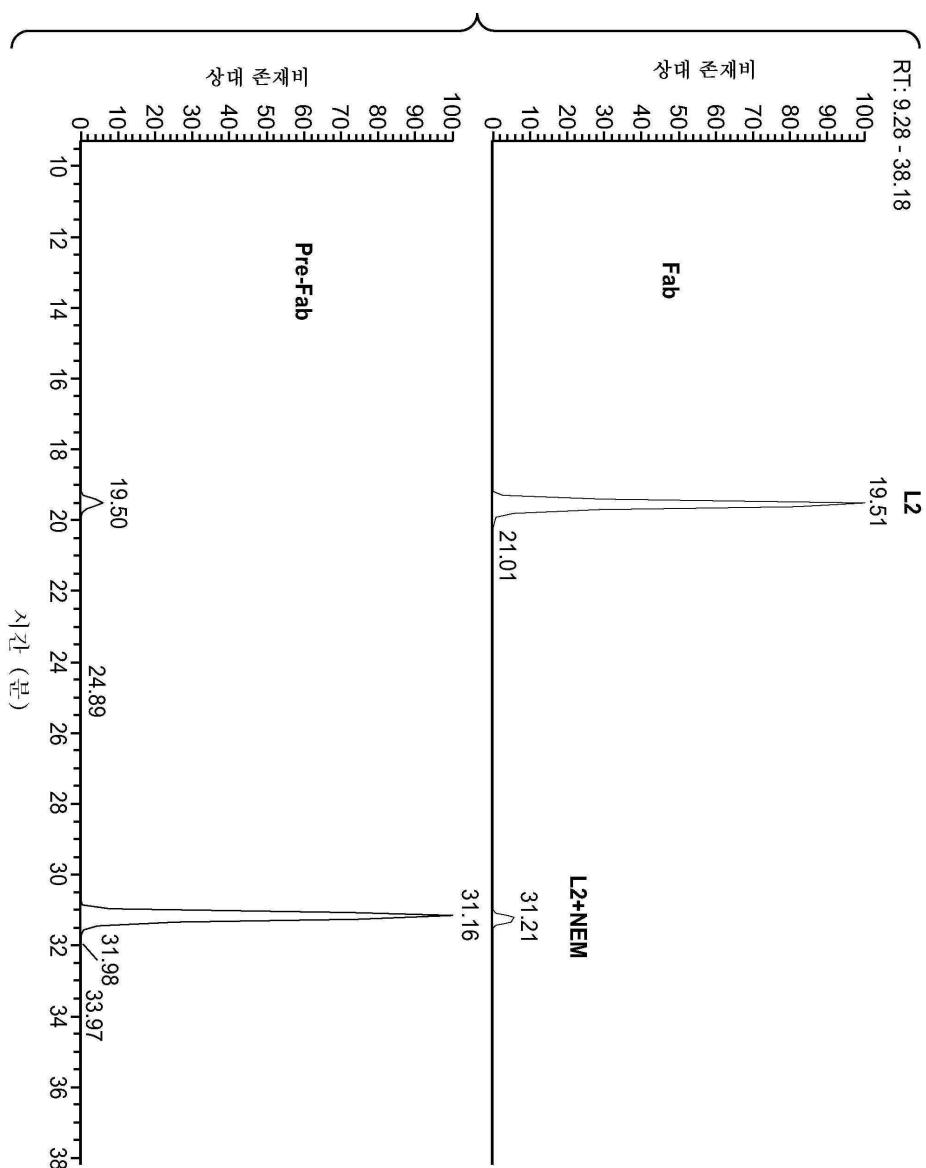
도면17



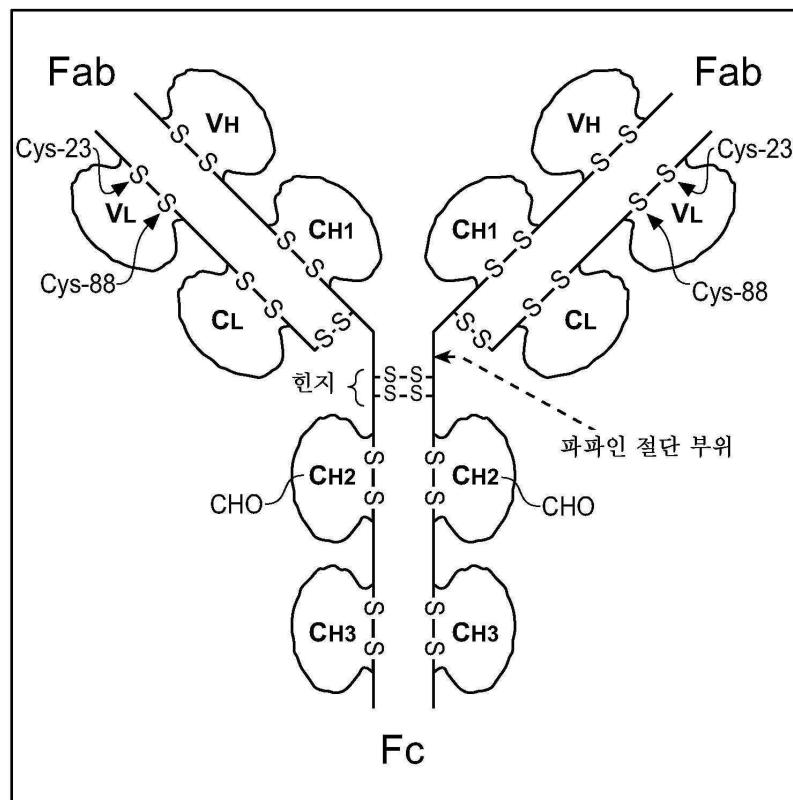
도면18



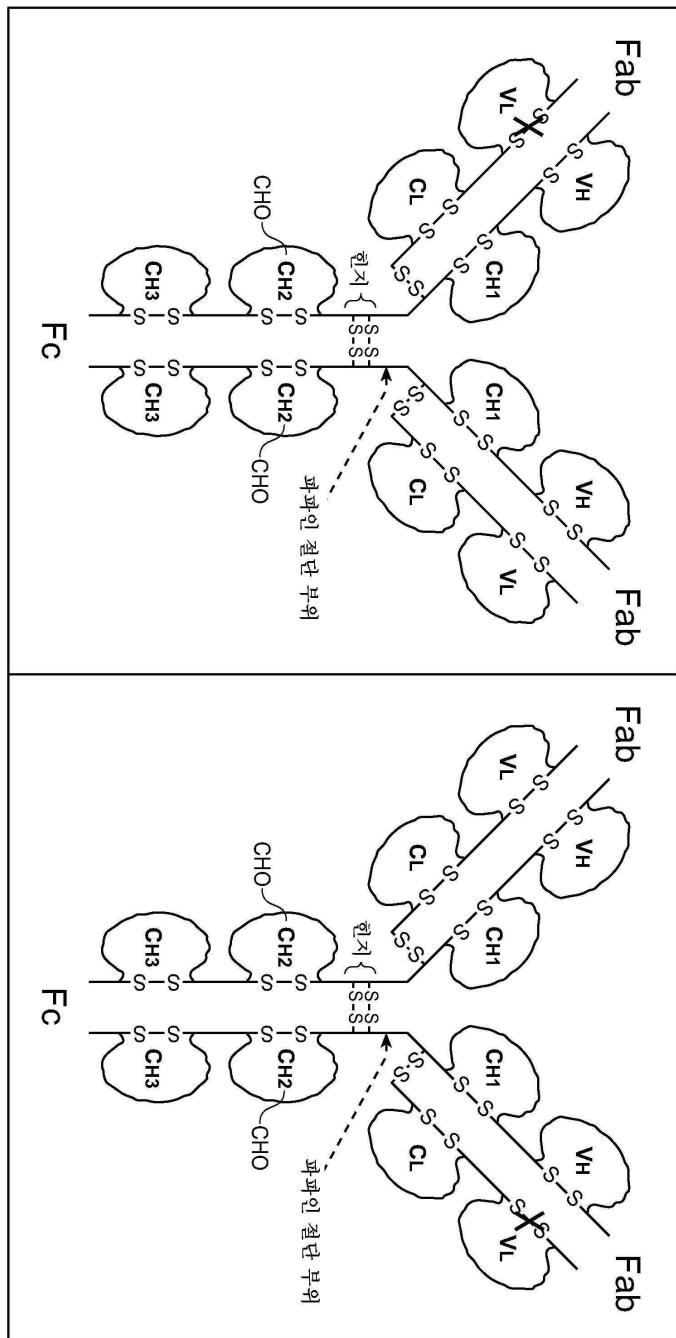
도면19



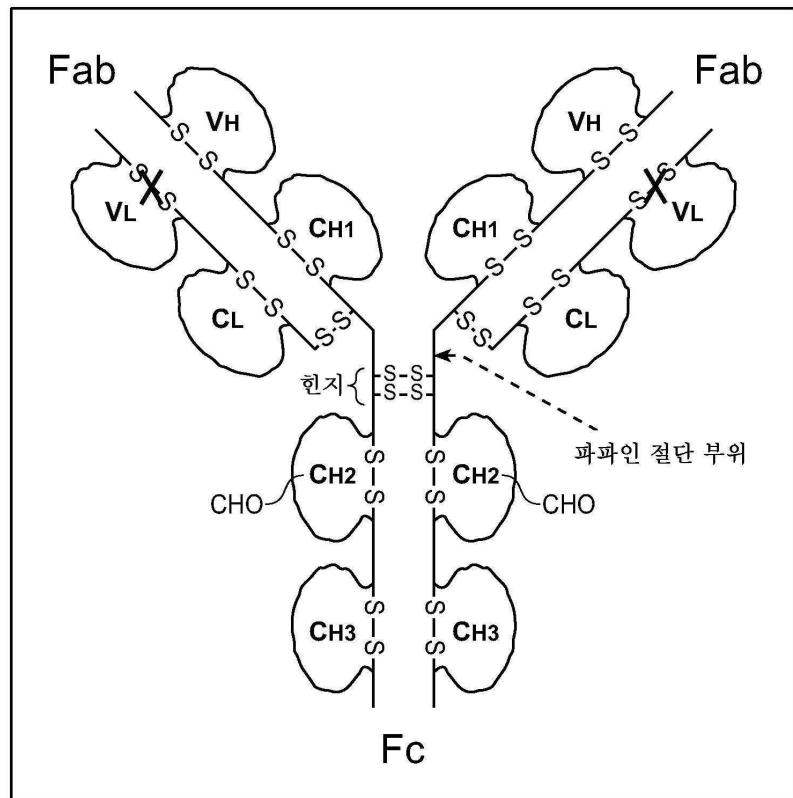
도면20a



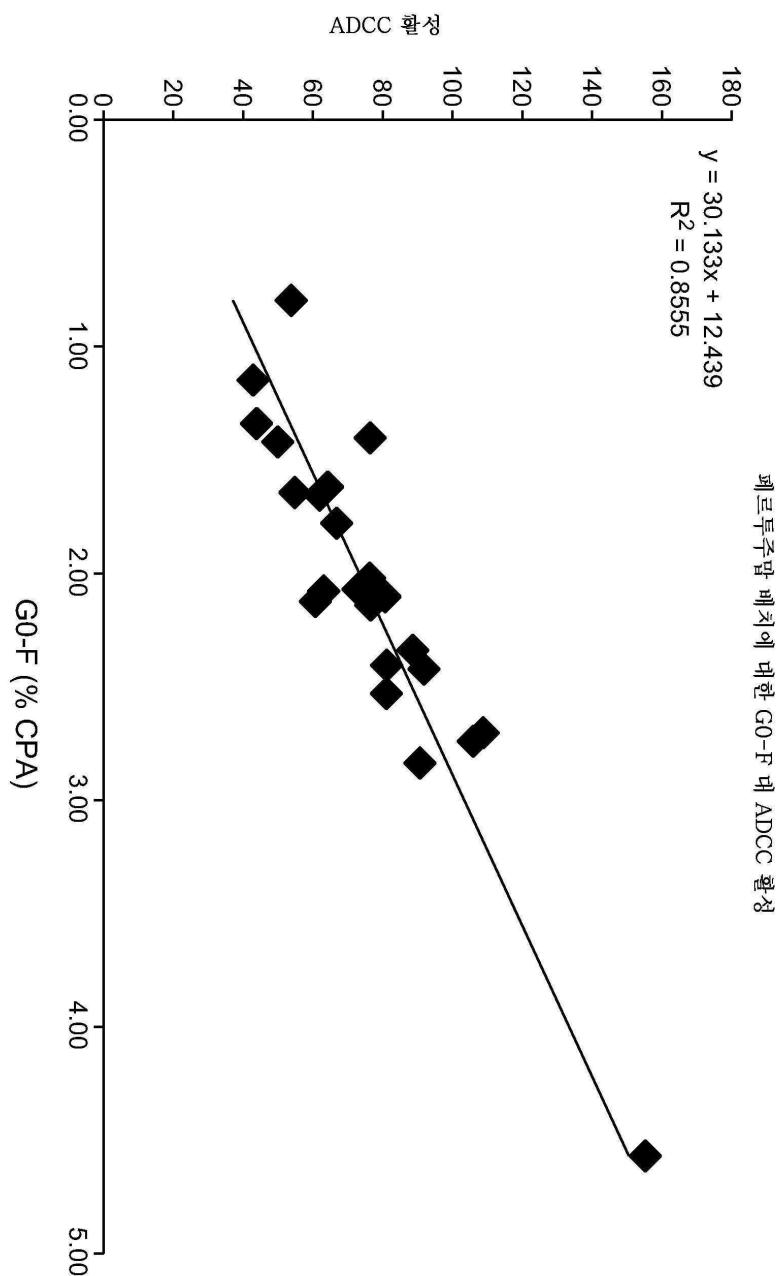
도면20b



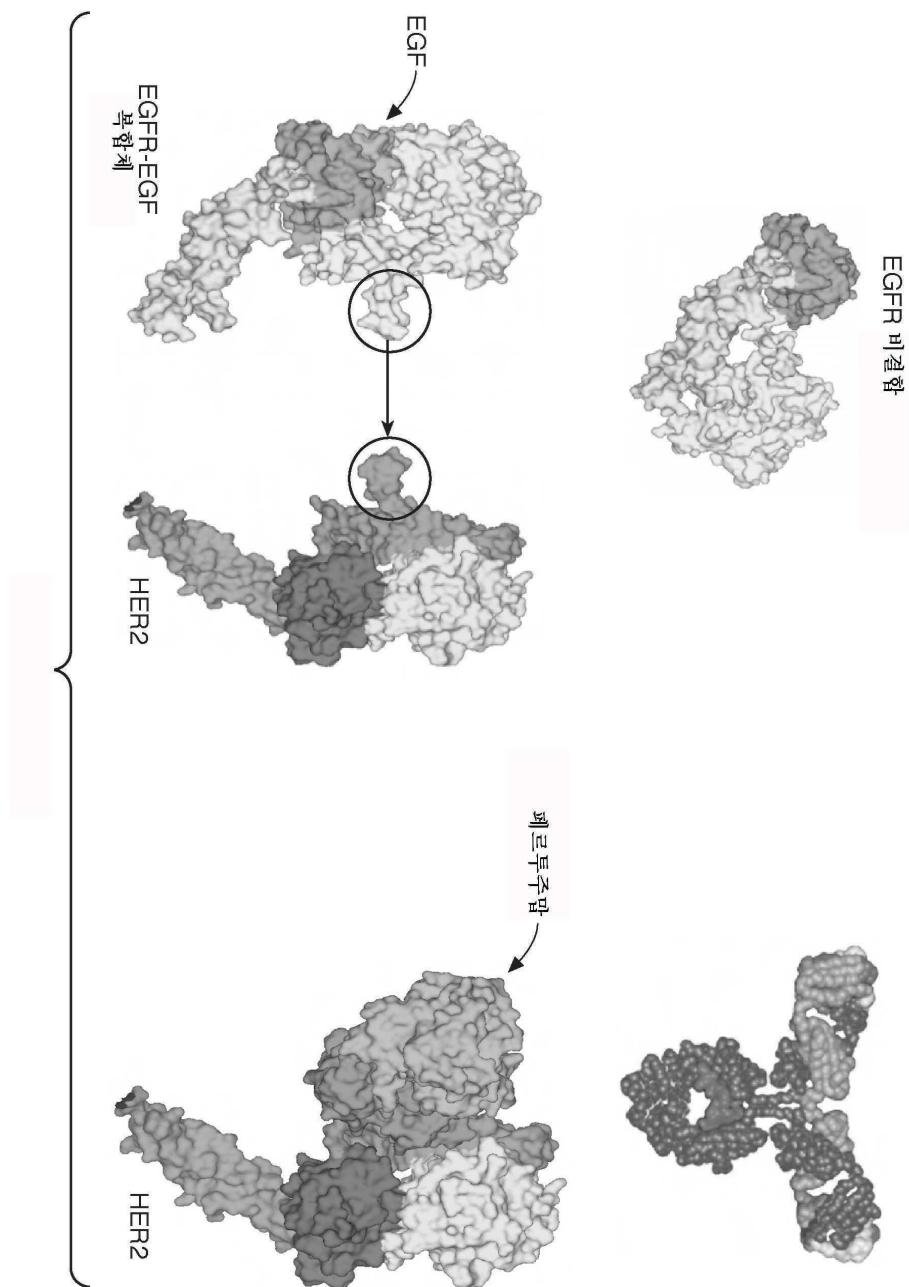
도면20c



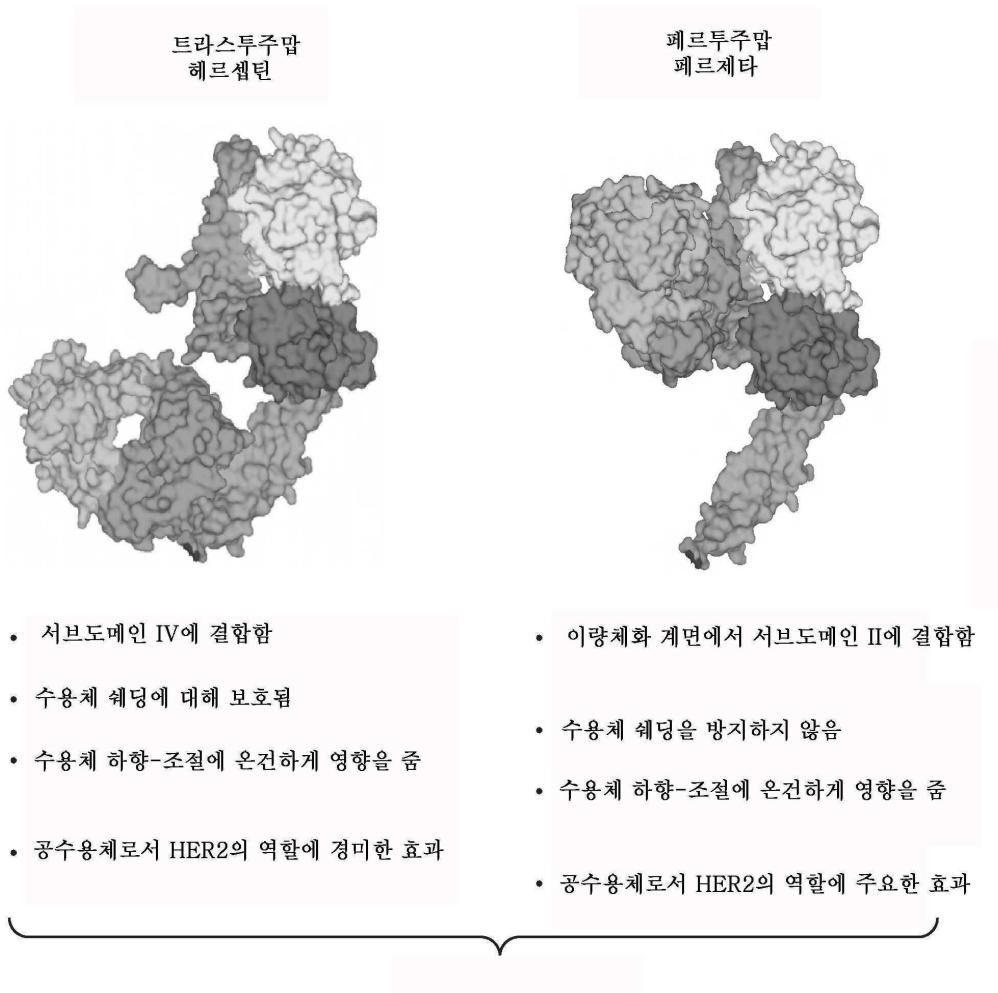
도면21



도면22



도면23



도면 24a

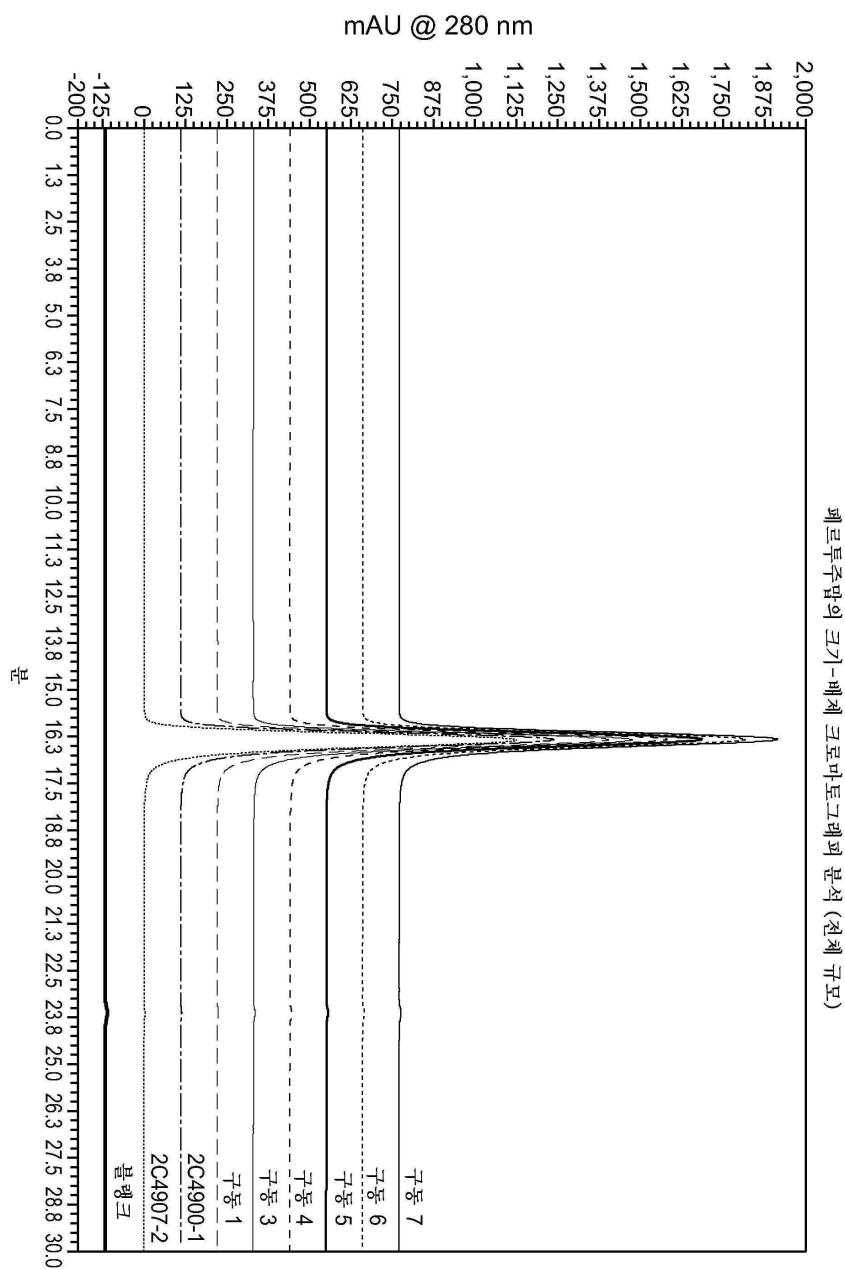
구조	IgG1에 부착된 올리고사카라이드 구조
Man5	Man α (1->6) > Man α (1->6) > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
1235	GlcNAc β (1->2) { Man α (1->6) Man α (1->3) } > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
G-1	Fuc α (1->6) I
1260	GlcNAc β (1->2)Man α (1->6) > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
GO-F	Man α (1->6) > Man α (1->3) > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
Man6	Man α (1->2)Man α (1->3) > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
1317	Man α (1->6) > Man α (1->3) > Man β (1->4)GlcNAc β (1->4)GlcNAc-
약어	

도면24b

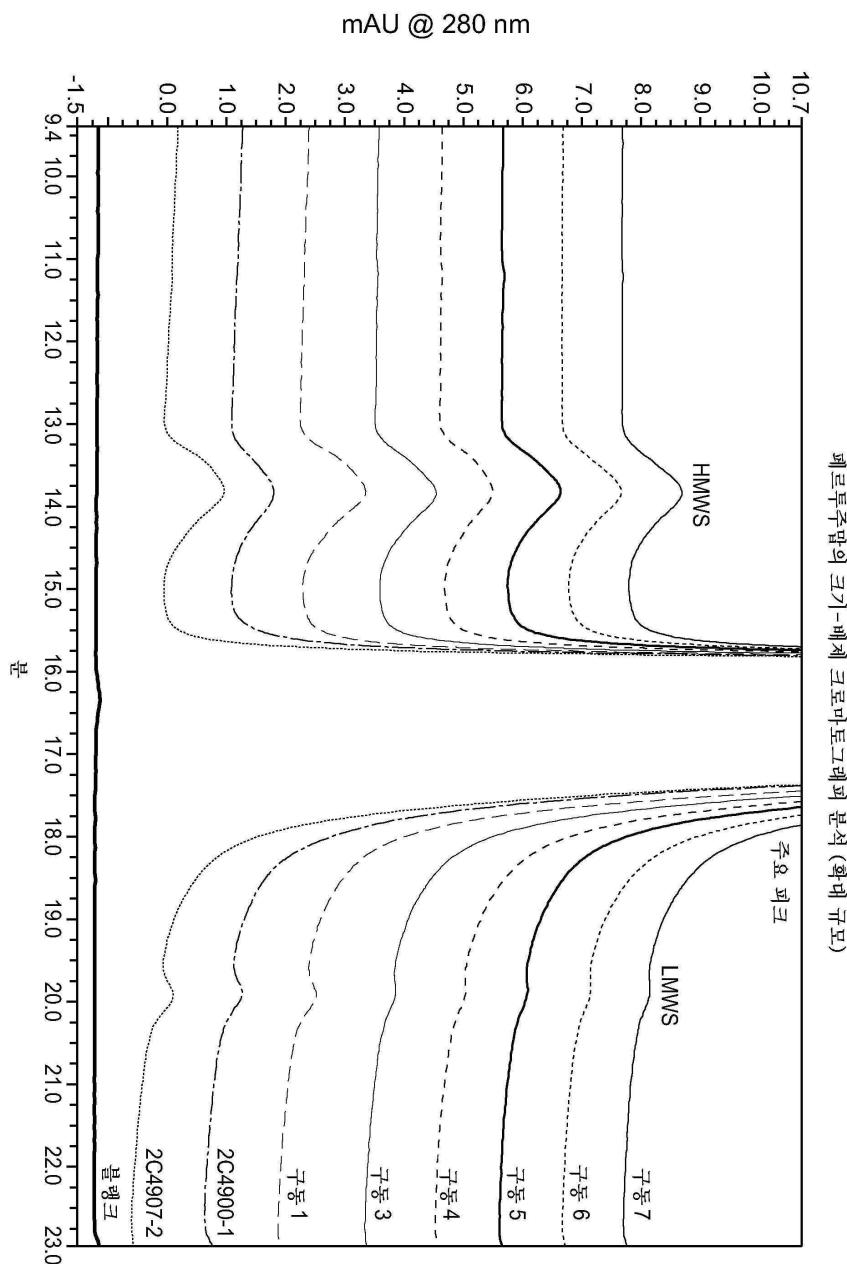
IgG1에 부착된 올리고사카리아이드 구조		
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow 3) \end{array} \right\} > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	1463
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 3) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	1788
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow 6) > \text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc-}$	$\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow 6)$	

이 도면에 나타난 질량은 $(M + Na)^+$ 밸류에 상응한다.

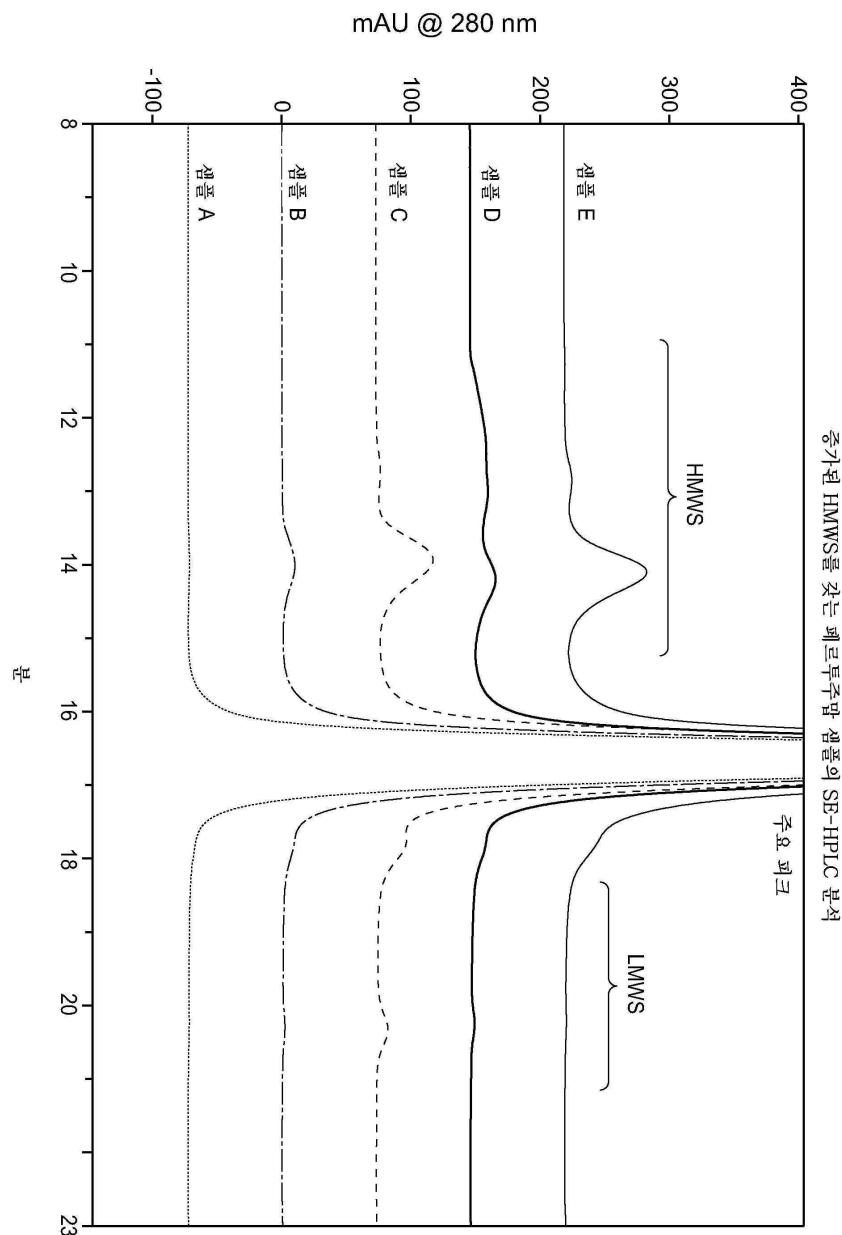
도면25



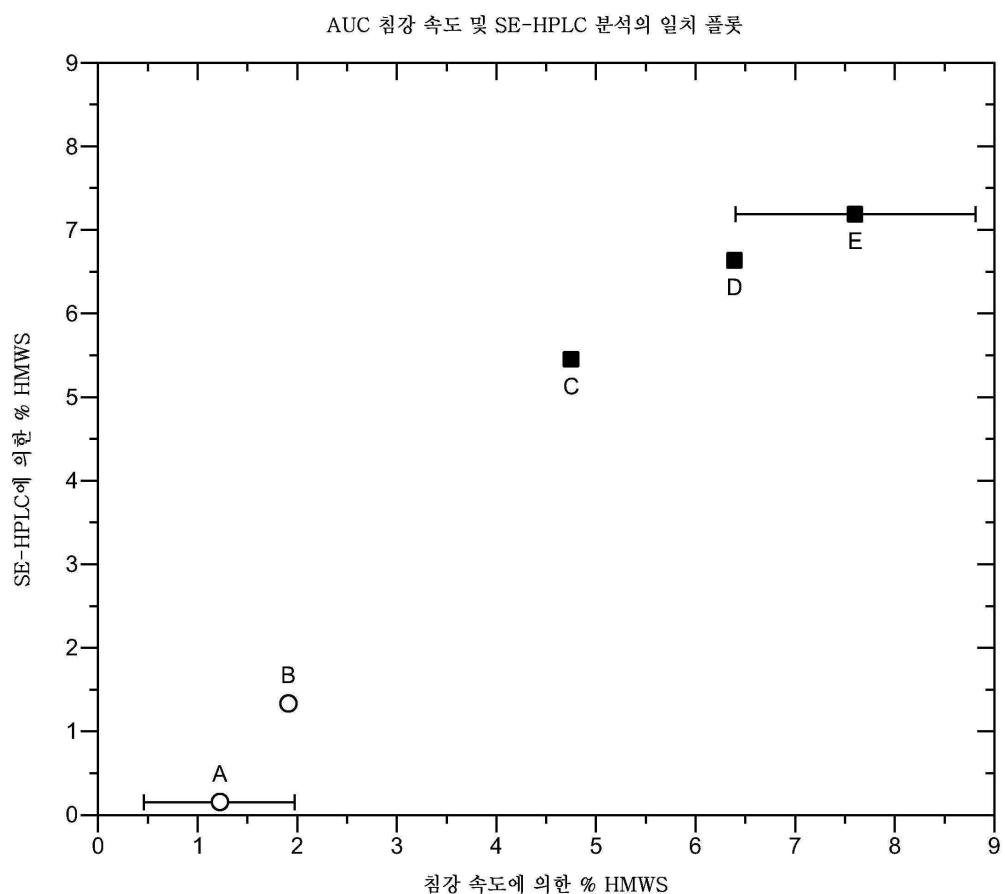
도면26



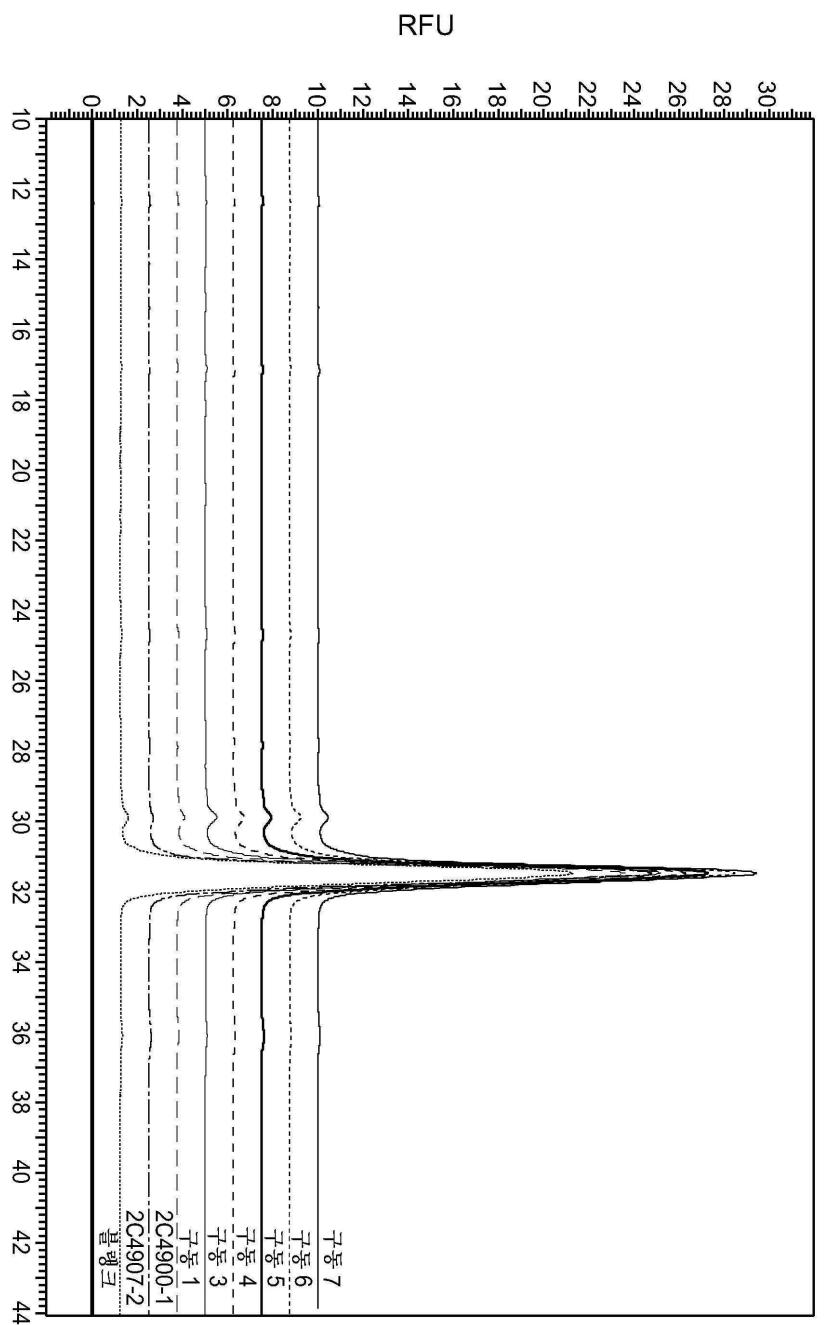
도면27



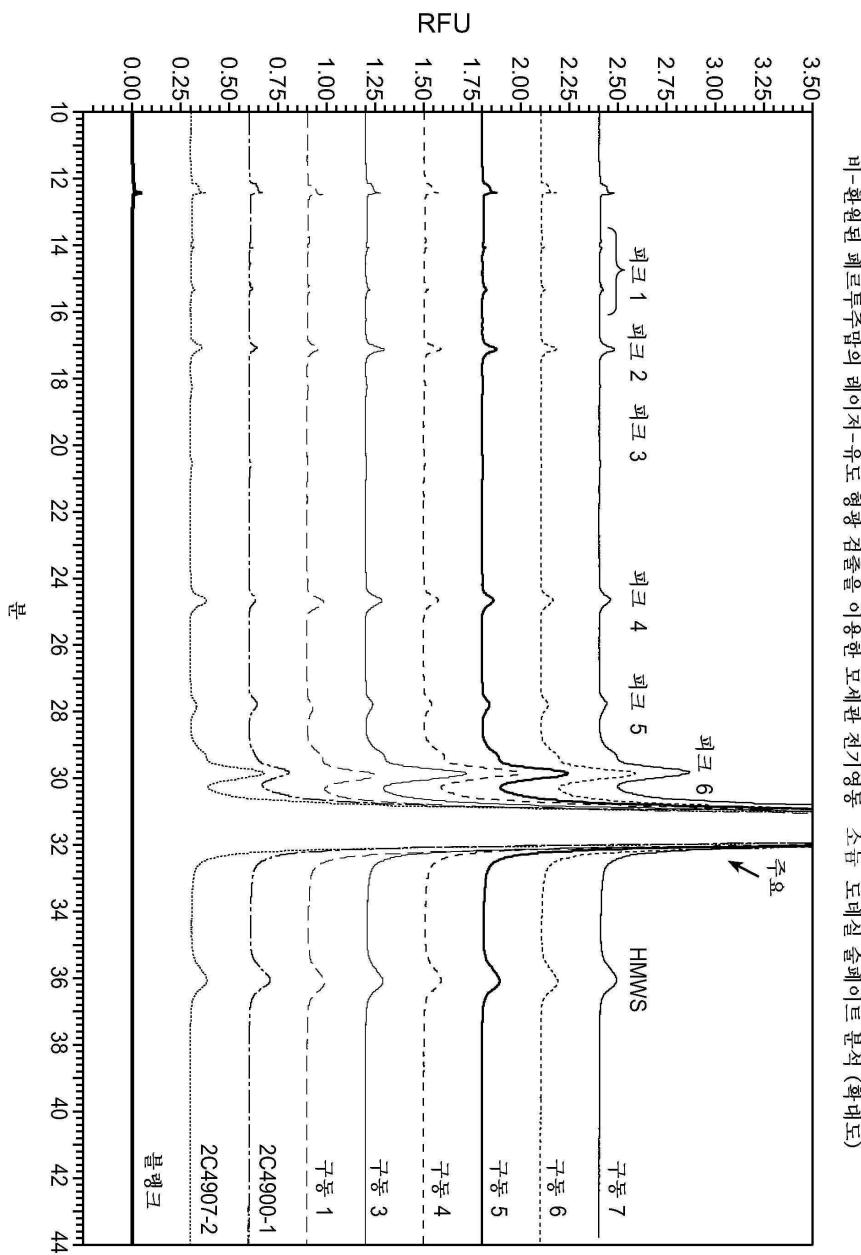
도면28



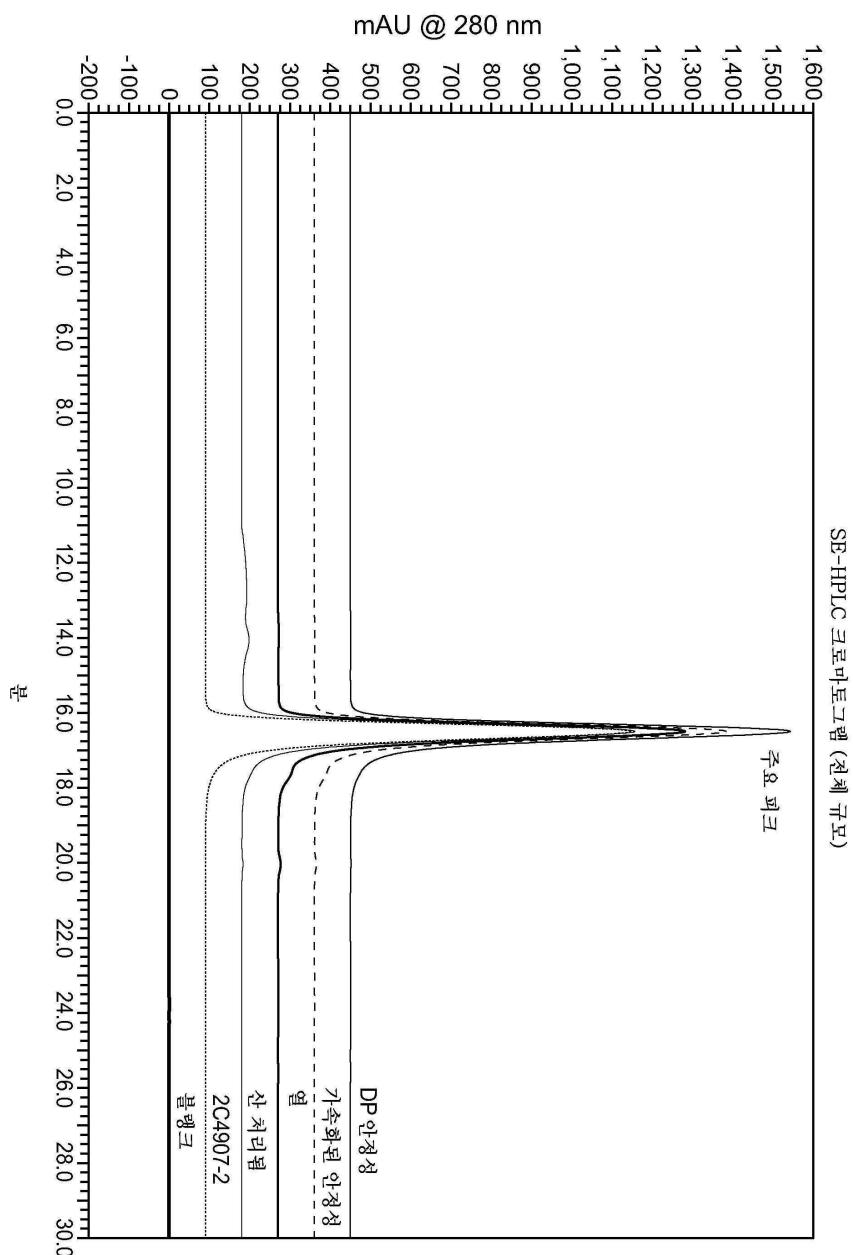
도면29



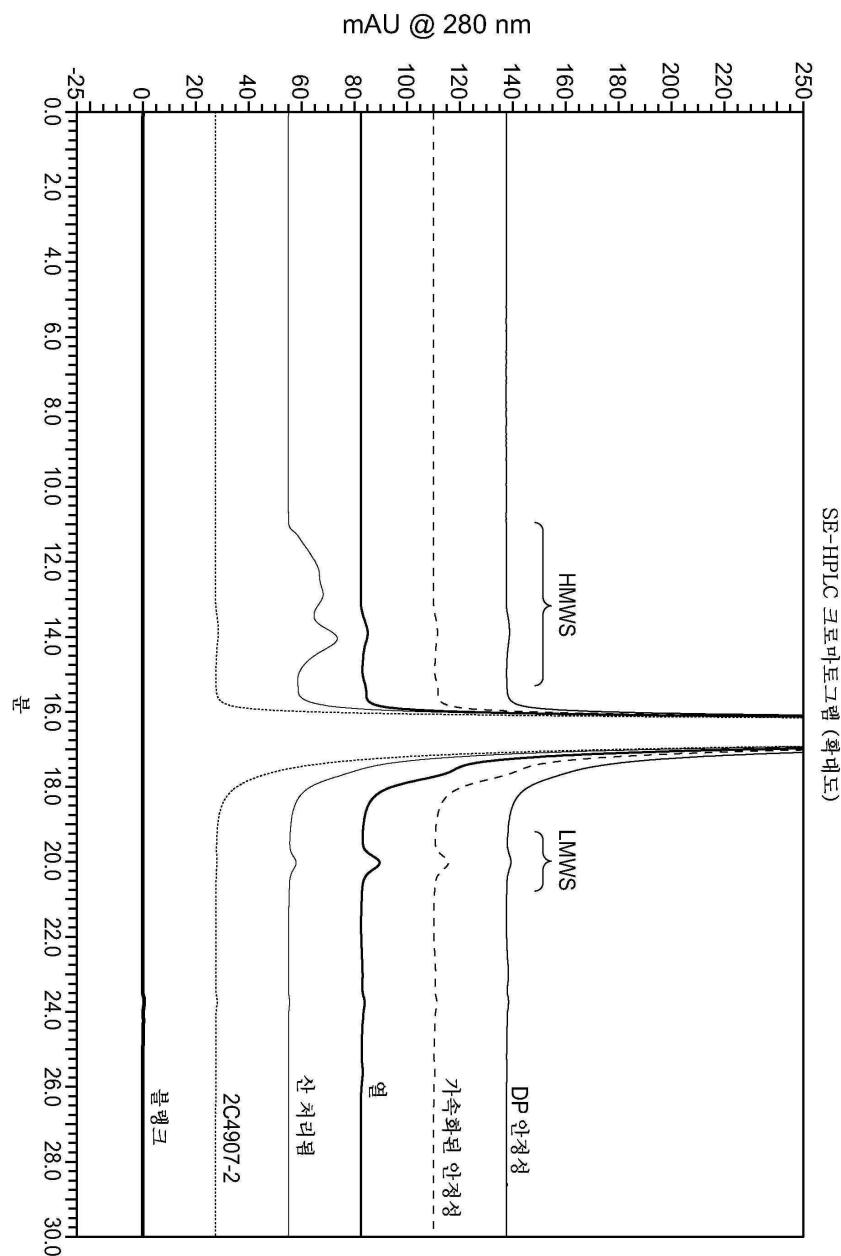
도면30



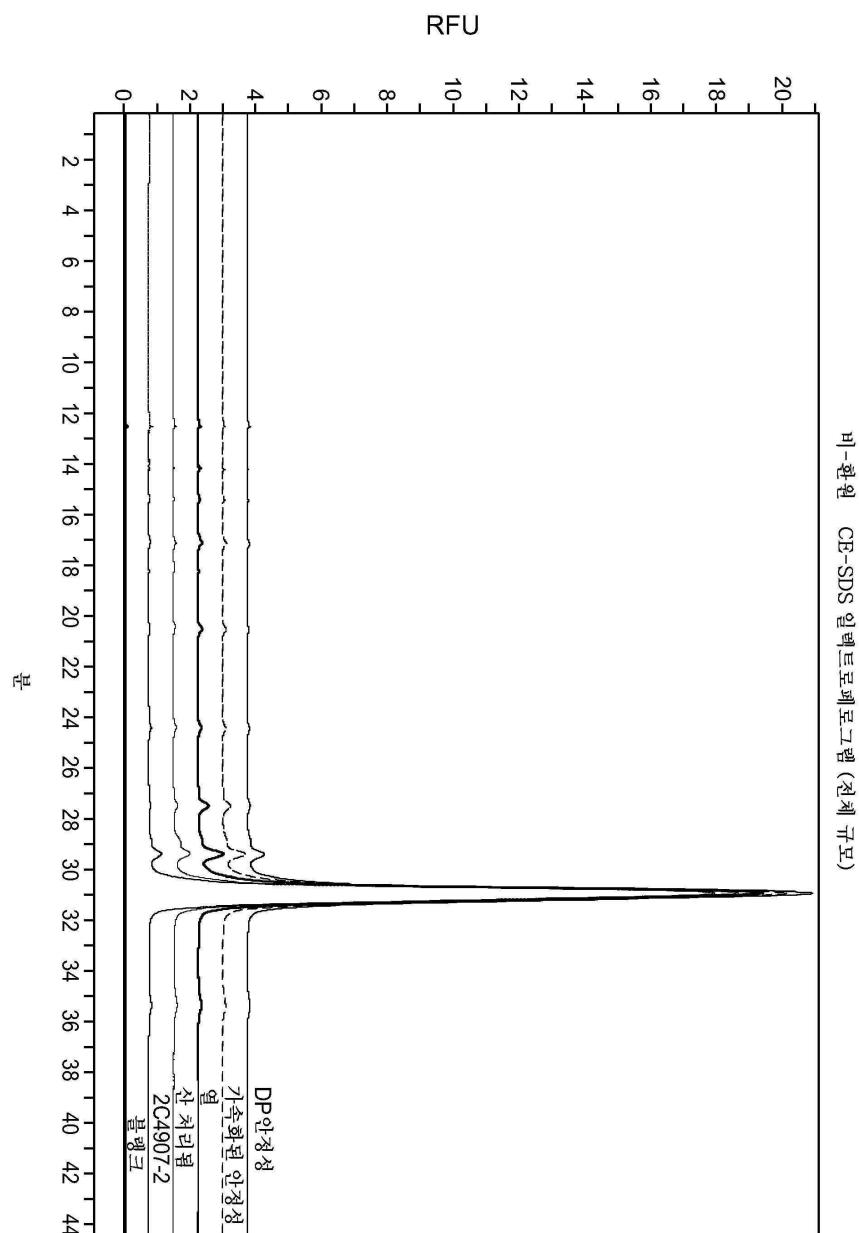
도면31a



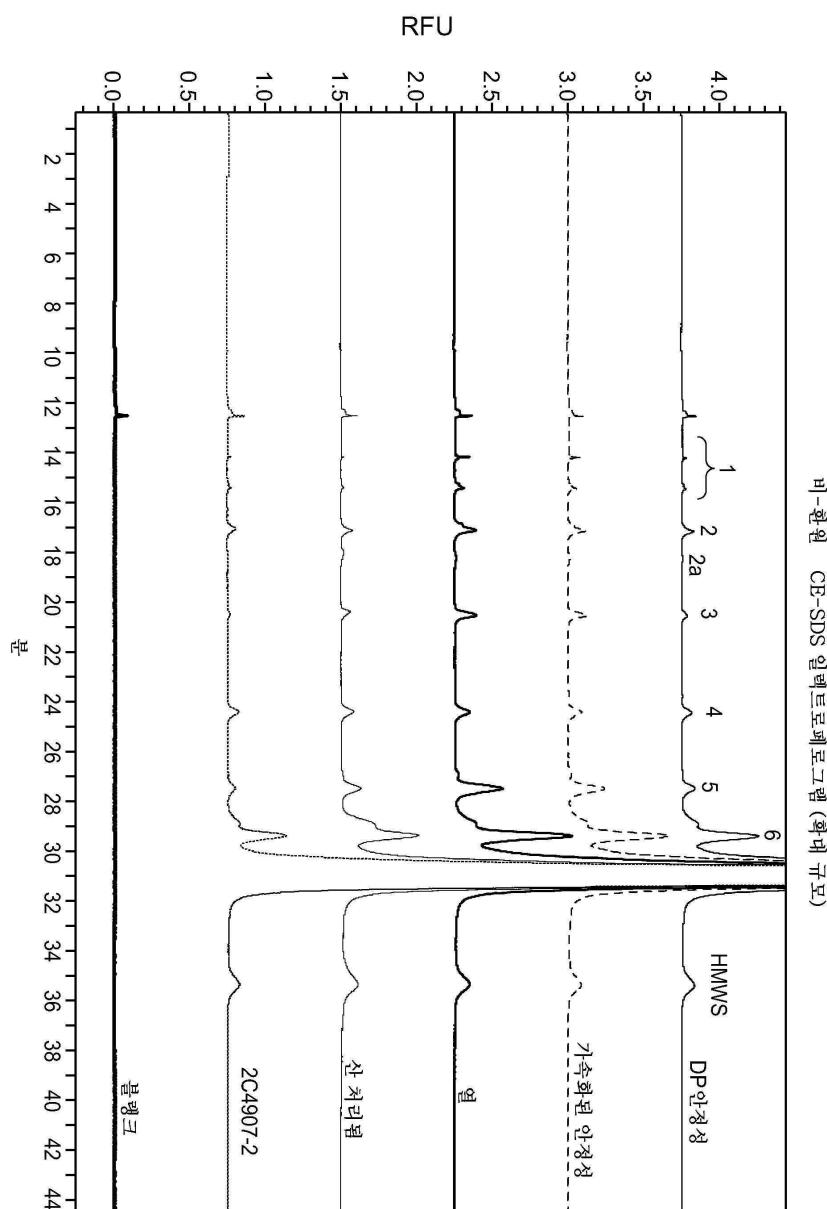
도면31b



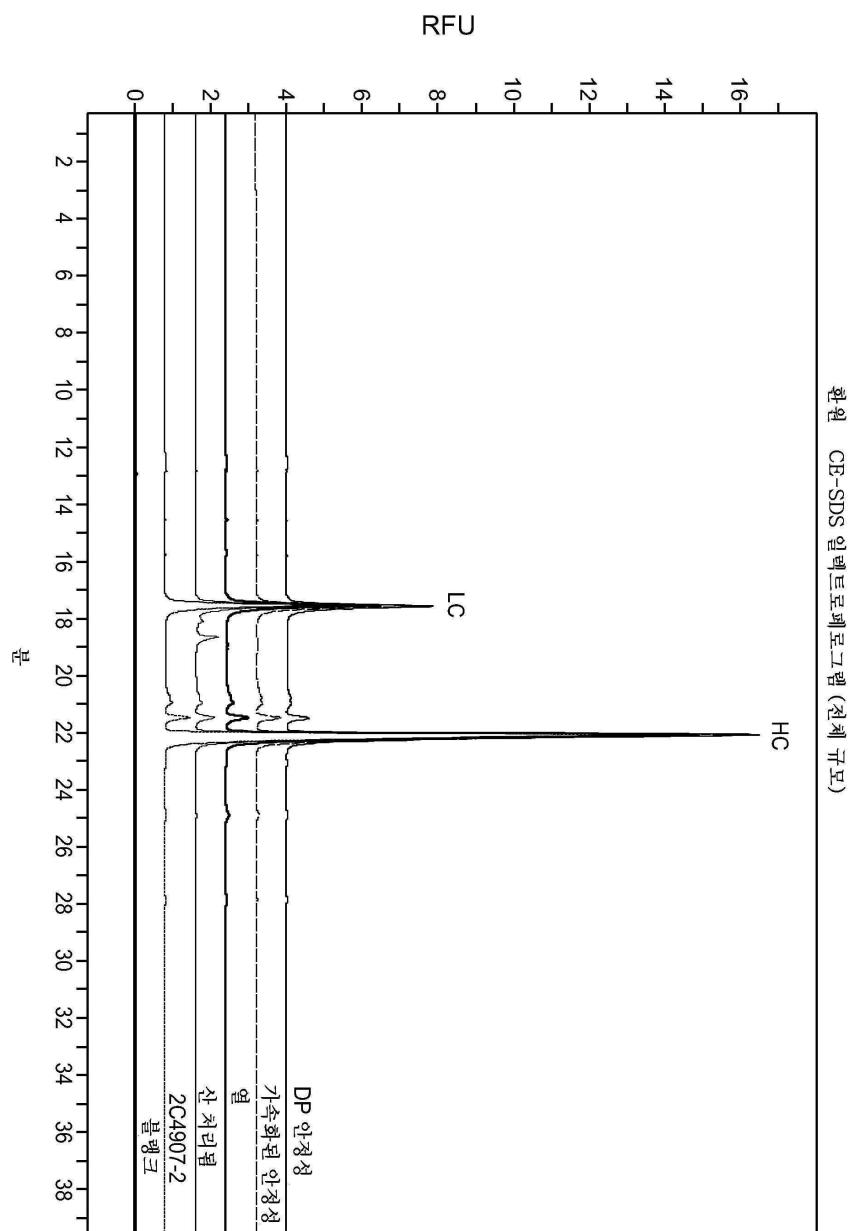
도면32a



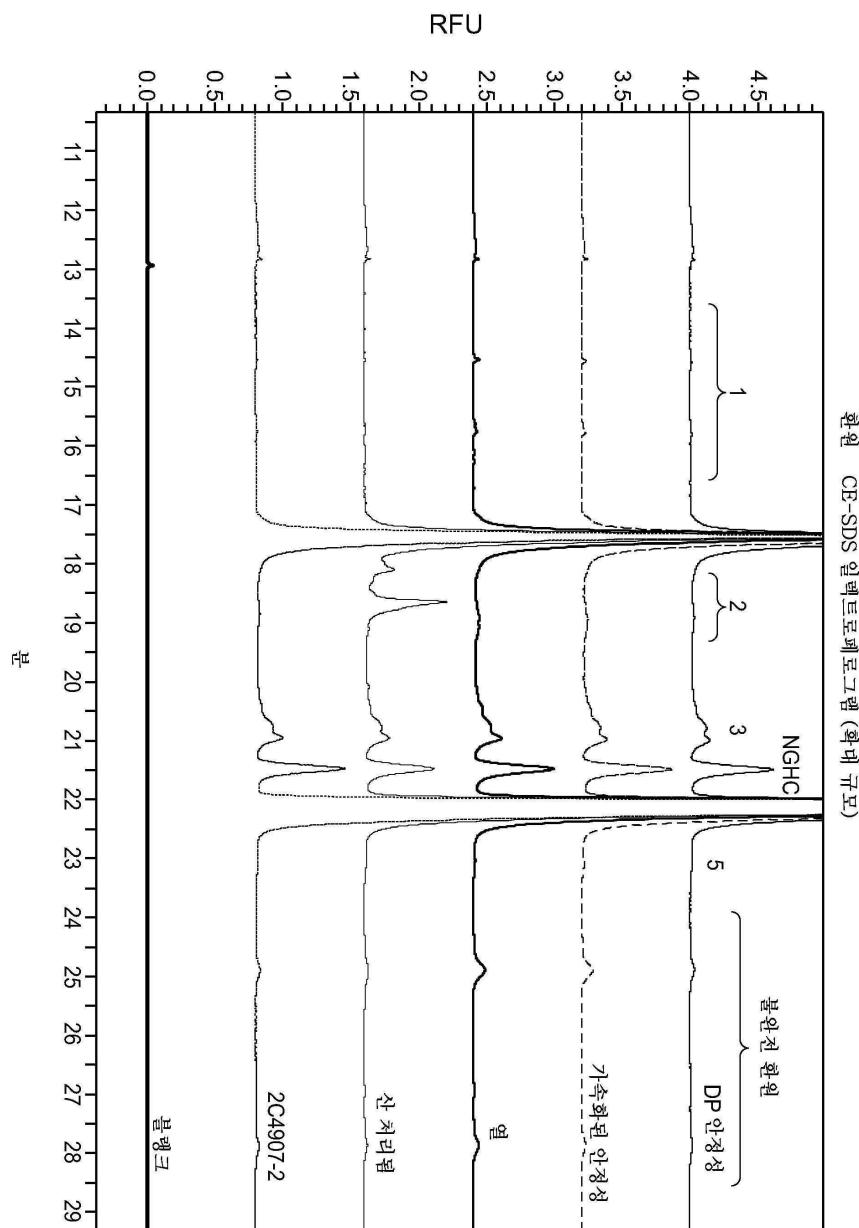
도면32b



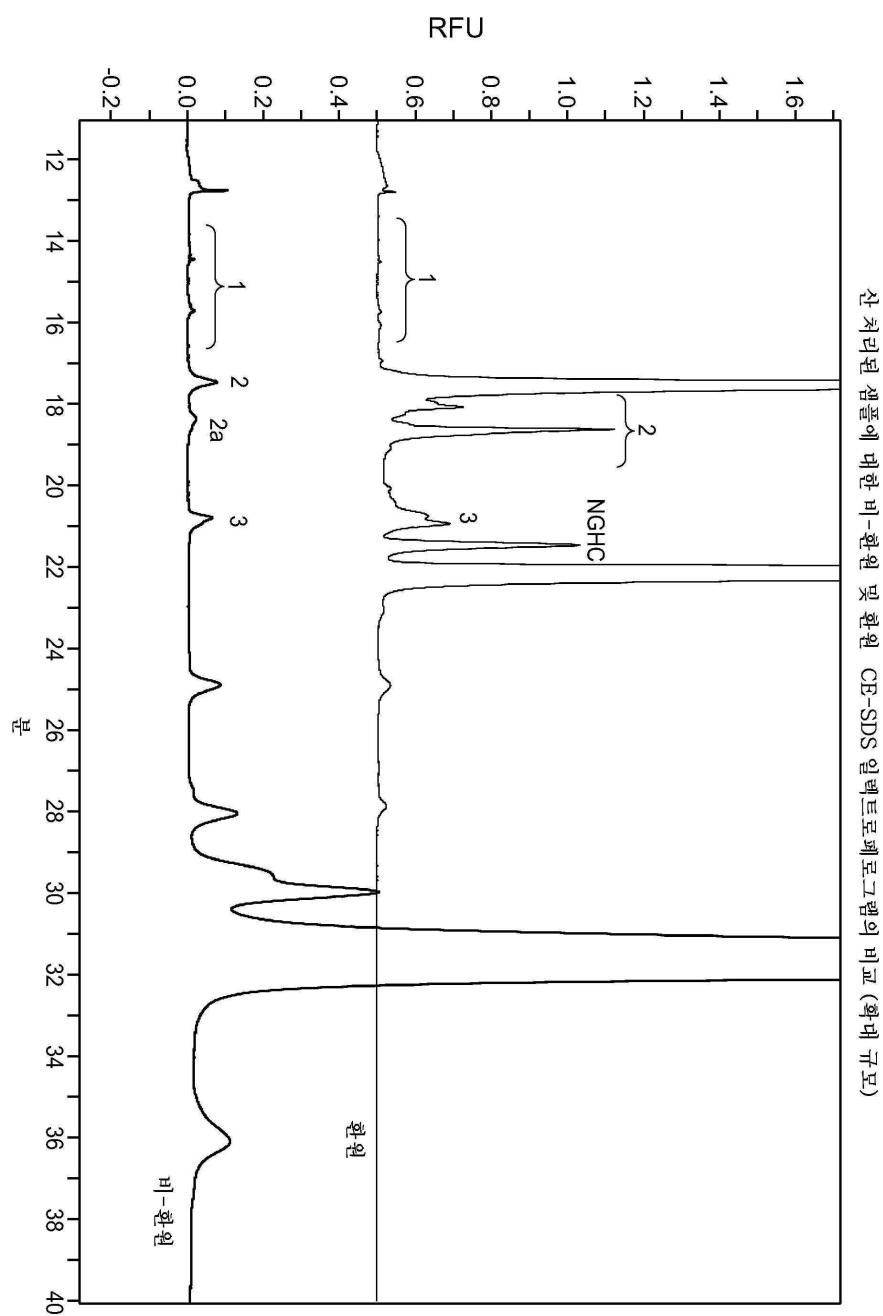
도면33a



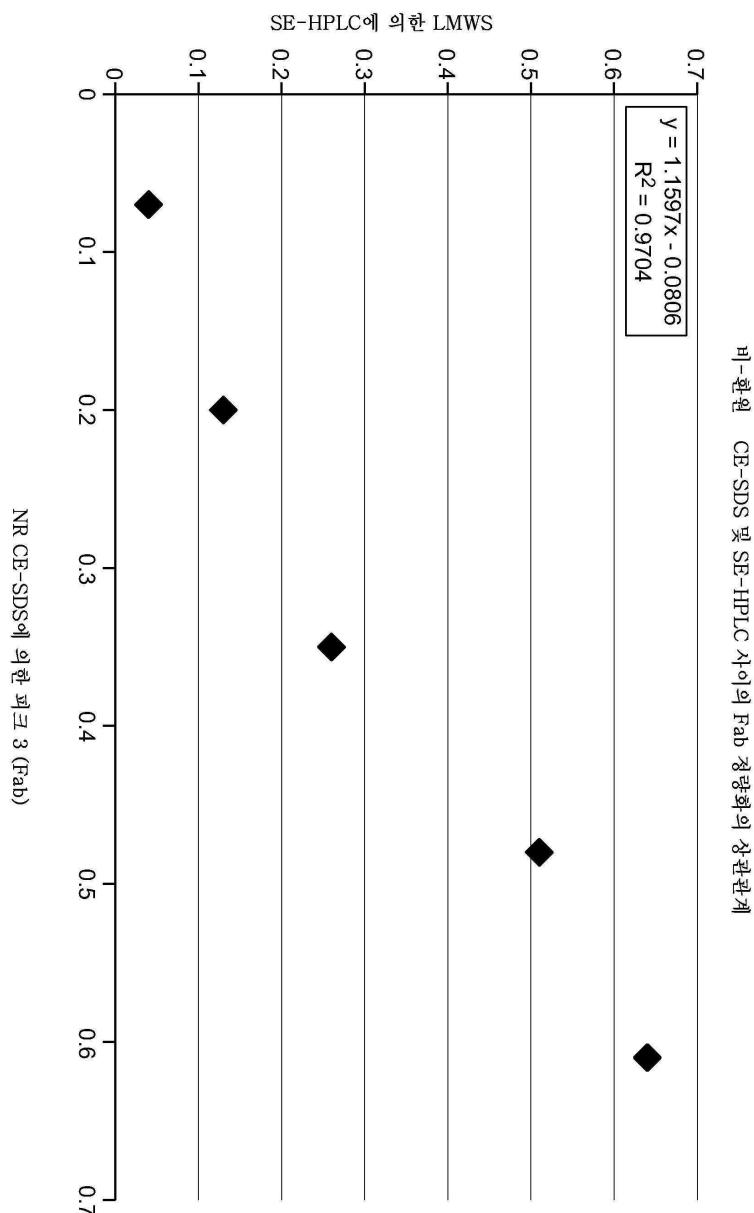
도면33b



도면34



도면35



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

GENNARO, LYNN A.

KAO, YUNG-HSIANG

ZHANG, YONGHUA

<120> PERTUZUMAB VARIANTS AND EVALUATION THEREOF

<130> P5584R1-WO

<141> 2014-04-15

<150> US 61/812,603

<151> 2013-04-16

<160> 24

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> 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> 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

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

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

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr

140

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> *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> 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
----	----	----

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> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<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> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 8

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

110	115
-----	-----

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<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> Artificial Sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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		

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 11

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

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 12

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

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

440 445

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<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> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 14

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	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
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> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 15

Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
1														
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> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<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
 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> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<220><221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa is preferably D or S

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa

5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<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> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 19

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr

5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala

5 10

<210> 21

<211> 7

<212>

PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<220><221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa is preferably R or L

<220><221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa is preferably Y or E

<220><221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa is preferably T or S

<400> 21

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 22

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp

5

10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Sequence is synthesized.

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

5