



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048740

(51)^{2022.01} A61K 39/395; C07K 16/28; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2022-07396

(22) 17/06/2021

(86) PCT/CN2021/100658 17/06/2021

(87) WO2021/254447 23/12/2021

(30) 202010566153.8 19/06/2020 CN

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/04/2023 421A

(73) SINOCELLTECH LTD (CN)

No.31 Kechuang 7th St., BDA Beijing 100176, China

(72) HU, Ping (CN); LIU, Yan (CN); SUN, Chunyun (CN); HUAI, Qingru (CN); TIAN, Shaomei (CN); TAO, Mingzhen (CN).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) CHẾ PHẨM ỔN ĐỊNH CHO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG TÁI TỔ HỢP KHÁNG-PD-1

(21) 1-2022-07396

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định cho kháng thể đơn dòng tái tổ hợp, bao gồm kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp, chất đệm, chất điều chỉnh độ thẩm thấu, chất ổn định, và chất hoạt động bề mặt. Chế phẩm này có thể tăng cường độ ổn định của kháng thể này và kéo dài thời gian hiệu lực của kháng thể này trong các chế phẩm chứa nước.

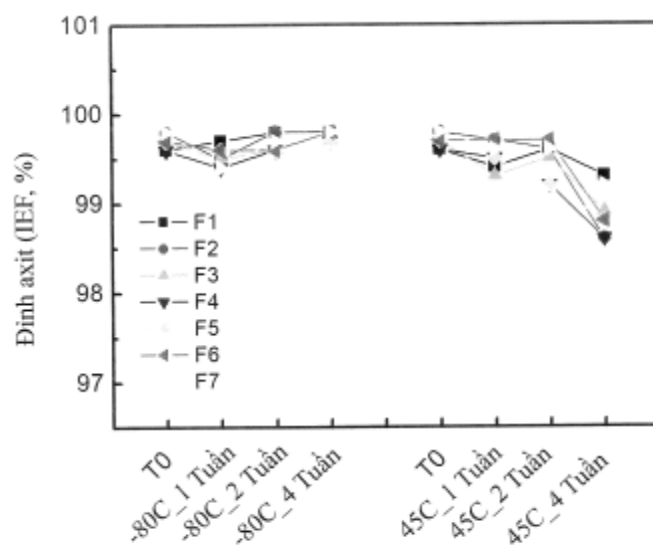


Fig. 8

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực các chế phẩm dược sinh học, và cụ thể là đề cập đến chế phẩm ổn định cho các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

PD-1, được gọi là thụ thể gây chết tế bào theo chương trình 1, là thành viên của họ CD28, còn được gọi là CD279. PD-1 hoạt động như chất điều hòa quá trình chết tế bào theo chương trình và được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt của các tế bào T CD4 + và CD8 + trưởng thành, và cũng như các tế bào T tiêu diệt tự nhiên, các tế bào B, các bạch cầu đơn nhân và một số tế bào đuôi gai. PD-1 tham gia vào quá trình điều hòa miễn dịch của các tế bào T.

PD-1 có hai phối tử: PD-L1 và PD-L2, chúng thường được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên và, khi liên kết với PD-1, chúng sẽ ức chế hoạt hóa và tăng sinh của các tế bào T. Trong các trường hợp thông thường, hệ thống miễn dịch phản ứng với các kháng nguyên lạ tích tụ trong các hạch bạch huyết hoặc lá lách, thúc đẩy sự hoạt hóa và sự tăng sinh tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên. . Ngược lại, sự gắn kết của PD-1 với PD-L1 dẫn tới các tín hiệu điều hòa âm tính và ức chế sự hoạt hóa và sự tăng sinh của tế bào T.

Một trong các cách để các tế bào khối u tránh được sự tiêu diệt của tế bào T là biểu hiện PD-L1 trên bề mặt tế bào của các tế bào khối u này. Khi PD-L1 liên kết với PD-1 trên bề mặt của các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên khối u, nó dẫn tới các tín hiệu điều hòa âm tính, làm cho các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên khối u không thể theo dõi các tế bào khối u và gửi các tín hiệu tấn công đến các tế bào khối u, dẫn đến các tế bào khối u trốn tránh được sự phát hiện và sự tiêu diệt của hệ thống miễn dịch của cơ thể.

Các kháng thể kháng PD-1 liên kết đặc biệt với PD-1, ngăn chặn sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và vô hiệu hóa sự ức chế miễn dịch tế bào T qua trung gian PD-1/PD-L1, do đó thúc đẩy quá trình hoạt hóa tế bào T và thiết lập lại khả năng giám sát và tấn công các tế bào khối u của cơ thể.

Tuy nhiên, trước khi sử dụng, các chế phẩm kháng thể phải trải qua các quá trình lưu trữ và vận chuyển trong đó xảy ra sự phân hủy vật lý và hóa học của kháng thể, và các quá trình thiếu ổn định này có thể làm giảm hiệu lực và/hoặc tăng tính sinh miễn dịch của kháng thể này, do đó, cần có chế phẩm ổn định để đảm bảo rằng kháng thể vẫn giữ được hoạt tính điều trị và an toàn cho đến khi sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật được giải quyết bởi sáng chế là đề xuất chế phẩm ổn định cho kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1. Chế phẩm này tạo cho kháng thể đơn dòng tái tổ hợp

kháng-PD-1 này có độ ổn định cao.

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến chế phẩm được làm ổn định bao gồm kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1, chất đệm, chất điều chỉnh độ thẩm thấu, chất ổn định, và chất hoạt động bề mặt.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

nồng độ của kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1 này nằm trong khoảng từ 10 mg/mL đến 50 mg/mL, ưu tiên nồng độ của kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1 nằm trong khoảng từ 10 mg/mL đến 25 mg/mL; và

nồng độ của chất đệm này nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM, ưu tiên nồng độ của chất đệm nằm trong khoảng từ 20 mM đến 40 mM;

nồng độ của chất điều chỉnh độ thẩm thấu này nằm trong khoảng từ 20 mM đến 200 mM, ưu tiên nằm trong khoảng từ 80 mM đến 160 mM;

nồng độ của chất ổn định này nằm trong khoảng từ 10 mM đến 250 mM, ưu tiên nằm trong khoảng từ 20 mM đến 205 mM;

nồng độ của chất hoạt động bề mặt này nằm trong khoảng từ 0,005 % đến 0,05 % theo khối lượng, ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,04 % theo khối lượng;

độ pH của dung dịch này nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, ưu tiên nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

chất đệm này được chọn từ một hoặc nhiều trong số đệm axit citric, đệm axetat, và đệm histidin;

chất điều chỉnh độ thẩm thấu này được chọn từ natri clorua;

chất ổn định này là một hoặc nhiều trong số sucroza, trehaloza, và arginin hydroclorua, ưu tiên 205 mM sucroza, hoặc arginin hydroclorua với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 mM đến 80 mM, hoặc 200 mM trehaloza;

chất hoạt động bề mặt này được chọn từ polysorbate 80.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

độ pH của dung dịch chế phẩm này là 6,0.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

chế phẩm này có chứa 25 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp; 20 mM đệm histidin, 120 mM natri clorua, 40 mM arginin hydroclorua, và 0,02 % theo khối lượng polysorbate 80.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi

nhẹ và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng.

trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này bao gồm đoạn chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID số: 1, đoạn chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID số: 2, và đoạn chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID số: 3; và

các vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm đoạn chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID số: 4, đoạn chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID số: 5, và đoạn chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID số: 6.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này bao gồm trình tự axit amin có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 100% với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể PD-1 có trình tự SEQ ID số: 8, và/hoặc trình tự axit amin có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 100% với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể PD-1 có trình tự SEQ ID số: 7.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

kháng thể này còn bao gồm vùng không đổi chuỗi nhẹ và vùng không đổi chuỗi nặng, ưu tiên trình tự axit amin này của vùng không đổi chuỗi nhẹ này có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 100% với vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa của SEQ ID số: 10, và/hoặc trình tự axit amin của vùng không đổi chuỗi nặng này có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98% hoặc 100% với vùng không đổi chuỗi nặng IgC4 của SEQ ID số: 9.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này là kháng thể IgC, ưu tiên kháng thể IgC4.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này là kháng thể đơn dòng.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

Ái lực liên kết, KD trung bình của kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này với protein PD-1 người tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 20 pM đến 200 pM, ưu tiên nằm trong khoảng từ 60 pM đến 70 pM, ưu tiên hơn nữa là 64,8 pM.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

chế phẩm này ở dạng dung dịch nước hoặc dạng đông khô.

Theo một phương án trong số các phương án của khía cạnh thứ nhất,

chế phẩm này có thể được lưu trữ ổn định trong ít nhất 42 tháng ở nhiệt độ từ 2°C ~ 8°C và ít nhất 12 tháng ở 25°C.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến việc sử dụng các chế phẩm theo sáng chế

để bào chế các thuốc dùng để điều trị các khối u hoặc các bệnh ung thư, ưu tiên ung thư ruột kết.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề cập đến việc sử dụng các chế phẩm theo sáng chế để điều trị các khối u hoặc các bệnh ung thư, ưu tiên ung thư ruột kết.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện xu hướng tinh khiết của mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 1 ở 4°C và 37°C ở tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 2 thể hiện xu hướng của các đỉnh axit đối với mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 1 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 3 thể hiện xu hướng tinh khiết của mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 2 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 4 thể hiện xu hướng của các đỉnh axit đối với mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 2 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 5 thể hiện xu hướng tinh khiết của mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 3 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 6 thể hiện xu hướng của các đỉnh axit đối với mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 3 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 7 thể hiện xu hướng tinh khiết của mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 4 ở 4°C và 37°C đối với tuần 0, tuần 3, và tuần 5.

Fig. 8 thể hiện xu hướng tinh khiết của mỗi mẫu thử chế phẩm trong Ví dụ 5 ở -80°C và 45°C đối với tuần 0, tuần 1, tuần 2, và tuần 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm ổn định cho kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1 giải quyết vấn đề độ ổn định kháng thể trong quá trình lưu trữ và vận chuyển. Kháng thể này được đảm bảo duy trì hoạt tính và an toàn cho các mục đích điều trị trước khi sử dụng cho các bệnh nhân.

Thuật ngữ "chế phẩm" đề cập đến chế phẩm duy trì hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính một cách hiệu quả và không chứa các thành phần khác gây độc không chấp nhận được cho đối tượng. Các chế phẩm này là vô trùng. Thuật ngữ "vô trùng" đề cập đến việc không có các vi khuẩn sống hoặc việc không có hoặc về cơ bản không có tất cả các vi sinh vật sống và các bào tử của chúng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, chế phẩm "ổn định" đề cập đến chế phẩm trong đó thành phần hoạt tính về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và/hoặc độ ổn định hóa học, và/hoặc hoạt tính sinh học sau khi lưu trữ. Ưu tiên, chế phẩm này về cơ bản vẫn giữ được tính ổn định vật lý và hóa học, cũng như hoạt tính sinh học của nó sau khi lưu trữ.

Các thuật ngữ "bệnh nhân" hoặc "đối tượng" được sử dụng thay thế lẫn nhau và đề cập đến bất kỳ động vật có vú nào gặp phải tình trạng hoặc mắc bệnh theo sáng chế. Ưu tiên là con người.

Chế phẩm ổn định theo sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng-PD-1, chất đệm, chất điều chỉnh độ thẩm thấu, chất ổn định, và chất hoạt động bề mặt.

Các thuật ngữ "bao gồm" và "có chứa" có nghĩa là có thể bao gồm các thành phần bổ sung ngoài những thành phần được đề cập đến.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một," "khác" và "này" bao gồm chỉ định số nhiều của đối tượng trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác đi.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "chất đệm" đề cập đến dung dịch đệm chống lại sự thay đổi độ pH thông qua hoạt động của các cặp axit-bazơ liên hợp của dung dịch đệm này. Theo các phương án của sáng chế, dung dịch đệm histidin được chọn, ưu tiên có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, ưu tiên khoảng 6.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "chất hoạt động bề mặt" đề cập đến chất hoạt tính bề mặt, và theo một phương án, chất hoạt động bề mặt ở đây là polysorbat 20.

Thuật ngữ "chất điều chỉnh độ thẩm thấu" dùng để chỉ chất điều chỉnh độ thẩm thấu được dùng. Các chất điều chỉnh độ thẩm thấu thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối, theo một phương án của sáng chế là natri clorua (NaCl), ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80 mM đến 160 mM.

Thuật ngữ "chất ổn định" đề cập đến chất ổn định được dùng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các axit amin và các đường, chẳng hạn như arginin hydroclorua, sucroza, và trehaloza theo các phương án của sáng chế, chất ổn định này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với các nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mM đến 80 mM arginin hydroclorua, khoảng 205 mM sucroza, và khoảng 200 mM trehaloza.

"Độ ổn định" của protein có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng sau khi lưu trữ ở các nhiệt độ đã chọn trong các khoảng thời gian đã chọn theo một số cách khác nhau, bao gồm việc đánh giá sự hình thành kết tụ (ví dụ: bằng cách sử dụng sắc ký rây phân tử, đo độ đục và/hoặc kiểm tra bằng mắt); đánh giá sự không đồng nhất của điện tích bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi cation, hội tụ đẳng điện mao quản hình ảnh (image capillary isoelectric focusing - icIEF) hoặc điện di vùng mao quản; phân tích trình tự đầu tận cùng amin hoặc đầu tận cùng cacboxy; khối phổ; phân tích SDS-PAGE để so sánh các kháng thể bị giảm và các kháng thể nguyên vẹn; phân tích ánh xạ peptit (ví dụ, trypsin hoặc LYS-C); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng liên kết kháng nguyên của các kháng thể; v.v.

Theo một phương án của sáng chế, độ tinh khiết của mẫu thử sau khi lưu trữ trong khoảng thời gian đã chọn được phát hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử:

tách và định lượng theo các kích thước phân tử khác nhau, và do đó thu được thông tin về lượng của các mẫu thử monome, các khối kết tụ và các mảnh; các chất đồng phân điện tích được phát hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi cation (cation exchange high performance liquid chromatography - CEX-HPLC): phân tách và định lượng theo các điện tích protein khác nhau, và do đó thu được thông tin về tính không đồng nhất điện tích của mẫu thử; hoặc các chất đồng phân điện tích được phát hiện bằng điện di hội tụ đẳng điện mao quản hình ảnh (imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis - IEF): phân tách và định lượng dựa trên các điểm đẳng điện khác nhau của các protein này, do đó thu được thông tin về lượng của các protein axit và bazơ trong mẫu thử; xác định "hoạt tính sinh học" của mẫu thử này bằng thử nghiệm gen chỉ thị, dựa trên nguyên tắc rằng sự liên kết của các tế bào đích biểu hiện PD-L1 với các tế bào hiệu ứng biểu hiện PD-1 và luciferaza ức chế biểu hiện luciferaza, và việc bổ sung kháng thể PD-1 ngăn chặn sự liên kết của PD-1 với PD-L1, do đó hoạt tính sinh học của kháng thể PD-1 có thể được xác định bằng cách phân tích độ mạnh của biểu hiện luciferaza.

Thuật ngữ "kháng thể" đề cập đến phân tử globulin miễn dịch và đề cập đến bất kỳ dạng nào của kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), các kháng thể đa dòng và các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và thậm chí là các mảnh kháng thể. Thông thường, ưu tiên cấu trúc kháng thể có chiều dài đầy đủ có chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), thường được kết nối với nhau bằng các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nặng. Mỗi chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng không đổi chuỗi nhẹ. Ngoài cấu trúc kháng thể có chiều dài đầy đủ điển hình này, cấu trúc này cũng bao gồm các dạng dẫn xuất khác.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" đề cập đến vùng trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có liên quan đến liên kết kháng thể với kháng nguyên. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của các kháng thể tự nhiên (tương ứng là VH và VL) thường có cấu trúc tương tự và có thể được chia nhỏ hơn nữa thành các vùng biến đổi cao (được gọi là vùng xác định bổ sung (complementary determining region - CDR)) được xen kẽ với các vùng được bảo tồn nhiều hơn (được gọi là các vùng khung (framework region - FR)).

Thuật ngữ "vùng xác định bổ sung" (CDR, ví dụ CDR1, CDR2, và CDR3) đề cập đến các gốc axit amin như vậy của vùng biến đổi của kháng thể mà sự hiện diện của các gốc axit amin này là cần thiết để liên kết với kháng nguyên. Mỗi vùng biến đổi thường có ba vùng CDR được xác định là CDR1, CDR2 và CDR3. Mỗi vùng xác định bổ sung có thể chứa các gốc axit amin từ "vùng xác định bổ sung" như được định nghĩa bởi Kabat (Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991) và/hoặc các gốc từ "vòng lặp biến đổi cao" (Chothia và Lesk; *J Mol Biol* 196: 901- 917 (1987)).

Mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thường có chứa 3 CDR và tối đa 4 FR, các CDR và các FR này được sắp xếp từ các đầu tận cùng amin đến các đầu tận cùng cacboxyl theo thứ tự sau, ví dụ, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Vùng xác định bổ sung (CDR) và vùng khung (FR) của kháng thể nhất định có thể được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Kabat (Kabat và các đồng tác giả: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, U.S. Department of Health và Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991).

Thuật ngữ "vùng không đổi" đề cập đến các trình tự axit amin như vậy trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể không trực tiếp tham gia vào liên kết kháng thể-kháng nguyên nhưng thể hiện nhiều chức năng khác nhau, chẳng hạn như độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

"Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể" bao gồm một phần của phân tử kháng thể nguyên vẹn giữ lại ít nhất một số đặc tính liên kết của kháng thể mẹ và thường bao gồm ít nhất một phần của vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi (ví dụ, một hoặc nhiều CDR) của kháng thể mẹ. Các ví dụ về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, các mảnh Fd, các mảnh Fd', các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv, di-scFv hoặc tri-scFv, các kháng thể lưỡng cực hoặc scFab), và các kháng thể miền đơn.

"Mảnh kháng thể" là phân tử kháng thể không nguyên vẹn giữ lại ít nhất một số đặc tính sinh học của kháng thể mẹ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mảnh Fc, ngoài các loại được mô tả trên đây đối với "các mảnh liên kết kháng nguyên".

Thuật ngữ kháng thể "thể khảm" đề cập đến kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ nguồn hoặc các loài cụ thể và phần còn lại có nguồn gốc từ nguồn hoặc các loài khác. "Các kháng thể được nhân hóa" là nhánh của "các kháng thể thể khảm".

Thuật ngữ "kháng thể được nhân hóa" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên được nhân hóa" được định nghĩa trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà: (i) các kháng thể có nguồn gốc từ nguồn không phải người (ví dụ, chuột chuyển gen mang hệ thống miễn dịch dị hợp) và dựa trên trình tự mầm của người; hoặc (ii) các kháng thể thể khảm trong đó vùng biến đổi có nguồn gốc không phải người và vùng không đổi có nguồn gốc từ người; hoặc (iii) các cắt ghép CDR trong đó CDR trong vùng biến đổi này có nguồn gốc không phải người và một hoặc nhiều vùng khung trong vùng biến đổi này có nguồn gốc từ người và vùng không đổi này, nếu có, có nguồn gốc từ người. Mục đích của "nhân hóa" là loại bỏ tính sinh miễn dịch của các kháng thể không có nguồn gốc từ người ở người trong khi vẫn giữ lại được ái lực lớn nhất có thể. Có lợi nếu lựa chọn trình tự vùng khung của con người gần giống nhất với trình tự vùng khung của kháng thể nguồn gốc không phải con người làm khuôn mẫu cho quá trình nhân hóa. Trong một số trường hợp, có thể cần thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự vùng khung của người bằng các gốc tương

ứng trong vùng khung nguồn gốc không phải con người để tránh mất ái lực.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" đề cập đến kháng thể có nguồn gốc từ quần thể kháng thể cơ bản đồng nhất, tức là mọi kháng thể đơn lẻ trong quần thể này đều giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể (ví dụ, các đột biến tự nhiên) có thể xuất hiện với số lượng rất nhỏ. Do đó, thuật ngữ "đơn dòng" chỉ bản chất của các kháng thể này, tức là, không phải là hỗn hợp của các kháng thể không liên quan. Ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể khác nhau chống lại các yếu tố quyết định kháng nguyên (các epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng hướng đến yếu tố quyết định kháng nguyên riêng biệt. Ngoài tính đặc hiệu, các chế phẩm kháng thể đơn dòng có ưu điểm là chúng thường không bị nhiễm các kháng thể khác. Thuật ngữ "đơn dòng" sẽ không được hiểu là yêu cầu bất kỳ phương pháp sản xuất kháng thể cụ thể nào. Thuật ngữ kháng thể đơn dòng đặc biệt bao gồm các kháng thể thể khảm, các kháng thể được nhân hóa và các kháng thể con người.

Kháng thể "liên kết đặc biệt" với kháng nguyên đích, chẳng hạn như đích kháng nguyên peptit liên quan đến khối u (ở đây là PD-1), tức là liên kết kháng nguyên này với ái lực thích hợp để cho phép kháng thể này được sử dụng làm tác nhân điều trị, nhắm đích tế bào hoặc mô biểu hiện kháng nguyên này và không phản ứng chéo đáng kể với các protein khác hoặc với các protein không phải là các đồng đẳng và các biến thể (ví dụ: các dạng đột biến, các biến thể cắt nối hoặc các dạng protein thủy phân được cắt ngắn) của các kháng nguyên đích nêu trên.

Thuật ngữ "ái lực liên kết" đề cập đến độ mạnh của tổng các tương tác không cộng hóa trị giữa các vị trí liên kết riêng lẻ của phân tử và các đối tác liên kết của nó. Trừ khi có nêu rõ khác đi, "ái lực liên kết" khi được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến ái lực liên kết nội tại, phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). "KD", "hằng số tốc độ liên kết kon" và "hằng số tốc độ phân ly koff" thường được sử dụng để mô tả ái lực giữa phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của phân tử này (ví dụ, kháng nguyên), tức là mức độ chặt chẽ phối tử liên kết với protein cụ thể. Ái lực liên kết này bị ảnh hưởng bởi các tương tác nội phân tử không cộng hóa trị chẳng hạn như liên kết hydro, các tương tác tĩnh điện, và các lực kỵ nước và các lực van der Waals giữa hai phân tử. Ngoài ra, ái lực liên kết giữa phối tử và phân tử đích của phối tử này có thể bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của các phân tử khác. Ái lực có thể được phân tích bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm cả ELISA được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể "phân lập" là kháng thể đã được xác định và được phân lập từ tế bào biểu hiện kháng thể một cách tự nhiên. Các kháng thể phân lập bao gồm các kháng thể tại chỗ trong các tế bào tái tổ hợp và các kháng thể thường được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

"Tương đồng trình tự" giữa hai trình tự peptit hoặc axit nucleic chỉ báo số lượng các gốc giống nhau giữa các trình tự này dưới dạng phần trăm tổng số các gốc này. Khi tính

toán phần trăm tương đồng, các trình tự được so sánh này sẽ được so khớp theo cách tạo ra sự trùng khớp tối đa giữa các trình tự này và các vị trí trống trong sự so khớp này (nếu có) sẽ được giải quyết bằng thuật toán cụ thể. Các phương pháp chương trình máy tính được ưu tiên dùng để xác định sự tương đồng giữa hai trình tự bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các gói chương trình GCG bao gồm GAP, BLASTP, BLASTN và FASTA (Altschul và các cộng sự, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). Các phương pháp nêu trên được cung cấp công khai bởi Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI) và các nguồn khác. Thuật toán Smith Waterman nổi tiếng cũng có thể được sử dụng để xác định sự tương đồng.

Một phương án của sáng chế sử dụng kháng thể đơn dòng kháng PD-1 tái tổ hợp được nêu trong Đơn đăng ký sáng chế quốc tế số PCT/CN2019/126594 được nộp vào ngày 19 tháng 12 năm 2019 và theo phương án được ưu tiên đặc biệt, là kháng thể PD1-H944.

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt của sáng chế, chế phẩm chế phẩm này có chứa 25 mg/mL kháng thể PD1-H944; 20 mM đệm histidin, 120 mM natri clorua, 40 mM arginin hydroclorua, và 0,02% theo khối lượng polysorbat 80. Chế phẩm này có độ ổn định tốt và ổn định trong ít nhất 42 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 °C đến 8 °C và ít nhất 12 tháng ở 25 °C .

Chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng lỏng hoặc có thể được tạo ra ở dạng đông khô. Điều này có thể được thực hiện bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô trước khi sử dụng.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể điều trị các khối u hoặc bệnh ung thư, ưu tiên điều trị ung thư ruột kết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các phương án sau đây. Tuy nhiên, các phương án này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu, các bằng sáng chế và đơn sáng chế đều được tích hợp vào bản mô tả này để tham khảo.

Theo các phương án sau đây, kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp được sử dụng là PD1-H944, việc điều chế, xác định tính chất, và xác định hiệu suất của kháng thể này được mô tả trong Đơn đăng ký sáng chế quốc tế số PCT/CN2019/126594, nộp ngày 19/12/ 2019.

Theo các phương án sau đây, phương pháp phát hiện được sử dụng sẽ được mô tả dưới đây.

1) Sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử (Molecular Exclusion High-Performance Liquid Chromatography - SEC-HPLC)

Sử dụng cột: Cột lọc gen TSKgel G3000SWX (7,8×300mm, 5µm) (số danh mục 0008541), pha động là pha động SEC (200mM dinatri hydro phosphat, 100mM arginin, độ pH 6,50, 1% isopropanol), bước sóng phát hiện UV là 280nm, nhiệt độ cột là 25°C, bơm

80µg mẫu thử nghiệm này vào sắc ký lỏng này, và tính toán độ tinh khiết mẫu thử này theo phương pháp chuẩn hóa điện tích (Quy tắc chung 0514 của Dược điển Trung Quốc (Chinese Pharmacopoeia) (Ấn bản 2015 Tập III)).

2) Sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi cation (Cation exchange high-performance liquid chromatography) (CEX-HPLC)

Sử dụng cột trao đổi cation yếu WCX-10 (4*250 mm) (Sản phẩm số 054993) với pha A (10 mM PB, độ pH=7,0) và pha B (10 mM PB, 200 mM NaCl, độ pH=7,0) làm các pha động, bước sóng phát hiện UV là 280 nm, và nhiệt độ cột là 35 °C. Quá trình rửa giải gradient của SCT-I10A được thực hiện theo bảng sau.

	Thời gian (phút)	B (%)	C(%)	Áp suất bảo vệ (bar)
1	0,00	100	0	200
2	40,00	50	50	200
3	45,00	0	100	200
4	45,01	100	0	200
5	70,00	100	0	200

Bơm 80 µg mẫu thử nghiệm này vào sắc ký lỏng này và tính toán độ tinh khiết của mẫu thử này theo phương pháp chuẩn hóa điện tích (tham khảo Quy tắc chung 0512 và Quy tắc chung 0513 của Dược điển Trung Quốc (Ấn bản 2015 tập III)).

3) Điện di tập trung đẳng điện mao mạch hình ảnh (Imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis - IEF)

Thử nghiệm iCE3 được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị điện di tập trung đẳng điện mao quản hình ảnh. Các thông số liên quan đối với iCIEF là: điều chế dung dịch thử dùng để phân tích bằng cách trộn mẫu thử nghiệm này với Pharmalyte 3-10 cho IEF, 1% methylxeluloza (1% MC), chất đánh dấu pI với pI là 5,12 và 9,33, và nước. Nồng độ cuối cùng của protein là 0,25 mg/mL, nồng độ cuối cùng của chất điện ly lưỡng tính là 4% và nồng độ cuối cùng của MC là 0,35% trong dung dịch cuối cùng. Phân tích ICE3 được thực hiện trong các điều kiện hội tụ sau: 1500 V trong 1 phút; 3000 V trong 6 phút. Sau khi tác dụng điện áp vào ống mao dẫn, mẫu thử này sẽ được hội tụ tại điểm pI của mẫu thử này. Bước sóng phát hiện là 280 nm, và đỉnh hấp thụ UV được chụp ảnh, sau đó có thể thu được phổ hội tụ, có thể thu được thông tin về lượng protein axit và bazơ của mẫu thử bằng cách tính toán (Dược điển Trung Quốc, ấn bản 2015, tập IV, Quy tắc chung 0542 Phương pháp điện di mao quản).

4) Phương pháp gen chỉ thị để xác định "hoạt tính sinh học" của mẫu thử này

Cấy tế bào CHO-K1-PD-L1-CD3E vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 20K/giếng và ủ qua

đêm ở 37 °C, 5% CO₂ và sau đó loại bỏ phần dịch nổi phía trên. Thêm các tế bào này vào các dung dịch pha loãng theo dãy của các mẫu thử đối chứng làm việc và các mẫu thử nghiệm ở nồng độ 40µL/giếng để tạo ra nồng độ cuối cùng là 40,000, 13,333, 4,444, 1,481, 0,494, 0,165, 0,055, 0,018 và 0,006 µg/mL, thêm các tế bào Jurkat-NFAT-Luc2p-PD-1 ở nồng độ 75K/giếng (40 µL/giếng) và ủ trong 6 giờ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂, và dung giải các tế bào và cho dịch dung giải tế bào 20 µL/giếng vào đĩa đáy trắng 96 giếng, đặt trên máy dò phát quang vi tấm, và thêm Hệ thống Thử nghiệm Luciferaza 60 µL/giếng vào để phát hiện sự phát quang sinh học. Tính toán hoạt tính tương đối của các mẫu thử này bằng cách vẽ đồ thị với hàm logarit của nồng độ mẫu thử là tọa độ ngang và giá trị phát quang sinh học (RLU) là tọa độ dọc và khớp với phương trình bốn tham số để thu được các giá trị EC₅₀ của các mẫu thử này và các mẫu thử đối chứng làm việc. Hoạt tính tương đối (%) = EC₅₀ mẫu thử đối chứng làm việc/ EC₅₀ mẫu thử × 100% (Lan Wang, Chuanfei Yu, Yalan Yang, và các cộng sự, Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies. Journal of Pharmaceutical và Biomedical Analysis, 2017, 145:447-453; Dược Điển Trung Quốc, Ấn bản 2015, tập IV, Quy tắc Chung 3523 Định lượng hoạt tính sinh học Interferon Phương pháp II phương pháp chỉ thị gen). .

Ví dụ 1: Sàng lọc độ pH của dung dịch chế phẩm

Chế phẩm của PD1-H944 theo phương án này được thể hiện trong bảng sau.

Bảng 1: Các chế phẩm với độ pH khác nhau

Số sê-ri chế phẩm	Kháng thể đơn dòng PD-1	Đệm histidin	Arginin hydroclorua	Natri clorua	Polysorbate 80	Độ pH
F1	25mg/mL	40mM	40mM	120mM	0,02% theo khối lượng	5,5
F2	25mg/mL	40mM	40mM	120mM	0,02% theo khối lượng	5,8
F3	25mg/mL	40mM	40mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,0
F4	25mg/mL	40mM	40mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,2
F5	25mg/mL	40mM	40mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,5

Phương pháp điều chế chế phẩm kháng thể: Đưa kháng thể này vào đệm đích (tất cả các thành phần ngoại trừ polysorbate 80 và kháng thể) bằng cách siêu lọc, bổ sung lượng polysorbate 80 cần thiết, và điều chỉnh nồng độ kháng thể thành 25 mg/mL, phân phối vô

trùng và lần lượt đặt trong tủ lạnh 4 °C và máy điều nhiệt 37 °C, và lấy ra vào tuần 0, tuần 3 và tuần 5 để phân tích và phát hiện, và các thử nghiệm bao gồm SEC-HPLC và IEF.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Xác định độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử (SEC-HPLC); nguyên tắc xác định của phương pháp này là tách và định lượng các phân tử theo các kích thước khác nhau của chúng, sau đó thu được thông tin về hàm lượng của các monome, các kết tụ và các mảnh của mẫu thử.

Các chất đồng phân điện tích: điện di tập trung đẳng điện mao quản hình ảnh (IEF); nguyên tắc phát hiện của phương pháp này là tách và định lượng các protein theo các điểm đẳng điện khác nhau của các protein, sau đó thu được thông tin về hàm lượng của các protein axit và bazơ có trong mẫu thử; đối với các sản phẩm kháng thể, ít đỉnh axit hơn là thích hợp.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng độ tinh khiết của PD1-H944 trong F3 cao hơn độ tinh khiết trong các chế phẩm khác và đỉnh axit thấp hơn các chế phẩm khác, chứng tỏ rằng độ ổn định của F3 tốt hơn các chế phẩm khác.

Ví dụ 2: Sàng lọc các nồng độ kháng thể

Chế phẩm của PD1-H944 đối phương án này được thể hiện trong bảng sau.

Bảng 2: Các chế phẩm với các nồng độ kháng thể khác nhau

Số sê-ri chế phẩm	Kháng thể đơn dòng PD-1	Đệm histidin	Natri clorua	Polysorbat 80	Độ pH
F1	25mg/mL	20mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,0
F2	10mg/mL	20mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,0

Phương pháp điều chế chế phẩm kháng thể: đưa kháng thể này vào đệm đích (tất cả các thành phần ngoại trừ polysorbate 80 và kháng thể) bằng siêu lọc, bổ sung lượng polysorbate 80 cần thiết, và sau đó điều chỉnh nồng độ kháng thể lần lượt này đến 10 mg/mL và 25 mg/mL, phân phối vô trùng và đặt trong tủ lạnh 4 °C và máy điều nhiệt 37 °C, và lấy ra lần lượt vào tuần 0, tuần 3 và tuần 5 để phân tích. Các thử nghiệm bao gồm SEC-HPLC và IEF.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Thử nghiệm độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử.

Các chất đồng phân điện tích: điện di hội tụ đẳng điện mao quản hình ảnh.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 3 và Fig. 4.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy độ tinh khiết của PD1-H944 trong F1 và F2 cao hơn 99% khi đặt ở 37 °C trong các tuần 0, 3 và 5 và xu hướng thay đổi của đỉnh axit về cơ bản là giống nhau, chứng tỏ độ ổn định của PD1-H944 trong F1 và F2 là có thể so sánh được.

Ví dụ 3: Sàng lọc nồng độ của các chất hoạt động bề mặt

Chế phẩm của PD1-H944 theo phương án này được trình bày dưới đây.

Bảng 3: Các chế phẩm với các nồng độ chất hoạt động bề mặt khác nhau

Số sê-ri chế phẩm	Kháng thể đơn dòng PD-1	Đệm histidin	Natri clorua	Polysorbate 80	Độ pH
F1	25mg/mL	20mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,0
F2	25mg/mL	20mM	120mM	0,04% theo khối lượng	6,0

Phương pháp điều chế chế phẩm kháng thể: đưa kháng thể này vào đệm đích này (tất cả các thành phần ngoại trừ polysorbate 80 và kháng thể) bằng siêu lọc, bổ sung lượng polysorbate 80 cần thiết, và điều chỉnh nồng độ kháng thể này đến 25 mg/mL, phân phối vô trùng và đặt lần lượt trong tủ lạnh 4 °C và máy điều nhiệt 37 °C và lấy ra ở tuần 0, tuần 3, và tuần 5 để phân tích và dò tìm, và các thử nghiệm bao gồm SEC -HPLC và IEF.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Thử nghiệm độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử.

Các chất đồng phân điện tích: điện di tập trung đẳng điện mao quản hình ảnh.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 5 và Fig. 6.

Các kết quả phát hiện đã chứng tỏ rằng độ tinh khiết của PD1-H944 trong F1 cao hơn độ tinh khiết của PD1-H944 trong F2, và xu hướng thay đổi đỉnh axit về cơ bản là giống nhau, chứng tỏ rằng độ ổn định của F1 tốt hơn độ ổn định của F2.

Ví dụ 4: Sàng lọc các nồng độ của các chất điều chỉnh độ thẩm thấu

Chế phẩm của PD1-H944 theo phương án này được thể hiện dưới đây.

Bảng 4: Các chế phẩm với các nồng độ chất điều chỉnh nồng độ thẩm thấu khác nhau

Số sê-ri chế phẩm	Kháng thể đơn dòng PD-1	Đệm histidin	Natri clorua	Polysorbate 80	Độ pH
F1	25mg/mL	20mM	120mM	0,02% theo khối lượng	6,0
F2	25mg/mL	20mM	160mM	0,02% theo khối lượng	6,0
F3	25mg/mL	20mM	80mM	0,02% theo khối lượng	6,0

Phương pháp điều chế chế phẩm kháng thể: đưa kháng thể này vào đệm đích này (tất cả các thành phần ngoại trừ polysorbate 80 và kháng thể) bằng siêu lọc, bổ sung lượng polysorbate 80 cần thiết, và điều chỉnh nồng độ kháng thể này đến 25 mg/mL, phân phối vô trùng và đặt lần lượt trong tủ lạnh 4°C và máy điều nhiệt 37°C, và lấy ra để phân tích và dò tìm ở tuần 0, tuần 3 và tuần 5 một cách tương ứng.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Kiểm tra độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 7.

Các kết quả thử nghiệm đã chứng tỏ rằng độ tinh khiết của PD1-H944 trong F1 cao hơn độ tinh khiết của PD1-H944 trong F2 và F3, chứng tỏ rằng độ ổn định của F1 tốt hơn độ tinh khiết của PD1-H944 trong F2 và F3.

Ví dụ 5: Sàng lọc chất ổn định và nồng độ chất ổn định

Chế phẩm của PD1-H944 theo phương án này được thể hiện dưới đây.

Bảng 5: Các chế phẩm với các chất ổn định khác nhau và các nồng độ chất ổn định khác nhau*

Số sê-ri chế phẩm	Kháng thể đơn dòng PD-1	Đệm histidin	Natri clorua	Sucroza	Arginin hydroclorua	Trehaloza	Polysorbate 80
F1	25mg/mL	20mM	120mM		40mM		0,02% theo khối lượng
F2	25mg/mL	20mM	120mM		80 mM		0,02% theo khối lượng
F3	25mg/mL	20mM	120mM		20 mM		0,02% theo khối lượng
F4	25mg/mL	20mM		205mM			0,02% theo khối lượng
F5	25mg/mL	20mM				200mM	0,02% theo khối lượng
F6	25mg/mL	20mM		205mM	40mM		0,02% theo khối lượng
F7	25mg/mL	20mM			40mM	200mM	0,02% theo khối lượng

* độ pH 6,0 trong mỗi chế phẩm

Phương pháp điều chế chế phẩm kháng thể: đưa kháng thể này vào đệm đích này (tất cả các thành phần ngoại trừ polysorbate 80 và kháng thể) bằng siêu lọc, bổ sung lượng

polysorbate 80 cần thiết, và điều chỉnh nồng độ kháng thể này đến 25 mg/mL, phân phối vô trùng và đặt trong tủ lạnh -80°C và máy điều nhiệt 45°C, và lấy ra để phân tích và dò tìm tương ứng ở tuần 0, tuần 1, tuần 2 và tuần 4.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Kiểm tra độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 8.

Các kết quả thử nghiệm đã chứng tỏ rằng độ tinh khiết của PD1-H944 trong F1 cao hơn độ tinh khiết của PD1-H944 trong các chế phẩm khác ở 45°C trong 4 tuần, chứng tỏ rằng độ ổn định của F1 tốt hơn các chế phẩm khác.

Ví dụ 6: Thử nghiệm thẩm định chế phẩm

Ba lô chế phẩm kháng thể đơn dòng tái tổ hợp PD-1 (chế phẩm 25 mg/mL PD1-H944 + 20 mM đệm histidine + 120 mM natri clorua + 40 mM arginin hydroclorua + 0,02% theo khối lượng polysorbate 80, độ pH 6,0) được thử nghiệm về tính ổn định ở nhiệt độ trong khoảng từ 2 °C ~ 8 °C và 25 ± 2 °C với SEC-HPLC, CEX-HPLC và hoạt tính sinh học.

Các phương pháp phân tích và phát hiện:

Thử nghiệm độ tinh khiết: sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ phân tử.

Các chất đồng phân điện tích: Sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi cation (CEX-HPLC); Nguyên tắc phát hiện của phương pháp này là tách và định lượng các protein theo các điện tích khác nhau của chúng, và do đó thu được thông tin về tính không đồng nhất về điện tích của mẫu thử này.

Hoạt tính sinh học: phương pháp gen chỉ thị; nguyên tắc của thử nghiệm này là sự liên kết của các tế bào đích biểu hiện PD-L1 với các tế bào hiệu ứng biểu hiện PD-1 và luciferaza ức chế biểu hiện của luciferaza, và việc bổ sung kháng thể PD-1 ngăn chặn sự liên kết của PD-1 với PD-L1, do đó, hoạt tính sinh học của kháng thể PD-1 có thể được xác định bằng cách phân tích độ mạnh của biểu hiện luciferaza (xem PCT/CN2019/126594).

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong các Bảng 6 đến 11.

Bảng 6: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lot1) được lưu trữ ở 4°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 4°C (tháng)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36	42
Độ tinh khiết (SEC-HPLC, %)	Các monome	99,5	99,4	99,4	99,0	99,1	99,3	99,2	99,2	99,1	99,4
	Các kết tụ	0,5	0,6	0,6	1,0	0,9	0,7	0,7	0,8	0,9	0,6
	Các mảnh	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Các chất đồng phân	Các đỉnh axit	12,3	12,0	13,2	13,8	14,5	15,6	15,7	16,9	18,2	18,9

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 4°C (tháng)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36	42
điện tích (CEX-HPLC, %)	Các biến thể lysin	87,7	88,1	86,8	86,1	85,5	84,4	84,2	83,2	81,8	81,0
Hoạt tính sinh học (%)		100	93	92	87	97	86	94	88	87	83

Bảng 7: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lô 1) được lưu trữ ở 25°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 25°C (tháng)						
		0	2	4	6	8	10	12
Độ tinh khiết (SEC-HPLC, %)	Các monome	99,5	99,3	99,2	99,1	99,0	98,1	96,8
	Các kết tụ	0,5	0,7	0,7	0,8	0,9	1,8	3,0
	Các mảnh	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Các chất đồng phân điện tích (CEX-HPLC, %)	Các đỉnh axit	12,3	17,2	20,3	25,3	29,7	33,7	39,4
	Các biến thể lysin	87,7	82,8	79,7	74,8	70,3	66,3	60,6
Hoạt tính sinh học(%)		100	92	93	90	88	81	90

Bảng 8: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lô 2) được lưu trữ ở 4°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 4°C (tháng)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36	42
Độ tinh khiết (SEC-HPLC, %)	Các monome	99,6	99,5	99,4	99,1	98,9	99,3	99,2	99,2	99,2	99,4
	Các kết tụ	0,4	0,5	0,6	0,9	1,1	0,7	0,8	0,8	0,8	0,6
	Các mảnh	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Các chất đồng phân điện tích (CEX-HPLC, %)	Các đỉnh axit	13,6	13,4	14,4	15,3	14,7	16,7	16,8	18,0	18,5	19,6
	Các biến thể lysin	86,5	86,6	85,6	84,7	85,3	83,2	83,1	82,0	81,6	80,4
Hoạt tính sinh học (%)		92	99	93	97	95	104	75	84	78	86

Bảng 9: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lô 2) được lưu trữ ở 25°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 25°C (tháng)						
		0	2	4	6	8	10	12
Độ tinh khiết (SEC-HPLC,%)	Các monome	99,6	99,4	99,1	98,9	99,0	98,5	98,3
	Các kết tụ	0,4	0,6	0,8	1,0	1,0	1,4	1,6
	Các mảnh	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Các chất đồng phân điện tích (CEX-HPLC,%)	Các đỉnh axit	13,6	18,0	22,0	27,1	31,5	32,8	38,4
	Các biến thể lysine	86,5	82,0	78,0	72,9	68,6	67,2	61,6
Hoạt tính sinh học(%)		92	87	92	97	87	74	90

Bảng 10: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lô 3) được lưu trữ ở 4°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 4°C (tháng)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36	42
Độ tinh khiết (SEC- HPLC,%)	Các monome	99,6	99,5	99,5	99,2	98,9	99,3	99,4	99,3	99,2	99,5
	Các kết tụ	0,4	0,5	0,5	0,8	1,1	0,7	0,6	0,7	0,8	0,5
	Các mảnh	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Các chất đồng phân điện tích (CEX- HPLC,%)	Các đỉnh axit	13,6	13,6	14,9	15,6	15,7	16,6	17,2	17,7	19,5	19,5
	Các biến thể lysine	86,4	86,4	85,1	84,5	84,3	83,4	82,8	82,3	80,5	80,4
Hoạt tính sinh học(%)		100	100	100	104	86	100	82	90	96	90

Bảng 11: Dữ liệu độ ổn định của chế phẩm PD1-H944 (Lô 3) được lưu trữ ở 25°C

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 25°C(tháng)						
		0	2	4	6	8	10	12
Độ tinh khiết(SEC- HPLC,%)	Các monome	99,6	99,4	99,2	99,1	99,0	98,5	98,6
	Các kết tụ	0,4	0,6	0,7	0,9	0,9	1,4	1,3
	Các mảnh	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
Các chất đồng	Các đỉnh axit	13,6	19,1	23,7	27,6	32,2	33,8	38,9

Các mục kiểm tra		Khoảng thời gian lưu trữ ở 25°C(tháng)						
		0	2	4	6	8	10	12
phân điện tích(CEX-HPLC,%)	Các biến thể lysin	86,4	80,9	76,3	72,3	67,8	66,3	61,1
Hoạt tính sinh học(%)		100	93	92	95	94	82	94

Các kết quả thử nghiệm chứng tỏ rằng chế phẩm PD1-H944 được bọc lộ theo sáng chế có độ ổn định tốt và có thể được lưu trữ ổn định trong ít nhất 42 tháng ở nhiệt độ từ 2°C~8°C và ít nhất 12 tháng ở 25°C.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

Trình tự số	Mô tả trình tự	Trình tự axit amin
SEQ ID số: 1	Trình tự axit amin của CDR1 chuỗi nhẹ của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	ESVDSYGNFSMH
SEQ ID số: 2	Trình tự axit amin của CDR2 chuỗi nhẹ của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	AASNQGSQVPA
SEQ ID số: 3	Trình tự axit amin của CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	QQSKEVPWT
SEQ ID số: 4	Trình tự axit amin của CDR1 chuỗi nặng của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	GFTFSSYGMS
SEQ ID số: 5	Trình tự axit amin của CDR2 chuỗi nặng của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	VATISGGGRDTYYSDSVKG
SEQ ID số: 6	Trình tự axit amin CDR3 chuỗi nặng của kháng thể chuột PD1-M944/kháng thể nhân hóa PD1-H944	SRQYGTWFFN
SEQ ID số: 7	Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể nhân hóa PD1-H944	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYGMSWVRQAPGKRLEWVA TISGGGRDTYYSDSVKGRFTISRDN AKNNLYLQMNSLRAEDTAVYYCSR QYGTWFFNWGQGTLTVSS

SEQ ID số: 8	Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể nhân hóa PD1-H944	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASE SVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPRL IYAASNQGSQVPAFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAMYPFCQQSKEVPWTF GQGTKVEIK
SEQ ID số: 9	Trình tự axit amin của vùng không đổi chuỗi nặng kháng thể nhân hóa PD1-H944	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSFGSFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG K
SEQ ID số: 10	Trình tự axit amin của vùng không đổi chuỗi nhẹ kháng thể nhân hóa PD1-H944	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm ổn định bao gồm:

kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 mg/mL đến 50 mg/mL;

chất đệm với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM;

chất điều chỉnh độ thẩm thấu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 mM đến 200 mM;

chất ổn định với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 mM đến 250 mM;

chất hoạt động bề mặt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005 % theo khối lượng đến 0,05 % theo khối lượng;

độ pH của dung dịch này nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5;

trong đó kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm đoạn chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID số: 1, đoạn chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID số: 2 và đoạn chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID số: 3;

vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm đoạn chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID số: 4, đoạn chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID số: 5, và đoạn chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID số: 6.

2. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó nồng độ của kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này nằm trong khoảng từ 10 mg/mL đến 25 mg/mL.

3. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó nồng độ của chất đệm này nằm trong khoảng từ 20 mM đến 40 mM.

4. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó nồng độ của chất điều chỉnh độ thẩm thấu này nằm trong khoảng từ 80 mM đến 160 mM.

5. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó nồng độ của chất ổn định này nằm trong khoảng từ 20 mM đến 205 mM.

6. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó hàm lượng của chất hoạt động bề mặt này nằm trong khoảng từ 0,02 % theo khối lượng đến 0,04 % theo khối lượng.

7. Chế phẩm ổn định theo điểm 1, trong đó độ pH của chế phẩm này nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này bao gồm trình tự axit amin có sự tương đồng trình tự ít nhất là

90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 100% với trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể PD-1 SEQ ID số: 8, và/hoặc trình tự axit amin có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể PD-1 SEQ ID số: 7.

9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-8, trong đó kháng thể này còn bao gồm vùng không đổi chuỗi nhẹ và vùng không đổi chuỗi nặng.

10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó trình tự axit amin của vùng không đổi chuỗi nhẹ này có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 100% với vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa của SEQ ID số: 10, và/hoặc trình tự axit amin của vùng không đổi chuỗi nặng này có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 92%, 95%, 98% hoặc 100% với vùng không đổi chuỗi nặng IgC4 SEQ ID số: 9.

11. Chế phẩm theo điểm 9 hoặc điểm 10, trong đó kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này là kháng thể IgG.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó kháng thể IgG này là kháng thể IgG4.

13. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp này là kháng thể đơn dòng.

14. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó:

chất đệm này được chọn từ một hoặc nhiều trong số đệm axit xitric, đệm axetat, và đệm histidin;

chất điều chỉnh độ thẩm thấu này được chọn từ natri clorua;

chất ổn định này là một hoặc nhiều trong số sucroza, trehaloza, và arginin hydroclorua,

chất hoạt động bề mặt này được chọn từ polysorbate 80.

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chất ổn định này là một hoặc nhiều trong số sucroza 205 mM, hoặc arginin hydroclorua với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 mM đến 80 mM, hoặc trehaloza 200 mM.

16. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó dung dịch chế phẩm này có độ pH là 6,0.

17. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó chế phẩm này bao gồm 25 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng-PD-1 tái tổ hợp; 20 mM đệm histidin, 120 mM natri clorua, 40 mM arginin hydroclorua, và 0,02 % theo khối lượng polysorbate 80.

18. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó trong đó kháng thể đơn dòng kháng PD-1 tái tổ hợp này liên kết với protein PD-1 người tái tổ hợp với ái lực KD trung bình nằm trong khoảng từ 20 pM đến 200 pM.

19. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó kháng thể đơn dòng kháng PD-1 tái tổ hợp này liên kết với protein PD-1 người tái tổ hợp với ái lực KD trung bình nằm trong khoảng từ 60 pM

đến 70 pM.

20. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó kháng thể đơn dòng kháng PD-1 tái tổ hợp này liên kết với protein PD-1 người tái tổ hợp với ái lực KD trung bình là 64,8 pM.

21. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó chế phẩm này có dạng chế phẩm chứa nước hoặc dạng đông khô.

22. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó chế phẩm này có thể được lưu trữ ổn định trong ít nhất 42 tháng ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8°C và trong ít nhất 12 tháng ở 25°C.

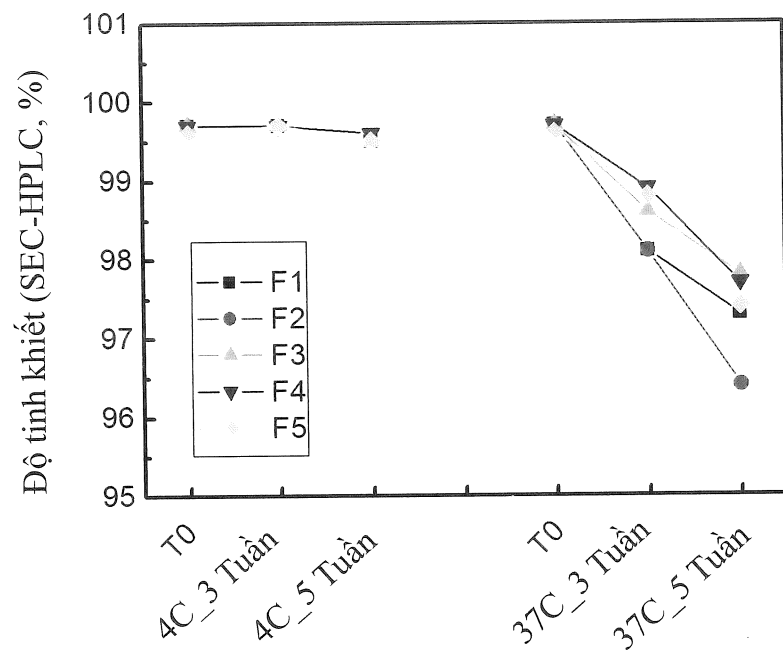


Fig. 1

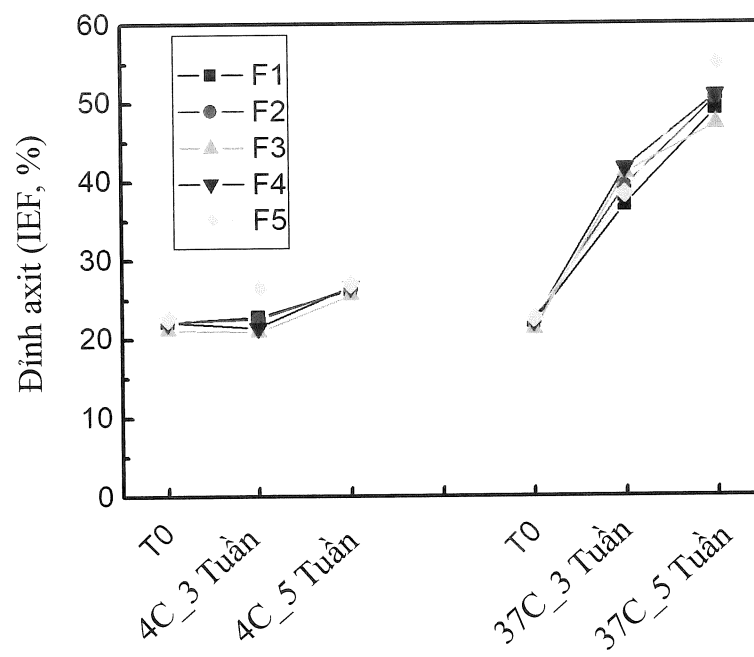


Fig. 2

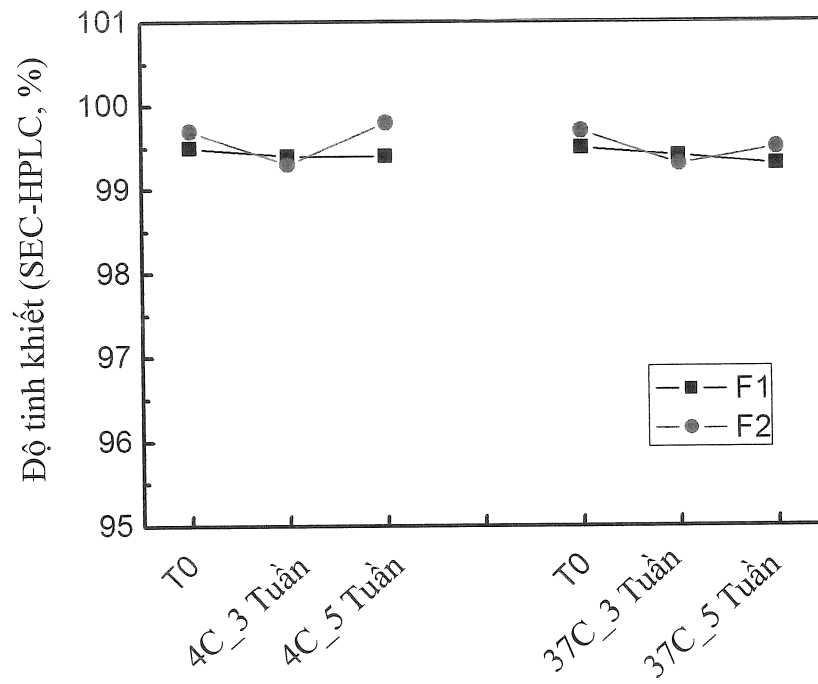


Fig. 3

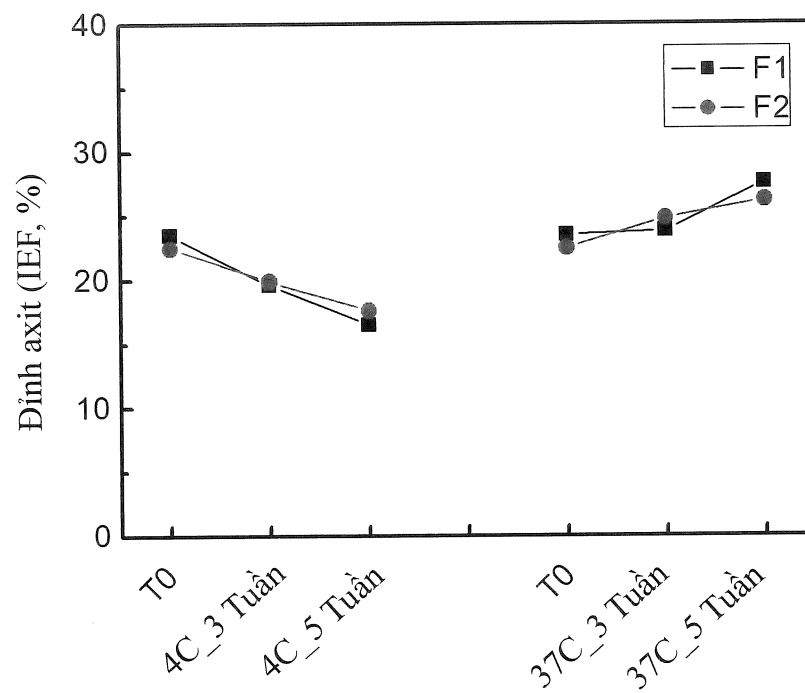


Fig. 4

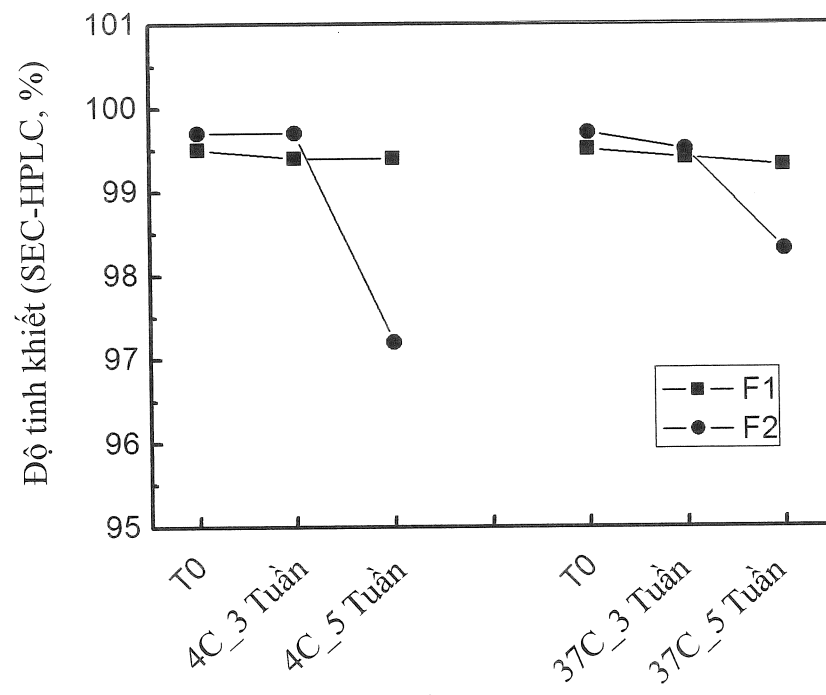


Fig. 5

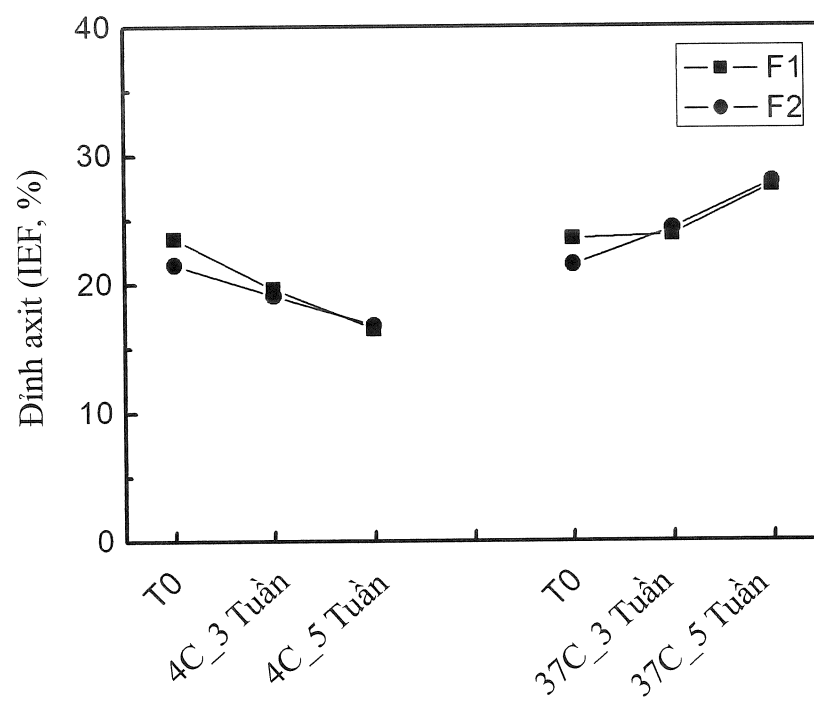


Fig. 6

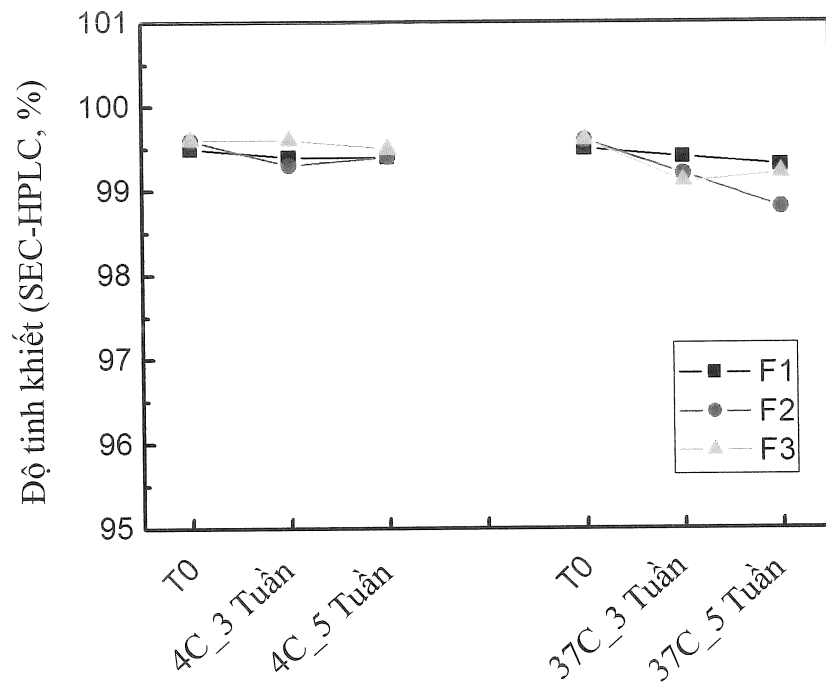


Fig. 7

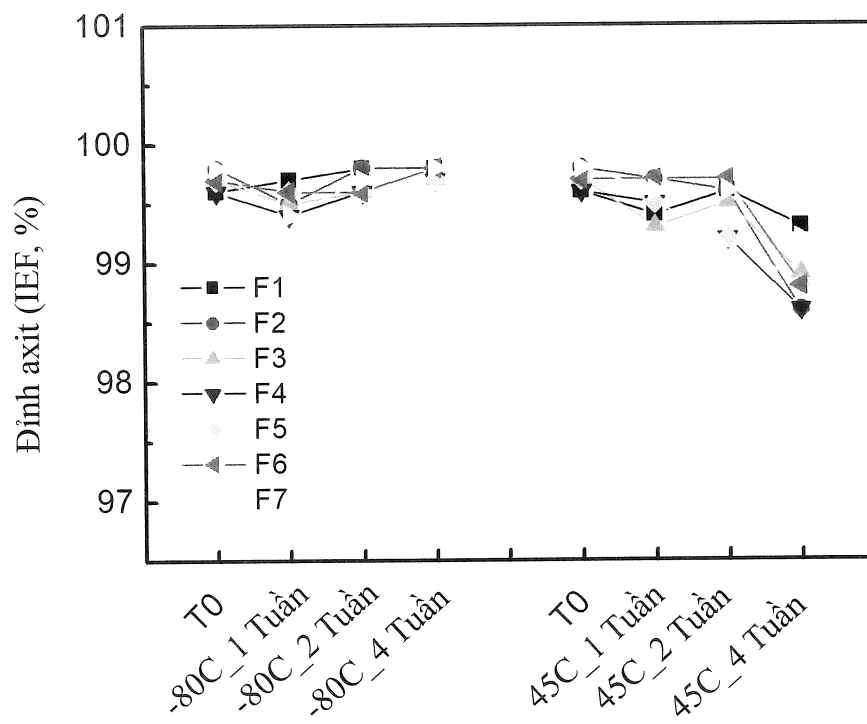


Fig. 8

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SINOCELLTECH LIMITED

<120> CHẾ PHẨM ỔN ĐỊNH CHO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG-PD-1 TÁI TỔ HỢP

<130> PCT69930SXB

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 1

Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Phe	Met	His
1				5					10		

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 2

Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
1			5					10		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 3

Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Trp	Thr
1			5					

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 5

Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 6

Ser Arg Gln Tyr Gly Thr Val Trp Phe Phe Asn
 1 5 10

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 7

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gln Tyr Gly Thr Val Trp Phe Phe Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9

<211> 327

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 9

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp nhân tạo.

<400> 10

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105