



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

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

(11)



1-0026011

(51)⁷ C07K 16/32; G01N 33/53; A61P 35/04 (13) B

(21) 1-2015-03991

(22) 15/04/2014

(86) PCT/US2014/034200 15/04/2014

(87) WO 2014/172371 23/10/2014

(30) 61/812,603 16/04/2013 US

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/03/2016 336A

(73) Genentech, Inc. (US)

1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America

(72) GENNARO, Lynn A. (US); KAO, Yung-Hsiang (US); ZHANG, Yonghua (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BIẾN THỂ PERTUZUMAB, CHẾ PHẨM CHỨA BIẾN THỂ PERTUZUMAB VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các biến thể của Pertuzumab. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến biến thể xystein không ghép cặp chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab, biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab, và loại phân tử lượng cao (HMWS) hoặc Pertuzumab. Sáng chế còn đề cập đến các biến thể được phân lập, chế phẩm, dược phẩm, và vật phẩm chứa các biến thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các biến thể của Pertuzumab. Cụ thể sáng chế đề cập đến biến thể xystein không ghép cặp chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab, biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab, và loại phân tử lượng cao (HMWS) hoặc Pertuzumab. Sáng chế còn đề cập đến các biến thể được phân lập, chế phẩm, dược phẩm, và vật phẩm bao gồm các biến thể này, cũng như các phương pháp sản xuất và xác định đặc tính các biến thể và các chế phẩm của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pertuzumab (PERJETA®) (còn được gọi là rhuMAb 2C4) là kháng thể đơn dòng (MAb), kháng thể này là kháng thể đầu tiên trong lớp của nó thuộc dòng các tác nhân được gọi là “các chất ức chế dime hoá HER”. Bằng cách liên kết với HER2, kháng thể này ức chế sự dime hoá HER2 với các thụ thể HER khác và do đó ức chế sự phát triển của khối u. Pertuzumab được Cục Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (US FDA) cấp phép lưu hành để điều trị bệnh ung thư vú di căn dương tính với HER2 ngày 8 tháng 6 năm 2012.

Patent Mỹ số 7,862,817 (Adams và các đồng tác giả) mô tả biến thể được làm giống như của người của kháng thể 2C4 gọi là phiên bản 2C4 được làm giống như của người 574 hoặc kháng thể đơn dòng được làm giống như của người tái tổ hợp 2C4 (rhuMAb 2C4). Kháng thể này liên kết miền phụ II trên miền ngoại bào (ECD) thụ thể yếu tố phát triển biểu bì của người 2 (HER2). Kháng thể rhuMAb 2C4 được sản xuất ở quy mô phòng thử nghiệm và đã chứng tỏ là liên kết với HER2 và ức chế sự tăng trưởng của các tế bào MDA-175 (các tế bào này biểu hiện HER2 ở mức 1+) và các mảnh ghép khác loài MCF7 được cấy ghép vào chuột nhắt. Xem tài liệu: Cancer Immunol. Immunother. 55(6):717-727 (2006) cũng của Adams và các đồng tác giả.

Patent Mỹ số 6,339,142 (Blank và Basey) mô tả chế phẩm kháng thể HER2 chứa hỗn hợp của kháng thể kháng HER2 và một hoặc nhiều biến thể axit của nó, trong đó hàm lượng (các) biến thể axit thấp hơn khoảng 25%. Biến thể kháng thể đơn

dòng được làm giống như của người 4D5 8 (humMAb4D5-8 hoặc Trastuzumab) là kháng thể HER2 tiêu biểu.

Patent Mỹ số 7,560,111, Patent Mỹ số 7,879,325, và Patent Mỹ số 8,241,630 (Kao và các đồng tác giả) mô tả biến thể của Pertuzumab (rhuMAb 2C4) chứa đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amino (-VHS) trên một hoặc cả hai các chuỗi nhẹ của kháng thể, còn gọi là “biến thể VHS”. Khi chất chuẩn (Giai đoạn I), lô S9802A (Giai đoạn II), và Chất nghiên cứu phát triển quy trình quy mô 400 L được thử nghiệm thiol tự do bằng cách sử dụng phân tích của Ellman ở điều kiện nguyên thủy, nồng độ thiol tự do là thấp hơn ngưỡng phát hiện ở tất cả các chất thử nghiệm. Từ 1 đến 2% Pertuzumab trong các chế phẩm được thử nghiệm là không được fucosyl hoá (G0-F) như được xác định bằng điện di mao quản (CE). Xem Bảng 5 của Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả).

WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả) mô tả các biến thể axit của Pertuzumab bao gồm: biến thể khử amit, biến thể được glycat hóa, biến thể được khử disulfua, biến thể không được khử, và biến thể được sialyl hóa. Các biến thể này được xác định đặc tính như đề cập dưới đây:

Bảng 1: Các biến thể axit trong tài liệu: WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả)

Phương pháp xác định đặc tính của các biến thể axit		
Phương pháp	Các biến thể được phát hiện	Tên biến thể
Xử lý bằng CEX +/- Sialydaza	6% được sialyl hóa	Biến thể được sialyl hóa
CE-SDS được khử	1,5% Khử không hoàn toàn	Biến thể không được khử
CE-SDS không được khử	6% disulfua đã khử	Biến thể được khử disulfua
Sắc ký Boronate	3,5% được glycat hóa (bậc cao hơn)	Biến thể được glycat hóa
Bản đồ Peptit	Khử amit	Biến thể khử amit

CEX = trao đổi cation. CE-SDS = Điện di mao quản với natri dodecyl sulfat.

Phương pháp thử nghiệm sử dụng để xác định đặc tính biến thể được khử disulfua trong WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả), CE-SDS không được

khử của kháng thể nguyên vẹn, đánh giá các liên kết disulfua giữa các chuỗi khử, hơn là các liên kết disulfua trong chuỗi.

Zhang và các đồng tác giả trong tài liệu: Anal. Chem. 84(16):7112-7123 (2012) báo cáo kháng thể tái tổ hợp (mAb A) có các xystein không ghép cặp (Cys22 và Cys96) trong miền biến đổi chuỗi nặng (miền VH) của nó. Các xystein không ghép cặp được thấy là không có tác động đáng kể đến sự liên kết của kháng thể với CD20, và mAb A với các xystein không ghép cặp có hoạt tính đầy đủ trong thử nghiệm hiệu lực (thử nghiệm độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)).

WO 2009/009523 (Kao và các đồng tác giả) đề cập đến việc ngăn chặn sự khử liên kết disulfua giữa các chuỗi trong quá trình sản xuất tái tổ hợp kháng thể ocrelizumab (rhuMAb 2H7) liên kết với CD20.

R. Dev. Biol. (Basel, Switzerland) 122: 117-127 (2005) của Harris, đề cập đến các xystein không ghép cặp (Cys22 và Cys96) trong miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của omalizumab, kháng thể kháng IgE được làm giống như của người. Dạng xysten không ghép cặp có hiệu lực thấp hơn đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các dữ liệu thử nghiệm trong bản mô tả này đề cập đến các dạng biến thể của Pertuzumab, bao gồm biến thể xystein không ghép cặp, biến thể không được fucosyl hoá, loại phân tử lượng thấp (LMWS), và loại phân tử lượng cao (HMWS). Các cách nhận biết, xác định đặc tính, và định lượng các biến thể này là có giá trị trong các phương pháp sản xuất và kiểm soát chất lượng của chế phẩm thuốc Pertuzumab.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, mục đích của sáng chế là đề cập đến chế phẩm chứa Pertuzumab và biến thể xystein không ghép cặp của nó, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab. Biến thể xystein không ghép cặp này bao gồm biến thể dị dime (bao gồm các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 chỉ ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab) và/hoặc biến thể homodime (bao gồm các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab).

Chế phẩm này tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều biến thể bổ sung của Pertuzumab như biến thể không được fucosyl hoá, biến thể loại phân tử lượng thấp (LMWS), biến thể loại phân tử lượng cao (HMWS), biến thể được glycat hóa, biến thể được khử disulfua, biến thể không được khử, biến thể khử amit, biến thể được sialyl hóa, biến thể VHS, biến thể lysin đầu tận C, biến thể oxy hoá methionin, biến thể glycosyl hoá G1, biến thể glycosyl hoá G2, và biến thể glycosyl hoá chuỗi nặng không được glycosyl hoá.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa Pertuzumab và biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hoá chiếm từ 0,9 đến 4,1% hỗn hợp. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm Pertuzumab và biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hoá chiếm nhiều hơn 2% chế phẩm. Theo phương án này, lượng biến thể không được fucosyl hoá là lớn hơn lượng được báo cáo trong Patent Mỹ số 7,560,111, Patent Mỹ số 7,879,325, và Patent Mỹ số 8,241,630 (Kao và các đồng tác giả).

Theo một khía cạnh bổ sung, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của Pertuzumab, loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab, và loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab, trong đó lượng LMWS là $\leq 1,6\%$ và lượng HMWS là $\leq 1,7\%$.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của Pertuzumab, Pic 1, và Pic 2, trong đó lượng Pic 1 là $\leq 0,5\%$ và lượng Pic 2 là $\leq 1,0\%$ như được xác định bằng thử nghiệm điện di mao quản được khử natri dodecyl sulphat (R-CE-SDS).

Các khía cạnh bổ sung của sáng chế đề cập đến các dược phẩm, các vật phẩm, và các phương pháp điều trị cho bệnh nhân ung thư có sử dụng hoặc bao gồm các chế phẩm trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh bổ sung, sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá chế phẩm Pertuzumab bao gồm các bước: (1) đo lượng biến thể xystein không ghép cặp trong chế phẩm này, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; và/hoặc (2) đo lượng Pertuzumab không được fucosyl hoá trong chế

phẩm này; và/hoặc (3) đo lượng của loại phân tử lượng thấp (LMWS) hoặc loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab trong chế phẩm này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học của chế phẩm Pertuzumab bao gồm việc đo lượng biến thể Pertuzumab không fucosyl hoá trong hỗn hợp này để xác định hoạt tính độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của chế phẩm này, và xác nhận lượng Pertuzumab không được fucosyl hoá là nằm trong khoảng từ 0,9 đến khoảng 4,1%.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm bao gồm các bước: (1) sản xuất chế phẩm chứa Pertuzumab và một hoặc nhiều biến thể của nó, và (2) tiến hành thử nghiệm phân tích chế phẩm đã được sản xuất này để đánh giá lượng của (các) biến thể có trong đó, trong đó (các) biến thể bao gồm: (i) biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; và/hoặc (ii) biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab; và/hoặc (iii) loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab; và/hoặc (iv) loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab, và/hoặc (v) (các) mảnh Pic 1 của Pertuzumab, và/hoặc (vi) (các) mảnh Pic 2 của Pertuzumab.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến biến thể được phân lập của Pertuzumab, trong đó biến thể được phân lập bao gồm: (a) biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab, trong đó biến thể này là biến thể dị đime chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 chỉ ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; và/hoặc (b) biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab, trong đó biến thể này là biến thể homodime chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; và/hoặc (c) biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab; và/hoặc (d) loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab; và/hoặc (e) loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab; và/hoặc (f) (các) mảnh Pic 1 của Pertuzumab, và/hoặc (g) (các) mảnh Pic 2 của Pertuzumab.

Theo một khía cạnh bổ sung, sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá mức phân mảnh của chế phẩm Pertuzumab bao gồm bước đo lượng Pic 1 và Pic 2 trong hỗn hợp này bằng thử nghiệm điện di mao quản được khử natri dodecyl sulphat (R-CE-SDS) và xác nhận lượng Pic 1 là $\leq 5\%$ và lượng Pic 2 là $\leq 1,0\%$.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình mô tả phác hoạ cấu trúc protein HER2, và các trình tự axit amin cho các Miền phụ I-IV (tương ứng từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4) của miền ngoại bào của nó.

Fig. 2A và Fig. 2B là hình mô tả sự sắp thẳng hàng các trình tự axit amin của các miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) (Fig. 2A) và biến đổi chuỗi nặng (VH) (Fig. 2B) kháng thể đơn dòng của chuột 2C4 (tương ứng là SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6); các miền VL và VH của biến thể 574/Pertuzumab (tương ứng là SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8), và các khung liên ứng VL và VH của người (hum κ 1, chuỗi nhẹ kappa phân nhóm I; humIII, chuỗi nặng phân nhóm III) (tương ứng là SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO:10). Các dấu hoa thị chỉ các khác biệt giữa các miền biến đổi của Pertuzumab và kháng thể đơn dòng của chuột 2C4 hoặc giữa các miền biến đổi của Pertuzumab và khung liên ứng của người. Các vùng xác định tính hỗ trợ (các CDR) là ở trong ngoặc.

Fig. 3A và Fig. 3B là hình thể hiện các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ Pertuzumab (Fig. 3A; SEQ ID NO: 11) và chuỗi nặng (Fig. 3B; SEQ ID NO: 12). Các CDR được in đậm. Khối lượng phân tử đã tính của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng này là 23.526,22 Da và 49.216,56 Da (các xystein ở dạng được khử). Gốc hydrat cacbon được gắn với Asn 299 của chuỗi nặng.

Fig. 4A và Fig. 4B là hình thể hiện các trình tự axit amin tương ứng của chuỗi nhẹ Trastuzumab (Fig. 4A; SEQ ID NO: 13) và chuỗi nặng Trastuzumab (Fig. 4B; SEQ ID NO: 14). Các ranh giới của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và biến đổi chuỗi nặng được chỉ bằng các mũi tên.

Fig. 5A và Fig. 5B là hình mô tả lần lượt trình tự chuỗi nhẹ biến thể Pertuzumab (Fig. 5A; SEQ ID NO: 15) và trình tự chuỗi nặng biến thể Pertuzumab (Fig. 5B; SEQ ID NO: 16).

Fig. 6 là hình mô tả cấu trúc của (các loại chính) Pertuzumab bao gồm 4 liên kết disulfua giữa các chuỗi và 12 liên kết disulfua trong chuỗi, bao gồm các liên kết disulfua trong chuỗi Cys23/Cys88 ở lần lượt các miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Các miền được mô tả là: VL = miền biến đổi chuỗi nhẹ; VH = miền biến đổi chuỗi nặng; CL = miền cố định chuỗi nhẹ; CH1 = miền cố định chuỗi nặng 1; CH2 = miền cố định chuỗi nặng 2; CH3 = miền cố định chuỗi nặng 3.

Fig. 7 thể hiện bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin không được khử (nguyên thủy) của Pertuzumab.

Fig. 8 thể hiện bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin của Pertuzumab được khử và không được khử (tỷ lệ nguyên cỡ).

Fig. 9 thể hiện bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin của Pertuzumab được khử và không được khử (0-120 phút).

Fig. 10 thể hiện bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin của Pertuzumab được khử và không được khử (120-204 phút).

Fig. 11 là sơ đồ thể hiện phân tích sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) của Pertuzumab thủy phân bằng papain.

Fig. 12 là sơ đồ thể hiện phân tích HIC của Pertuzumab thủy phân bằng papain (hình phóng đại).

Fig. 13 là sơ đồ thể hiện phân tích HIC của Pertuzumab nguyên vẹn. Các pic bao gồm: homodime thiol tự do được làm giàu (thiol tự do trên cả hai chuỗi nhẹ), dị dime thiol tự do (thiol trên một chuỗi nhẹ), và homodime kiểu đại (kháng thể loại chính) được thể hiện.

Fig. 14 là sơ đồ thể hiện hoạt tính của Pertuzumab (Lô anti2C4907-2) trong thử nghiệm độc tính thể bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Fig. 15 là sơ đồ thể hiện tác động của hàm lượng G0-F lên hoạt tính ADCC. Các mẫu đã thử nghiệm là Pertuzumab giai đoạn III (G0-F = 2,2%) và Pertuzumab giai đoạn I (G0-F = 0,8%).

Fig. 16 là sơ đồ thể hiện phân tích điện di mao quản của các oligosacarit được liên kết ở vị trí N được giải phóng từ Pertuzumab.

Fig. 17 là sơ đồ thể hiện phân tích điện di mao quản của các oligosacarit được liên kết ở vị trí N được giải phóng từ Pertuzumab (hình phóng đại). Ghi chú: oligosacarit G1 có hai dạng đồng phân (được ký hiệu là G1 và G1') trong đó gốc galactosa đầu tận được gắn với nhánh α 1-6 hoặc nhánh α 1-3.

Fig. 18 là sơ đồ thể hiện sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HP-HPLC) để phân tách Fab và Fc của Pertuzumab (được thủy phân Lys-C hạn chế). Pertuzumab

được thuỷ phân Lys-C và Pertuzumab được thuỷ phân Lys-C hạn chế sau đó được xử lý bằng N-ethylmaleimide (NEM) được thể hiện.

Fig. 19 thể hiện bản đồ peptit xác nhận Fab thiol tự do của Pertuzumab có chứa Cys23 và Cys88 tự do ở chuỗi nhẹ của nó. Peptit L2 từ Fab có chứa thiol tự do được đánh dấu (gắn nhãn) NEM và do đó có dịch chuyển trong phân tích bản đồ peptit.

Fig. 20 là hình thể hiện ở dạng sơ đồ: IgG1 loại chính hoặc kiểu đại (Fig. 20A), biến thể dị dimer Cys23/Cys88 (Fig. 20B), và biến thể homodimer Cys23/Cys88 (Fig. 20C).

Fig. 21 là sơ đồ thể hiện % G0-F theo hoạt tính ADCC đối với các lô Pertuzumab bằng cách sử dụng thử nghiệm trong Ví dụ 4 trong bản mô tả này.

Fig. 22 là hình thể hiện ở dạng sơ đồ liên kết của Pertuzumab ở vị trí liên kết dị dimer của HER2, nhờ đó ngăn chặn sự dị dimer hoá với EGFR hoặc HER3 đã hoạt hoá.

Fig. 23 là hình so sánh hoạt tính của Trastuzumab (liên kết với Miền phụ IV gần miền gần màng của HER2 ECD) và Pertuzumab (liên kết với Miền phụ II của HER2 ECD).

Fig. 24A và Fig. 24B là hình thể hiện các cấu trúc oligosacarit được gắn với kháng thể IgG.

Fig. 25 là sơ đồ thể hiện phân tích sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) của Pertuzumab (tỷ lệ nguyên cỡ).

Fig. 26 là sơ đồ thể hiện phân tích SEC của Pertuzumab (tỷ lệ phóng đại). Các pic bao gồm pic chính (kháng thể loại chính), loại phân tử lượng cao (HMWS), và loại phân tử lượng thấp (LMWS).

Fig. 27 là sơ đồ thể hiện phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao-loại trừ kích cỡ (SE-HPLC) của các mẫu Pertuzumab. Mẫu A là lô sản phẩm thuốc Pertuzumab đại diện. Mẫu B là lô Pertuzumab bị phơi sáng ở 1,2 mlux giờ. Mẫu C là lô Pertuzumab bị phơi sáng ở 3,6 mlux giờ. Mẫu D là lô Pertuzumab được xử lý axit ở pH=3,2. Mẫu E là biến thể bazơ đã tinh chế từ HPLC-trao đổi ion (IE-HPLC).

Fig. 28 thể hiện đồ thị đối chiếu của tốc độ lắng cặn siêu ly tâm phân tích (AUC) và phân tích SE-HPLC. Các thanh sai số thể hiện hai độ lệch chuẩn từ giá trị xác định ở n=3. Tất cả các điểm dữ liệu khác chỉ kết quả xác định đơn lẻ. Các vòng

tròn chỉ các mẫu có các mức HMWS thấp hơn các mức phát hiện của AUC.

Fig. 29 là sơ đồ thể hiện phân tích điện di mao quản natri dodexyl sulfat (CE-SDS) với phát hiện huỳnh quang cảm ứng laze (LIF) của Pertuzumab không được khử.

Fig. 30 là hình thể hiện CE-SDS-LIF Pertuzumab không được khử (NR) (hình phóng đại).

Fig. 31A và Fig. 31B là sơ đồ thể hiện sắc ký đồ SE-HPLC cho Ví dụ 6: tỷ lệ nguyên cỡ (Fig. 31A) và tỷ lệ phóng đại (Fig. 31B).

Fig. 32A và 32B là sơ đồ mô tả điện di đồ CE-SDS không được khử (NR-CE-SDS) cho Ví dụ 6: tỷ lệ nguyên cỡ (Fig. 32A) và tỷ lệ phóng đại (Fig. 32B).

Fig. 33A và Fig. 33B là sơ đồ thể hiện điện di đồ CE-SDS được khử (R-CE-SDS) cho Ví dụ 6: tỷ lệ nguyên cỡ (Fig. 33A), và tỷ lệ phóng đại (Fig. 33B).

Fig. 34 là sơ đồ thể hiện so sánh các điện di đồ NR-CE-SDS và R-CE-SDS của mẫu được xử lý axit (tỷ lệ phóng đại).

Fig. 35 là sơ đồ thể hiện tương quan định lượng Fab giữa NR-CE-SDS và SE-HPLC.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

“Các xystein được ghép cặp” trong bản mô tả này chỉ hai gốc xystein tạo thành liên kết disulfua trong protein, như kháng thể. Liên kết disulfua này có thể là liên kết disulfua giữa các chuỗi (ví dụ liên kết disulfua giữa các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể, hoặc giữa hai chuỗi nặng của kháng thể), hoặc liên kết disulfua trong chuỗi (ví dụ trong chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc trong chuỗi nặng của kháng thể). Đa số các kháng thể IgG1 bao gồm 4 liên kết disulfua giữa các chuỗi và 12 liên kết disulfua trong chuỗi. Xem Fig. 6.

“Biến thể xystein không ghép cặp” là biến thể của protein (ví dụ kháng thể như Pertuzumab) trong đó một hoặc nhiều xystein được ghép cặp không ở trạng thái được liên kết disulfua. Các xystein không ghép cặp này có thể không được ghép cặp để tạo thành liên kết disulfua (ví dụ khi protein gấp nếp ban đầu thành cấu trúc bậc ba của nó) hoặc có thể đã tạo thành liên kết disulfua nhưng liên kết này sau đó bị phá vỡ (ví dụ

trong quá trình sản xuất hoặc khi bảo quản). Các xystein không ghép cặp thường được gọi là các thiol tự do hoặc các sulfhydryl tự do. Theo một phương án, các xystein không ghép cặp là từ liên kết disulfua trong chuỗi. Theo một phương án, các xystein không ghép cặp là ở chuỗi nhẹ, ví dụ miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một phương án, biến thể xystein không ghép cặp là biến thể Cys23/Cys88.

Biến thể xystein không ghép cặp “Cys23/Cys88” không có liên kết disulfua nội phân tử ở các gốc xystein 23 và 88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Xem Fig. 20(b) và Fig. 20(c) trong bản mô tả này.

“Biến thể homodime” không có các liên kết disulfua Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Xem Fig. 20(c) trong bản mô tả này.

“Biến thể dị dime” chỉ không có liên kết disulfua Cys23/Cys88 ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Xem Fig. 20(b) trong bản mô tả này.

“Biến thể không được fucosyl hoá” là biến thể glycosyl hoá của kháng thể trong đó một hoặc cả hai cấu trúc oligosacarit được gắn với gốc Asn299 của một hoặc cả hai chuỗi nặng không có fucoza, ví dụ không có Fuca(1->6), trong cấu trúc oligosacarit lõi.

“Loại phân tử lượng thấp” hoặc “LMWS” của Pertuzumab bao gồm mảnh của Pertuzumab có phân tử lượng thấp hơn phân tử lượng của loại chính hoặc Pertuzumab nguyên vẹn (ví dụ trong trường hợp Pertuzumab nguyên vẹn có phân tử lượng bằng khoảng 145.197 Da chỉ tính các mạch peptit của nó). LMWS có thể được phát hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (SE-HPLC) và/hoặc điện di mao quản không khử với natri dodexyl sulfat (CE-SDS) ví dụ như trong Ví dụ 5. Theo một phương án, LMWS bao gồm hoặc gồm có “Pic 6” như thu được bằng CE-SDS (ví dụ, xem Ví dụ 5).

“Loại phân tử lượng cao” hoặc “HMWS” bao gồm chế phẩm của Pertuzumab có phân tử lượng lớn hơn loại chính hoặc Pertuzumab nguyên vẹn (ví dụ trong trường hợp Pertuzumab nguyên vẹn có phân tử lượng khoảng 145.197 Da chỉ tính các mạch peptit của nó). HMWS có thể được phát hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (SE-HPLC) và/hoặc thử nghiệm điện di mao quản không khử với Natri dodexyl sulfat (CE-SDS) ví dụ như trong Ví dụ 5.

“Pic 1” trong bản mô tả này chỉ (các) mảnh Pertuzumab có kích cỡ nhỏ hơn chuỗi nhẹ (LC) Pertuzumab. (Các) mảnh Pic 1 có thể được tách từ Pertuzumab loại chính bằng thử nghiệm CE-SDS, tốt hơn là bằng thử nghiệm CE-SDS được khử (R-CE-SDS). Xem, ví dụ, Fig. 33B, Bảng 16, và Bảng 18 trong bản mô tả này. Tốt hơn là, lượng của pic 1 trong hỗn hợp Pertuzumab là $\leq 0,5\%$. Tùy ý, tiến hành thử nghiệm R-CE-SDS như mô tả trong Ví dụ 6 và diện tích pic đã hiệu chỉnh (CPA) cho % pic 1 trong hỗn hợp.

“Pic 2” trong bản mô tả này chỉ (các) mảnh Pertuzumab có kích cỡ lớn hơn chuỗi nhẹ (LC) Pertuzumab và nhỏ hơn chuỗi nặng không được glycosyl hoá của Pertuzumab (NGHC). Pic 2 có thể được tách từ Pertuzumab loại chính bằng CE-SDS, tốt hơn là bằng thử nghiệm (R-CE-SDS) được khử. Pic 2 loại trừ pic 3 mà có thể xuất hiện trong thử nghiệm R-CE-SDS như được giải thích trong Ví dụ 6 trong bản mô tả này. Xem, ví dụ, Fig. 33B, Bảng 16, và Bảng 18 trong bản mô tả này. Tốt hơn là, lượng của pic 2 trong hỗn hợp Pertuzumab là $\leq 1,0\%$. Tùy ý, tiến hành thử nghiệm R-CE-SDS như mô tả trong Ví dụ 6 và diện tích pic đã hiệu chỉnh (CPA) cho % pic 2 trong hỗn hợp.

“Phân mảnh” chỉ sự phân cắt chuỗi polypeptit, ví dụ phân cắt của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của Pertuzumab. Phân mảnh này ví dụ không bao gồm sự phân ly các chuỗi polypeptit kết hợp không phải cộng hoá trị trong phân tích NR-CE-SDS.

“Thử nghiệm phân tích” là thử nghiệm đánh giá định lượng và/hoặc đo định tính sự có mặt hoặc khối lượng của một chất phân tích (ví dụ biến thể kháng thể) trong chế phẩm. Chế phẩm được thử nghiệm có thể là chế phẩm đã tinh chế, bao gồm được phẩm.

“Thử nghiệm sắc ký tương tác kỵ nước Fab” hoặc “thử nghiệm HIC Fab” bao gồm tạo ra các mảnh (ví dụ các mảnh Fab) của các kháng thể trong hỗn hợp (ví dụ bằng cách sử dụng enzym papain) và chạy sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) cho các mảnh kháng thể đã tạo ra này để tách các biến thể xystein không ghép cặp ra khỏi Pertuzumab loại chính. Thử nghiệm ví dụ được đề cập trong Ví dụ 1 trong bản mô tả này.

“Thụ thể HER” là thụ thể protein tyrosin kinaza thuộc họ thụ thể HER và bao gồm các thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), HER2, HER3 và HER4. Thụ thể HER nói chung sẽ bao gồm miền ngoại bào, miền này có thể liên kết phối tử HER

và/hoặc dime hoá với một phân tử thụ thể HER khác; miền xuyên màng ưa chất béo; miền tyrosin kinaza nội bào được bảo toàn; và miền tín hiệu đầu tận carboxyl neo giữ một vài gốc tyrosin có thể được phosphoryl hoá.

"HER2" chỉ protein HER2 của người, ví dụ được mô tả trong tài liệu: PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) của Semba và các đồng tác giả, và Nature 319:230-234 (1986) của Yamamoto và các đồng tác giả (Genebank accession number X03363).

Trong bản mô tả này, "miền ngoại bào HER2" hoặc "ECD HER2" chỉ miền của HER2 ở bên ngoài tế bào, được neo giữ vào màng tế bào, hoặc trong máu, bao gồm các mảnh của nó. Trình tự axit amin của HER2 được thể hiện trên Fig. 1. Theo một phương án, miền ngoại bào của HER2 có thể bao gồm 4 miền: "Miền phụ I" (các gốc axit amin từ khoảng 1-195; SEQ ID NO:1), "Miền phụ II" (các gốc axit amin từ khoảng 196-319; SEQ ID NO:2), "Miền phụ III" (các gốc axit amin từ khoảng 320-488; SEQ ID NO:3), và "Miền phụ IV" (các gốc axit amin từ khoảng 489-630; SEQ ID NO:4) (đánh số gốc không tính peptit tín hiệu). Xem tài liệu : Mol. Cell. 11: 495-505 (2003) của Garrett và các đồng tác giả, Nature 421: 756-760 (2003) của Cho và các đồng tác giả, Cancer Cell 5:317-328 (2004) của Franklin và các đồng tác giả, và Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993) của Plowman và các đồng tác giả, cũng như Fig. 1 trong bản mô tả này.

"Dime HER" trong bản mô tả này là dime được kết hợp không theo cách cộng hoá trị bao gồm ít nhất là 2 thụ thể HER. Các phức hợp này có thể tạo thành khi tế bào biểu hiện hai hoặc nhiều hơn hai thụ thể HER được tiếp xúc với phối tử HER và có thể được phân lập bằng cách kết tủa miễn dịch và được phân tích bằng SDS-PAGE như ví dụ được Sliwkowski và các đồng tác giả mô tả trong: J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994). Các protein khác, như cấu trúc dưới phân tử thụ thể xytokin (ví dụ gp130) có thể kết hợp với dime này. Tốt hơn là, dime HER bao gồm HER2.

"Dị dime HER" trong bản mô tả này là dị dime được kết hợp không theo cách cộng hoá trị bao gồm ít nhất là hai thụ thể HER khác nhau, như các dị dime EGFR-HER2, HER2-HER3 hoặc HER2-HER4.

"Hoạt hoá HER" chỉ sự hoạt hoá, hoặc phosphoryl hoá, một hoặc nhiều thụ thể. Nói chung, sự hoạt hoá HER dẫn đến việc tải nạp tín hiệu (ví dụ gây ra bởi miền kinaza nội bào của các gốc tyrosin phosphoryl hoá thụ thể trong thụ thể HER hoặc

polypeptit cơ chất). Việc hoạt hoá HER có thể được điều tiết bởi liên kết phối tử HER với dime HER bao gồm thụ thể HER quan tâm. Liên kết phối tử HER với dime HER có thể hoạt hoá miền kinaza của một hoặc nhiều thụ thể HER trong dime này và nhờ đó dẫn đến phosphoryl hoá các gốc tyrosin trong một hoặc nhiều thụ thể HER và/hoặc phosphoryl hoá các gốc tyrosin trong (các) polypeptit cơ chất bổ sung, như các kinaza nội bào Akt hoặc MAPK.

Các dạng "được làm giống như của người" của các kháng thể không phải của người (ví dụ, loài gặm nhấm) là các kháng thể khảm có chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Phần lớn các kháng thể được làm giống như của người là các globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến đổi của thể nhận được thay bằng các gốc từ vùng siêu biến đổi của các loài không phải là người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải là người có tính đặc hiệu, ái lực và năng lực mong muốn. Trong một vài trường hợp, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm các gốc mà không được tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được tiến hành để cải tiến hơn nữa chất lượng của kháng thể. Nói chung, kháng thể được làm giống như của người sẽ bao gồm về cơ bản tất cả ít nhất là một, và thông thường là hai miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vòng siêu biến đổi tương ứng với các vòng này của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các FR là các vùng khung này của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất là một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), thông thường là vùng này của globulin miễn dịch của người. Xem chi tiết hơn trong: Nature 321:522-525 (1986) của Jones và các đồng tác giả; Nature 332:323-329 (1988) của Riechmann và các đồng tác giả; và Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) của Presta. Các kháng thể HER2 được làm giống như của người cụ thể bao gồm Trastuzumab và các kháng thể 2C4 được làm giống như của người như Pertuzumab như được mô tả và xác định trong bản mô tả này.

“Kháng thể nguyên vẹn” trong bản mô tả này là kháng thể bao gồm 2 vùng liên kết kháng nguyên, và vùng Fc. Tốt hơn là, kháng thể nguyên vẹn có vùng Fc mang chức năng. Theo một phương án, “Pertuzumab nguyên vẹn” có phân tử lượng khoảng

145.197 Da chỉ tính các chuỗi peptit của nó.

Thuật ngữ “vùng siêu biến đổi” khi được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các gốc axit amin của kháng thể có vai trò đối với liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến đổi nói chung bao gồm các gốc axit amin từ “vùng xác định tính hỗ trợ” hoặc “CDR” (ví dụ các gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng; Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) của Kabat và các đồng tác giả) và/hoặc các gốc từ “vùng siêu biến đổi” (ví dụ các gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng; J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) của Chothia và Lesk). Các gốc “vùng khung” hoặc “FR” là các gốc miền biến đổi mà không phải các gốc vùng siêu biến đổi như được xác định trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “vùng Fc” trong bản mô tả này được dùng để chỉ vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên thể và các vùng Fc biến thể. Mặc dù các ranh giới vùng Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch có thể thay đổi, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của nó. Lysin đầu tận C (gốc 449 theo hệ thống đánh số châu Âu) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình sản xuất hoặc tinh chế kháng thể này, hoặc bằng cách xử lý tái tổ hợp axit nucleic mã hoá chuỗi nặng của kháng thể này. Do đó, chế phẩm của các kháng thể nguyên vẹn có thể bao gồm quần thể kháng thể với tất cả các gốc K449 đã bị loại bỏ, quần thể kháng thể không có gốc K449 bị loại bỏ, và quần thể kháng thể có hỗn hợp các kháng thể có và không có gốc K449.

Trừ khi có quy định khác, trong bản mô tả này việc đánh số các gốc trong chuỗi nặng globulin miễn dịch là đánh số theo chỉ số EU như trong xác định trong Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) của Kabat và các đồng tác giả, được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. “Chỉ số EU theo Kabat” chỉ cách đánh số gốc kháng thể IgG1 theo châu Âu.

“Vùng Fc mang chức năng” có “chức năng thực hiện” của vùng Fc trình tự

nguyên thể. Các “chức năng thực hiện” ví dụ bao gồm liên kết C1q; độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể; liên kết thụ thể Fc; độc tính thể bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); thực bào; điều tiết giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B; BCR), v.v. Các chức năng thực hiện này nói chung đòi hỏi vùng Fc phải kết hợp với miền liên kết (ví dụ, miền biến đổi của kháng thể) và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều loại thử nghiệm.

“Vùng Fc trình tự nguyên thể” bao gồm trình tự axit amin tương đồng với trình tự axit amin của vùng Fc tìm thấy trong tự nhiên. Các vùng Fc trình tự nguyên thể của người bao gồm vùng Fc IgG1 trình tự nguyên thể của người (típ alen A và típ alen không phải A); vùng Fc IgG2 trình tự nguyên thể của người; vùng Fc IgG3 trình tự nguyên thể của người; và vùng Fc IgG4 trình tự nguyên thể của người cũng như các biến thể có trong tự nhiên của chúng.

“Kháng thể trần” là kháng thể không được tiếp hợp với phân tử khác loại, như gốc độc tính tế bào hoặc chất đánh dấu phóng xạ.

Thuật ngữ “kháng thể loại chính” hoặc “kháng thể kiểu đại” trong bản mô tả này chỉ cấu trúc trình tự axit amin của kháng thể trong hỗn hợp là phân tử kháng thể chiếm lượng chủ yếu trong hỗn hợp này. Tốt hơn là, kháng thể loại chính là kháng thể HER2, như kháng thể liên kết với Miền phụ II của HER2, kháng thể ức chế dimer hoá HER hiệu quả hơn Trastuzumab, và/hoặc liên kết với vị trí liên kết dị dimer trên HER2. Theo một phương án, kháng thể loại chính là kháng thể chứa CDR-H1 (SEQ ID NO: 17 hoặc 23), CDR-H2 (SEQ ID NO: 18), và CDR-H3 (SEQ ID NO: 19), CDR-L1 (SEQ ID NO: 20), CDR-L2 (SEQ ID NO: 21 hoặc 24) và CDR-L3 (SEQ ID NO: 22), các trình tự axit amin VL và VH tương ứng trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, (xem Fig. 2A- Fig. 2B), và tùy ý, các trình tự axit amin chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 15 và các trình tự axit amin chuỗi nặng trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 16 (xem Fig. 3A-Fig. 3B và Fig. 5A-Fig. 5B). Theo một phương án, kháng thể loại chính là Pertuzumab.

Kháng thể “ức chế dimer hoá HER” là kháng thể ức chế, hoặc can thiệp vào quá trình tạo thành dimer hoặc dị dimer HER. Theo một phương án, kháng thể này liên kết với HER2 ở vị trí liên kết dị dimer của nó. Kháng thể ức chế dimer hoá được ưu tiên nhất trong bản mô tả này là Pertuzumab.

“Vị trí liên kết dị đime” trên HER2, chỉ vùng trong miền ngoại bào của HER2 mà tiếp xúc, hoặc tương tác với, vùng trong miền ngoại bào của EGFR, HER3 hoặc HER4 khi tạo thành đime với nó. Vùng này được tìm thấy trong Miền phụ II của HER2 (SEQ ID NO: 2). Cancer Cell 5:317-328 (2004) của Franklin và các đồng tác giả.

Kháng thể HER2 “liên kết với vị trí liên kết dị đime” của HER2, liên kết với các gốc trong Miền phụ II (SEQ ID NO: 2) và tùy ý cũng liên kết với các gốc trong các miền khác của miền ngoại bào HER2, như các Miền phụ I và III (SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO:3), và có thể cản trở về mặt không gian, ít nhất ở mức độ nhất định, tạo thành dị đime HER2-EGFR, HER2-HER3, hoặc HER2-HER4. Franklin và các đồng tác giả trong Cancer Cell 5:317-328 (2004) xác định đặc tính cấu trúc tinh thể HER2-Pertuzumab, nộp cho Ngân Hàng Dữ liệu Protein RCSB (ID Code IS78), minh họa kháng thể ví dụ liên kết với vị trí liên kết dị đime của HER2.

Kháng thể “liên kết với Miền phụ II” của HER2 liên kết với các gốc trong Miền phụ II (SEQ ID NO: 2) và tùy ý các gốc (các) Miền phụ còn lại của HER2, như các Miền phụ I và III (tương ứng là SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO:3).

Trong bản mô tả này, “Pertuzumab” và “rhuMAb 2C4”, mà được sử dụng thay thế lẫn nhau, chỉ kháng thể bao gồm các trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và biến đổi chuỗi nặng (VH) tương ứng trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Fig. 22 và Fig. 23 trong bản mô tả này minh họa các chức năng sinh học ví dụ của Pertuzumab. Trong trường hợp Pertuzumab là kháng thể nguyên vẹn, tốt hơn là bao gồm kháng thể IgG1; theo một phương án bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 15, và trình tự axit amin chuỗi nặng trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 16. Kháng thể này tùy ý được sản xuất bởi các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO). Các thuật ngữ “Pertuzumab” và “rhuMAb 2C4” trong bản mô tả này bao gồm các phiên bản tương tự về mặt sinh học hoặc được dự định của thuốc có tên được sử dụng ở Mỹ (USAN) hoặc tên chung quốc tế (INN) là: Pertuzumab.

Trong bản mô tả này, “Trastuzumab” và “rhuMAb4D5”, được sử dụng thay thế lẫn nhau, chỉ kháng thể bao gồm các trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và biến đổi chuỗi nặng (VH) tương ứng từ SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO:14 (xem Fig. 4A-

Fig. 4B). Trong trường hợp Trastuzumab là kháng thể nguyên vẹn, tốt hơn là bao gồm kháng thể IgG1; theo một phương án bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 13 và trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO: 14. Kháng thể này tùy ý được sản xuất bởi các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO). Các thuật ngữ “Trastuzumab” và “rhuMAb4D5” trong bản mô tả này bao gồm các phiên bản tương tự về mặt sinh học hoặc được dự định của thuốc có tên được sử dụng ở Mỹ (USAN) hoặc tên chung quốc tế (INN): Trastuzumab.

Kháng thể biến thể trình tự axit amin trong bản mô tả này là kháng thể có trình tự axit amin khác với kháng thể loại chính. Thông thường, các biến thể sẽ trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là khoảng 70% với kháng thể loại chính, và tốt hơn là, tương đồng ít nhất là khoảng 80%, và tốt hơn nữa là tương đồng ít nhất là khoảng 90% với kháng thể loại chính. Các biến thể trình tự axit amin có các thay thế, khuyết đoạn, và/hoặc bổ sung ở các vị trí nhất định trong hoặc liền kề với trình tự axit amin của kháng thể loại chính. Ví dụ về các biến thể trình tự axit amin trong bản mô tả này bao gồm biến thể kháng thể khử amit, kháng thể có đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin (ví dụ VHS) trên một hoặc hai chuỗi nhẹ của nó, kháng thể với gốc lysin đầu tận C trên một hoặc hai chuỗi nặng của nó v.v., và bao gồm tổ hợp các biến đổi của các trình tự axit amin của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ.

Biến thể axit là biến thể của kháng thể loại chính mà có tính axit mạnh hơn kháng thể loại chính. Biến thể axit có được điện tích âm hoặc mất điện tích dương so với kháng thể loại chính. Các biến thể axit này có thể được phân giải bằng cách sử dụng phương pháp tách, như sắc ký trao đổi ion, phương pháp này tách riêng các protein theo điện tích. Các biến thể axit của kháng thể loại chính rửa giải sớm hơn so với pic chính khi tách bằng sắc ký trao đổi cation.

Biến thể được khử disulfua có một hoặc nhiều xystein được liên kết disulfua giữa các chuỗi mà được khử bằng hoá chất thành dạng thiol tự do. Biến thể này có thể được theo dõi bằng điện di mao quản không khử với natri dodexyl sulfat (CE-SDS), ví dụ như được mô tả trong WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả).

Trong bản mô tả này, biến thể không được khử hoặc “biến thể khử không hoàn toàn” là biến thể của kháng thể loại chính mà không thể được khử bằng hoá chất thành chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng cách xử lý với tác nhân khử như dithiothreitol. Các biến

thể này có thể được đánh giá bằng cách xử lý hỗn hợp này với tác nhân khử và đánh giá hỗn hợp thu được bằng cách sử dụng phương pháp đánh giá kích cỡ protein, như điện di mao quản với natri dodecyl sulfat (CE-SDS), ví dụ bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả).

Kháng thể biến thể glycosyl hóa trong bản mô tả này là kháng thể có một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon gắn với nó khác biệt với một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được gắn với kháng thể loại chính. Theo một phương án, biến thể glycosyl hoá có cấu trúc oligosacarit được gắn với một hoặc cả hai chuỗi nặng của kháng thể, ví dụ ở gốc 299 của chuỗi nặng. Theo một phương án, kháng thể loại chính (ví dụ Pertuzumab) bao gồm oligosacarit G0 làm oligosacarit chiếm ưu thế được gắn với vùng Fc của nó. Cấu trúc oligosacarit được gắn với IgG1 ví dụ được mô tả trong Fig. 24A- Fig. 24B. Các ví dụ về các biến thể glycosyl hoá trong bản mô tả này bao gồm biến thể không được fucosyl hoá, kháng thể với cấu trúc oligosacarit G1 hoặc G2, thay cho cấu trúc oligosacarit G0, được gắn với vùng Fc của nó (“biến thể glycosyl hoá G1” hoặc “biến thể glycosyl hoá G2”), kháng thể không có hydrat cacbon được gắn với một hoặc hai chuỗi nặng của kháng thể (“biến thể chuỗi nặng không được glycosyl hoá”), biến thể được sialyl hóa, v.v., cũng như tổ hợp của các biến đổi glycosyl hoá này. Xem, ví dụ Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả).

Trong trường hợp kháng thể có vùng Fc, cấu trúc oligosacarit có thể được gắn với một hoặc hai chuỗi nặng của kháng thể, ví dụ ở gốc 299. Theo một phương án, G0 là cấu trúc oligosacarit chiếm ưu thế, với cấu trúc oligosacarit khác như G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) và G2 được tìm thấy với lượng ít hơn trong chế phẩm này.

Trừ khi có quy định khác, cấu trúc oligosacarit G1 trong bản mô tả này bao gồm các cấu trúc G1(1-6) và G1(1-3).

Trong bản mô tả này, biến thể được sialyl hóa là biến thể của kháng thể loại chính bao gồm một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được sialyl hóa được gắn với một hoặc hai chuỗi nặng của nó. Biến thể được sialyl hóa có thể có thể được nhận biết bằng cách đánh giá hỗn hợp (ví dụ, bằng sắc ký trao đổi ion) kèm theo hoặc không kèm theo xử lý với sialidaza, ví dụ như được mô tả trong WO 2009/099829.

Biến thể được glycat hóa là kháng thể mà đường, như glucoza, được gắn cộng hoá trị vào đó, ví dụ với một hoặc cả hai các chuỗi nhẹ của nó. Sự cộng hợp này có thể xảy ra do phản ứng của glucoza với gốc lysin trên protein (ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào). Biến thể được glycat hóa có thể có thể được nhận biết bằng phân tích phổ khối kháng thể được khử bằng cách đánh giá sự tăng khối lượng các chuỗi nặng hoặc các chuỗi nhẹ. Biến thể được glycat hóa cũng có thể được định lượng bằng sắc ký Boronate như được giải thích trong WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả).

Kháng thể khử amit là một kháng thể trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin của nó được tạo dẫn xuất, ví dụ với axit aspartic, suxinimit, hoặc axit iso-aspartic. Ví dụ về kháng thể khử amit là biến thể pertuzumab, trong đó Asn-386 và/hoặc Asn-391 trên một hoặc hai chuỗi nặng của Pertuzumab được khử amit. Xem, ví dụ WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả).

Biến thể đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin trong bản mô tả này chỉ kháng thể loại chính với một hoặc nhiều gốc axit amin của trình tự dẫn đầu đầu tận amin ở đầu tận amin của một hoặc nhiều chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ bất kỳ của kháng thể loại chính. Đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin bao gồm hoặc gồm có 3 gốc axit amin, -VHS, có mặt trên một hoặc cả hai chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể, được gọi là “biến thể-VHS” trong bản mô tả này. Xem Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả).

“Biến thể lysin đầu tận C” chỉ biến thể bao gồm gốc lysin (K) ở đầu tận C của chuỗi nặng của nó. Xem, Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả).

“Biến thể được oxy hoá methionin” chỉ biến thể chứa một hoặc nhiều gốc methionin được oxy hoá trong đó, ví dụ Met-254 được oxy hoá. Xem, Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả).

Thuật ngữ "bệnh ung thư" chỉ tình trạng sinh lý ở động vật có vú thông thường đặc trưng bởi sự tăng trưởng tế bào không kiểm soát. Ví dụ về bệnh ung thư trong bản mô tả này bao gồm ung thư vú (ví dụ bệnh ung thư vú di căn), ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng, ung thư phúc mạc nguyên phát, và ung thư ống dẫn trứng. Ví dụ về bệnh ung thư trong bản mô tả này bao gồm bệnh ung thư dương tính HER2 và bệnh ung thư HER3 thấp.

Bệnh ung thư hoặc mẫu sinh phẩm “có sự biểu hiện, khuếch đại, hoặc hoạt hoá

HER” là một trường hợp, trong xét nghiệm chẩn đoán, biểu hiện (bao gồm biểu hiện quá mức) thụ thể HER, có gen HER được khuếch đại, và/hoặc theo cách khác chứng tỏ sự hoạt hoá hoặc phosphoryl hoá thụ thể HER.

Bệnh ung thư “dương tính HER2” bao gồm các tế bào ung thư có mức HER2 cao hơn bình thường. Ví dụ về bệnh ung thư dương tính HER2 bao gồm ung thư vú dương tính HER2 và ung thư dạ dày dương tính HER2. Các phương pháp xác định bệnh ung thư dương tính HER2 bao gồm: các thử nghiệm xác định protein HER2 như thử nghiệm hoá mô miễn dịch (IHC), các thử nghiệm xác định axit nucleic mã hoá HER2 như lai in situ (ISH), bao gồm các kỹ thuật lai huỳnh quang in situ (FISH; xem WO98/45479 công bố tháng 10, 1998) và lai sinh màu in situ (CISH; xem, ví dụ Am. J. Pathol. 157(5): 1467–1472 (2000) của Tanner và các đồng tác giả; J. Clin. Oncol. 26: (May 20 suppl; abstr 22147) (2008) của Bella và các đồng tác giả), thẩm tách Southern, hoặc phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), như PCR thời gian thực định lượng (qRT-PCR); các thử nghiệm kháng nguyên giải phóng (ví dụ HER2 ECD) (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,933,294 cấp ngày 12 tháng 6 năm 1990; và Patent Mỹ số 5,401,638 cấp ngày 28 tháng 3 năm 1995); và các thử nghiệm in vivo. Tuy ý, bệnh ung thư dương tính HER2 có điểm hoá mô miễn dịch (IHC) 2+ hoặc 3+ và/hoặc tỷ lệ khuếch đại lai in situ (ISH) $\geq 2,0$.

Bệnh ung thư “HER3 thấp” bao gồm các tế bào ung thư có mức HER3 thấp hơn bình thường. Ví dụ về bệnh ung thư HER3 thấp bao gồm ung thư biểu mô buồng trứng, ung thư biểu mô phúc mạc nguyên phát, và ung thư biểu mô ống dẫn trứng. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,981,418 (Amler và các đồng tác giả). Theo một phương án, HER3 thấp được xác định dựa trên các mức biểu hiện ARNt HER3 (tỷ lệ nồng độ bằng hoặc thấp hơn 2,81, như được đánh giá bằng qRT-PCR trên thiết bị COBAS z480®).

"Epitop 2C4" là vùng trong miền ngoại bào của HER2 mà kháng thể 2C4 gắn vào. Để sàng lọc các kháng thể hầu như liên kết với epitop 2C4, có thể thực hiện thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow và David Lane (1988). Tốt hơn là, kháng thể phong bế khả năng liên kết của 2C4 với HER2 ở mức 50% hoặc cao hơn. Theo cách khác, có thể tiến hành lập bản đồ epitop để đánh giá kháng thể hầu như liên kết với epitop 2C4 của HER2. Epitop 2C4 bao gồm các gốc từ

Miền phụ II (SEQ ID NO: 2) trong miền ngoại bào của HER2. 2C4 và Pertuzumab liên kết với miền ngoại bào của HER2 ở điểm giao nhau của các Miền phụ I, II và III (tương ứng là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, và SEQ ID NO:3). Cancer Cell 5:317-328 (2004) của Franklin và các đồng tác giả.

Thuật ngữ “điều trị” chỉ cả các biện pháp điều trị trị liệu và phòng bệnh hoặc phòng ngừa. Những người có nhu cầu điều trị bao gồm những người đã mắc bệnh ung thư cũng như những người cần phòng bệnh ung thư. Do đó, bệnh nhân được điều trị trong bản mô tả này có thể đã được chẩn đoán mắc bệnh ung thư hoặc có thể dễ mắc hoặc nhạy cảm với bệnh ung thư.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng thuốc hữu hiệu để điều trị ung thư ở bệnh nhân này. Lượng hữu hiệu của thuốc có thể làm giảm số lượng các tế bào ung thư; giảm kích cỡ khối u; ức chế (có nghĩa là, làm chậm ở mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng) sự thâm nhiễm tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (có nghĩa là, làm chậm ở mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng) di căn khối u; ức chế, ở mức độ nhất định, tăng trưởng khối u; và/hoặc làm giảm nhẹ ở mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng kèm theo bệnh ung thư. Mức độ mà thuốc có thể ngăn ngừa sự phát triển và/hoặc giết chết các tế bào ung thư hiện hữu, thuốc có thể là độc tế bào và/hoặc kìm tế bào. Lượng hữu hiệu có thể kéo dài thời gian sống sót không có bệnh tiến triển (ví dụ, như được xác định bằng các chỉ số đánh giá đáp ứng cho khối u rắn, RECIST, hoặc thay đổi CA-125), dẫn đến đáp ứng khách quan (bao gồm đáp ứng một phần, PR, hoặc đáp ứng hoàn toàn, CR), gia tăng thời gian sống sót tổng thể, và/hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư (ví dụ, như được đánh giá bằng FOSI).

Liều dùng “cố định” hoặc “không thay đổi” của chất trị liệu trong bản mô tả này chỉ liều dùng được sử dụng cho bệnh nhân là người, không xét đến cân nặng (WT) hoặc diện tích bề mặt cơ thể (BSA) của bệnh nhân. Liều dùng cố định hoặc không thay đổi do đó không được cung cấp dưới dạng liều mg/kg hoặc mg/m², mà đúng hơn là dưới dạng lượng tuyệt đối của chất trị liệu.

Thuật ngữ “vật đựng” chỉ vật có thể được sử dụng để đựng hoặc chứa được phẩm hoặc chế phẩm. Ví dụ về các vật đựng trong bản mô tả này bao gồm lọ, xi-lanh, túi truyền tĩnh mạch, v.v.

Thuật ngữ “túi truyền tĩnh mạch” hoặc “túi IV” là túi đựng dung dịch có thể được sử dụng qua tĩnh mạch của bệnh nhân. Theo một phương án, dung dịch là dung dịch nước muối (ví dụ khoảng 0,9% hoặc khoảng 0,45% NaCl). Tùy ý, túi IV được làm bằng polyolefin hoặc polyvinyl clorua.

Thuật ngữ “lọ” là vật đựng thích hợp để đựng chế phẩm lỏng hoặc chế phẩm đông khô. Theo một phương án, lọ là lọ dùng một lần, ví dụ lọ dùng một lần 20 ml có nút đậy.

“Tờ hướng dẫn sử dụng” là tờ giấy in rời theo quy định của Cục Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) hoặc cơ quan quản lý khác, cần phải cho vào bên trong bao gói của thuốc kê đơn. Tờ giấy in rời nói chung bao gồm nhãn hiệu hàng hoá của thuốc, tên gốc, và cơ chế tác dụng; nêu rõ chỉ định, chống chỉ định, cảnh báo, thận trọng, tác dụng bất lợi và dạng phân liều; và bao gồm hướng dẫn liều, thời gian và đường dùng khuyến cáo.

“Dược phẩm” là chế phẩm chứa thuốc có dược tính (ví dụ Pertuzumab và các dạng biến thể như được đề cập trong bản mô tả này) và một hoặc nhiều “tá dược dược dụng” (ví dụ chất đệm, chất làm ổn định, chất điều hoà độ đẳng trương, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt, v.v.) mà có thể được sử dụng an toàn cho bệnh nhân. Các chế phẩm này ví dụ có thể ở dạng lỏng hoặc đông khô.

Protein “tái tổ hợp” là protein được sản xuất bởi tế bào vật chủ được cải biến về gen, như tế bào vật chủ buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO).

“Quy mô sản xuất” chỉ sản xuất thuốc protein (ví dụ kháng thể) ở quy mô thương mại, ví dụ ở 12.000 lít (L) hoặc cao hơn, sử dụng quy trình thương mại đã được FDA hoặc cơ quan quản lý khác phê duyệt.

“Tinh chế” chỉ một hoặc nhiều bước tinh chế, như sắc ký Protein A, sắc ký trao đổi ion v.v.

Biến thể “được phân lập” chỉ biến thể đã được tách từ kháng thể loại chính hoặc kiểu đại bằng một hoặc nhiều quy trình tinh chế hoặc phân tích. Biến thể được phân lập này có thể được đánh giá về hoạt tính sinh học và/hoặc hiệu lực của nó.

II. Các chế phẩm kháng thể

(i) Kháng thể loại chính

Các chế phẩm kháng thể trong bản mô tả này bao gồm kháng thể liên kết HER2 (kháng thể HER2), tùy ý kháng thể HER2 được làm giống như của người. Các kháng thể được làm giống như của người trong bản mô tả này có thể, ví dụ, bao gồm các gốc vùng siêu biến đổi không phải của người được hợp nhất vào miền biến đổi chuỗi nặng của người và có thể còn bao gồm thay thế vùng khung (FR) ở vị trí được chọn từ nhóm gồm 69H, 71H và 73H sử dụng hệ đánh số miền biến đổi của Kabat và các đồng tác giả, trong: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Theo một phương án, kháng thể được làm giống như của người bao gồm các thay thế FR ở hai trong số hoặc tất cả các vị trí 69H, 71H và 73H.

Kháng thể được làm giống như của người được quan tâm ví dụ trong bản mô tả này bao gồm các gốc CDR VH:

- GFTFTDYTMX (SEQ ID NO: 17), trong đó X tốt hơn là D hoặc S, ví dụ GFTFTDYTMD (SEQ ID NO: 23) cho CDR-H1;
- DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO: 18) cho CDR-H2; và/hoặc
- NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 19) cho CDR-H3, tùy ý bao gồm các cải biến axit amin của các gốc CDR này, ví dụ trong đó các cải biến về cơ bản là duy trì hoặc cải thiện ái lực của kháng thể. Ví dụ, biến thể kháng thể để sử dụng trong các phương pháp của sáng chế có thể có từ 1 đến 7 hoặc khoảng 5 thay thế axit amin trong các trình tự CDR biến đổi chuỗi nặng nêu trên. Các biến thể kháng thể này có thể được điều chế bằng cách làm trưởng thành ái lực, ví dụ, như mô tả dưới đây.

Kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm các gốc CDR VL:

- KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 20) cho CDR-L1;
- SASYX¹X²X³, trong đó X¹ tốt hơn là R hoặc L, X² tốt hơn là Y hoặc E, và X³ tốt hơn là T hoặc S (SEQ ID NO: 21), ví dụ SASYRYT (SEQ ID NO: 24) cho CDR-L2; và/hoặc
- QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 22) cho CDR-L3,

ví dụ ngoài các gốc CDR miền biến đổi chuỗi nặng nêu trên.

Các kháng thể được làm giống như của người này tùy ý bao gồm các cải biến axit amin của các gốc CDR nêu trên, ví dụ trong đó các cải biến hầu như duy trì hoặc

cải thiện ái lực của kháng thể. Ví dụ, kháng thể biến thể quan tâm có thể có từ 1 đến 7 hoặc khoảng 5 thay thế axit amin trong các trình tự CDR biến đổi chuỗi nhẹ nêu trên. Các biến thể kháng thể này có thể được điều chế bằng cách làm trưởng thành ái lực.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể được làm trưởng thành ái lực liên kết HER2. Kháng thể gốc có thể là kháng thể của người hoặc kháng thể được làm giống như của người, ví dụ, một kháng thể bao gồm các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc biến đổi chuỗi nặng tương ứng của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 (nghĩa là bao gồm VL và/hoặc VH của Pertuzumab). Biến thể được làm trưởng thành ái lực của Pertuzumab tốt hơn là liên kết với thụ thể HER2 với ái lực lớn hơn ái lực của 2C4 hoặc Pertuzumab của chuột (ví dụ ái lực được cải thiện từ khoảng 2 hoặc khoảng 4 lần, đến khoảng 100 lần hoặc khoảng 1000 lần, ví dụ như được đánh giá bằng cách sử dụng HER2 ECD ELISA). Các gốc CDR biến đổi chuỗi nặng ví dụ để thay thế bao gồm H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, hoặc tổ hợp của 2 hoặc nhiều (ví dụ 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 gốc này). Ví dụ về các gốc CDR biến đổi chuỗi nhẹ để biến đổi bao gồm L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 hoặc tổ hợp của 2 hoặc nhiều (ví dụ 2 đến 3, 4, 5 hoặc tối đa đến khoảng 10 gốc này).

Các dạng khác nhau của kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm trưởng thành ái lực được tính đến. Ví dụ, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm trưởng thành ái lực. Theo cách khác, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm trưởng thành ái lực có thể là kháng thể nguyên vẹn, như kháng thể IgG1 nguyên vẹn.

Tốt hơn là, kháng thể HER2 (một trong hai hoặc cả hai kháng thể loại chính HER2 và biến thể kháng thể của nó) là kháng thể liên kết với Miền phụ II của HER2, ức chế sự dimer hóa HER hiệu quả hơn Trastuzumab, và/hoặc liên kết với vị trí liên kết dị dimer của HER2. Kháng thể loại chính được ưu tiên là kháng thể chứa các trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ và biến đổi chuỗi nặng trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, và tốt nhất là chứa các trình tự axit amin chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 15 và trình tự axit amin chuỗi nặng trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 16.

(ii) Các biến thể xystein không ghép cặp

Các Ví dụ 1 và 3 trong bản mô tả này mô tả các biến thể xystein không ghép

cặp của Pertuzumab. Các thử nghiệm phân tích để phân lập, xác định đặc tính, và định lượng các biến thể này bao gồm các thử nghiệm đánh giá đặc hiệu các liên kết disulfua trong chuỗi (phân biệt với liên kết disulfua giữa các chuỗi), ví dụ, phân tích sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) các mảnh kháng thể (ví dụ mảnh Fab) như trong Ví dụ 1, HIC kháng thể nguyên vẹn như trong Ví dụ 1, phân tích bản đồ peptit các kháng thể được gắn nhãn phân biệt như trong Ví dụ 3, và/hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) như trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này và trong Anal. Chem. 84(16):7112-7123 (2012) của Zhang và các đồng tác giả.

Nói chung, dạng chủ yếu của Pertuzumab bao gồm liên kết disulfua giữa Cys23 và Cys88 ở cả hai miền VL của hai miền Fab của nó. Xem Fig. 6.

Một biến thể xystein không ghép cặp trong bản mô tả này, biến thể dị đime, không có liên kết disulfua Cys23/Cys88 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của 1 trong 2 vùng Fab của nó. Xem Fig. 20(b). Biến thể này đã được xác định là biến thể xystein không ghép cặp chủ yếu.

Biến thể xystein không ghép cặp khác trong bản mô tả này, biến thể homodime, không có các liên kết disulfua Cys23/Cys88 ở cả hai vùng Fab của nó. Xem Fig. 20(c).

Theo một phương án, hàm lượng biến thể xystein không ghép cặp trong chế phẩm này (bao gồm biến thể homodime và biến thể dị đime) là $\leq$ khoảng 25%, ví dụ, theo xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) Fab.

Theo một phương án, lượng biến thể homodime trong chế phẩm này là $\leq$ 4,9% như được xác định bằng HIC của kháng thể nguyên vẹn.

Theo một phương án, lượng biến thể dị đime trong chế phẩm này là trong khoảng từ 13% đến khoảng 18%, ví dụ, như được xác định bằng HIC của kháng thể nguyên vẹn.

Chế phẩm này tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều biến thể bổ sung như mô tả dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến biến thể xystein không ghép cặp được phân lập của Pertuzumab, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab. Biến thể xystein không ghép cặp được phân lập này có thể bao gồm hoặc gồm có biến

thể dị đime và/hoặc biến thể homodime. Các biến thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp HIC hoặc tinh chế khác, và có thể được thử nghiệm sinh học như thử nghiệm hiệu lực (sử dụng các tế bào ung thư vú dương tính HER2) như trong Ví dụ 1 dưới đây.

(iii) Biến thể không được fucosyl hoá

Các ví dụ 2 và 4 trong bản mô tả này mô tả các biến thể không được fucosyl hoá của Pertuzumab và chứng tỏ cách xác định hoạt tính ADCC dựa trên % Pertuzumab không được fucosyl hoá trong chế phẩm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa Pertuzumab và biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hoá chiếm nhiều hơn 2% chế phẩm. Xem, ví dụ, anti2C4907-2, và Mẫu thử 1 trong Bảng 9 dưới đây.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm Pertuzumab và biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hoá chiếm từ 0,9 đến 4,1% chế phẩm. Lượng biến thể không được fucosyl hoá có thể, ví dụ, được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm CE-LIF đã được thẩm định trong Ví dụ 4.

Tuỳ ý, chế phẩm này còn chứa các biến thể xystein không ghép cặp (dị đime và/hoặc homodime như được mô tả ở trên) và/hoặc các biến thể bổ sung được mô tả dưới đây.

(iv) LMWS và HMWS

Sáng chế còn đề cập đến loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab và/hoặc loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab ở dạng được phân lập hoặc trong chế phẩm chứa (các) biến thể và kháng thể loại chính. LMWS và HMWS có thể được phân lập, xác định đặc tính, và được định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, không giới hạn ở, sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (SE-HPLC), và/hoặc điện di mao quản natri dodecyl sulfat (CE-SDS).

Bằng cách sử dụng thử nghiệm SE-HPLC (ví dụ như trong Ví dụ 5), lượng Pertuzumab loại chính và HMWS hoặc LMWS trong chế phẩm có thể là:

Pic chính: $\geq$ khoảng 96%, ví dụ, $\geq$ khoảng 96,7%, $\geq$ khoảng 97,3%, ví dụ, $\geq$ khoảng 97,4%.

HMWS: $\leq$ khoảng 2%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,7%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,5%, ví dụ $\leq$ khoảng 1,4%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,8%.

LMWS: $\leq$ khoảng 2%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,6%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,2%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,6%.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm NR-CE-SDS (ví dụ như trong Ví dụ 5), lượng Pertuzumab loại chính và HMWS hoặc LMWS trong chế phẩm có thể là:

Pic chính: $\geq$ khoảng 95%, ví dụ, $\geq$ khoảng 96,0%, ví dụ, $\geq$ khoảng 97,8%.

HMWS: $\leq$ khoảng 1%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,6%.

LMWS: $\leq$ khoảng 4%, ví dụ $\leq$ khoảng 3,4%.

Ví dụ, lượng Pic chính hoặc Pertuzumab loại chính (ngoại trừ LMWS và HMWS) theo xác định bằng CE-SDS có thể là từ khoảng 95% đến khoảng 99%, ví dụ, từ khoảng 96,0% đến khoảng 97,8%, ví dụ từ khoảng 95,3% đến khoảng 97,3% Pic chính.

Tuỳ ý, LMWS bao gồm hoặc gồm có “Pic 6” như thu được bằng NR-CE-SDS (xem, Ví dụ 5). Pic 6 có thể được xác định là từ khoảng 0,9% đến khoảng 2,3%, ví dụ khoảng 2% đến khoảng 2,3% chế phẩm này.

(v) Các Mảnh Pic 1 và Pic 2 của Pertuzumab

Sáng chế còn đề cập đến (các) mảnh Pic 1 và/hoặc (các) mảnh Pic 2 của Pertuzumab ở dạng được phân tách hoặc được phân lập hoặc ở dạng chế phẩm chứa (các) mảnh và kháng thể loại chính. Pic 1 và Pic 2 có thể được phân lập, xác định đặc tính, và được định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, không giới hạn ở, sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ kích cỡ (SE-HPLC), và/hoặc điện di mao quản natri dodecyl sulfat (CE-SDS), bao gồm điện di mao quản natri dodecyl sulfat được khử (R-CE-SDS) và điện di mao quản natri dodecyl sulfat không được khử (NR-CE-SDS). Theo một phương án, Pic 1 và Pic 2 được phân tách và/hoặc được phân tích bằng R-CE-SDS, ví dụ như mô tả trong các Ví dụ 5 và 6 và diện tích pic đã hiệu chỉnh (CPA) cho % Pic 1 hoặc Pic 2 trong chế phẩm này.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm R-CE-SDS (ví dụ như trong các Ví dụ 5 và 6), lượng Pic 1 trong hỗn hợp là $\leq 5\%$ (ví dụ từ 0,13% đến 0,41% CPA) và lượng Pic 2 trong chế phẩm là $\leq 1,0\%$ (ví dụ từ 0,47% đến 0,74% CPA).

(vi) Các biến thể bổ sung

Các chế phẩm trong bản mô tả này tùy ý bao gồm các biến thể bổ sung của Pertuzumab như các biến thể được mô tả trong Patent Mỹ số 7,560,111 (Kao và các đồng tác giả) và/hoặc trong WO 2009/099829 (Harris và các đồng tác giả).

Các ví dụ về các biến thể bổ sung này bao gồm, không giới hạn ở, một hoặc nhiều biến thể bất kỳ sau đây: biến thể được glycat hóa, biến thể được khử disulfua, biến thể không được khử, biến thể khử amit, biến thể được sialyl hóa, biến thể-VHS, biến thể lysin đầu tận C, biến thể được oxy hoá methionin, biến thể không được fucosyl hoá, biến thể glycosyl hoá G1, biến thể glycosyl hoá G2, và biến thể chuỗi nặng không được glycosyl hoá.

Ví dụ, chế phẩm này có thể chứa các biến thể axit (xem WO 2009/099829, Harris và các đồng tác giả), trong đó các biến thể axit trong hỗn hợp này có thể bao gồm 1, 2, 3, 4, hoặc 5 biến thể trong số biến thể được glycat hóa, biến thể khử amit, biến thể được khử disulfua, biến thể được sialyl hóa, và biến thể không được khử. Tốt hơn là, tổng lượng các biến thể axit trong chế phẩm này nhỏ hơn khoảng 25%. Theo một phương án, biến thể được glycat hóa, biến thể khử amit, biến thể được khử disulfua, biến thể được sialyl hóa, và biến thể không được khử chiếm ít nhất là khoảng 75-80% các biến thể axit trong chế phẩm này.

Các biến thể axit có thể được đánh giá bằng nhiều phương pháp, nhưng tốt hơn là các phương pháp này bao gồm 1, 2, 3, 4, hoặc 5 phương pháp trong số các phương pháp: sắc ký trao đổi ion (IEC), trong đó chế phẩm được xử lý bằng sialidaza trước, sau và hoặc trong khi IEC (ví dụ để đánh giá biến thể được sialyl hóa), CE-SDS được khử (ví dụ để đánh giá biến thể được khử disulfua), CE-SDS không được khử (ví dụ để đánh giá biến thể không được khử), sắc ký Boronate (ví dụ để đánh giá biến thể được glycat hóa), và bản đồ peptit (ví dụ để đánh giá biến thể khử amit).

Chế phẩm này tùy ý chứa biến thể kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin. Tốt hơn là, kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin là ở chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể (ví dụ trên một hoặc hai chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể). Biến thể kháng thể trong bản

mô tả này có thể chứa đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin ở một hoặc nhiều trong số các chuỗi nặng hoặc các chuỗi nhẹ của nó. Tốt hơn là, đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin là ở một hoặc hai chuỗi nhẹ của kháng thể. Đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin tốt hơn là bao gồm hoặc gồm có -VHS (có nghĩa là biến thể-VHS). Sự có mặt của đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin trong chế phẩm này có thể được phát hiện bằng nhiều kỹ thuật phân tích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tích trình tự đầu tận N, thử nghiệm tính không đồng nhất điện tích (ví dụ, sắc ký trao đổi cation hoặc điện di mao quản), phổ khối lượng v.v. Lượng biến thể kháng thể trong hỗn hợp này nói chung nằm trong khoảng từ lượng là ngưỡng phát hiện dưới của thử nghiệm bất kỳ (tốt hơn là phân tích trao đổi) được sử dụng để phát hiện biến thể đến lượng thấp hơn lượng kháng thể loại chính. Nói chung, khoảng 20% hoặc thấp hơn (ví dụ từ khoảng 1% đến khoảng 15%, ví dụ từ 5% đến khoảng 15%, và tốt hơn là từ khoảng 8% đến khoảng 12%) các phân tử kháng thể trong chế phẩm này bao gồm đoạn kéo dài trình tự dẫn đầu đầu tận amin. Lượng % này tốt hơn là được xác định bằng cách sử dụng phân tích trao đổi cation.

Các biến đổi trình tự axit amin khác nữa của kháng thể loại chính và/hoặc biến thể được tính đến, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở kháng thể bao gồm gốc lysin đầu tận C trên một hoặc cả hai chuỗi nặng của nó (biến thể kháng thể này có thể có mặt với lượng từ khoảng 1% đến khoảng 20%), kháng thể với một hoặc nhiều gốc methionin được oxy hoá (ví dụ, Pertuzumab bao gồm Met-254 được oxy hoá) v.v.

Hơn nữa, ngoài biến thể không được fucosyl hoá và biến thể được sialyl hóa nêu trên, kháng thể loại chính hoặc biến thể có thể bao gồm các biến đổi glycosyl hoá bổ sung, các ví dụ không mang tính giới hạn về các kháng thể này bao gồm kháng thể bao gồm cấu trúc oligosacarit G1 hoặc G2 được gắn với vùng Fc của nó, kháng thể bao gồm một hoặc hai chuỗi nặng không được glycosyl hoá v.v.

III. Phương pháp sản xuất và phân tích

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp đánh giá chế phẩm Pertuzumab bao gồm 1, 2, 3, 4 trong số: (1) xác định lượng của biến thể xystein không ghép cặp trong chế phẩm này, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab, và/hoặc (2) xác định lượng của không được fucosyl hoá

Pertuzumab trong chế phẩm này, và/hoặc (3) xác định lượng của loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab trong chế phẩm này, và/hoặc (4) xác định lượng của loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab trong chế phẩm này. Tùy ý, tiến hành tất cả 4 thử nghiệm phân tích cho hỗn hợp bao gồm Pertuzumab và các biến thể của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm bao gồm: (1) sản xuất hỗn chế phẩm chứa Pertuzumab và một hoặc nhiều biến thể của nó, và (2) thử nghiệm chế phẩm được sản xuất này trong một hoặc nhiều thử nghiệm phân tích để đánh giá lượng của (các) biến thể có trong đó. (Các) thử nghiệm phân tích có thể đánh giá và định lượng lượng một hoặc nhiều biến thể trong số: (i) biến thể xystein không ghép cặp này chứa các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và/hoặc (ii) biến thể dị đime bao gồm các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 chỉ ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và/hoặc (iii) biến thể homodime bao gồm các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và/hoặc (iv) biến thể không fucosyl hoá của Pertuzumab và/hoặc (v) loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab và/hoặc (vi) loại phân tử lượng thấp (LMWS) của Pertuzumab, và/hoặc (vii) (các) mảnh Pic 1 của Pertuzumab và/hoặc (viii) (các) mảnh Pic 2 của Pertuzumab. Do đó, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 biến thể này có thể được phân tích.

Tùy ý, thử nghiệm phân tích đánh giá, định lượng, hoặc phân lập biến thể xystein không ghép cặp, bao gồm các biến thể dị đime và/hoặc homodime. Ví dụ, thử nghiệm phân tích có thể bao gồm sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) kháng thể mảnh (ví dụ mảnh Fab) hoặc kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ 1), phân tích bản đồ peptit (xem Ví dụ 3), hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (HPLC) (ví dụ, xem Ví dụ 3).

Theo một phương án, hàm lượng biến thể xystein không ghép cặp (biến thể dị đime và/hoặc homodime) trong chế phẩm này là $\leq$ khoảng 25% theo xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) Fab.

Theo một phương án, hàm lượng biến thể homodime trong chế phẩm này là $\leq$ 4,9% theo xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) kháng thể nguyên vẹn.

Theo một phương án, hàm lượng biến thể dị đime trong chế phẩm này là từ khoảng 13% đến khoảng 18% theo xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) kháng thể nguyên vẹn.

Tuỳ ý, thử nghiệm phân tích đánh giá, định lượng, hoặc phân lập biến thể không được fucosyl hoá. Lượng biến thể không được fucosyl hoá có thể được sử dụng để xác định hoặc định lượng hoạt tính sinh học, ví dụ ADCC, của hỗn hợp này.

Ngoài ra, phương pháp này bao gồm đánh giá hoạt tính sinh học của chế phẩm Pertuzumab bao gồm xác định lượng không được fucosyl hoá của biến thể Pertuzumab trong chế phẩm này để xác định hoạt tính độc tính thể bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC) của chế phẩm này, và xác nhận hàm lượng không được fucosyl hoá của Pertuzumab là nằm trong khoảng từ 0,9% đến khoảng 4,1%. Ví dụ, phương pháp này bao gồm xác định lượng không được fucosyl hoá của Pertuzumab bằng cách sử dụng điện di mao quản-huỳnh quang được cảm ứng bằng-laze (CE-LIF).

Tuỳ ý, thử nghiệm phân tích để đánh giá mức không fucosyl hoá là điện di mao quản (CE), bao gồm điện di mao quản-huỳnh quang được cảm ứng bằng-laze (CE-LIF), xem, các ví dụ 2 và 4 dưới đây. Hàm lượng biến thể không được fucosyl hoá tuỳ ý từ khoảng 0,9 đến khoảng 4,1% của chế phẩm này (ví dụ như được xác định bằng CE-LIF trong Ví dụ 4). Theo một phương án, hàm lượng biến thể không được fucosyl hoá chiếm > 2% chế phẩm (ví dụ như được xác định bằng CE-LIF trong Ví dụ 4).

Tuỳ ý, thử nghiệm phân tích đánh giá, định lượng, hoặc phân lập loại phân tử lượng thấp (LMWS) và/hoặc loại phân tử lượng cao (HMWS) của Pertuzumab. Các thử nghiệm ví dụ bao gồm SE-HPLC và/hoặc CE-SDS (xem, ví dụ 5 dưới đây).

Theo một phương án, thử nghiệm phân tích bao gồm SE-HPLC (ví dụ như trong Ví dụ 5), và hàm lượng Pertuzumab loại chính, HMWS hoặc LMWS trong chế phẩm đã phân tích được xác định như sau:

Pic chính: $\geq$ khoảng 96%, ví dụ, $\geq$ khoảng 96,7%, $\geq$ khoảng 97,3%, ví dụ, $\geq$ khoảng 97,4%.

HMWS: $\leq$ khoảng 2%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,7%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,5%, ví dụ $\leq$ khoảng 1,4%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,8%.

LMWS: $\leq$ khoảng 2%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,6%, ví dụ, $\leq$ khoảng 1,2%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,6%.

Theo một phương án, thử nghiệm phân tích bao gồm CE-SDS (ví dụ như trong Ví dụ 5), và hàm lượng Pertuzumab loại chính và HMWS hoặc LMWS Pertuzumab trong chế phẩm đã phân tích được xác định như sau:

Pic chính: $\geq$ khoảng 95%, ví dụ, $\geq$ khoảng 96,0%, ví dụ, $\geq$ khoảng 97,8%

HMWS: $\leq$ khoảng 1%, ví dụ $\leq$ khoảng 0,6%.

LMWS: $\leq$ khoảng 4%, ví dụ $\leq$ khoảng 3,4%.

Theo một phương án, chế phẩm được đánh giá bằng NR-CE-SDS, và lượng Pic chính hoặc Pertuzumab loại chính (ngoại trừ LMWS và HMWS) được xác định là từ khoảng 95% đến khoảng 99%, ví dụ, từ khoảng 96,0% đến khoảng 97,8%, ví dụ từ khoảng 95,3% đến khoảng 97,3% chế phẩm này được phân tích như trên.

Theo một phương án, hàm lượng “Pic 6” trong chế phẩm được đánh giá bằng CE-SDS (xem Ví dụ 5), và hàm lượng Pic 6 LMWS được xác định là khoảng 0,9% đến khoảng 2,3%, ví dụ khoảng 2% đến khoảng 2,3% hỗn hợp được phân tích như trên.

Theo một phương án, lượng Pic 1 và/hoặc Pic 2 trong chế phẩm được đánh giá bằng R-CE-SDS (xem, ví dụ 5 và 6), và hàm lượng Pic 1 được xác định là $\leq$ 5% (ví dụ từ 0,13% đến 0,41% CPA) và hàm lượng Pic 2 được xác định là $\leq$ 1,0% (ví dụ từ 0,47% đến 0,74% CPA).

Các phương pháp này tùy ý còn bao gồm kết hợp hỗn hợp đã tinh chế với một hoặc nhiều tá dược được dụng để bào chế dược phẩm. Ngoài ra, dược phẩm có thể được cho vào vật đựng đóng gói kèm theo tờ hướng dẫn sử dụng (ví dụ kèm theo thông tin kê đơn hướng dẫn người dùng sử dụng dược phẩm để điều trị bệnh ung thư) để tạo ra chế phẩm.

IV. Dược phẩm

Các dược phẩm bao gồm Pertuzumab và các biến thể của nó được bào chế để bảo quản bằng cách trộn hỗn hợp có độ tinh khiết mong muốn với tá dược được dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), nói chung ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Tinh thể kháng thể cũng được

tính đến (xem Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2002/0136719). Tá dược được dùng là không độc với người dùng ở liều lượng và nồng độ sử dụng, và bao gồm các chất đệm như histidin axetat; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các polypeptit phân tử lượng thấp (< khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manosa, hoặc các dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối ứng tạo muối như natri; các phức hợp kim loại (ví dụ các phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động không ion như các polysorbat (ví dụ polysorbat 20 hoặc 80), PLURONICS™ hoặc polyetylen glycol (PEG).

Các chế phẩm kháng thể đông khô được mô tả trong Patent Mỹ số 6,267,958, Patent Mỹ số 6,685,940 và Patent Mỹ số 6,821,515, được viện dẫn ở đây để tham khảo. Dược phẩm Trastuzumab ví dụ là bột đông khô không có chất bảo quản màu từ trắng đến vàng nhạt, vô trùng để sử dụng tĩnh mạch (IV), bao gồm 440 mg Trastuzumab, 400 mg α,α -trehaloza dehydrat, 9,9 mg L-histidin-HCl, 6,4 mg L-histidin, và 18 mg polysorbate 20. Pha hoàn nguyên với 20 mL nước kim khuẩn để tiêm (BWF), có chứa 1,1% rượu benzylic làm chất bảo quản, cho dung dịch đa liều có chứa 21 mg/mL Trastuzumab, ở pH xấp xỉ 6,0.

Dược phẩm Pertuzumab ví dụ để sử dụng điều trị bao gồm 30mg/mL Pertuzumab trong 20mM histidin axetat, 120mM sucroza, 0,02% polysorbat 20, ở pH 6,0. Chế phẩm Pertuzumab khác bao gồm 25 mg/mL Pertuzumab, 10 mM đệm histidin-HCl, 240 mM sucroza, 0,02% polysorbat 20, pH 6,0.

Các dược phẩm để sử dụng in vivo cần phải vô trùng. Có thể dễ dàng đạt được vô trùng bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

V. Các ứng dụng và sử dụng điều trị

Các chế phẩm trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú dương tính- HER2, ví dụ bệnh ung thư vú di căn hoặc tái phát khu trú, không thể cắt bỏ, hoặc bệnh Giai đoạn IV de novo, được xác định theo hoá mô miễn dịch (IHC) 3+ và/hoặc tỷ lệ khuếch đại lai huỳnh quang in situ (FISH)

$\geq 2,0$. Tùy ý, các bệnh nhân trong nhóm trước đó chưa được điều trị hoặc tái phát sau liệu pháp phụ trợ, có phân suất tổng máu thất trái (LVEF) $\geq 50\%$ ở đường nền, và/hoặc có chỉ số toàn trạng theo Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS) bằng 0 hoặc 1.

Theo phương án khác, chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú dương tính HER2 giai đoạn đầu, ví dụ, kết hợp với Trastuzumab, và hoá trị liệu, trong đó hoá trị liệu này bao gồm hoá trị liệu dựa trên-anthraxyclin, hoặc hoá trị liệu dựa trên-carboplatin. Theo một phương án, hoá trị liệu bao gồm hoá trị liệu dựa trên-anthraxyclin, ví dụ bao gồm 5-FU, epirubicin, và xyclophosphamit (FEC). Theo phương án khác, hoá trị liệu bao gồm hoá trị liệu dựa trên-carboplatin, ví dụ bao gồm taxan (ví dụ Docetaxel), Carboplatin ngoài HERCEPTIN®/Trastuzumab (ví dụ chế độ TCH). Theo một phương án, chế phẩm được sử dụng đồng thời với hoá trị liệu dựa trên-anthraxyclin hoặc với hoá trị liệu dựa trên-carboplatin, ví dụ trong đó Pertuzumab, Trastuzumab và hoá trị liệu được sử dụng theo các đợt 3 tuần với Pertuzumab, Trastuzumab và hoá trị liệu sẽ sử dụng vào ngày-1 của mỗi đợt. Liệu pháp trị bệnh ung thư vú dương tính HER2 giai đoạn đầu được tính đến trong bản mô tả này bao gồm liệu pháp phụ trợ và liệu pháp phụ trợ mới.

Theo một phương án khác, chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư dạ dày dương tính HER2, tùy ý kết hợp với Trastuzumab và hoá trị liệu, như platin (ví dụ cisplatin) và/hoặc a flopurimidin (ví dụ capecitabin và/hoặc 5-flouracil (5-FU)).

Theo phương án khác, chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú dương tính HER2 tùy ý kết hợp với Trastuzumab và vinorelbin. Bệnh ung thư vú theo phương án này tùy ý là di căn hoặc tiến triển tại chỗ. Tùy ý, bệnh nhân trước đó chưa dùng liệu pháp kháng ung thư không phải hormon toàn thân trong trường hợp di căn.

Theo một khía cạnh khác, chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú dương tính -HER2 ở bệnh nhân bao gồm cho bệnh nhân này dùng chế phẩm, Trastuzumab, và chất ức chế aromataza (ví dụ anastrozol hoặc letrozol). Theo phương án này, bệnh ung thư vú là bệnh ung thư vú tiến triển, bao gồm bệnh ung thư vú dương tính-thụ thể hormon như bệnh ung thư vú dương tính-thụ thể estrogen (ER) và/hoặc thụ thể-progesteron (PgR). Tùy ý, bệnh nhân trước đó chưa dùng liệu pháp kháng ung

thư không phải hormon toàn thân trong trường hợp di căn. Phương pháp điều trị này tùy ý còn bao gồm cho bệnh nhân này dùng hoá trị liệu cảm ứng (ví dụ bao gồm taxan).

Theo một khía cạnh bổ sung, chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư HER3 thấp, như bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư phúc mạc nguyên phát, hoặc bệnh ung thư ống dẫn trứng. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,981,418 (Amler và các đồng tác giả) và Công bố đơn yêu cầu cấp sáng chế Mỹ số US-2006-0013819-A1 (Kelsey, S.).

Các kháng thể và các phương pháp điều trị hoá trị liệu được sử dụng cho bệnh nhân theo các phương pháp đã biết. Phác đồ và chế phẩm sử dụng cụ thể là được mô tả trong các ví dụ trong bản mô tả này.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, khoảng 840mg (liều tấn công) của Pertuzumab được sử dụng, tiếp đó là một hoặc nhiều liều dùng khoảng 420mg ((các) liều duy trì của Pertuzumab. Các liều duy trì tốt hơn là được sử dụng khoảng 3 tuần/1 lần, tổng cộng ít nhất hai liều, cho đến khi bệnh tiến triển trên lâm sàng, hoặc có độc tính không thể kiểm soát được, ví dụ từ 6 đến 20 liều. Các thời gian điều trị kéo dài hơn, kể cả nhiều đợt điều trị hơn, cũng được tính đến.

Theo một phương án cụ thể, trong trường hợp bệnh ung thư là bệnh ung thư dạ dày, Pertuzumab được sử dụng ở liều 840 mg cho tất cả các đợt điều trị.

VI. Vật phẩm

Một phương án chế phẩm trong bản mô tả này bao gồm vật đựng, như lọ, xi-ranh, hoặc túi tĩnh mạch (IV) có chứa chế phẩm hoặc dược phẩm trong bản mô tả này. Tùy ý, chế phẩm còn bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng kèm theo thông tin kê đơn hướng dẫn sử dụng chế phẩm theo phần mô tả ở trên trong bản mô tả này.

VII. Ký gửi vật liệu sinh học

Các dòng tế bào lai dưới đây đã được ký gửi ở American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, Mỹ (ATCC):

Ký hiệu Kháng thể	ATCC No.	Ngày ký gửi
4D5	ATCC CRL 10463	24 tháng 5 năm 1990

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không mang tính giới hạn dưới đây sẽ mô tả sáng chế chi tiết hơn. Tài liệu được viện dẫn ở đây là để tham khảo.

Ví dụ 1

Biến thể xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 của Pertuzumab và đặc tính của nó

Pertuzumab là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người (MAb) dựa trên khung IgG1(κ) của người. Kháng thể tái tổ hợp này được sản xuất bởi các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO) và bao gồm 2 chuỗi nặng (449 gốc axit amin/chuỗi) và hai chuỗi nhẹ (214 gốc axit amin/chuỗi) có các liên kết disulfua giữa các chuỗi và trong chuỗi. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của Pertuzumab tương ứng được thể hiện trong Fig. 3A và Fig. 3B. Khối lượng phân tử Pertuzumab nguyên vẹn được tính bằng 145.197 Da (chỉ tính các chuỗi peptit, không có gốc lysin đầu tận C chuỗi nặng).

Miền CH2 của mỗi chuỗi nặng có vị trí glycosyl hoá bảo toàn duy nhất ở Asn299.

Pertuzumab khác biệt với Trastuzumab (HERCEPTIN[®]) ở các vùng xác định tính hỗ trợ (các CDR) của chuỗi nhẹ (12 khác biệt axit amin) và chuỗi nặng (29 khác biệt axit amin), và thực tế là nó liên kết với epitop khác trên thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô 2 (p185^{HER2}). Khả năng liên kết của Pertuzumab với thụ thể HER2 trên các tế bào biểu mô của người ngăn không cho HER2 tạo thành các phức hợp với các thành viên khác của họ thụ thể HER (bao gồm EGFR, HER3, HER4) và tạo thành các homodime HER2. Do phong bế tạo thành phức hợp, pertuzumab ức chế truyền tín hiệu qua trung gian-phối tử qua hai con đường tín hiệu chính, kinaza protein hoạt hoá tác nhân gây phân bào (MAP) và phosphoinositit 3-kinaza (PI3K), tương ứng dẫn đến ức chế tăng sinh tế bào và sống sót.

Ví dụ này đề cập đến việc nhận biết và xác định đặc tính biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab: biến thể xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 bao gồm các xystein không ghép cặp ở một hoặc cả hai chuỗi nhẹ của kháng thể.

Các sulfhydryl tự do được xác định bằng cách sử dụng chất phản ứng của Ellman, và thể hiện hàm lượng sulfhydryl tự do có tính phản ứng 0,1–0,3 mol/mol protein. Phân tích sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) và phân tích bản đồ peptit cho thấy các gốc xystein không ghép cặp ở Cys23 và Cys88 ở một hoặc cả hai chuỗi nhẹ. Bằng cách sử dụng HIC papain, xác định được các mức biến thể Fab có chứa các sulfhydryl tự do ở các vị trí này là 12,7%–13,5% trong các chất Pertuzumab được sản xuất bằng quy trình sản xuất thương mại, phân tích HIC kháng thể nguyên vẹn cho thấy hai dạng chính là 78%–85% Pertuzumab kiểu đại và 13,4%–18,4% Pertuzumab dị đime (cặp xystein không ghép cặp ở một nhánh).

Vật liệu và phương pháp

Các chế phẩm được thử nghiệm: Ví dụ mô tả việc xác định đặc tính lô chất chuẩn Pertuzumab hiện hành anti2C4907-2 và Mẫu thử 1, là chất thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn III, và 5 lô thương mại/Giai đoạn III (các Mẫu thử từ 3 đến 7), tất cả được sản xuất ở quy mô 12.000 (L) bằng cách sử dụng quy trình thương mại. Cũng so sánh với lô chất chuẩn trước đó anti2C4-900-1, đây là đại diện của chất thử trên lâm sàng Giai đoạn I/II.

Các chế phẩm được thử nghiệm là các lô thuốc được bào chế ở chế phẩm thương mại ở 30 mg/mL trong 20 mM L-histidin axetat, 120 mM sucroza, và 0,02% (w/v) polysorbat 20 ở pH=6,0. Lô anti2C4-900-1 đã được bào chế trước đây trong phát triển lâm sàng ở nồng độ 25 mg/mL trong 10 mM L-histidin clorua, 240 mM sucroza, và 0,02% (trọng lượng/thể tích) polysorbat 20 at pH 6,0.

Phân tích liên kết disulfua bằng phân tích bản đồ peptit không được khử và phổ khối: Để làm biến tính pertuzumab trong các điều kiện không được khử và alkyl hoá nhóm sulfhydryl tự do bị chôn vùi, khoảng 0,5 mg của Pertuzumab trong dịch đệm được trộn với đệm làm biến tính (gồm có 8 M GdHCl, 10 mM N-etylmaleimit (NEM), 0,1 M natri axetat, pH 5,0) và sau đó ủ ở 37°C trong 3 giờ. Dung dịch được thay đệm bằng 600 µL 0,1 M Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7,0 sử dụng các cột NAP-5. Axetonitril (ACN) được thêm vào mỗi mẫu để đạt đến nồng độ 10%. Tiến hành thủy phân bằng trypsin ở tỷ lệ enzym: cơ chất là 1:10 (trọng lượng/trọng lượng) ở 37°C trong 16 giờ. Các peptit thu được được tách bằng RP-HPLC bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả dưới đây cho bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin tạo cầu nối disulfua.

Bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin tạo cầu nối disulfua: Để tạo ra bản đồ peptit pertuzumab, protein được thủy phân bằng trypsin sau khi khử khoá và tạo cầu nối disulfua các gốc xystein. Các dịch mẫu (1 mg) của Pertuzumab được thêm vào 360 mM Tris-HCl pH=8,6, 6 M guanidin hydroclorua (GdHCl), 2 mM axit etylendiamintetraacetic (EDTA), 13 mM natri sulfit, và 38 mM natri tetrathionat để được khử và tạo cầu nối disulfua các gốc xystein. Ủ các mẫu ở 37°C trong 20 phút. Các mẫu đã tạo cầu nối disulfua được nạp vào các cột PD 10 và rửa giải bằng 10 mM Tris, 0,1 mM CaCl_2 , pH 8,3. Sau khi thay đổi đệm, 20 μL dung dịch 10% octyl-B-glucosit và 20 μL 1 mg/mL trypsin được thêm vào. Ủ các mẫu ở 37°C trong 5 giờ. Dập tắt phản ứng thủy phân bằng 25 μL 10% axit trifloaxetic (TFA). Tách các peptit thu được bằng RP-HPLC sử dụng cột Zorbax 300SB-C8 (4,6 mm $\times$ 150 mm). Tách các peptit sau 5 phút giữ ở điều kiện ban đầu với gradien tuyến tính từ 0% đến 17% dung môi B trong 57 phút, đến 32% dung môi B ở 149 phút, đến 45% dung môi B ở 162 phút, và đến 95% dung môi B ở 173 phút. Ở 179 phút, cột được xử lý lại trong 100% dung môi A trong 25 phút, cho thời gian chạy tổng cộng là 204 phút. Dung môi A gồm có 0,1% TFA trong nước và dung môi B gồm có 0,08% TFA trong axetonitril. Duy trì cột ở 37°C và rửa giải ở tốc độ 0,5 mL/phút. Theo dõi profin rửa giải ở 214 nm và 280 nm. Xác định khối lượng các peptit đã thủy phân bằng trypsin bằng cách phân tích phối khối sắc ký lỏng (LC-MS) hỗn hợp thủy phân đã tách bằng cách sử dụng máy đo phổ khối LTQ ORBITRAP™.

Hàm lượng sulfydryl tự do theo phân tích của Ellman: Mẫu Pertuzumab được thay đổi đệm bằng dịch đệm phản ứng (100 mM kali phosphat, 1 mM EDTA, 8 M ure, pH 8) và điều chỉnh đến nồng độ dẫn đến nồng độ thiol tự do trong khoảng nồng độ đường cong chuẩn độ. Pha dung dịch chứa dithionitrobenzen (DTNB) (10 mM) và đường cong chuẩn độ xystein (8 điểm giữa nồng độ 0 và 100 μM) trong dịch đệm phản ứng. Trên đĩa 96 giếng, 165 μL dịch mẫu hoặc dịch chuẩn được thêm vào các giếng lặp lại 3 lần. Khởi mào phản ứng bằng cách thêm vào 10 μL DTNB và tiếp đó ủ trong 30 phút. Sau khi ủ, đo độ hấp thụ ở 412 nm bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa SPECTRAMAX M²®. Tính nồng độ thiol tự do bằng cách sử dụng phương trình tuyến tính thu được từ đường cong chuẩn độ. Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng độ hấp thụ ở 280 nm thu được từ máy đo quang phổ. Thiol tự do được báo cáo theo nồng độ mol của thiol tự do/mol Pertuzumab.

HIC Papain: Cho các mẫu Pertuzumab thuỷ phân bằng papain, các mẫu được thuỷ phân bằng papain sau khi loại bỏ lysin đầu tận C bằng carboxypeptidaza B (CpB). Các miền Fab và Fc được phân tách bằng HIC bằng cách sử dụng cột PolyPropyl Aspartamit (4,6 mm × 100 mm, 1500 Å, 3 µm). Dung môi A gồm có 1,6 M amoni sulfat, 20 mM kali phosphat, pH 6,05 và dung môi B gồm có 20 mM kali phosphat pH 6,05. Phân tách các chất phân tích bằng gradien từ 0% đến 18% dung môi B từ 3 đến 6 phút, đến 24% dung môi B ở 21 phút. Duy trì cột ở 25°C với tốc độ chảy 0,8 mL/phút. Theo dõi profin rửa giải ở 280 nm.

HIC kháng thể nguyên vẹn: Các mẫu Pertuzumab nguyên vẹn được phân tách bằng HIC bằng cách sử dụng cột PolyPropyl Aspartamit (9,4 mm × 100 mm, 1500 Å, 3 µm). Dung môi A gồm có 1,0 M amoni sulfat, 20 mM kali phosphat, pH 6,05 và dung môi B gồm có 20 mM kali phosphat, pH 6,05. Phân tách các chất phân tích ở nồng độ pha động hằng định bằng 12% dung môi B trong 25 phút. Duy trì cột ở 30°C với tốc độ chảy 2 mL/phút. Theo dõi profin rửa giải ở 280 nm.

SDS-PAGE với nhận biết khối lượng peptit: Cả các mẫu Pertuzumab được khử và không được khử được phân tích bằng natri dodecyl sulfat-điện di gel polyacrylamit (SDS-PAGE). Các mẫu (5 µg) được làm biến tính bằng cách gia nhiệt với sự có mặt của dịch đệm mẫu SDS PAGE trong 5–10 phút ở $60 \pm 2^\circ\text{C}$ bằng iodoacetamid cho các mẫu không được khử. Các mẫu được khử trong 15–20 phút ở $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ với sự có mặt của 80 mM dithiothreitol (DTT). Các mẫu được làm biến tính được phân tách trong các gel gradien 4%–20% polyacrylamit và được nhuộm màu bằng chất nhuộm màu đỏ ruby SYPRO™ để thu được mẫu phân dải protein. Cùng với các mẫu pertuzumab, chất chuẩn phân tử lượng và chất chuẩn độ nhạy nhuộm màu đỏ ruby SYPRO™ (2 ng/đường chạy và 8 ng/đường chạy albumin huyết thanh bò (BSA)) được bao gồm trên các gel.

Nhận biết khối lượng peptit là kỹ thuật phân tích nhận biết protein. Các gel được nạp với 10 µg lô chất chuẩn bán sẵn anti2C4907-2 và Mẫu thử 5. Tất cả các dải được phân tách bằng SDS-PAGE được phân cắt thành các peptit bằng trypsin. Xác định chính xác khối lượng tuyệt đối của các peptit này bằng phổ khối thời gian bay ion hoá/ma trận giải hấp bằng laze BRUKER™ (MALDI–TOF MS). Các danh mục khối lượng peptit được sử dụng để nhận biết các protein bằng cách tra cứu các trình tự

protein. Tất cả các dải nhận thấy ở cả Pertuzumab không được khử và được khử được nhận biết bằng nhận biết khối lượng peptit.

Hiệu lực bằng thử nghiệm sinh học: Phương pháp hiệu lực Pertuzumab đánh giá hiệu lực của Pertuzumab bằng cách xác định khả năng ức chế tăng sinh dòng tế bào ung thư vú biểu hiện-HER2 của người. Trong thử nghiệm thông thường, (các) đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được gây giống bằng các tế bào ung thư vú và ủ trong tủ ấm có làm ẩm. Sau khi ủ, loại bỏ môi trường và các nồng độ khác nhau của chất chuẩn Pertuzumab, chất đối chứng của thử nghiệm, và (các) mẫu được thêm vào (các) đĩa. Sau đó, các đĩa được ủ, và định lượng số lượng tương đối các tế bào sống sót gián tiếp bằng cách sử dụng chất nhuộm màu oxy hoá khử, ALAMARBLUE®. Độ huỳnh quang được xác định bằng cách sử dụng bước sóng kích hoạt ở 530 nm và phát xạ ở 590 nm. ALAMARBLUE® là chất nhuộm màu xanh da trời và không phát huỳnh quang ở trạng thái được oxy hoá của nó, nhưng được khử trong môi trường nội bào của tế bào thành màu hồng, màu này phát huỳnh quang mạnh (Int. J. Oncol. 3: 473-476 (1993) của Page và các đồng tác giả). Các thay đổi về màu sắc và độ huỳnh quang là tỷ lệ với số lượng các tế bào sống sót. Các kết quả, được biểu thị bằng đơn vị độ huỳnh quang tương đối (RFU), được vẽ đồ thị theo nồng độ của Pertuzumab và chương trình đường song song được sử dụng để ước tính hoạt tính chống tăng sinh của các mẫu Pertuzumab so với Chất chuẩn.

Kết quả

Phân bố các liên kết disulfua: Có 32 cysteine trong Pertuzumab, tạo thành 16 liên kết disulfua, trong số này có 4 liên kết giữa các chuỗi và 12 liên kết là trong chuỗi. Tuy nhiên, do bản chất multimeric, chỉ có 9 liên kết disulfua khác biệt. Protein nguyên thủy được thủy phân bằng trypsin để giải phóng tất cả các peptit được liên kết bằng-disulfua. Các protein sắc ký cho các lô Pertuzumab được thể hiện trong Fig. 7. Phân tích LC-MS pha đảo lô chất chuẩn thủy phân bán sẵn anti2C4907-2 cho tất cả các cặp peptit được liên kết bằng-disulfua được kỳ vọng (Bảng 2).

Bảng 2: Các cặp peptit được liên kết bằng-đisulfua được nhận biết bằng LC-MS

Được kỳ vọng ^a	Liên kết disulfua	Tìm thấy	Khối lượng	
			được kỳ vọng (Da) ^b	Khối lượng tìm thấy (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

Ghi chú: dấu bằng (=) thể hiện liên kết disulfua.

H = chuỗi nặng; L = chuỗi nhẹ; LC-MS = phổ khối sắc ký lỏng hiệu năng cao; T = peptit thuỷ phân bằng trypsin.

^a tham khảo Fig. 9 và Fig. 10.

^b Các khối lượng đơn đồng vị (MH⁺).

^c Disulfua được suy đoán. Đime T19H không bao gồm xác nhận các disulfua Cys228=Cys228 và Cys231=Cys231.

^d Khẳng định có mặt cặp được liên kết disulfua này bằng cách sử dụng enzym khác, Lys-C, enzym này không phân cắt T19L và T20L.

Các peptit đã nhận biết được khẳng định tiếp bằng cách nhận biết các peptit được kỳ vọng từ các cặp-peptit khi được khử các disulfua (Fig. 8 với hình phóng đại trong Fig. 9 và Fig. 10). Đime của peptit chuỗi nặng T19H (T19H=T19H) được nhận biết có chứa hai liên kết disulfua; nhận biết các cặp Cys228=Cys228 và

Cys231=Cys231 được suy đoán. Một cặp disulfua, T18H=T20L, đã được phát hiện bằng LC-MS nhưng rửa giải gần với thể tích trống và không thể nhận biết như một pic phân biệt trên sắc ký đồ tử ngoại (UV). Sự có mặt của cặp disulfua này được khẳng định tiếp bằng phân tích LC-MS thủy phân Lys-C, trong đó nhận thấy có peptit T18H=T19L–T20L. Không tìm thấy các liên kết không được kỳ vọng. Một liên kết disulfua được ghép cặp một phần, như nêu dưới đây.

Phân tích sulfhydryl tự do: Tất cả các gốc xystein trong pertuzumab đã gấp nếp đúng đều tham vào các liên kết disulfua. Thử nghiệm của Ellman (Ellman, G. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77 (1959)), phương pháp xác định hàm lượng sulfhydryl tự do của các peptit và protein, đã được sử dụng để xác định có mặt các thiol (tự do) chưa được cải biến có tính phản ứng trong pertuzumab. Tất cả các chất đã được đánh giá về hàm lượng thiol tự do (gốc xystein không ghép cặp) và các kết quả được tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 3: Hàm lượng thiol tự do theo thử nghiệm của Ellman

Tên Lô	Nồng độ mol thiol tự do/mol Pertuzumab
anti2C4-900-1	0,06
anti2C4907-2	0,15
Mẫu thử 1	0,28
Mẫu thử 3	0,16
Mẫu thử 4	0,17
Mẫu thử 5	0,16
Mẫu thử 6	0,16
Mẫu thử 7	0,14

Ghi chú: Nồng độ thiol tự do được xác định bằng thử nghiệm của Ellman với sự có mặt của 8 M ure.

Khoảng 0,1–0,3 mol các thiol tự do/mol Pertuzumab được nhận thấy trong tất cả các lô đã phân tích. Khi không có mặt 8 M ure, nồng độ thiol tự do thấp hơn

ngưỡng định lượng (QL; khoảng 0,1 mol thiol tự do/mol protein) trong tất cả các chất được thử nghiệm, điều này cho thấy là các thiol tự do (có nghĩa là, các xystein không ghép cặp) có mặt trong các phân tử pertuzumab bị chôn vùi và chất phản ứng của Ellman không thể tiếp cận được chúng trong các điều kiện không làm biến tính.

Phân tích các chất Pertuzumab bằng HIC sau khi thủy phân bằng CpB và papain cho thấy một pic bổ sung ở giữa các pic Fc và Fab, mà đã được nhận biết là biến thể Fab có chứa các gốc xystein không ghép cặp ở Cys23 và Cys88 (Fig. 11 và Fig. 12, được đánh dấu là Fab thiol tự do). Việc nhận biết này được khẳng định bằng phương pháp bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin LC-MS, trong đó mẫu được làm biến tính với sự có mặt của NEM trước khi được khử và thủy phân bằng trypsin. Xác định mức độ của biến thể Fab thiol tự do bằng cách sử dụng phương pháp HIC papain giữa các lô pertuzumab và xác định được là phù hợp với quy trình hiện hành (Bảng 4).

Bảng 4: Lượng tương đối của biến thể Fab có xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 như được xác định bằng HIC Papain hoặc biến thể kháng thể nguyên vẹn đã tính

Tên Lô	% biến thể Fab xystein không ghép cặp	% biến thể kháng thể nguyên vẹn *
anti2C4-900-1	9,4	17,9
anti2C4907-2	12,7	23,8
Mẫu thử 1	13,2	24,6
Mẫu thử 3	13,3	24,9
Mẫu thử 4	13,5	25,2
Mẫu thử 5	13,3	24,9
Mẫu thử 6	12,9	24,2
Mẫu thử 7	13,2	24,6

Ghi chú: % pic Fab xystein không ghép cặp như thu được bằng cách chia diện tích của pic Fab xystein không ghép cặp cho các diện tích pic của Fab + Fab xystein không ghép cặp.

* được tính như mô tả dưới đây.

Bảng thử nghiệm HIC papain, các giá trị cho chất được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình thương mại nằm trong khoảng từ 12,7% đến 13,5%, trong khi giá trị cho chất chuẩn lô 2C4-900-1 (Giai đoạn I/II) là thấp hơn một chút bằng 9,4%.

Chuyển đổi % biến thể Fab từ HIC papain thành % được ước tính của biến thể kháng thể nguyên vẹn: Lượng tương đối các mảnh Fab có chứa các xystein không ghép cặp có thể được sử dụng để tính mức phân bố tương đối của các dạng dị dimer hoặc homodimer của các biến thể xystein không ghép cặp. Nếu thử nghiệm HIC papain cho thấy là 10% (hoặc x%) các mảnh Fab từ pertuzumab có chứa các xystein không ghép cặp ở Cys23/Cys88, thì phải có 10 mảnh Fab có chứa các xystein không ghép cặp được giải phóng từ 50 phân tử pertuzumab do thủy phân 50 kháng thể bằng papain cho 100 mảnh Fab. Giả sử là 10 mảnh này là từ 10 phân tử pertuzumab khác nhau, lượng tương đối pertuzumab có chứa 1 Fab với 2 xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 là khoảng 20%, có nghĩa là 10 trong số 50 phân tử pertuzumab, (hoặc 2x%). Chính xác hơn là, nếu xác suất pertuzumab với hai Fab có chứa các xystein Cys23/Cys88 không ghép cặp được xét đến, thì lượng tương đối của các biến thể xystein không ghép cặp dị dimer Pertuzumab phải là $2 \times 10\% \times 90\% = 18\%$ (hoặc $2 \times x\% \times [100-x]\%$). Ngoài ra, lượng tương đối của các biến thể xystein không ghép cặp homodimer Pertuzumab phải là $10\% \times 10\% = 1\%$ (hoặc $x\% \times x\%$). Trong trường hợp này, tỷ lệ tương đối giữa Pertuzumab có chứa 2 Fab không có các xystein không ghép cặp trên một trong hai Fab phải là $90\% \times 90\% = 81\%$ (hoặc $[100-x]\% \times [100-x]\%$).

Ngoài ra homodimer kiểu đại (không có các xystein không ghép cặp) và dị dimer (có các xystein không ghép cặp trên một Fab) có thể được định lượng trực tiếp bằng HIC. HIC kháng thể nguyên vẹn phân tách pertuzumab thành hai pic chính (Fig. 13), các pic này được nhận biết là homodimer kiểu đại (không có các thiol tự do) và dị dimer (có cặp thiol trên một Fab) bằng phân tích bản đồ peptit thủy phân bằng trypsin LC-MS. Pic kẻ vai phía trước thứ yếu cũng được thu gom và được xác định đặc tính bằng HIC papain là homodimer chủ yếu (cặp thiol tự do trên cả hai Fab, khoảng 40%)

và pertuzumab với oxy hoá Fc. Bằng cách sử dụng HIC kháng thể nguyên vẹn, pertuzumab được ước tính có chứa khoảng 17%–18% dị đime đối với các chất được sản xuất bằng quy trình hiện hành, và 13% sử dụng quy trình của Giai đoạn I/II (Bảng 5). Không bị giới hạn bởi lý thuyết, có thể là lượng đã gia tăng của biến thể xystein không ghép cặp được sản xuất bởi quy trình thương mại (so với quy trình giai đoạn I/II) là do tốc độ gấp nếp protein (có nghĩa là miền VL) tích lũy nhanh hơn tốc độ oxy hoá thiol (tạo thành disulfua), do đó bẫy các xystein trong biến thể.

Bảng 5: Lượng tương đối của biến thể xystein không ghép cặp nguyên vẹn như được xác định bằng HIC Pertuzumab nguyên vẹn

Tên lô	Pic		
	Homodime kiểu dại (%)	Dị đime xystein không ghép cặp (%)	Homodime xystein không ghép cặp được làm giàu một phần (%)
anti2C4-900-1	84,7	13,4	1,9
anti2C4907-2	78,9	18,2	2,9
Mẫu thử 1	78,4	18,4	3,2
Mẫu thử 3	79,1	17,6	3,2
Mẫu thử 4	79,3	17,3	3,4
Mẫu thử 5	79,1	17,4	3,5
Mẫu thử 6	79,7	17,2	3,1
Mẫu thử 7	79,3	17,3	3,4

Ghi chú: % pic tương đối thu được bằng cách chia diện tích pic đơn lẻ cho tổng diện tích pic của tất cả ba pic.

Do cặp xystein không ghép cặp ở Cys23/Cys88 trên chuỗi nhẹ của Pertuzumab đã được nhận thấy bởi HIC, các phân đoạn đã tinh chế của mỗi biến thể xystein không ghép cặp được thử nghiệm trong thử nghiệm chống tăng sinh. Fab có chứa xystein không ghép cặp được tinh chế và ước tính có hiệu lực giảm đi (hiệu lực được ước tính ~50% so với Fab nguyên thủy) (Bảng 6).

Bảng 6: Tác dụng chống tăng sinh của biến thể Fab xystein không ghép cặp

Các mẫu Pertuzumab và điều kiện	% Hoạt tính trung bình (n=2)	% chênh lệch
Fab nguyên thể	100	không áp dụng
Fab Xystein không ghép cặp	50 ^a	67

Ghi chú: % hoạt tính được báo cáo so với Fab nguyên thủy.

^a Giá trị hiệu lực được ước tính. Đường cong đáp ứng liều dùng là không song song, và đoạn bằng thấp hơn là không hội tụ.

Ngoài ra, 3 dạng nguyên vẹn (homodime kiểu đại, dị đime có chứa thiol tự do, và homodime có chứa không ghép cặp) được phân lập bằng HIC và được thử nghiệm với thử nghiệm hiệu lực chống tăng sinh. Xem Bảng 7.

Bảng 7: Các hoạt tính chống tăng sinh của Pertuzumab có độ dài đầy đủ

Các phân đoạn biến thể xystein không ghép cặp

Các mẫu Pertuzumab và điều kiện	Chống tăng sinh	
	% Hoạt tính trung bình (n = 3)	CV (%)
Nguyên liệu	110	11
Dị đime	112	7
Homodime kiểu đại	104	15
Homodime có chứa xystein không ghép cặp ^a	90	15

Ghi chú: % hoạt tính được báo cáo so với chất chuẩn Pertuzumab (Lô anti2C4907-2).

^a Phân đoạn có chứa khoảng 40% homodime có chứa xystein không ghép cặp và 60% dị đime hoặc homodime kiểu đại hỗn hợp.

Các dữ liệu này chứng tỏ là biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab là có mặt trong hỗn hợp được sản xuất ở quy mô thương mại. Các phương pháp HIC (đánh giá mảnh Fab hoặc kháng thể nguyên vẹn) trong Ví dụ này hoặc phương pháp

lập bản đồ peptit trong Ví dụ 3 dưới đây là các thử nghiệm có thể được sử dụng để đánh giá sự có mặt và lượng biến thể xystein không ghép cặp trong một hỗn hợp Pertuzumab.

Ví dụ 2

Hỗn hợp Pertuzumab không được fucosyl hoá và xác định đặc tính của nó

Độc tính thể bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC) là một khía cạnh của tính miễn dịch qua trung gian-tế bào, nhờ tính miễn dịch này tế bào hiệu ứng phân giải tích cực tế bào đích đã liên kết các kháng thể đặc hiệu-kháng nguyên. Pertuzumab thể hiện hoạt tính ADCC khi được thử nghiệm với các tế bào HER2 3+, nhưng nhận thấy hoạt tính rất thấp với các tế bào HER2 1+ (Fig. 14).

Các nồng độ của chất không fucosyl hoá trong các chất chuẩn pertuzumab Giai đoạn I và Giai đoạn III được xác định bằng cách sử dụng điện di mao quản. Nồng độ cao hơn của chất không được fucosyl hoá (G0-F = 2,2%) trong Chất chuẩn giai đoạn III pertuzumab tỷ lệ với hoạt tính ADCC cao hơn nhận thấy khi so với Chất chuẩn giai đoạn I (Fig. 15), chất này có G0-F thấp hơn (0,8%). Pertuzumab được khử glycosyl hoá bằng enzym cũng được điều chế và được thử nghiệm và thể hiện không có khả năng liên kết với FcγRIIIa và không có hoạt tính ADCC (Bảng 8).

Bảng 8: hoạt tính sinh học của Pertuzumab được khử glycosyl hoá

Các mẫu	% Hoạt tính trung bình (n = 3)			
	Liên kết	Liên kết	Liên kết	
Pertuzumab và Điều kiện	Chống tăng sinh HER2	FcγRIIIa	ADCC	FcRn
Đối chứng	90	105	106	101
Khử glycosyl hoá	87	94	không có hoạt tính	không có hoạt tính
				85
				72

Ghi chú: % hoạt tính được báo cáo so với chất chuẩn Pertuzumab (Lô anti2C4907-2).

ADCC = độc tính thể bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể.

Các dữ liệu này chứng tỏ là xác định pertuzumab G0-F (không được fucosyl hoá) là cách hữu hiệu để định lượng hoạt tính ADCC của pertuzumab. Các thử nghiệm nhằm định lượng mức không fucosyl hoá như sau.

Phân tích oligosacarit bằng điện di mao quản (CE): Các mẫu Pertuzumab (250–500 µg) được tinh chế bằng cách sử dụng Protein A loại ái lực chiết xuất pha rắn (PHYTIPS™) và hệ thống xử lý mẫu chất lỏng tự động hoá. Các mẫu Pertuzumab được rửa giải từ nhựa protein A bằng cách sử dụng 12 mM axit clohydric, pH=2,0 và trung hoà bằng cách sử dụng 10 µL 50 mM natri succinat. Ủ mẫu thu được với 2,5 U/mL PNGase F trong 15 giờ ở 37°C. Kết tủa protein bằng cách gia nhiệt dung dịch ở 95°C trong 5 phút và loại bỏ bằng ly tâm. Các dịch nổi có chứa các oligosacarit đã giải phóng được làm khô chân không. Các glycan đã giải phóng được tạo dẫn xuất với axit 8-aminopyren-1,2,6-trisulfonic (APTS) trong dung dịch axit axetic 15% có chứa natri xyanobohydrua ở 55°C trong 2 giờ. Tiến hành phân tích các glycan đã tạo dẫn xuất bằng hệ thống điện di mao quản (CE) có trang bị modul phát hiện huỳnh quang bằng cách sử dụng laze ion-argon (kích hoạt 488 nm, phát xạ 520 nm) và mao quản được phủ N-CHO (50 µm × 50 cm). Dịch đệm chạy là 40 mM axit ε-amino-n-caproic/axit axetic, pH=4,5, 0,2% hydroxypropyl metylxenluloza (HPMC). Các mẫu được tiêm vào mau quản bằng áp suất ở 0,5 psi. Tiến hành phân tách ở 20 kV, và duy trì nhiệt độ mao quản ở 20°C.

Pertuzumab có chứa một vị trí oligosacarit được liên kết ở vị trí-N trong miền C_{H2} của phần Fc của phân tử ở Asn299. Mức phân bố tương đối của các oligosacarit trung tính được xác định ở vị trí này cho mỗi lô được xác định bằng cách sử dụng CE sau khi xử lý bằng PNGase F và đánh dấu bằng APTS.

Các điện di đồ từ phân tích CE oligosacarit đã giải phóng, tạo dẫn xuất được thể hiện trong Fig. 16 với profin tỷ lệ phóng đại trong Fig. 17. Các lượng tương đối của các oligosacarit trong pertuzumab đối với các chất đã phân tích được tóm tắt trong Bảng 9.

Bảng 9: Phân bố của cấu trúc oligosacarit trong Pertuzumab (% diện tích pic)

Tên lô	G0-GlcNA					
	G0-F	c	Man5	G0	G1 ^a	G2
anti2C4-900-1	0,8	2,7	1,2	72,1	20,4	2,0
anti2C4907-2	2,2	0,8	0,3	63,6	27,6	3,0
Mẫu thử 1	2,5	1,6	0,2	62,4	29,1	3,4
Mẫu thử 3	1,7	1,2	0,3	70,3	23,4	2,2
Mẫu thử 4	1,8	1,8	0,3	75,4	18,3	1,4
Mẫu thử 5	1,4	1,0	0,4	71,8	22,4	2,1
Mẫu thử 6	1,1	1,0	0,2	73,3	21,3	1,9
Mẫu thử 7	1,2	0,8	0,2	69,7	24,5	2,5

Ghi chú: % tổng cộng có thể không cộng chính xác đến 100% do làm tròn số. Ngoài ra, loại thứ yếu (< 0,5%) có thể đã được bao gồm trong % diện tích pic toàn phần nhưng không được báo cáo trong Bảng này.

^a Tổng số của hai đồng phân G1 (tham khảo Fig. 17).

Oligosacarit với cấu trúc G0 là loại chủ yếu trong tất cả các chất (62%–75%). Dạng glycoprotein G0 có nhiều hơn một chút trong các Mẫu thử từ 3 đến 7 và lô chất chuẩn trước đó 2C4-900-1 (70%–75%) được so sánh với lô chất chuẩn hiện thời anti2C4907-2 và Mẫu thử 1 (62%–64%). Dạng glycoprotein G1 được nhận thấy là hai pic tương ứng với hai chất đồng phân với galactosa đầu tận ở một trong hai nhánh của cấu trúc hai anten. Diện tích của hai pic này được gộp lại để xác định lượng tương đối của dạng glycoprotein G1. Các dạng glycoprotein G1 và G2 chiếm khoảng 18%–29% và 1%–3%, tương ứng của các oligosacarit đã giải phóng đối với tất cả các chất. Các pic có cấu trúc oligosacarit khác cũng được nhận thấy trong các điện di đồ (tất cả ở mức 3% hoặc thấp hơn). Các cấu trúc này bao gồm G0-F (G0 không có fucoza lõi), G0-GlcNAc (G0 không có GlcNAc), Man5, và các dạng glycoprotein thứ yếu khác (Ma và Nashabeh Anal Chem 71:5185–92 (1999)). Các cấu trúc oligosaccarit khác của pertuzumab là phù hợp với các cấu trúc tìm thấy của MAb thu được từ-CHO (Ma và

Nashabeh, supra) và globulin miễn dịch có trong tự nhiên của người (Mol Immunol 47:2074–82 (2010) của Flynn và các đồng tác giả).

Ví dụ 3

Lập bản đồ peptit và RP-HPLC để đánh giá biến thể xystein không ghép cặp

Vật liệu: Vật liệu và công cụ được sử dụng trong các thử nghiệm bao gồm: axit 3-[N-morpholino]propansulfonic (MOPS; Sigma-Aldrich), N-etylmaleimit (d0-NEM; Thermo Scientific, Rockford, IL), N-etylmaleimit (d5-NEM; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), L-xystein (Sigma-Aldrich), trypsin (Promega, Madison, WI), axit trifloaxetic (TFA; Fisher, Fair Lawn, NJ), Axetonitril (ACN, Burdick & Jackson, Muskegon, MI). Tất cả hoá chất và chất phản ứng được sử dụng như nhận được không cần tinh chế thêm.

Đánh dấu bằng N-etylmaleimit (NEM) vi sai các kháng thể: Phương pháp gắn nhãn NEM vi sai cho phép các thiol tự do đã có mặt trong các kháng thể được gắn nhãn bằng d0-NEM và các cầu nối disulfua còn lại được khử và gắn nhãn bằng d5-NEM. Để gắn nhãn d0-NEM khởi đầu, 100 μ L kháng thể (3 mg/mL) được trộn nhẹ nhàng với 400 μ L đệm làm biến tính (7,5 M GdnHCl, pH 5) có chứa 6,25 mM d0-NEM và được ủ ở 37°C trong 2 giờ. 20 μ L xystein (125 mM) được thêm vào mẫu và ủ ở 37°C trong 15 phút để làm bất hoạt d0-NEM còn lại. Để được khử các cầu nối disulfua còn lại trong kháng thể, 10 μ L TCEP (0,5 M) được thêm vào mẫu và ủ ở 37°C trong 30 phút. 70 μ L d5-NEM (171 mM) tiếp đó được thêm vào mẫu và ủ ở 37°C trong 2 giờ để gắn nhãn các thiol tự do được tạo ra bởi các cầu nối disulfua đã được khử. 0,5 mL mẫu đã được gắn nhãn NEM vi sai được thay dịch đệm sử dụng các cột NAP-5 và rửa giải bằng 0,6 mL đệm MOPS (20 mM MOPS, 0,5 mM TCEP, pH 7).

Phân tích bản đồ peptit các kháng thể: Các mẫu đã được gắn nhãn NEM vi sai được thuỷ phân bằng trypsin ở tỷ lệ trypsin:kháng thể 1:50 (trọng lượng/trọng lượng) ở 37°C trong 2 giờ. Dập tắt phản ứng thuỷ phân bằng 10 % TFA. Các mẫu đã được gắn nhãn NEM vi sai đã thuỷ phân bằng trypsin được phân tách bằng cách sử dụng hệ thống HPLC Agilent 1200 (Agilent, Palo Alto, CA). Cột Jupiter C18 (250 x 2 mm, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA) cỡ lỗ 300 Å được sử dụng để phân tách bằng sắc ký các mẫu. Thể tích tiêm là 95 μ L, và nhiệt độ cột là 55°C. Pha động A là 0,1% TFA trong nước và pha động B là 0,08% TFA trong 90% ACN (thể tích/thể tích). Điều kiện

ban đầu được cài đặt ở 100% pha động A và duy trì trong 3 phút đầu tiên sau khi tiêm mẫu. Pha động B được tăng dần đến 10% trong 20 phút tiếp theo và tiếp đó tăng dần đến 40% cho đến 160 phút và 100% cho đến 162 phút tất cả trong gradien tuyến tính. Pha động B được giữ ở 100% cho đến 170 phút. Cột được cân bằng lại trong 100% pha động A cho đến 195 phút. Giữ tốc độ chảy ở 0,28 mL/phút.

Dịch rửa giải từ HPLC được nối trực tiếp với nguồn ion hoá phun điện tử của máy đo phổ khối LTQ ORBITRAP™ vận hành ở phương thức ion dương tính. Điện thế phun là 4,5kV, và nhiệt độ mao quản là 300°C. Máy đo phổ khối được vận hành ở cách thức phụ thuộc dữ liệu để chuyển tự động giữa các phương thức MS và MS/MS. Quét phổ MS từ m/z 300 đến m/z 2000 trên FT-Orbitrap với cài đặt phân giải R = 60.000 ở m/z 400. 5 ion cường độ mạnh nhất được phân trong bẫy ion tuyến tính bằng cách sử dụng phân ly do cảm ứng va đập (CID) ở năng lượng va đập được chuẩn hoá 35% với thời gian hoạt hoá 30 ms và độ rộng phân lập 2,5 đơn vị m/z. Chức năng loại trừ động học (DE) được bật để giảm thiểu sự dư thừa dữ liệu và cho các ion cường độ thấp được chọn lọc để quét MS/MS phụ thuộc dữ liệu. Các thông số loại trừ động học như sau: thời gian lập 30 giây, kích cỡ loại trừ 500, thời gian loại trừ 90, độ rộng khối lượng loại trừ mức thấp 0,76, độ rộng khối lượng loại trừ mức cao 1,56, và đếm lặp 2. Tiến hành phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm XCALIBUR™.

Chất chuẩn Pertuzumab lô hiện hành anti2C4907-2 được phân tích bằng phương pháp nêu trên. Xác định được là 10,9% các peptit T2L (được sản xuất bằng cách thuỷ phân bằng trypsin và có chứa Cys23) và 8,3% các peptit T7L (được sản xuất bằng cách thuỷ phân bằng trypsin và có chứa Cys88) được gắn nhãn d0-NEM. Do chỉ các xystein không ghép cặp được gắn nhãn d0-NEM trong thử nghiệm này, các kết quả này gợi ý là khoảng 10% Cys23 và Cys88 trong anti2C4907-2 không được liên kết bằng liên kết disulfua (có nghĩa là 10% các biến thể xystein không ghép cặp). Sử dụng phương pháp tính toán tương tự như phương pháp nêu trên để chuyển đổi % biến thể Fab xystein không ghép cặp thành % biến thể nguyên vẹn xystein không ghép cặp, ước tính là 18% các phân tử pertuzumab trong anti2C4907-2 là các biến thể xystein không ghép cặp dị dime, 1% các phân tử pertuzumab là các biến thể xystein không ghép cặp homodime, và 81% là dạng kiểu đại homodime (không có các xystein không ghép cặp). Các kết quả này phù hợp với các kết quả từ HIC phân tích các mảnh Fab hoặc Pertuzumab nguyên vẹn.

Thuỷ phân Lys-C bằng endoproteinaza hạn chế để tạo ra Fab: mảnh Fab của MAb A được tạo ra bằng quy trình thuỷ phân Lys-C hạn chế. Vắn tắt là, MAb A (1 mg/ml) được trộn với enzym Lys-C ở tỷ lệ 1:400 trong 100 mM Tris, pH 7,6, và tiếp đó hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được gắn nhãn NEM trong môi trường pH=5,5, 350 mM natri axetat và 8M Guanidin HCl. Phân tích các chất thuỷ phân bằng phương pháp RP-HPLC nêu dưới đây.

Điều kiện RP-HPLC: tiến hành phân tích RP-HPLC trên hệ thống HPLC AGILENT 1200™ (Palo Alto, CA, USA) có trang bị bơm gradien bậc hai, tự nạp mẫu, khoang cột có nhiệt độ kiểm soát, và bộ phát hiện mảng diot. Hệ thống này bao gồm cột pha đảo diphenyl Pursuit 3 (150 x 4,6 mm, 3 µm, Varian, Lake Forest, CA, USA) được chạy ở 75°C và 1mL/phút. Theo dõi quá trình phân tách bằng cách đo độ hấp thụ ở 280 nm. Pha động gồm có 0,1% TFA trong nước (pha động A) và 0,09% TFA trong ACN (pha động B). Phương pháp 38-phút bắt đầu với gradien 3 phút từ 32% đến 36 % pha động B, tiếp đó là gradien tuyến tính 18 phút cho đến 42% pha động B. Rửa cột trong 95 % pha động B trong 5 phút và cân bằng cột trong 32 % pha động B trong 10 phút.

Phân tích RP-HPLC Fab thiol tự do được tạo ra bằng cách thuỷ phân Lys-C hạn chế (Fig. 18) cho thấy là Fab thiol tự do là khoảng 13%, phù hợp với kết quả bằng HIC trong Ví dụ 1. Fab thiol tự do được gắn nhãn trở nên kỵ nước, do đó rửa giải muộn hơn so với Fab thiol tự do (Fig. 18) và khẳng định hơn nữa sự có mặt của thiol tự do. Cũng xem Fig. 19 trong đó phương pháp lập bản đồ peptit khẳng định Fab thiol tự do.

Ví dụ 4

Định lượng mức không fucosyl hoá bằng CE-LIF

Ví dụ này mô tả thử nghiệm điện di mao quản-huỳnh quang được cảm ứng bằng-laze (CE-LIF) đã được thẩm định để định lượng biến thể Pertuzumab không được fucosyl hoá. Các cải biến của phương pháp này được đề cập trong Ví dụ 2 ở trên bao gồm: không chuẩn bị mẫu tự động, không có bước tinh chế Protein A đảm bảo nồng độ protein đồng nhất giữa các mẫu, và các thay đổi thông số điện di (nồng độ tá được đệm).

Trong thử nghiệm này, các mẫu Pertuzumab được pha loãng đến nồng độ 10 mg/mL sử dụng dịch đệm của chế phẩm, và thay đổi dịch đệm bằng đệm thuỷ phân

Peptit-N-Glycanaza F (PNGase F). Các oligosacarit được liên kết asparagin tiếp đó được giải phóng bằng enzym bằng PNGase F. Các glycan đã giải phóng sau đó được tạo dẫn xuất với axit 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonic (APTS) là chất huỳnh quang tích điện âm. APTS cho tất cả các glycan ba điện tích âm, điện tích này cho phép chúng được phân tích điện di nhanh chóng. Hỗn hợp có chứa tác nhân tạo dẫn xuất còn dư và các thể tiếp hợp APTS-glycan được phân tích bằng CE sử dụng mao quan có phủ làm giảm lưu lượng điện thẩm thấu. Theo dõi quá trình phân tách bằng hệ thống laze được cảm ứng bằng huỳnh quang sử dụng laze ion-argon với bước sóng kích hoạt là 488 nm và lọc cho qua dải phát xạ 520 nm.

Sử dụng thử nghiệm này, đồ thị tương quan được thể hiện trong Fig. 21. Sử dụng đồ thị tương quan này ($\% ADCC = 30,133 + 12,439x$, trong đó $x = \%G0-F$) và khoảng hoạt tính ADCC từ 40 đến 135%, tiêu chuẩn cuối cùng cho Pertuzumab tương ứng với 0,9– 4,1% G0-F.

Do đó, bằng cách sử dụng thử nghiệm CE-LIF đã thẩm định này, có thể để đánh giá các hỗn hợp Pertuzumab để khẳng định hoạt tính sinh học theo ADCC là nằm trong khoảng mong muốn (40-135% hoạt tính ADCC = 0,9-4,1% G0-F).

Ví dụ 5

Pertuzumab loại phân tử lượng cao (HMWS), loại phân tử lượng thấp (LMWS) và xác định đặc tính của chúng

Pertuzumab được phân tích bằng SE-HPLC và CE-SDS để xác định lượng loại phân tử lượng cao (HMWS), đime nói chung, và loại phân tử lượng thấp (LMWS). Không có sự khác biệt trong HMWS khi pha loãng, điều này gợi ý là các thể kết tụ là không thể phân ly. Có sự thống nhất kết quả siêu ly tâm (AUC) và kết quả SE-HPLC về định lượng HMWS, thể hiện không có bằng chứng thiếu sắc ký loại trừ kích cỡ hoặc ước tính HMWS chủ yếu ở mức thấp.

Vật liệu và phương pháp

Các chế phẩm Pertuzumab được thử nghiệm: Ví dụ này mô tả việc xác định đặc tính của chất chuẩn Pertuzumab lô hiện hành anti2C4907-2 và Mẫu thử 1, là chất thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn III, và 5 lô thương mại/Giai đoạn III (các Mẫu thử từ 3 đến 7), tất cả được sản xuất ở quy mô 12.000 (L) bằng cách sử dụng quy trình thương mại.

HMWS được phân lập: Để điều chế HMWS đại diện được sử dụng cho xác định đặc tính sinh học, pertuzumab lô từ Mẫu thử 3 được tiêm vào hệ HPLC điều chế sử dụng cột SE-HPLC điều chế (TSK G3000SW, 21,5 mm × 600 mm) và cùng pha động nồng độ ổn định như mô tả ở trên ở tốc độ 4,5 mL/phút. Phân đoạn loại phân tử lượng cao được gom và sau đó thay dịch đệm bằng dịch đệm chế phẩm. HMWS đã chứng tỏ là tinh khiết 70% bằng cách phân tích SE-HPLC sau đó, với pic chính chiếm ưu thế phần còn lại. Pic chính cũng được gom và chứng tỏ tinh khiết 100%.

LMWS được phân lập: Để điều chế LMWS được phân lập, lô từ Mẫu thử 3 được thủy phân bằng papain và gom phân đoạn bằng cách sử dụng HPLC điều chế, như trên. Dạng chủ yếu được kiểm định là Fc và Fab bằng cách phân tích ESI-MS nguyên vẹn. LMWS đã chứng tỏ là tinh khiết 99% bằng SE-HPLC phân tích sau đó. Các biến thể Fab được phân lập cũng được điều chế bằng cách xử lý papain và thu gom bằng IE-HPLC điều chế. Biến thể Fab đã chứng tỏ là tinh khiết 100% bằng SE-HPLC phân tích sau đó.

SE-HPLC: Các dịch mẫu của Pertuzumab được pha loãng đến 10 mg/mL bằng pha động (0,2 M kali phosphat, pH 6,2, 0,25 M kali clorua). Các mẫu được phân tách trên cột TSK G3000SW_{XL} (7,8 mm × 300 mm) được rửa giải với pha động ở nồng độ ổn định. Tốc độ chảy là 0,5 mL/phút, và nhiệt độ cột là nhiệt độ môi trường. Theo dõi profin rửa giải ở 280 nm. Để phát hiện bằng tán xạ ánh sáng đa góc (MALS), các mẫu pertuzumab được phân tách bằng cách sử dụng 2 cột tuần tự được nối song song với bộ phát hiện WYATT DAWN HELEO™ MALS (sử dụng laze 658 nm, 17 bộ phát hiện) và bộ phát hiện chỉ số khúc xạ rex WYATT OPTILAB™.

-SDS: Mỗi lô Pertuzumab được tạo dẫn xuất với 5 carboxytetramethylrhodamin suxinimidyl, một chất nhuộm màu huỳnh quang. Sau khi loại bỏ chất nhuộm màu tự do bằng cách sử dụng các cột NAP-5, pha các mẫu không được khử bằng cách cho thêm 40 mM iodoacetamid và gia nhiệt ở 70°C trong 5 phút. Để phân tích các mẫu có được khử, pertuzumab đã tạo dẫn xuất được trộn với natri dodecyl sulfat (SDS) và 1 M DTT đến nồng độ cuối cùng 1% SDS (thể tích/thể tích). Các mẫu sau đó được gia nhiệt ở 70°C trong 20 phút. Các mẫu đã pha được phân tích trên hệ thống CE sử dụng mao quản silic oxit dung hợp đường kính trong 50 µm × 31,2 cm ở 20°C trong toàn bộ quá trình phân tích. Các mẫu được cho vào mao quản này bằng tiêm điện động học ở 10 kV trong 40 giây. Tiến hành phân tách ở điện thế hằng định 15 kV phương thức đảo

cực (âm thành dương) sử dụng dịch đệm chạy CE-SDS làm môi trường sàng lọc. Laze ion-argon vận hành ở 488 nm được sử dụng để kích hoạt huỳnh quang với tín hiệu phát thu được được theo dõi ở 560 nm.

Kết quả và nhận xét

SE-HPLC cung cấp thông tin định lượng về phân bố kích cỡ phân tử của protein nguyên thủy. Profin SE-HPLC cho các lô pertuzumab được thể hiện trong Fig. 25, và hình phóng đại của các profin này được thể hiện trong Fig. 26. Phân bố diện tích pic tương đối của các pic loại trừ kích cỡ được liệt kê trong Bảng 10.

Bảng 10: Phân bố kích cỡ tương đối theo sắc ký loại trừ kích cỡ

Tên lô	Pic		
	HMWS (%)	Pic chính (%)	LMWS (%)
anti2C4-900-1	0,1	99,8	0,1
anti2C4907-2 ^a	0,2	99,8	0,0
Mẫu thử 1	0,2	99,8	0,0
Mẫu thử 3	0,2	99,8	0,0
Mẫu thử 4	0,1	99,8	0,0
Mẫu thử 5	0,2	99,8	0,0
Mẫu thử 6	0,2	99,8	0,0
Mẫu thử 7	0,2	99,8	0,0

Lưu ý: % tổng cộng có thể không cộng đến 100% do làm tròn số.

HMWS = loại phân tử lượng cao; LMWS = loại phân tử lượng thấp.

^a các giá trị thu được từ chất chuẩn anti2C4907-2.

Tỷ lệ của Pertuzumab rửa giải trong pic chính > 99% đối với tất cả các chất thử. Lượng loại phân tử lượng cao (HMWS) nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,2%, và loại phân tử lượng thấp (LMWS) ≤ 0,1%. Tất cả các lô thể hiện profin sắc ký tương tự nhau. Phân đoạn HMWS được tinh chế, bao gồm thể kết tụ đime và cao hơn, đã chứng tỏ có 46% hiệu lực so với chất chuẩn lô anti2C4907-2.

SE-HPLC được tiến hành trên các mẫu không pha và có pha loãng được giữ ở 30°C để xét nghiệm pertuzumab HMWS cho các thể kết tụ phân ly nhanh và chậm có thể do pha loãng và/hoặc phơi nhiễm kéo dài với nhiệt độ trong phòng gia tăng. Không nhận thấy có giảm hàm lượng HMWS của chất chuẩn lô anti2C4907-2 được pha loãng và/hoặc gia nhiệt so với mẫu đối chứng.

Phân tách SE-HPLC kết hợp với MALS tiến hành trên chất chuẩn lô anti2C4907-2 khẳng định pic chính SE-HPLC là monome, với phân tử lượng khoảng 150 kDa.

AUC ở phương thức vận tốc lắng cặn được sử dụng để xác định đặc tính HMWS có mặt trong các mẫu pertuzumab. Tốc độ lắng cặn là kỹ thuật độc lập với sắc ký loại trừ kích cỡ xác định các hàm lượng của HMWS trong mẫu khi không có chất nền cột dạng rắn. Tiến hành AUC trên các mẫu pertuzumab với hàm lượng tăng dần của HMWS để xác định liệu SE-HPLC có khả năng phát hiện tất cả pertuzumab HMWS chủ yếu ổn định bằng cách so sánh các hàm lượng và loại thể kết tụ được xác định bằng tốc độ lắng cặn với các hàm lượng và loại kết tụ được xác định bằng SE-HPLC. 5 mẫu trong khoảng từ 0,2% đến 7,2% HMWS toàn phần (được xác định bằng SE-HPLC) được xác định đặc tính bằng tốc độ lắng cặn và ký hiệu từ A đến E trong Bảng 11 và Fig. 27.

Các mẫu này gồm có lô sản phẩm thuốc pertuzumab đánh dấu (ký hiệu A) và 4 mẫu làm giàu HMWS. Các mẫu HMWS làm giàu được chọn là đại diện cho một khoảng rộng các cơ chế phân huỷ (phơi nhiễm với ánh sáng, phơi nhiễm với pH axit, và các biến thể bazơ được tinh chế bằng IE-HPLC).

SE-HPLC thể hiện một pic HMWS chính cho các mẫu A, B, C và E và hai pic HMWS cho mẫu D (Fig. 27). Cho các mẫu A, B, C và E, AUC thể hiện chỉ một pic HMWS với hệ số lắng cặn ở khoảng 9,1S. Trong mẫu D, AUC thể hiện hai pic HMWS với hệ số lắng cặn khoảng 9,1S và 10,8S. HMWS được phát hiện bằng AUC phù hợp với các kết quả SE-HPLC; cả hai phương pháp thể hiện một sản phẩm phân huỷ chính, với hàm lượng nhỏ hơn của HMWS kích cỡ lớn hơn trong mẫu D.

So sánh các kết quả định lượng các mẫu này từ 2 phương pháp được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11: So sánh các kết quả AUC và SE-HPLC

Mẫu	% HMWS (tổng cộng)	
	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

Ghi chú 1: Mẫu A gồm có lô sản phẩm thuốc pertuzumab đại diện, Mẫu B gồm có lô pertuzumab bị phơi nhiễm ánh sáng ở 1,2 mlux giờ, Mẫu C gồm có lô pertuzumab bị phơi nhiễm ánh sáng ở 3,6 mlux giờ, Mẫu D gồm có lô pertuzumab bị xử lý axit ở pH 3,2, và Mẫu E gồm có biến thể bazơ đã tinh chế từ IE-HPLC.

Ghi chú 2: Tham khảo Fig. 27 cho sắc ký đồ SE-HPLC tương ứng.

AUC = siêu ly tâm phân tích; HMWS = loại phân tử lượng cao; RSD = độ lệch chuẩn tương đối; SE-HPLC = sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ kích cỡ.

^a Các mẫu A và B có hàm lượng HMWS < ngưỡng định lượng của kỹ thuật AUC.

Đối với các mẫu C, D, và E, có sự thống nhất giữa % HMWS được xác định bằng cả hai kỹ thuật. Hàm lượng HMWS thấp có mặt trong các mẫu A và B ngăn cản định lượng chính xác các loại bằng AUC, có ngưỡng định lượng được ước tính bằng 3,7% (Methods 54:83-91 (2011) của Gabrielson và Arthur). Điều này được phản ánh bằng sự chênh lệch rõ rệt về % HMWS giữa SE-HPLC và AUC (Bảng 11). Đánh giá sự tương quan trong khoảng các hàm lượng HMWS. Hệ số tương quan (Lin, L, Biometrics 45:255–68 (1989)) được tính bằng 0,97 (n=5) cho thấy có sự thống nhất giữa kết quả định lượng HMWS bằng AUC và SE-HPLC (Fig. 28).

Các kết quả này khẳng định là SE-HPLC là đủ mạnh để xác định HMWS của pertuzumab. SE-HPLC có khả năng phát hiện và định lượng chính xác tất cả các loại HMWS nhận thấy bởi AUC.

Tính không đồng nhất theo kích cỡ, được phân tích bằng SE-HPLC, SDS-PAGE, và CE-SDS, là thống nhất giữa các lô. Thử nghiệm SE-HPLC thể hiện hàm lượng HMWS tương tự (0,1%–0,2%) và LMWS (0,0%–0,1%) cho tất cả các lô được thử nghiệm. Các mẫu hình phân dải theo phân tích SDS-PAGE cho và các mẫu đã được khử và không được khử là thống nhất, như profin điện di tạo ra bằng CE-SDS.

Theo một phương án, hàm lượng của Pertuzumab loại chính và HMWS biến thể và LMWS biến thể như được đánh giá bằng SE-HPLC như sau:

$\geq 96\%$ Pic chính ví dụ, $\geq 96,7\%$ Pic chính, ví dụ, $\geq 97,3\%$ Pic chính ví dụ, $\geq 97,4\%$ Pic chính $\leq 2\%$ HMWS, ví dụ, $\leq 1,7\%$ HMWS, ví dụ, $\leq 1,5\%$ HMWS, ví dụ, $\leq 1,4\%$ HMWS, ví dụ $\leq 0,8\%$ HMWS.

$\leq 2\%$ LMWS, ví dụ, $\leq 1,6\%$ LMWS, ví dụ, $\leq 1,2\%$ LMWS, ví dụ $\leq 0,6\%$ LMWS.

Cả hai phân đoạn pertuzumab HMWS và LMWS được tinh chế bằng SE-HPLC thể hiện hoạt tính chống tăng sinh giảm so với pic chính và mẫu đối chứng, có hiệu lực đầy đủ. Các biến thể tất cả các kích cỡ thể hiện hoạt tính liên kết HER2 và hoạt tính liên kết FcRn tương đương nhau so với mẫu đối chứng, ngoại trừ LMWS, thể hiện hoạt tính liên kết FcRn thấp hơn. Do mẫu LMWS có chứa 2/3 các mảnh Fab và 1/3 các mảnh Fc, hoạt tính chống tăng sinh và hoạt tính liên kết FcRn thấp hơn là được kỳ vọng. HMWS thể hiện hoạt tính liên kết FcγRIIIa (CD16) V158 cao hơn, nhưng hoạt tính ADCC thấp hơn. Nhận thấy LMWS thể hiện hoạt tính liên kết FcγRIIIa (CD16) V158 thấp hơn, và không có hoạt tính ADCC đối với biến thể này (Bảng 12).

Bảng 12: Hoạt tính sinh học của Pertuzumab Pic chính, HMWS, và LMWS

Các mẫu	% Hoạt tính trung bình (n = 3)				
	Chống tăng sinh	Liên kết HER2	Liên kết FcγRIIIa	ADCC	Liên kết FcRn
Mẫu đối chứng	103	108	91 ^b	80 ^b	80
Pic chính	104	96	96	79	87
HMWS	46	82	522	38	73
LMWS	12 ^a	73 ^a	23 ^a	không có hoạt tính	7 ^a

Ghi chú: % hoạt tính được báo cáo so với chất chuẩn Pertuzumab (Lô anti2C4907-2).

ADCC = độc tính thể bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể; HMWS = loại phân tử lượng cao; LMWS = loại phân tử lượng thấp.

^a mẫu LMWS gồm có 2/3 các mảnh Fab và 1/3 các mảnh Fc. Các giá trị đã nêu phản ánh điều chỉnh nM/nM dựa trên phân tử lượng (Fab = 47644 Da, Fc = 52800 Da, và kháng thể có độ dài đầy đủ = 148088 Da).

^b chất chuẩn Pertuzumab (Lô anti2C4907-2) có hàm lượng G0-F 2,2%, trong khi mẫu đối chứng có G0-F 1,7%. Các kết quả không được hiệu chỉnh độ chênh lệch về hàm lượng chất không được fucosyl hoá.

Điện di mao quản natri dodecyl sulfat (CE-SDS): CE-SDS với phân tích phát hiện huỳnh quang được cảm ứng bằng-laze (LIF) là thử nghiệm có độ nhạy cao cung cấp phương tiện đánh giá định lượng phân bố kích cỡ phân tử các protein trong điều kiện gây biến tính. Trong phân tích CE-SDS các mẫu không được khử (Fig. 29), pertuzumab di chuyển như một pic nổi bật chiếm 96%–98% diện tích pic toàn phần với các pic phụ thể hiện LMWS và HMWS. Hàm lượng HMWS được xác định bằng kỹ thuật này là 0,6% cho tất cả các chất được thử nghiệm. Các loại còn lại di chuyển như LMWS như được thể hiện trong Fig. 30 (hình phóng đại). Sự phân mảnh do cảm ứng gia nhiệt mẫu được giảm tối thiểu bằng alkyl hoá (Anal Chem 78:6583–6594 (2006) của Salas-Solano và các đồng tác giả). Mức phân bố tương đối của các loại được phân tách bằng CE-SDS được liệt kê trong Bảng 13.

Bảng 13: Mức phân bố tương đối của Pertuzumab không được khử bằng CE-SDS (%)

diện tích pic)

Tên lô	Pic						Chính	HMW S
	1	2	3	4	5	6		
anti2C4-900-1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,9	97,8	0,6
anti2C4907-2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	1,9	96,5	0,6
Mẫu thử 1	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	1,7	96,7	0,6
Mẫu thử 3	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	2,3	96,0	0,6
Mẫu thử 4	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	2,3	96,1	0,6
Mẫu thử 5	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	2,0	96,4	0,6
Mẫu thử 6	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	2,2	96,2	0,6
Mẫu thử 7	0,1	0,4	0,0	0,2	0,2	2,1	96,3	0,6

Ghi chú: % tổng cộng có thể không thể cộng chính xác đến 100% do làm tròn số,

CE-SDS = điện di mao quản natri dodexyl sulfat; HMWS = loại phân tử lượng cao,

Nhận thấy có độ chênh lệch nhỏ trong đó Pic 6 tăng từ 0,9% trong lô chất chuẩn anti2C4-900-1 (quy trình Giai đoạn I/II) đến 1,7%–2,3% cho lô chất chuẩn anti2C4907-2, Mẫu thử 1, và các Mẫu thử từ 3 đến 7.

Theo một phương án, Pertuzumab pic chính (ngoại trừ LMWS và HMWS) như được phân tách hoặc phân lập bằng NR-CE-SDS là từ khoảng 95% đến khoảng 99%, ví dụ, từ khoảng 96,0% đến khoảng 97,8%. Tuy ý, hàm lượng HMWS là $\leq 1\%$, ví dụ $\leq 0,6\%$ và lượng LMWS là $\leq 4\%$, ví dụ $\leq 3,4\%$ như được phân tách hoặc phân lập bằng CE-SDS.

Ví dụ 6

Phát hiện và định lượng phân mảnh Pertuzumab

Mục đích của ví dụ này là để đánh giá các phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ (SE-HPLC), điện di mao quản natri dodexyl sulfat được khử(R-CE-SDS), và CE-SDS không được khử (NR-CE-SDS) nhằm phát hiện các mảnh của Pertuzumab.

Vật liệu và phương pháp

Các mẫu được đánh giá trong nghiên cứu này được tóm tắt dưới đây. Các mẫu này bao gồm các mẫu pertuzumab đã phải chịu nhiều điều kiện gây sức ép có thể dẫn đến sự phân mảnh gia tăng.

- Chất chuẩn (2C4907-2)
- Gây stress bằng nhiệt (42 ngày, 40°C)
- Xử lý bằng axit (pH 3,2; 1 ngày, 40°C)
- Độ ổn định cấp tốc (30 ngày ở 40°C tiếp đó bảo quản ở khoảng 5°C)
- Độ ổn định sản phẩm thuốc (DP) thời gian thực (T=0 và T=548 ngày và bảo quản ở khoảng 5°C) và tương ứng với dược chất (DS)

Tiến hành SE-HPLC như mô tả trong Ví dụ 5 nêu trên, với các giá trị báo cáo sau đây: LMWS, Pic chính, HMWS, và các pic đáng kể khác > ngưỡng định lượng (LOQ).

Tiến hành CE-SDS được khử (R-CE-SDS) theo Ví dụ 5 nêu trên, với các giá trị báo cáo: Pic 1, LC, Pic 2, Pic 3, NGHC, HC, Pic 5, kể cả khử không hoàn toàn, và các pic đáng kể khác > LOQ.

Tiến hành CE-SDS không được khử (NR-CE-CDS) như trong Ví dụ 5 nêu trên, với điều chế mẫu không có bước được khử kháng thể để cho phép phân tích không được khử bằng dithiothreitol được loại trừ (DTT) từ bước tạo phức hợp SDS.

Các kết quả định tính thu được bằng SE-HPLC, NR-CE-SDS, và R-CE-SDS tương ứng được trình bày trong các hình vẽ Fig. 31A-B, Fig. 32A-B, và Fig. 33A-B, cũng như tương ứng trong các Bảng 14, 15, và 16.

Nhận biết pic dựa trên tài liệu Analytical Chemistry 71: 2390-2397 (1999) của Hunt & Nashabeh, và Chromatographia Supplement 53: S75-S89 (2001) của Ma & Nashabeh. Để phân tích NR-CE-SDS, một pic nhỏ sau Pic 2 thông thường được bao gồm như một phần của Pic 2 trong quá trình báo cáo dữ liệu. Cho nghiên cứu này, pic nhỏ này được báo cáo riêng rẽ như Pic 2a để phân biệt mảnh từ chuỗi nhẹ (LC).

Bảng 14: Dữ liệu định lượng SE-HPLC (% diện tích Pic)

	HMWS (%)	Pic chính (%)	LMWS (%)
2C4907-2	0,18	99,77	0,04
Xử lý nhiệt	0,40	98,96	0,64
Xử lý bằng axit	7,09	92,65	0,26
Độ ổn định cấp tốc	0,26	99,23	0,51
Độ ổn định sản phẩm thuốc (DP)	0,19	99,68	0,13

Bảng 15: Dữ liệu định lượng NR-CE-SDS (% CPA)

	Pic 1	Pic 2 (LC)	Pic 2a	Pic 3 (Fab)	Pic 4 (HL)	Pic 5 (HH/des Fab)	Pic 6 (HHL)	Pic chính	HMWS
2C4907-2	0,12	0,29	0,05	0,07	0,35	0,18	1,90	96,32	0,73
Xử lý nhiệt	0,42	0,70	0,09	0,61	0,52	1,36	3,62	91,99	0,71
Xử lý bằng axit	0,15	0,37	0,17	0,35	0,45	0,66	3,19	93,42	1,25
Độ ổn định cấp tốc	0,35	0,59	0,09	0,48	0,44	1,07	3,25	92,90	0,84
Độ ổn định DP	0,22	0,37	0,06	0,20	0,33	0,43	2,53	95,27	0,60

LC = Chuỗi nhẹ, HC = Chuỗi nặng, L = Nhẹ, H= Nặng

Bảng 16: Dữ liệu định lượng R-CE-SDS (% CPA)

	Pic 1	LC	Pic 2	Pic 3	NGHC	HC	Pic 5	Inc. Red.
2C4907-2	0,31	25,30	0,92	2,44	2,81	66,82	0,48	0,91
Xử lý nhiệt	0,54	26,16	1,12	3,13	2,81	64,54	0,27	1,43

Xử lý bằng axit	0,38	25,04	5,58°	2,77	2,41	62,91	0,19	0,71
Độ ổn định cấp tốc	0,51	25,01	0,98	2,99	3,16	66,10	0,25	1,03
Độ ổn định DP	0,19	26,34	0,69	3,21	2,83	65,93	0,24	0,57

NGHC = Chuỗi nặng không được glycosyl hoá, HC = Chuỗi nặng, Inc. Red. = Khử không hoàn toàn

Đánh giá dữ liệu: % diện tích pic (hoặc % diện tích pic đã hiệu chỉnh, %CPA, cho CE-SDS) của mảnh thích hợp được so sánh để xác định phương pháp nào trong số các phương pháp CE-SDS cho thông tin không dư thừa so với SE-HPLC. Các mảnh thích hợp bao gồm các pic với cấu trúc chưa biết, hoặc các cấu trúc đã biết có chứa các sản phẩm thu được từ phân cắt (các) chuỗi polypeptit. Các mảnh này là phân biệt với các mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ không được liên kết disulfua không thể phân ly có trong các sản phẩm kháng thể và thường được nhận thấy bằng CE-SDS. Các pic của các mảnh cần phải được phân tách với các pic khác để phát hiện nhạy và định lượng chính xác.

Khả năng phát hiện các mảnh nhỏ: Các mảnh nhỏ có thể được nhận thấy trong cả phân tích R-CE-SDS và NR-CE-SDS, và được gọi như Pic 1 trong cả hai thử nghiệm. Các pic này vẫn giữ hình dạng chung và thời gian di chuyển giống nhau, và gia tăng tương tự trong điều kiện gây stress ở cả hai thử nghiệm. Do đó, Pic 1 được coi là có chứa cùng loại trong cả hai thử nghiệm. Cả hai thử nghiệm CE-SDS có khả năng phát hiện các mảnh nhỏ, như ghi chú trong Bảng 17.

Khả năng phát hiện các mảnh được tạo ra bằng thủy phân bằng axit (mảnh cắt bằng axit): Phơi nhiễm kéo dài với các điều kiện axit có thể tạo ra các mảnh, cụ thể là ở trình tự Asp-Pro (các gốc chuỗi nặng của pertuzumab 272-273), như đã chứng tỏ bằng phân tích phổ khối mẫu được xử lý bằng axit thể hiện các khối lượng ở 29039 Da (HC 1-272) và 21513 Da (HC 273-448 với glycan G0). Các khối lượng lý thuyết cho các dạng này tương ứng là 29031 Da và 21510 Da. Dựa trên thời gian di chuyển kỳ vọng của các dạng này, pic tương ứng có thể được nhận thấy rõ rệt trong phân tích CE-SDS được khử mẫu được xử lý bằng axit (Pic 2, Fig. 34), nhưng được phát hiện ở mức thấp hơn nhiều (tín hiệu thấp) trong thử nghiệm không được khử. Có thể giả thuyết là trong thử nghiệm NR-CE-SDS mảnh Pic 2 được cho là có liên kết disulfua, và do đó

không phát hiện được. Do hàm lượng Pic 2 được phát hiện bằng R-CE-SDS (5,58%) trong mẫu được xử lý bằng axit vượt quá hàm lượng LMWS tổng cộng được phát hiện bằng SE-HPLC (0,26%) cho mẫu này, có thể kết luận là SE-HPLC là không đủ mạnh để phát hiện các dạng này. Do đó, thử nghiệm CE-SDS được khừ là thử nghiệm duy nhất trong bản mô tả này có khả năng phát hiện phân mảnh được tạo ra do thủy phân bằng axit, như được ghi chú trong Bảng 17.

Khả năng phát hiện các mảnh Fab/DesFab: Có mối tương quan khá rõ ($r^2 = 0,97$) giữa LMWS như được phát hiện bằng SE-HPLC, và Pic 3 từ thử nghiệm CE-SDS không được khừ (Fig 35). LMWS được nhận biết có chứa mảnh Fab thông qua các nghiên cứu đồng-rửa giải với Fab được tạo ra bằng enzym. Tương tự, Pic 3 và Pic 5 trong thử nghiệm NR-CE-SDS được nhận biết thông qua các nghiên cứu đồng-di chuyển tương ứng với Fab và DesFab được tạo ra bằng enzym (Ma & Nashabeh, nêu trên). Pic desFab phát sinh từ phân cắt chuỗi nặng tạo ra dạng Fab, vì vậy được coi là ở lượng tương đương mol (tương ứng tỷ lệ khối lượng 2:1) với mảnh Fab, và do đó, thông tin về dạng này có thể thu được gián tiếp bằng SE-HPLC như ghi chú trong Bảng 17.

Bảng 17: Khả năng phát hiện các mảnh bằng SE-HPLC, NR-CE-SDS, và R-CE-SDS

Mảnh	SE-HPLC	NR-CE-SDS	R-CE-SDS
Các mảnh nhỏ CE-SDS Pic 1	không biết	có	có
Mảnh phân cắt bằng axit (R-CE-SDS Pic 2)	không	không	có
Fab / DesFab	có / (gián tiếp)	có	không

Pic 3 trong CE-SDS được khừ: R-CE-SDS Pic 3 là duy nhất đối với pertuzumab và không được nhận thấy trong phân tích CE-SDS các kháng thể khác. Các kết quả xác định đặc tính mở rộng chứng tỏ cho kết luận là Pic 3 không phải biến thể sản phẩm hoặc tạp chất, mà là thành phần lạ có vẻ do cảm ứng-phương pháp đặc hiệu đối với

pertuzumab gồm có dạng có thể phân ly của đime LC-LC. Nhiều kỹ thuật đã được sử dụng để xác định đặc tính Pic 3.

Pic 3 được nhận thấy bằng R-CE-SDS với phát hiện bằng UV và LIF, gợi ý là nó không phải thành phần lạ nhuộm màu đánh dấu hoặc điều chế mẫu.

Khi phân tích bằng R-CE-SDS, các phân đoạn chuỗi nhẹ pertuzumab đã tinh chế cho Pic 3 có phân tử lượng biểu kiến (MW) gấp khoảng 2-lần kích cỡ lý thuyết của LC.

Pic 3 không được nhận thấy khi điều kiện điện di bao gồm nhiệt độ mao quản cao hơn, và không nhận thấy các mảnh đồng-di chuyển khác trong các điều kiện này.

Các nghiên cứu về các đột biến axit amin đơn lẻ đã nhận biết 3 gốc axit amin trong CDR1 và CDR2 của LC liên quan đến tạo thành đime LC-LC. Khi gốc bất kỳ trong số 3 gốc này được thay bằng một axit amin khác, Pic 3 phân ly hoàn toàn và không còn được nhận thấy bằng CE-SDS được khử.

Phân tích SDS-PAGE kết hợp với nhận biết khối lượng protein (PMF) MALDI-TOF đã khẳng định không có các protein của tế bào vật chủ trong pertuzumab, không có dải tương tự được phát hiện ở các mức được nhận thấy bằng CE-SDS.

Tóm lại, các kết quả này chứng tỏ việc nhận biết Pic 3 là đime LC-LC được cảm ứng bởi-phương pháp đặc hiệu với pertuzumab.

Nhận xét

Đánh giá các dữ liệu thu được từ nghiên cứu này cho thấy:

(1) NR-CE-SDS cung cấp thông tin không dư thừa so với SE-HPLC để phát hiện các mảnh

(2) Thông tin phân mảnh không dư thừa thu được bằng phương pháp NR-CE-SDS (so với SE-HPLC) cũng có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp R-CE-SDS

Như được thể hiện trong Bảng 16, thử nghiệm được khử phát hiện các sản phẩm phân cắt do phơi nhiễm ở pH thấp, điều kiện này là có thể có trong quá trình sản xuất được chất. Bảng 18 có chứa các giá trị thu được đối với Pic 1 và Pic 2 CE-SDS được khử chất chuẩn Pertuzumab, chất của giai đoạn III (n=3), và các lô được sản xuất

bằng quy trình sản xuất thương mại ($n=39$). Khoảng dung sai (TI) 95/99 đã được tính cho Pic 1 và Pic 2 sử dụng giá trị $k = 3,2$, và được trình bày trong Bảng 18. Khoảng dung sai 95/99 cho Pic 1 là từ 0,0 đến 0,4 % CPA. Khoảng dung sai 95/99 cho Pic 2 là từ 0,3 đến 0,9 % CPA.

Bảng 18: Dữ liệu định lượng R-CE-SDS (% CPA) trên 43 lô được thử nghiệm

n	Lô	Pic 1 (% CPA)	Pic 2 (% CPA)
1	anti2C4907-2	0,31	0,92
2	SSF0001	0,25	0,63
3	SSF0002	0,20	0,62
4	SSF0003	0,27	0,60
5	VV0002	0,27	0,47
6	VV0003	0,28	0,49
7	VV0004	0,25	0,51
8	VV0005	0,41	0,55
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

Trung bình 0,21 0,62

độ lệch chuẩn 0,06 0,09

Tối thiểu 0,13 0,47

Tổ đa 0,41 0,92

N	43	43
K	3,2	3,2
khoảng dung sai cận dưới	0,02	0,33
khoảng dung sai cận trên	0,40	0,91

Tiêu chí chấp nhận cuối cùng của Pic 1 $\leq 0,5\%$ và Pic 2 $\leq 1,0\%$ theo giải phóng được chất được lựa chọn trong bản mô tả này.

Do được chất pertuzumab được bảo quản đông lạnh, sẽ không có các thay đổi kỳ vọng về độ ổn định của được chất (DS). Ngoài ra, dựa trên các dữ liệu R-CE-SDS thu được đối với được chất ở cả T=0 và T = 548 ngày (Bảng 19), không nhận thấy có thay đổi đáng kể đối với loại bất kỳ đã nêu tên.

Bảng 19: Dữ liệu định lượng R-CE-SDS (% CPA) cho mẫu độ ổn định sản phẩm thuốc

	Pic 1	LC	Pic 2	Pic 3	NGHC	HC	Pic 5	Kể cả được khử không hoàn toàn
Giải phóng được chất	0,25	26,72	0,51	2,27	2,76	66,66	0,27	0,56
Độ ổn định sản phẩm thuốc (DP) T=0	0,13	26,45	0,54	2,78	2,78	66,53	0,30	0,49
Độ ổn định sản phẩm thuốc T=548 ngày	0,19	26,34	0,69	3,21	2,83	65,93	0,24	0,57

NGHC = Chuỗi nặng không được glycosyl hoá, HC = Chuỗi nặng

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa Pertuzumab và biến thể xystein không ghép cặp của nó, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này chứa Cys23 và Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và các xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của nó.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này là biến thể dị đime chứa xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 chỉ ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này là biến thể homodime chứa xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó Pertuzumab và mỗi biến thể xystein không ghép cặp lần lượt bao gồm các trình tự axit amin chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO:8.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó Pertuzumab và mỗi biến thể xystein không ghép cặp bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO:15 và trình tự axit amin chuỗi nặng trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 16.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều biến thể bổ sung của Pertuzumab, trong đó các biến thể bổ sung này được chọn từ nhóm gồm: biến thể không được fucosyl hoá, loại phân tử lượng thấp (LMWS), loại phân tử lượng cao (HMWS), biến thể được glycat hóa, biến thể được khử disulfua, biến thể không được khử, biến thể khử amit, biến thể được sialyl hóa, biến thể-VHS, biến thể lysin đầu tận C, biến thể được oxy hoá-methionin, biến thể glycosyl hoá G1, biến thể glycosyl hoá G2, và biến thể chuỗi nặng không được glycosyl hoá.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó lượng biến thể xystein không ghép cặp trong chế phẩm này $\leq$ khoảng 25% như được xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) đối với Fab.
8. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó lượng biến thể homodime trong chế phẩm này $\leq$ 4,9% như được xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) đối với kháng thể nguyên vẹn.

9. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó lượng biến thể dị đime trong chế phẩm này là từ khoảng 13% đến khoảng 18% như được xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) đối với kháng thể nguyên vẹn.
10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được thử nghiệm phân tích để khẳng định lượng biến thể xystein không ghép cặp trong chế phẩm này $\leq$ khoảng 25% như được xác định bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) đối với Fab.
11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó chế phẩm này còn chứa biến thể không được fucosyl hóa, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hoá lớn hơn từ 2% đến 4,1% chế phẩm.
12. Dược phẩm chứa chế phẩm theo điểm 1 và một hoặc nhiều tá dược được dụng.
13. Vật phẩm bao gồm vật đựng chứa dược phẩm theo điểm 12 trong đó và tờ hướng dẫn sử dụng kèm theo thông tin kê đơn hướng dẫn người dùng sử dụng dược phẩm này để điều trị cho bệnh nhân ung thư.
14. Biến thể được phân lập của Pertuzumab, trong đó biến thể được phân lập này bao gồm: (a) biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab, trong đó biến thể này là biến thể dị đime bao gồm Cys23 và Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 chỉ ở một miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; hoặc (b) biến thể xystein không ghép cặp của Pertuzumab, trong đó biến thể này là biến thể homodime bao gồm Cys23 và Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab.
15. Chế phẩm chứa Pertuzumab và (a) biến thể xystein không ghép cặp của nó, trong đó biến thể xystein không ghép cặp này gồm gồm Cys23 và Cys88 ở cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab và xystein không ghép cặp Cys23/Cys88 ở một hoặc cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ của Pertuzumab; và (b) biến thể không được fucosyl hóa của Pertuzumab, trong đó lượng biến thể không được fucosyl hóa lớn hơn từ 2% đến 4,1% chế phẩm.

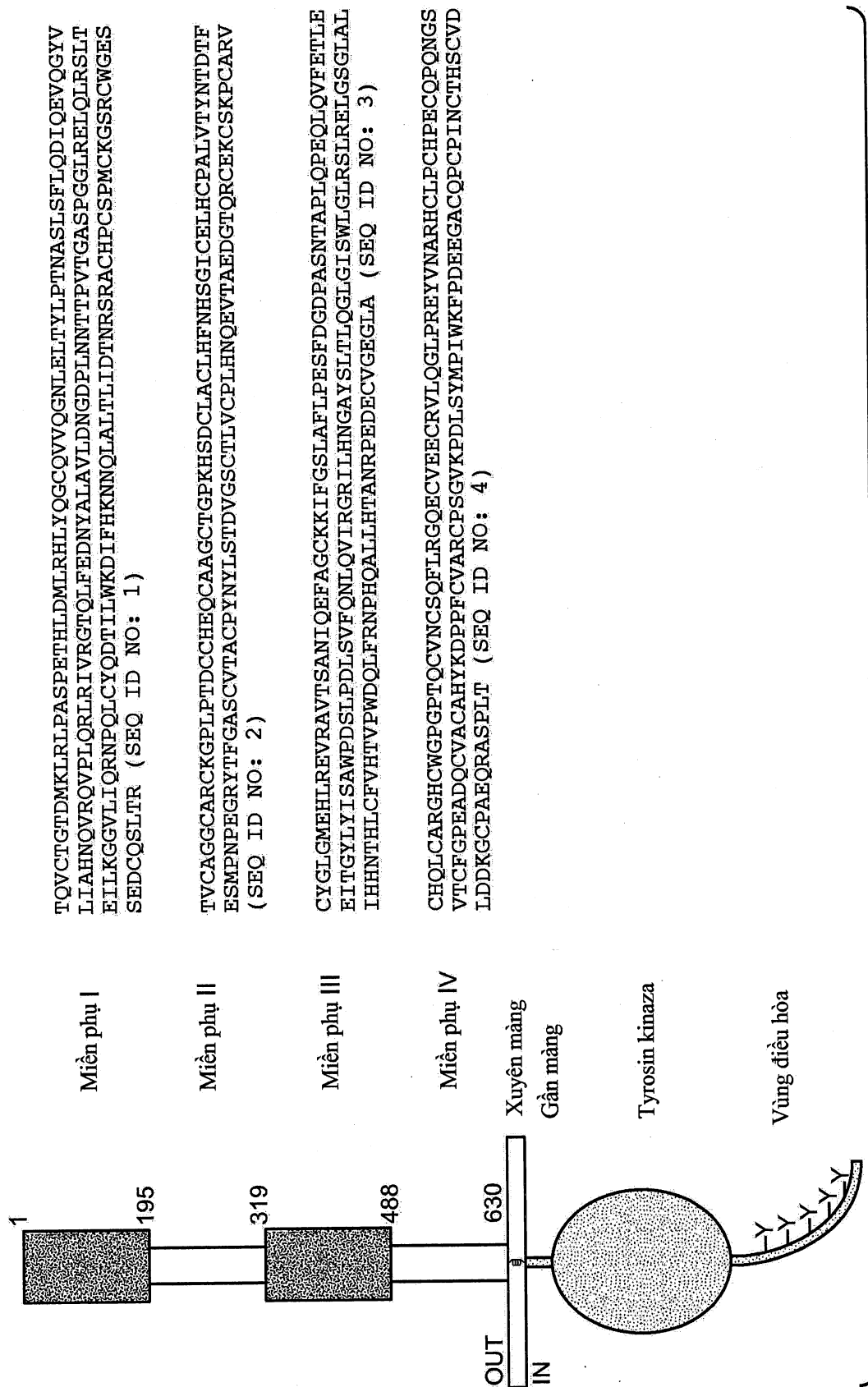


FIG. 1

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQORP	
	** ***** *	*	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQOKP	
		* ** ****		
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQOKP	

	50	60	0	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	* *	
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* *****			
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)	
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:7)	
	*** *		
hum KI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:9)	

FIG. 2A

Vùng biến đổi chuỗi nặng

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** * * * *	*	*	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * *	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** * *			
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		

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

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

FIG. 2B

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS**YRYTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC**QQYYIYPYTF**GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

FIG. 3A

Trình tự axit amin của chuỗi nặng pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTD**YTM~~DWVRQ~~APGKLEWVAD**VNPNSGGSIY**
 70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARN**LGPSFYFDYWG**QGT~~LV~~TVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SV~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 LYSLS~~SV~~VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYR~~V~~SVLT~~VL~~HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 12)

FIG. 3B

Chuỗi nhẹ trastuzmab

1 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 D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K 45
 46 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 90
 91 H Y T T 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 135
 136 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 180
 181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (SEQ ID NO: 13) 210 214

FIG. 4A

Chuỗi nặng trastuzmab

```

1   15   30   45
|EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL
46   75   90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91   120  135
TAVYYCSRWG G DGFYAMDYWGQGTLVTVSS|ASTKGP S VFPLAPSS
136   165  180
KSTSGGTAA L GCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSS
181   210  225
GLYSLSVVTPSSSLG TQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226   255  270
THTCPPCPAP ELLGGP S VFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDS
271   300  315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNS T YRVVS V LTVLHQD
316   345  360
WLN GKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREE
361   390  405
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
406   435  449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGQGV FSCSVMH EALHNH Y TQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO: 14)

FIG. 4B

Chuỗi nhẹ biến đổi của pertuzumab

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

FIG. 5A

Chuỗi nặng biến đổi của pertuzumab

```

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 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 R T P E V T C V V D V S H

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

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

```

(SEQ ID NO: 16)

FIG. 5B

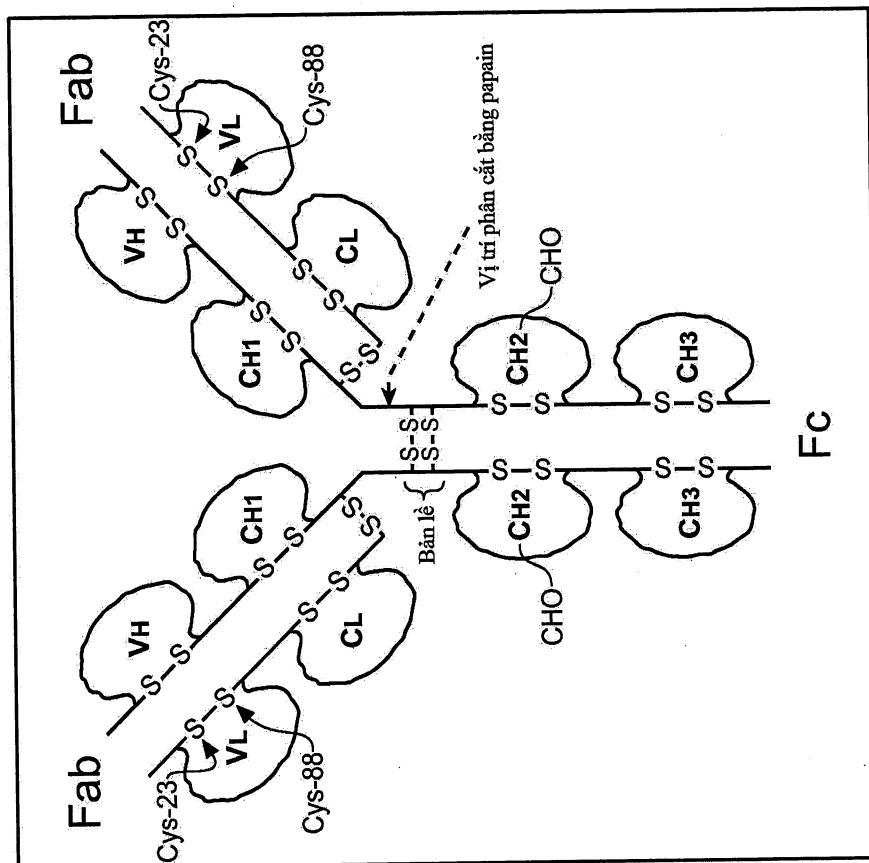


FIG. 6

Bản đồ pepit được thủy phân bằng trypsin (nguyên thủy) không khử của pertuzumab

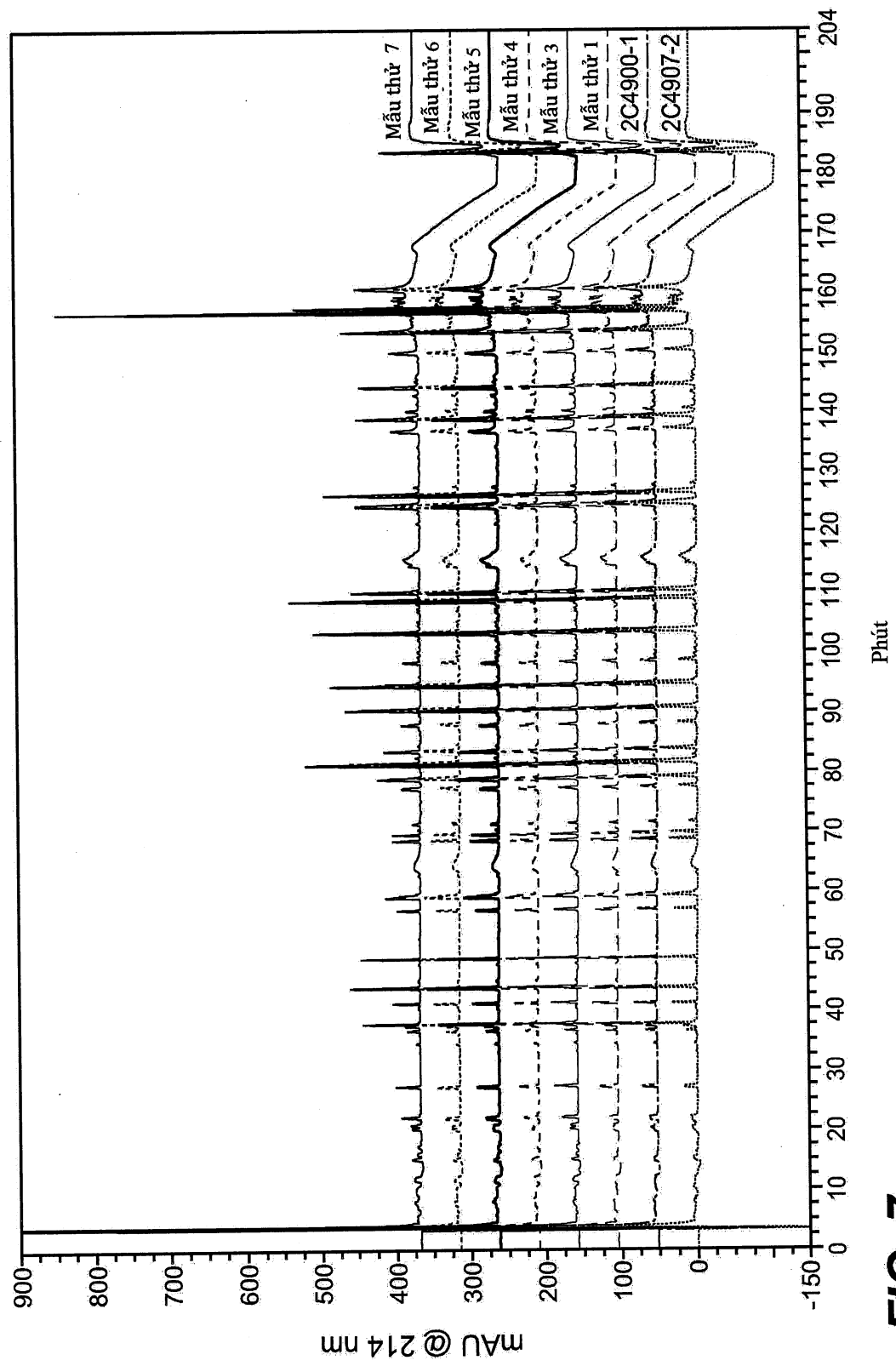
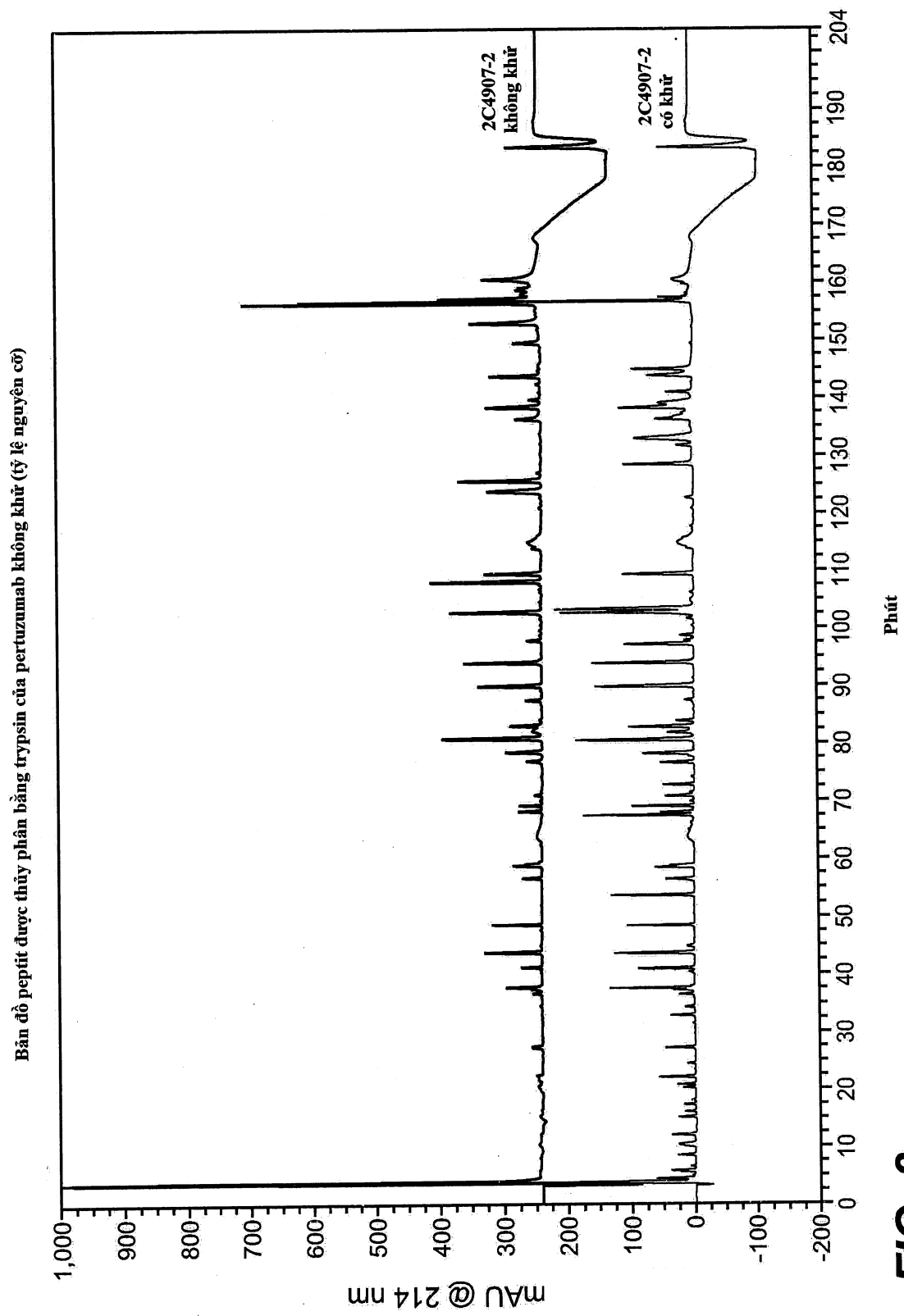
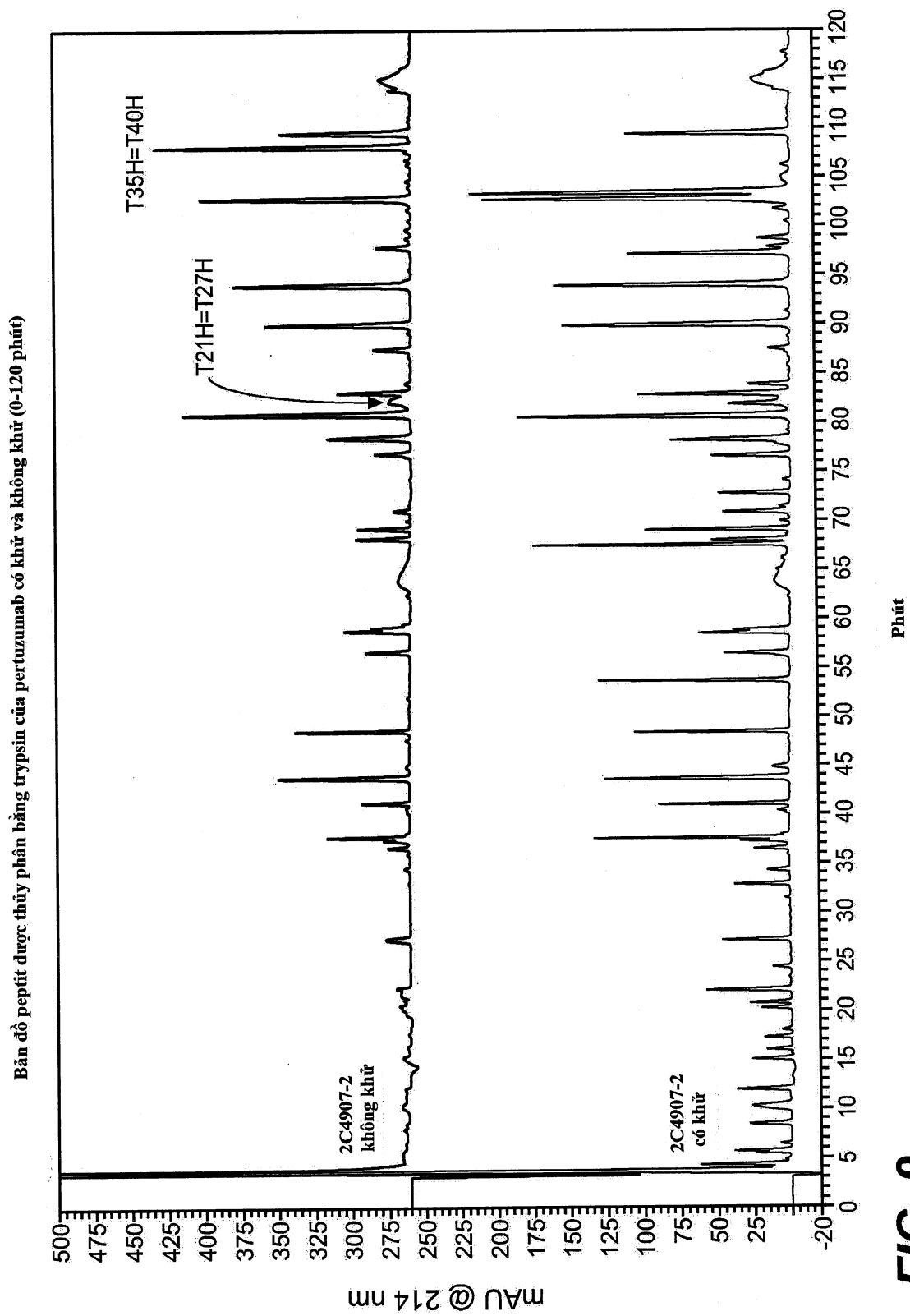


FIG. 7

**FIG. 8**

**FIG. 9**

Bản đồ peptide thủy phân bằng trypsin của pertuzumab có khử và không khử (120-204 phút)

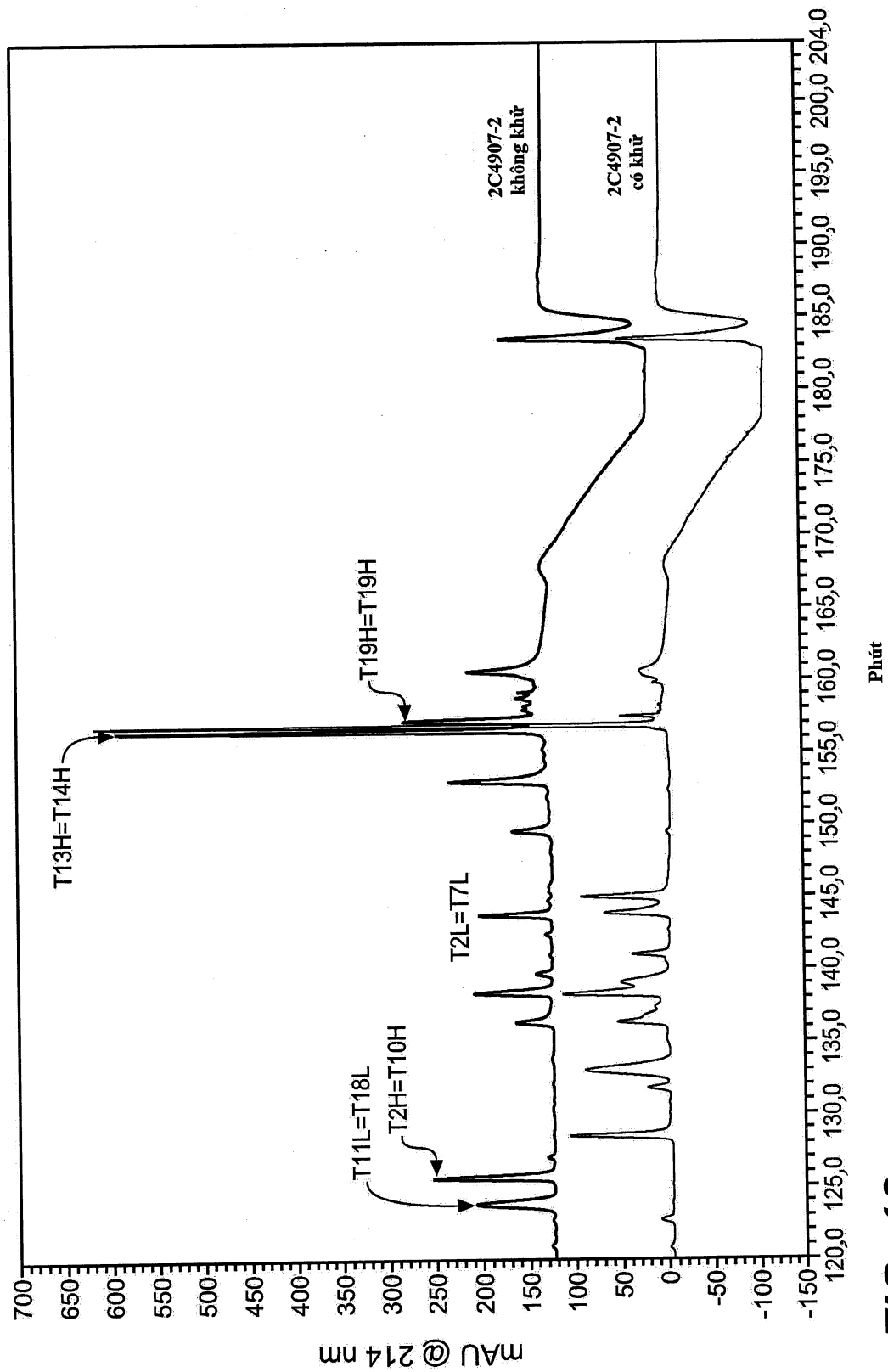


FIG. 10

Phân tích HIC của pertuzumab được thủy phân bằng papain

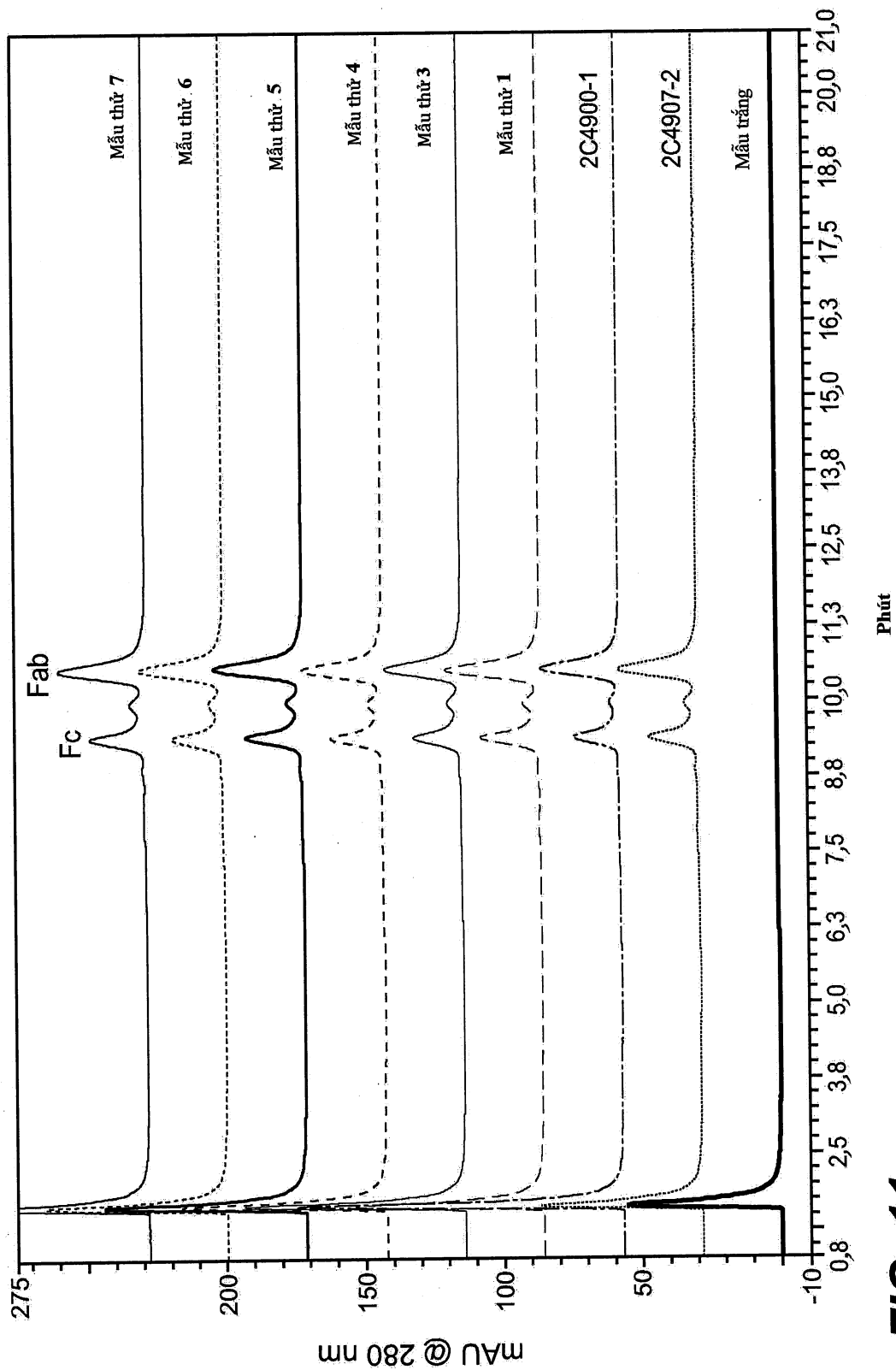
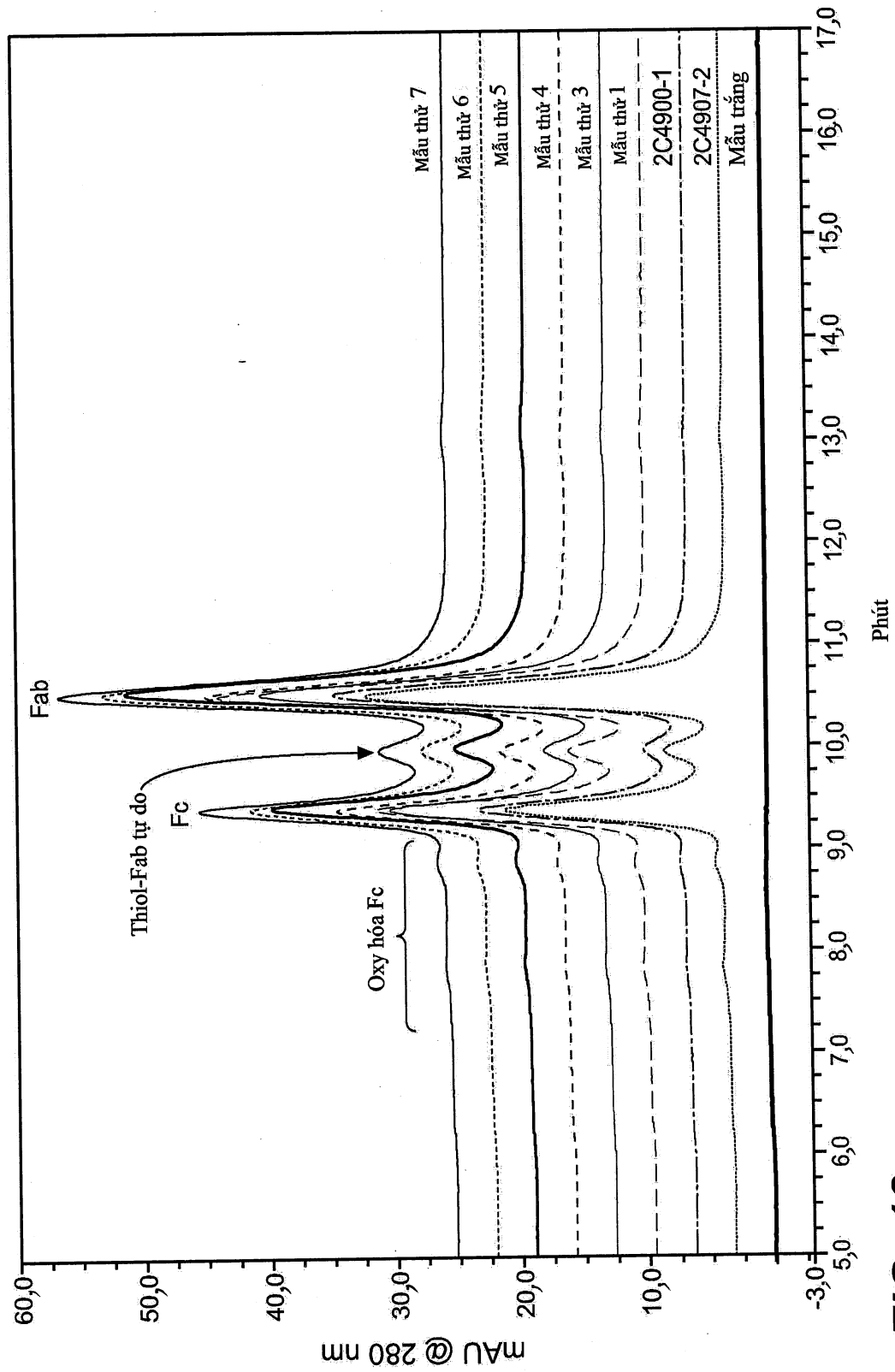


FIG. 11

Phân tích HIC của pertuzumab được thủy phân bằng papain (xem mở rộng)

**FIG. 12**

Phân tích HIC pertuzumab nguyên vẹn

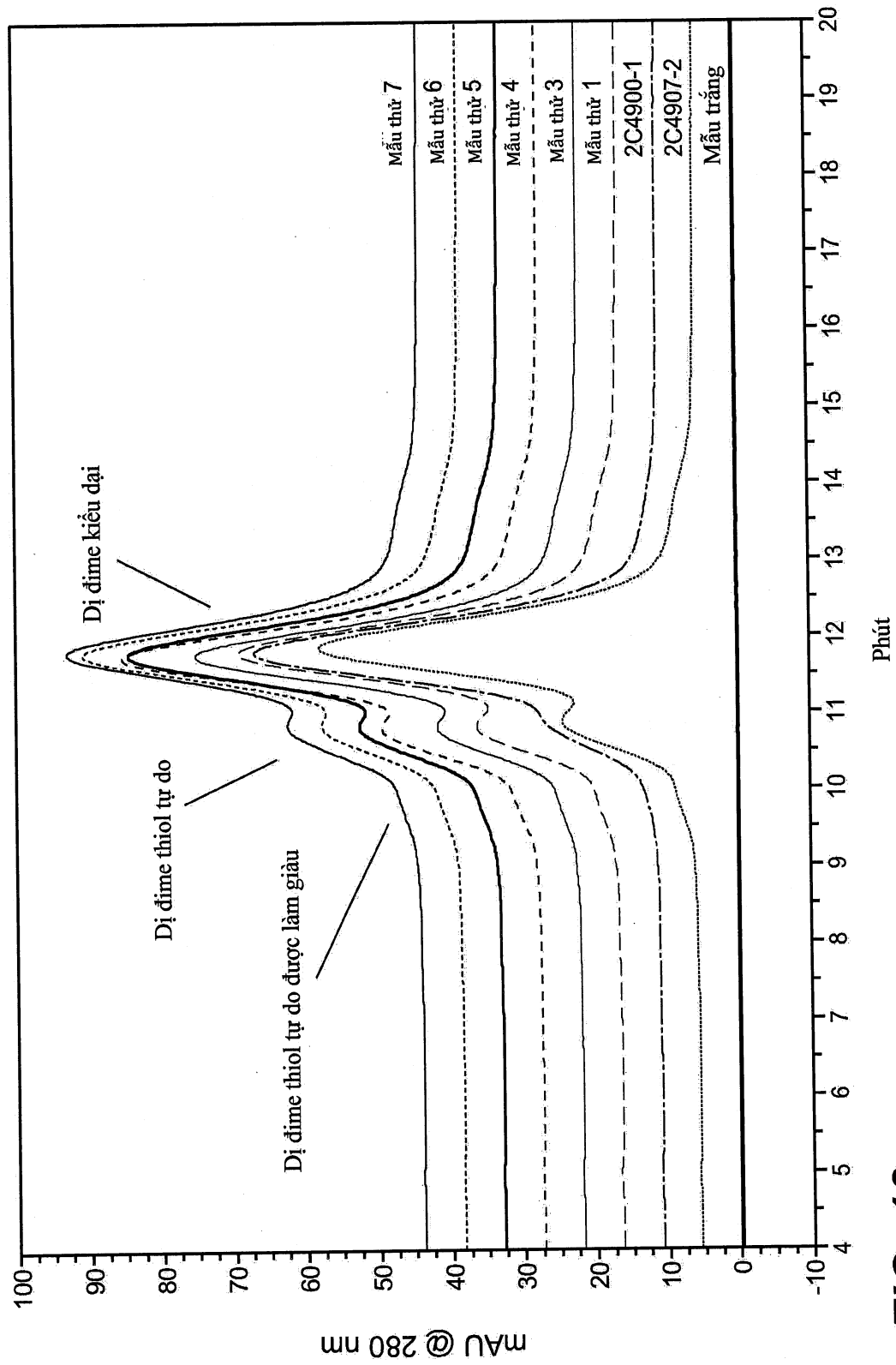
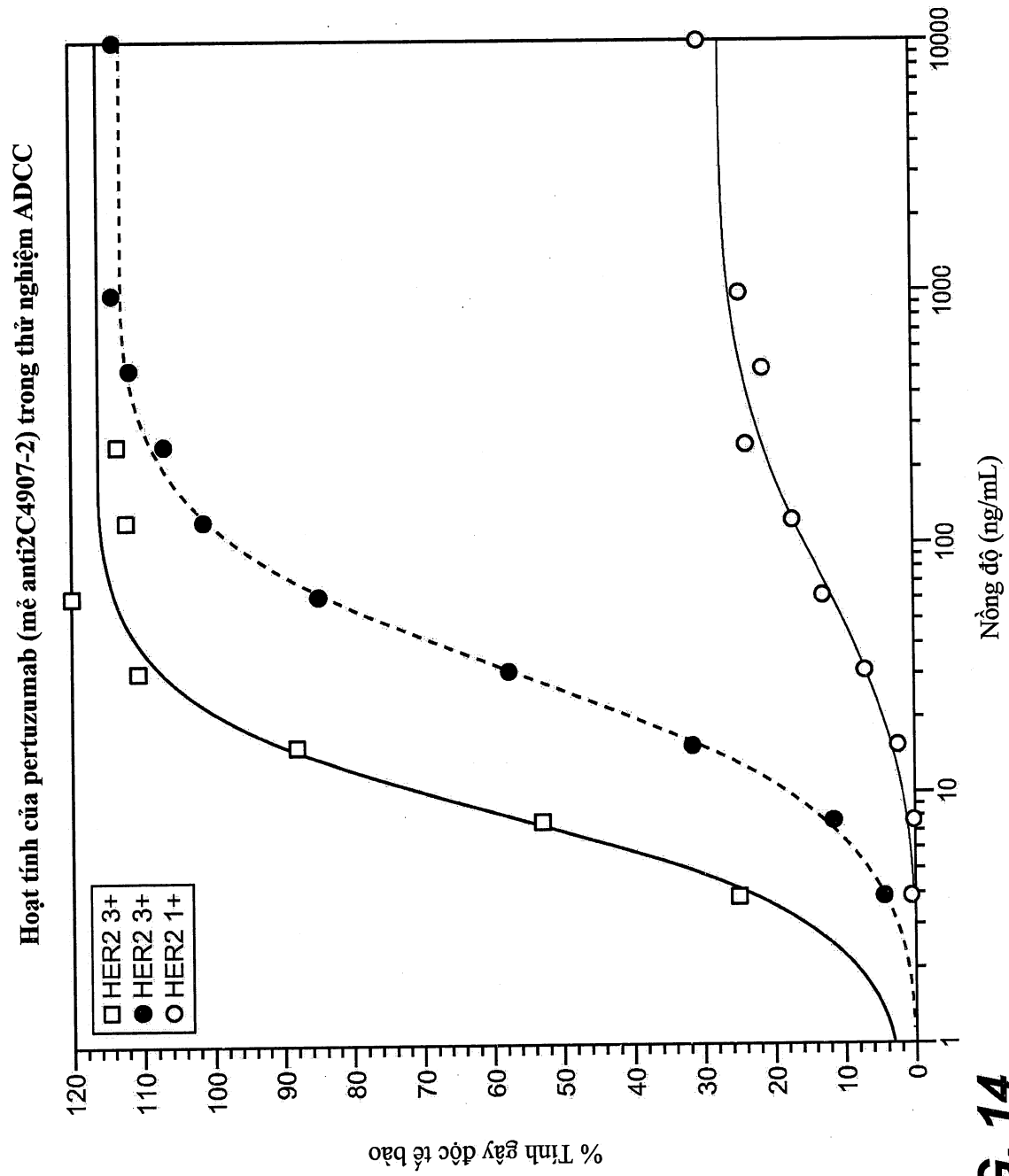
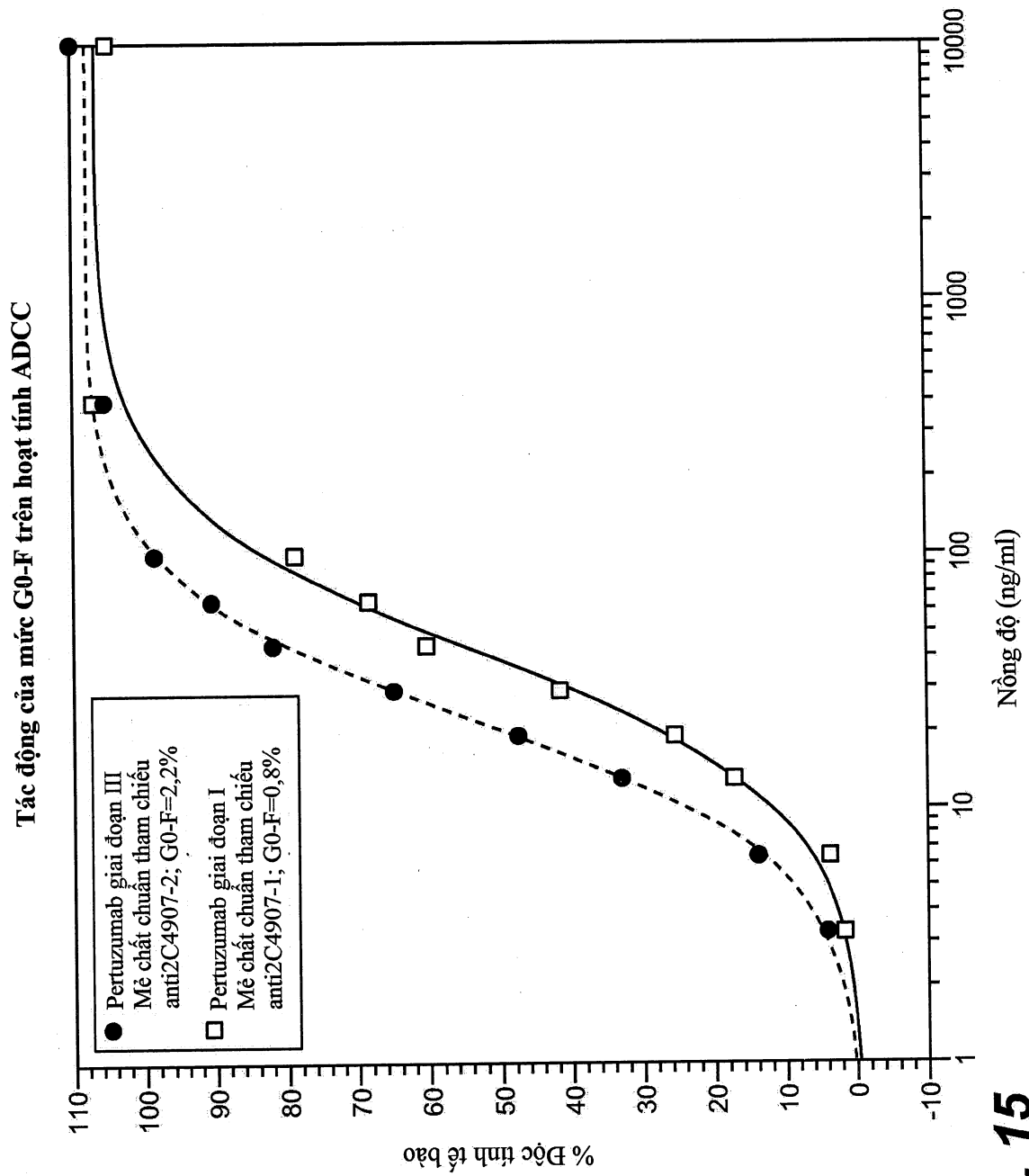
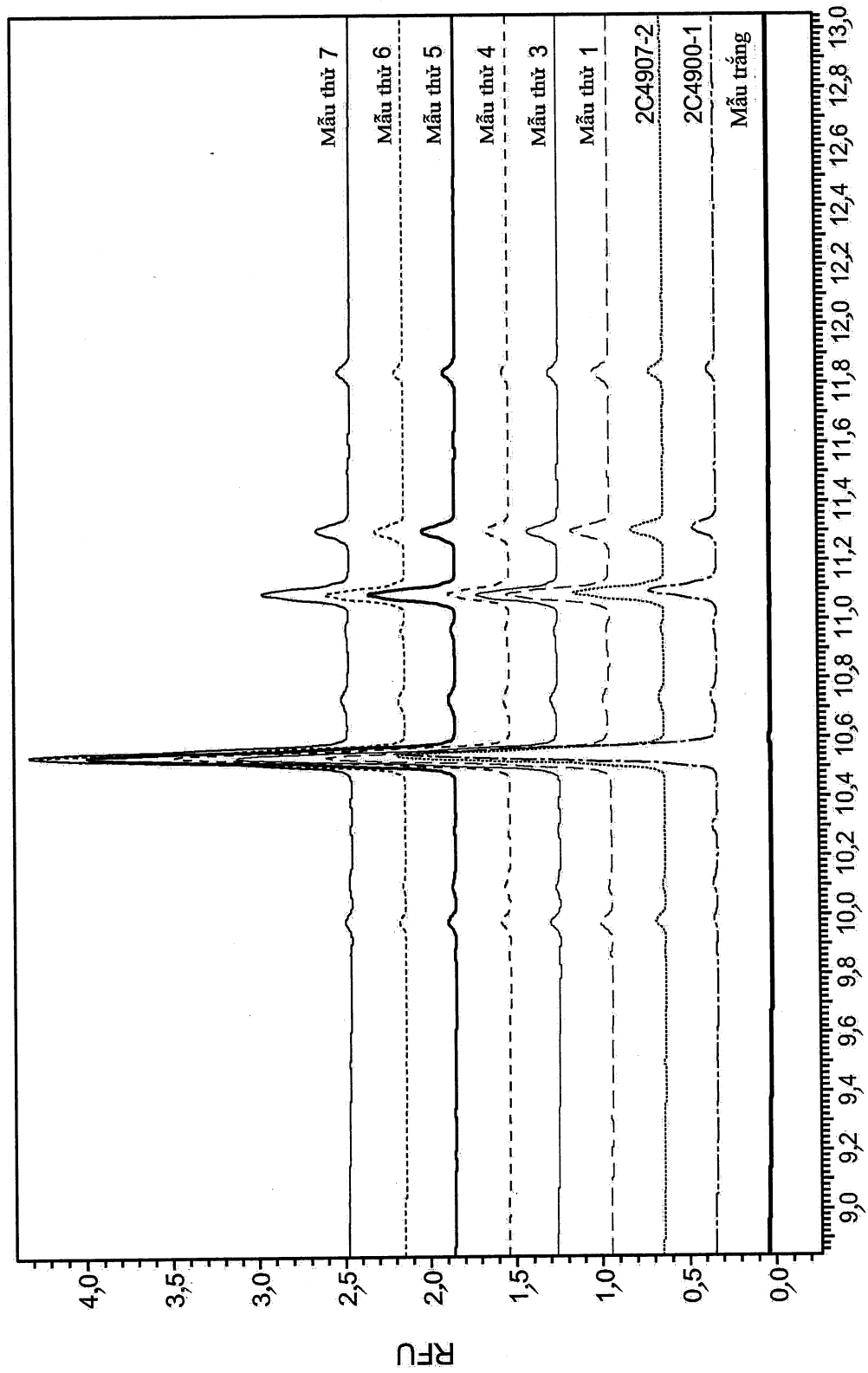


FIG. 13

**FIG. 14**

**FIG. 15**

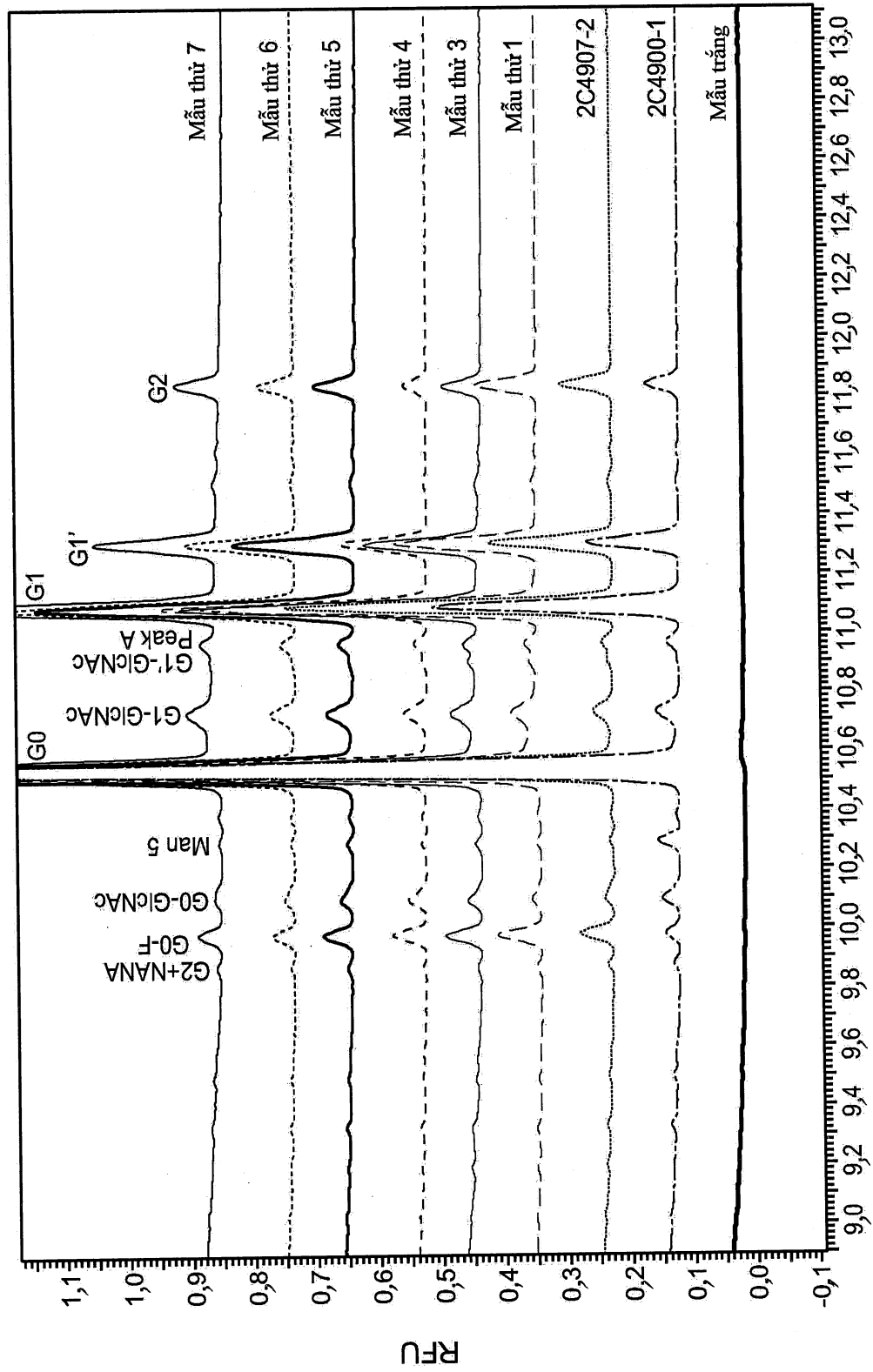
Phân tích điện di mao quản oligosaccarit liên kết N được giải phóng từ pertuzumab



Phút

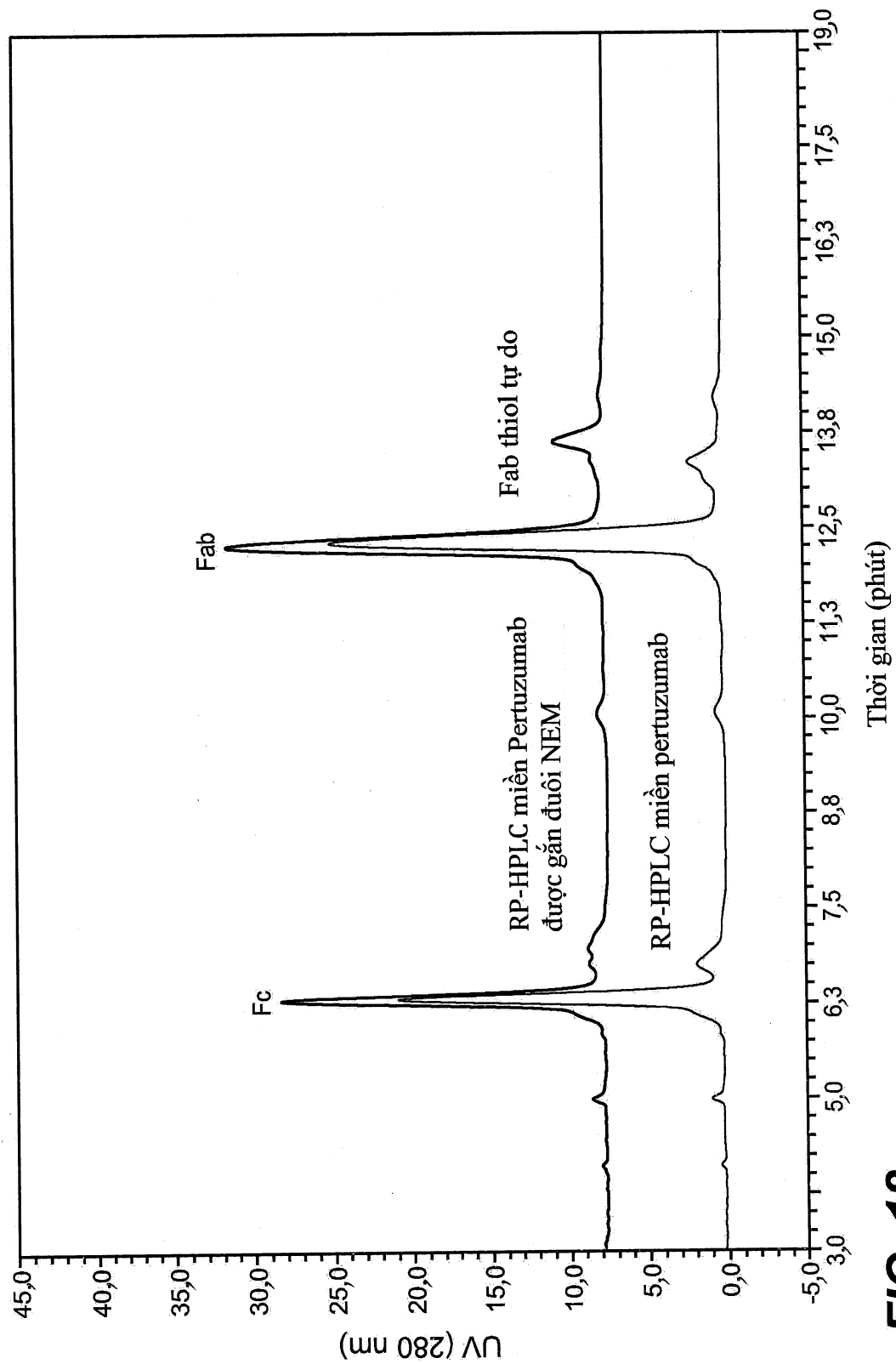
FIG. 16

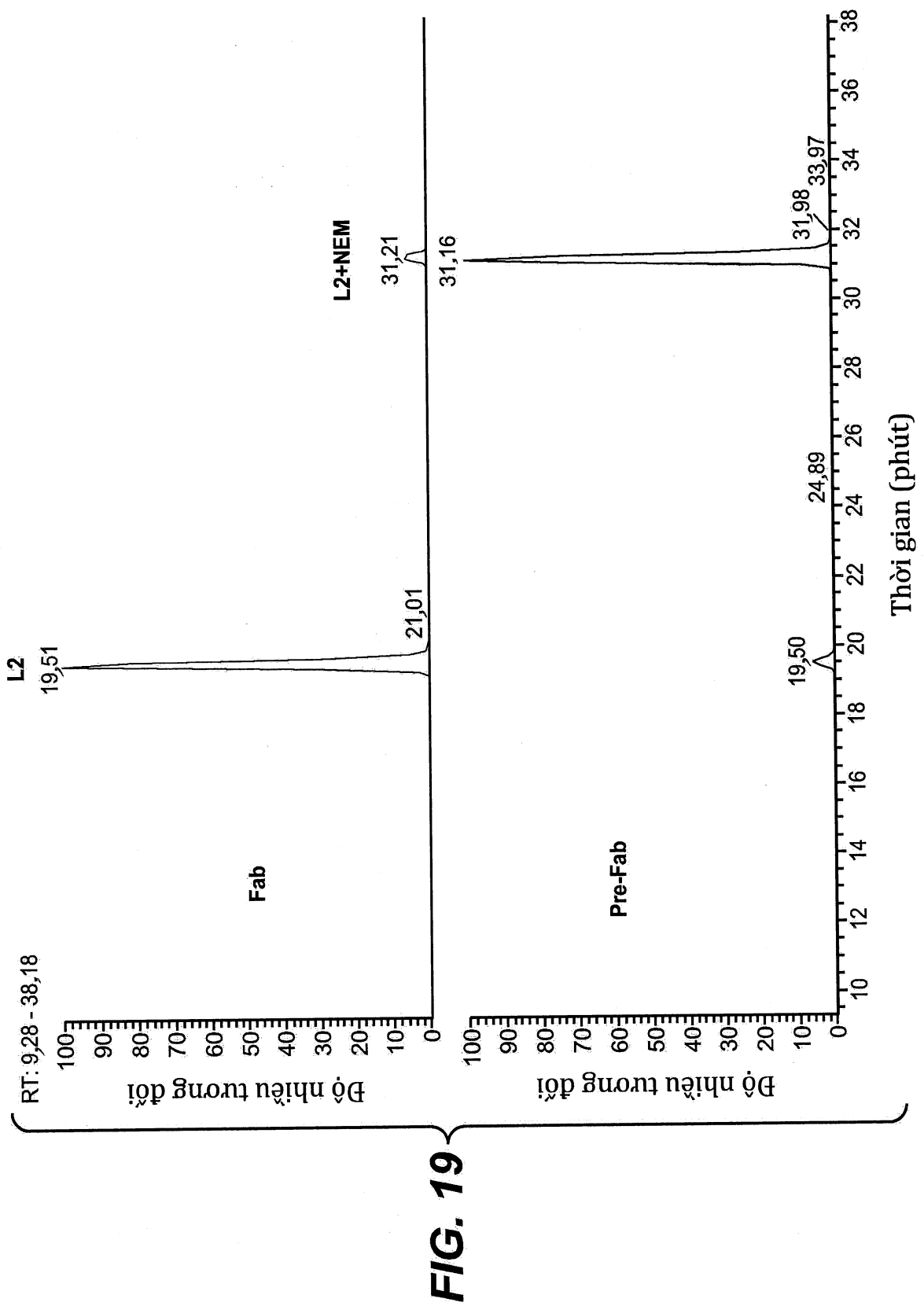
Phân tích điện di mao quản oligosaccharit liên kết N được giải phóng từ pertuzumab (xem mở rộng)



Phút

FIG. 17

**FIG. 18**



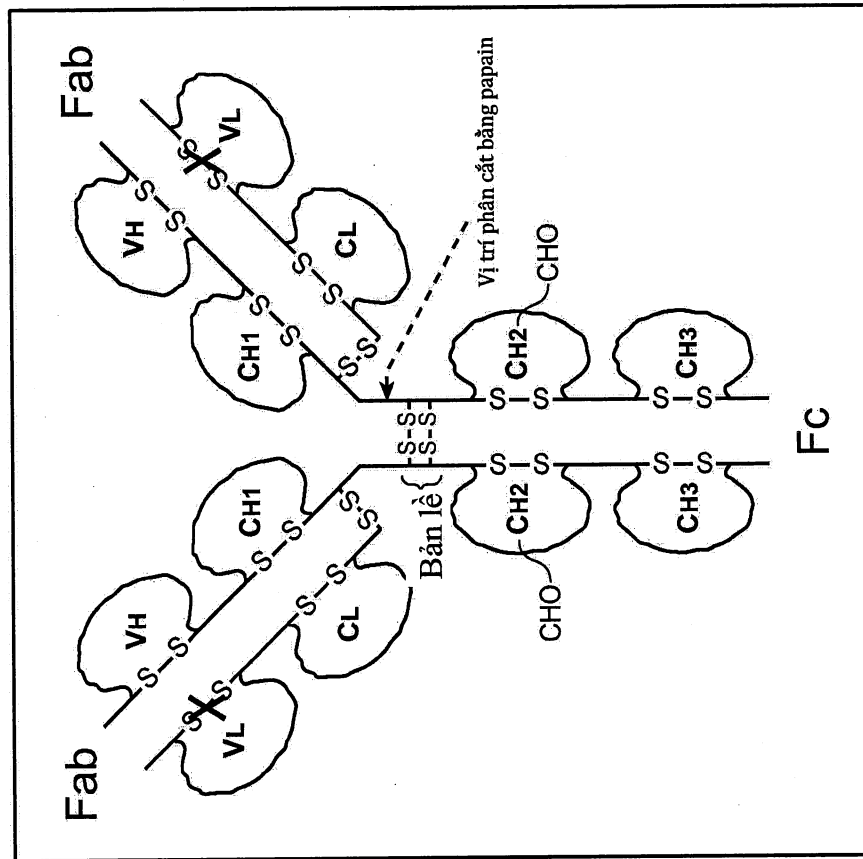


FIG. 20C

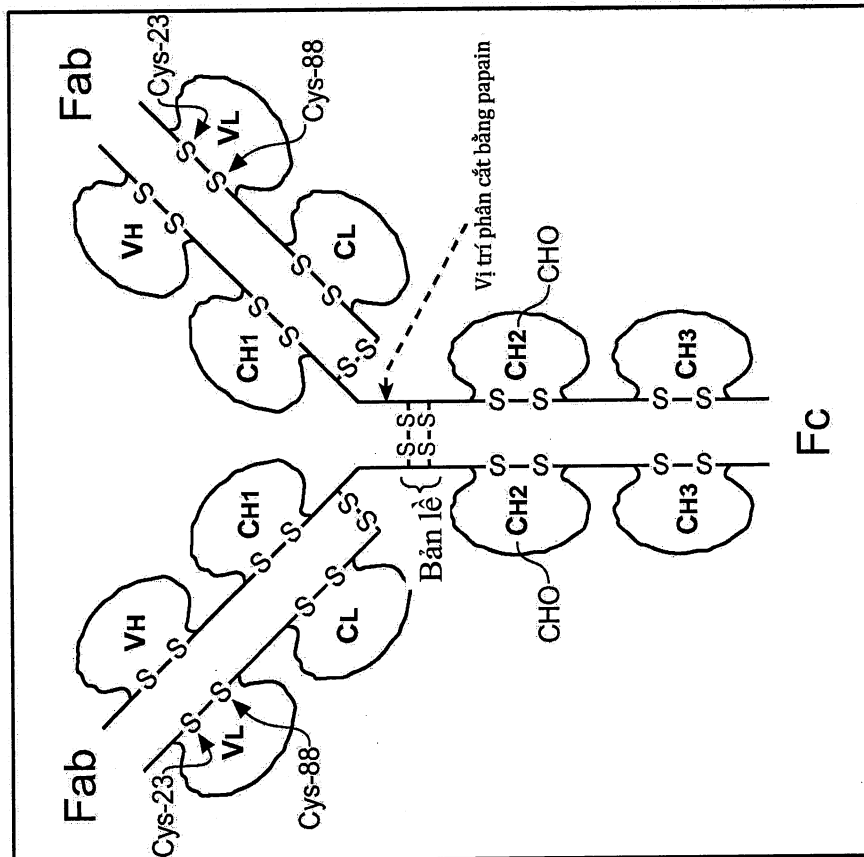


FIG. 20A

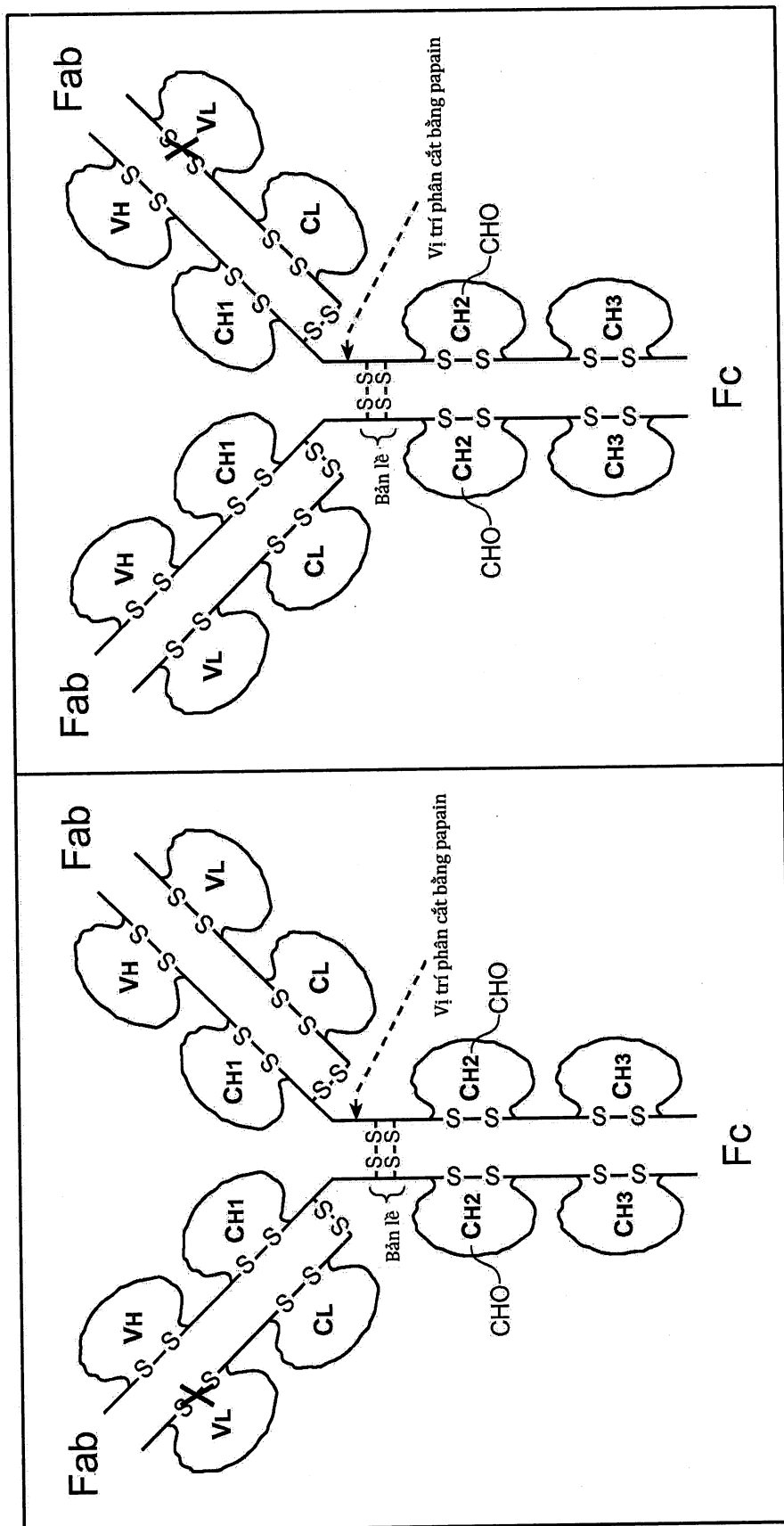


FIG. 20B

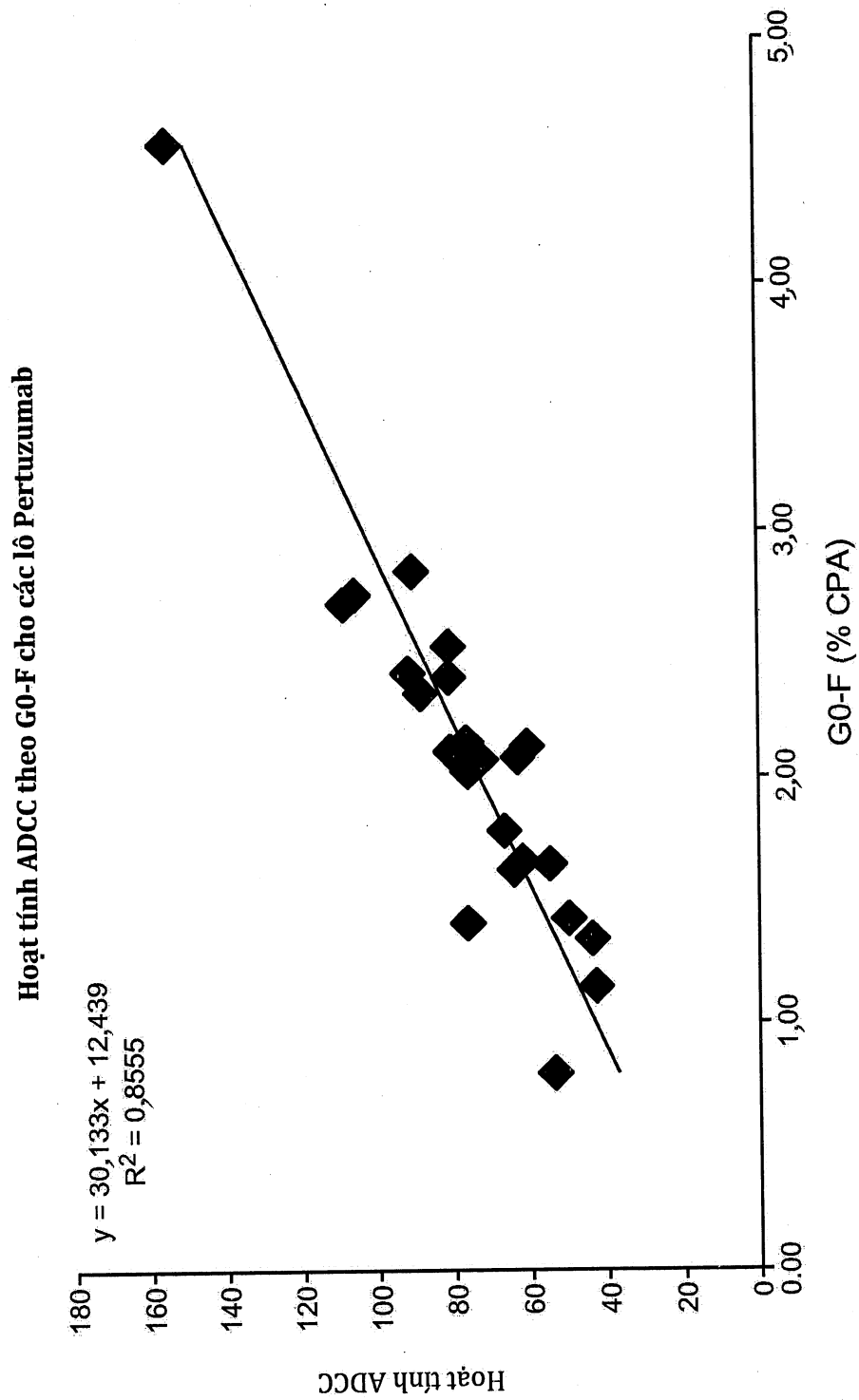
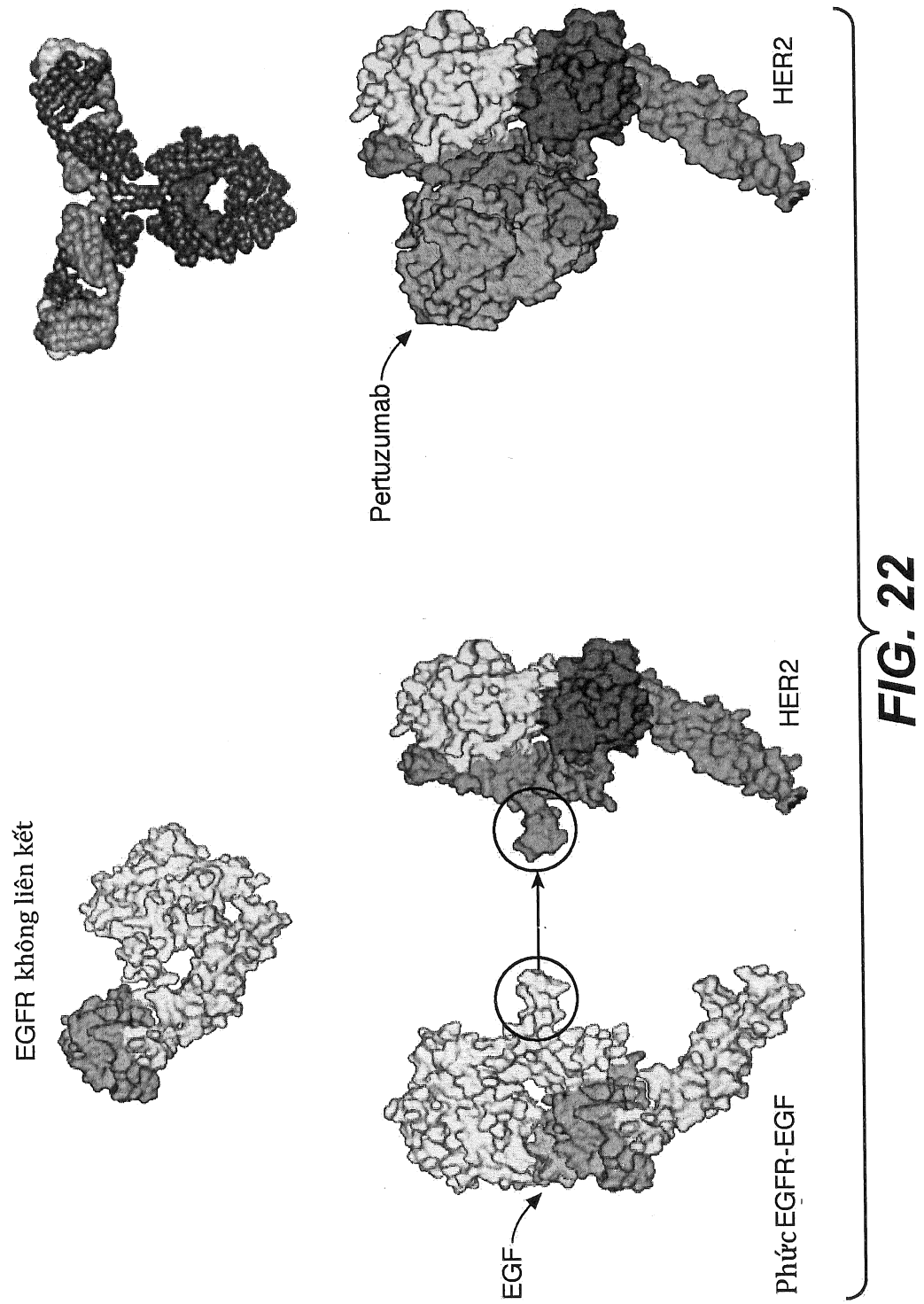
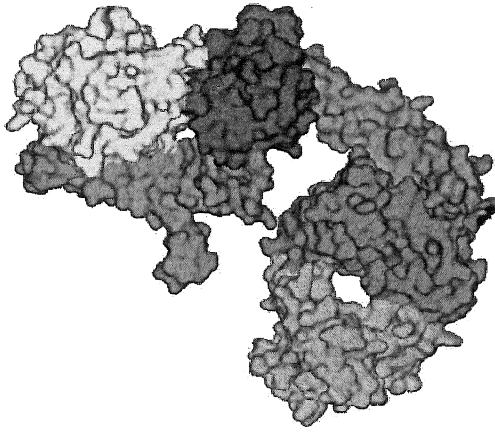


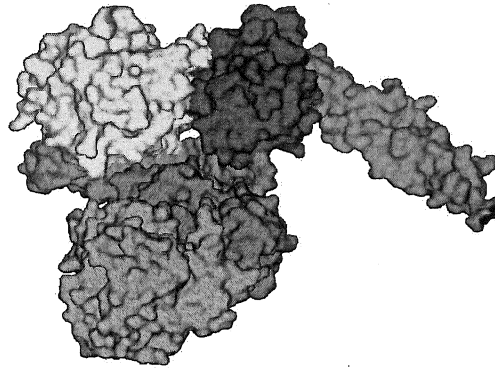
FIG. 21



Trastuzumab
HERCEPTIN



Pertuzumab
PERJETA



- Gắn kết miền phụ IV
- Bảo vệ kháng lại giải phóng thụ thể
- Có ảnh hưởng tương đối đến điều biến giảm thụ thể
- Có tác động nhẹ đối với vai trò của HER2 như một đồng thụ thể

- Gắn kết miền phụ II ở giao diện dime hoá
- Không ngăn ngừa giải phóng thụ thể
- Có ảnh hưởng tương đối đến điều biến giảm thụ thể
- Có tác động chủ yếu đối với vai trò của HER2 như một đồng thụ thể

FIG. 23

FIG. 24A

Các cấu trúc Oligosacarit được gắn với IgG1

Cấu trúc	Tên gọi tắt	Khối lượng
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$ $\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-} \end{array}$	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man6	1398

Các cấu trúc oligosaccarit được gắn vào IgG1

Cấu trúc	Tên viết tắt	Khối lượng
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1-1	1423
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G0	1463
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-6)	1626
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G1 (1-3)	1626
$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)$ $\text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6)$	G2	1788

Khối lượng nêu trong Fig. này tương ứng với giá trị (M+Na)⁺

FIG. 24B

Phân tích sắc ký loại trừ kích cỡ Pertuzumab (tỷ lệ nguyên cỡ)

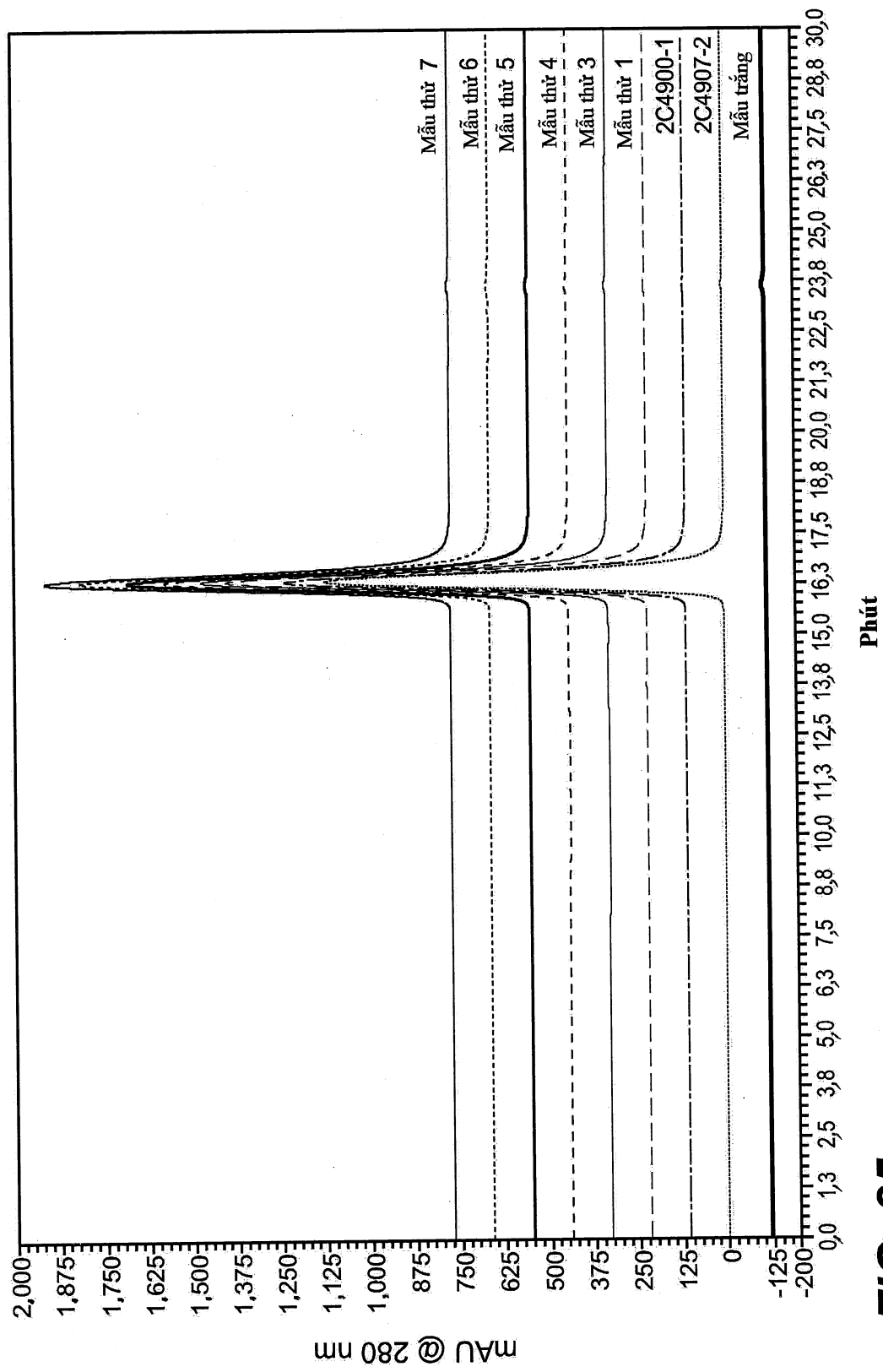


FIG. 25

Phân tích sắc ký loại trừ kích cỡ Pertuzumab (tỷ lệ phóng đại)

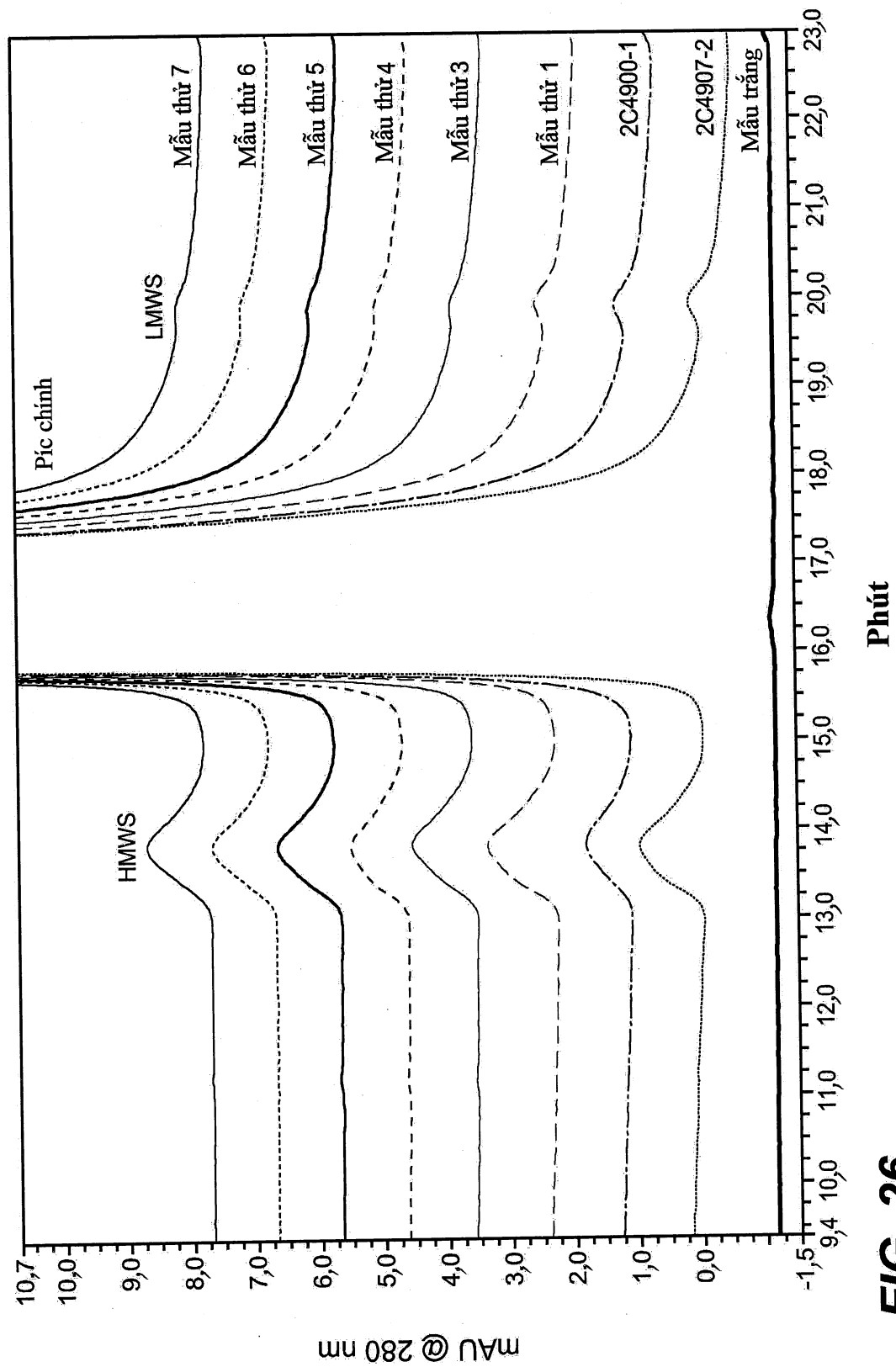
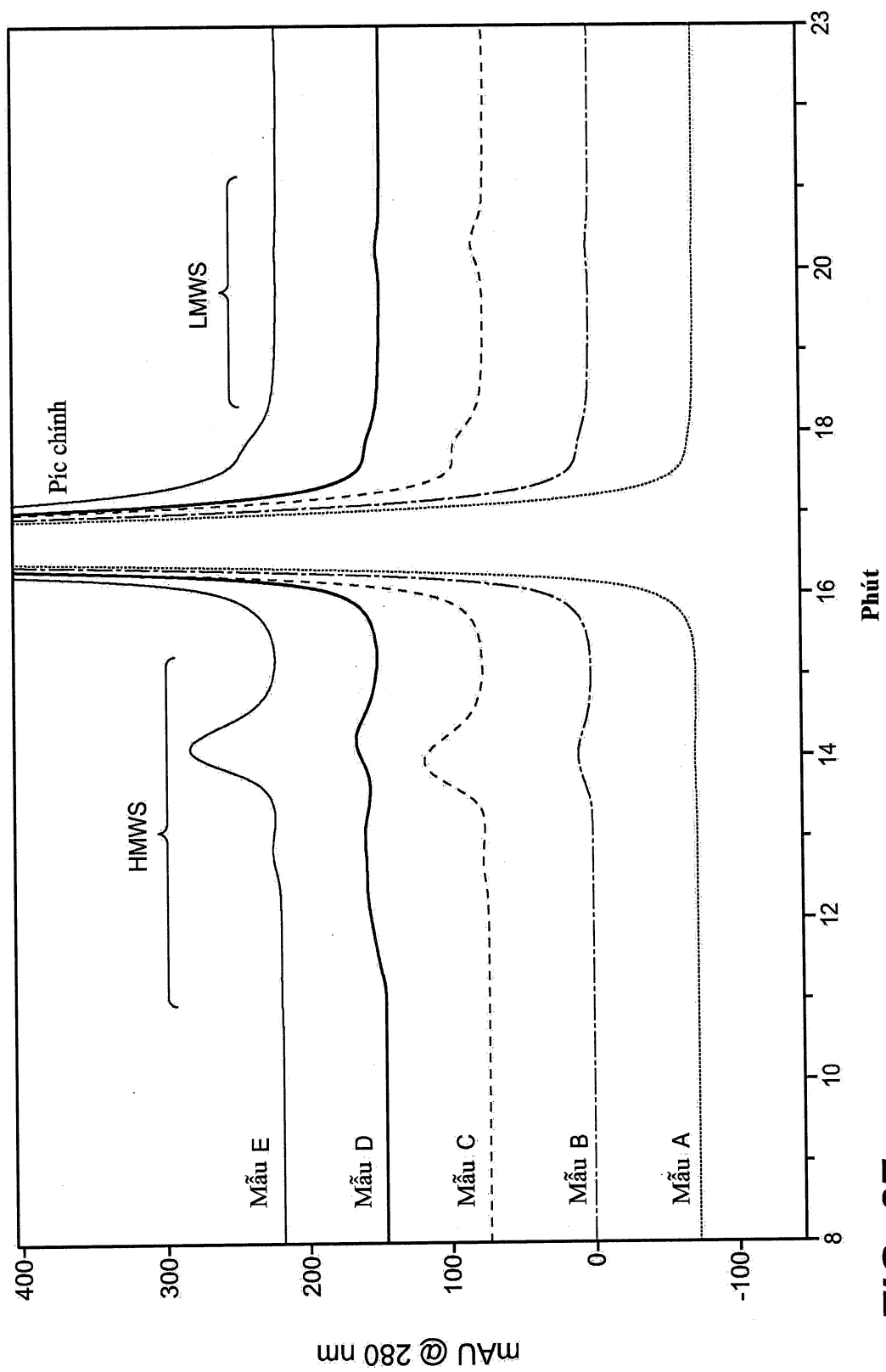
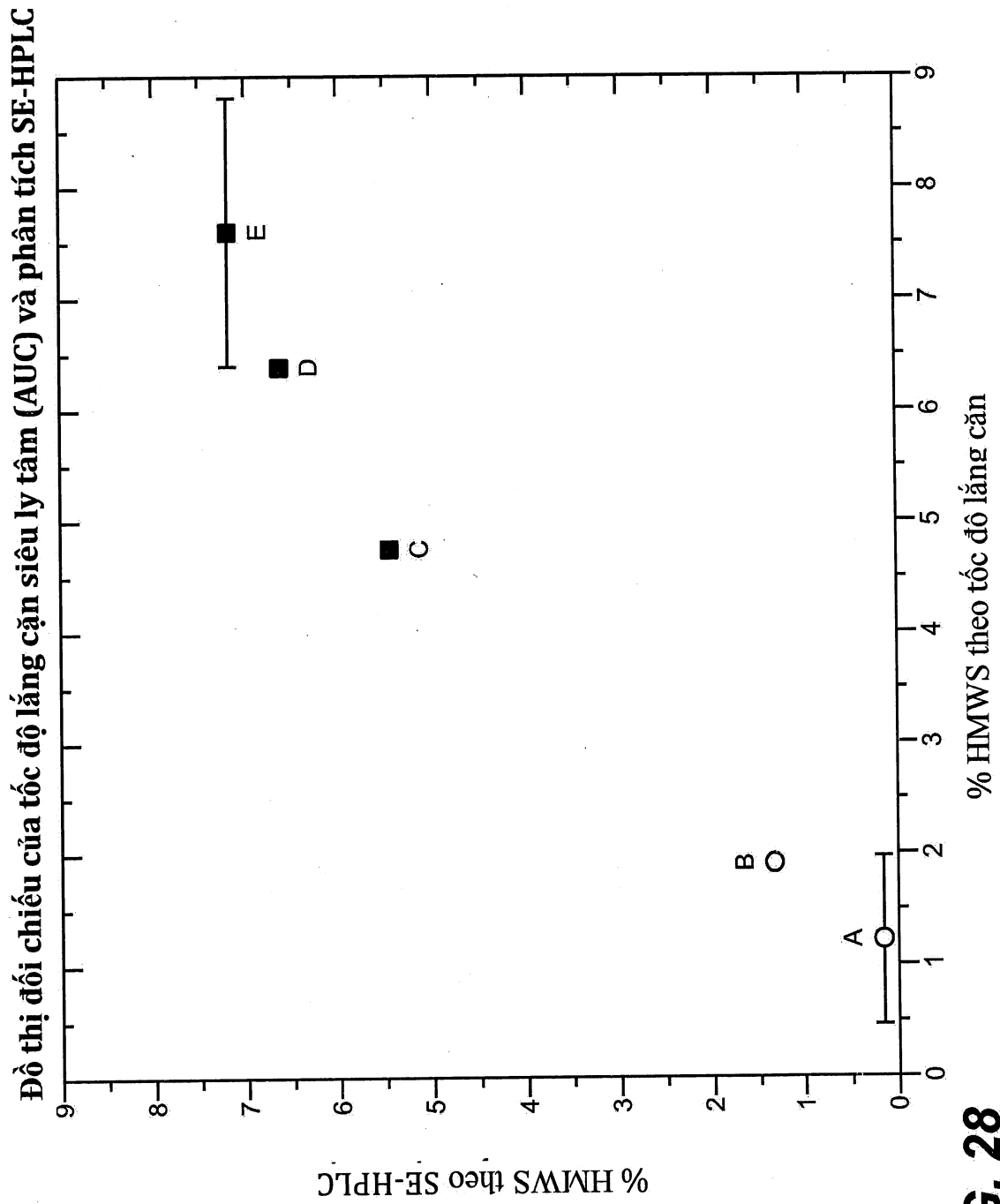


FIG. 26

Phân tích SE-HPLC các mẫu Pertuzumab với HMWS gia tăng

**FIG. 27**

**FIG. 28**

Phân tích điện di mao quản natri dodecyl sulfat (CE-SDS) với phát hiện huỳnh quang cảm ứng-laze (LIF) Pertuzumab không khử hoá

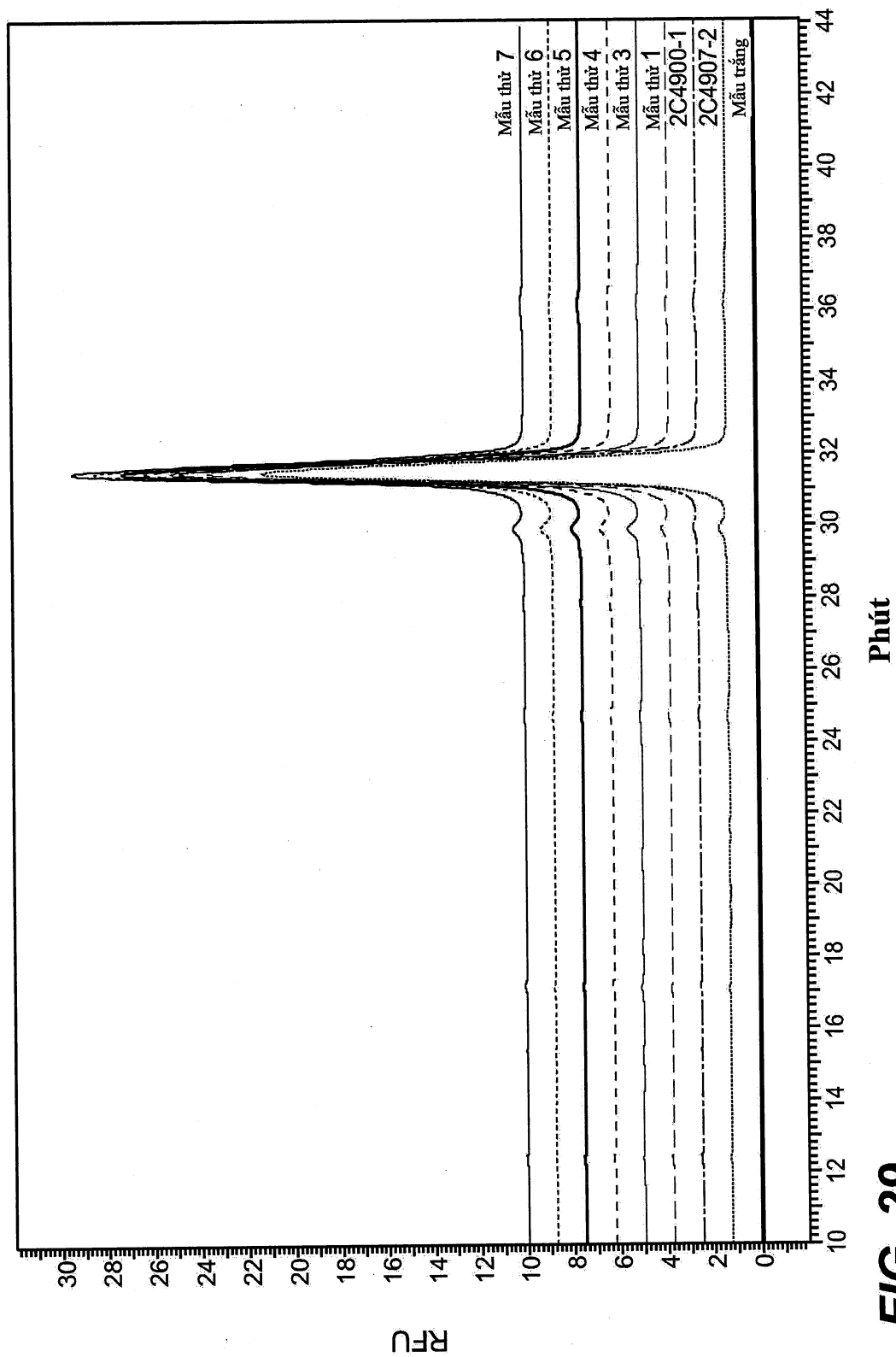


FIG. 29

Phân tích điện di mao quản natri dodecyl sulfat (CE-SDS) với phát hiện huỳnh quang cảm ứng-laze (LIF) Pertuzumab không khử hoá (hình phóng đại)

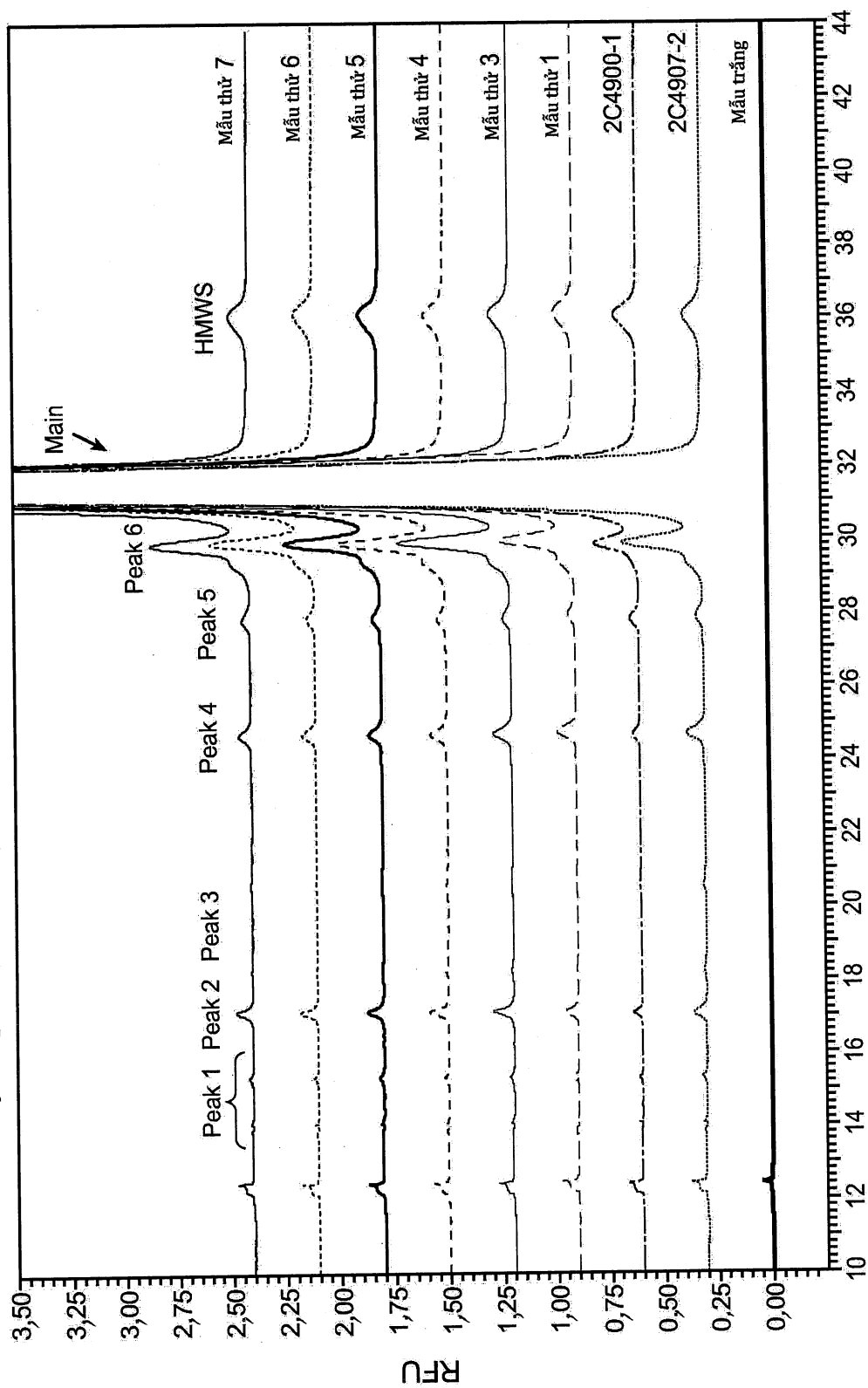


FIG. 30

Phút

Sắc ký đồ SE-HPLC (tỷ lệ nguyên cốt)

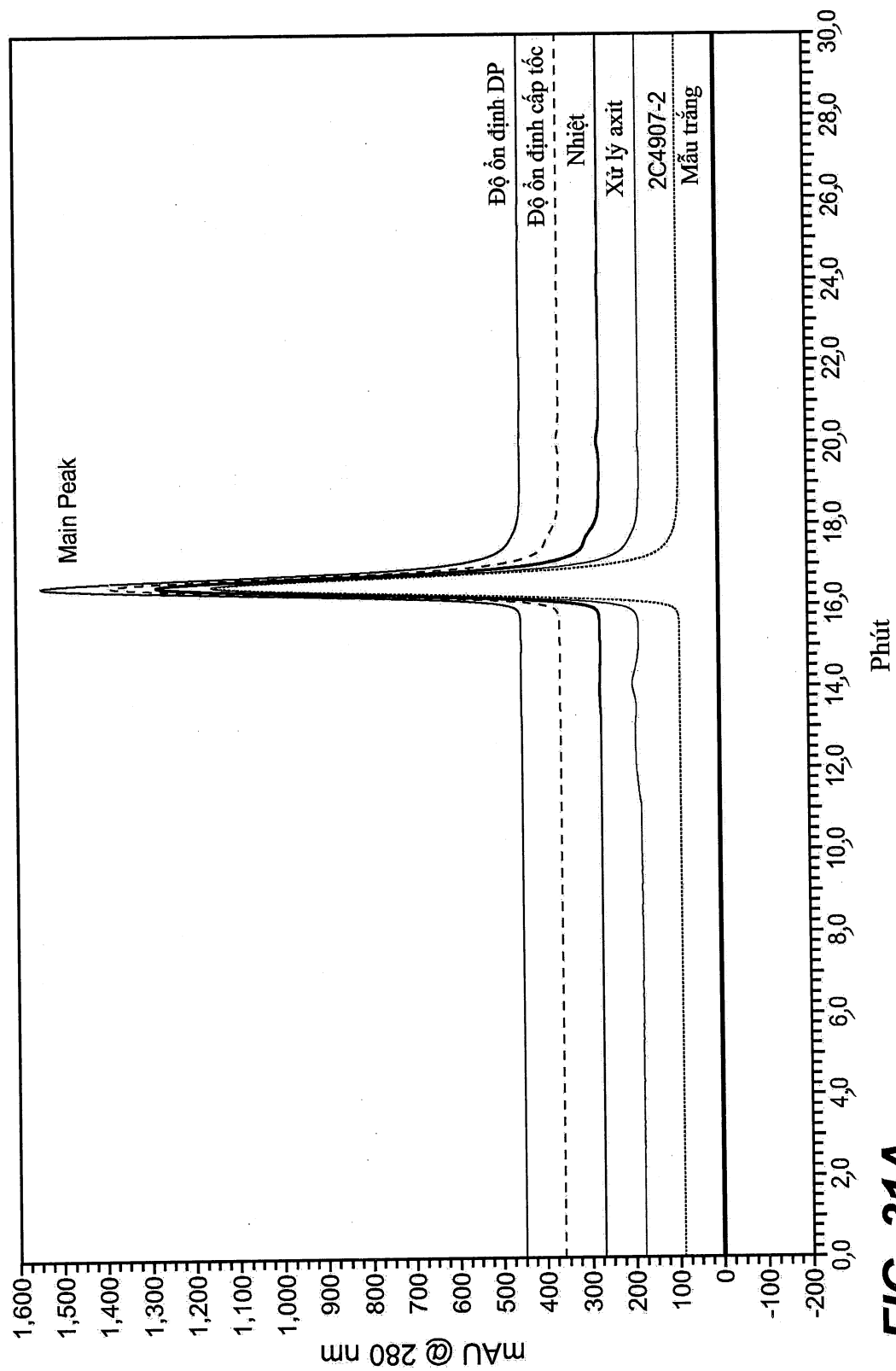
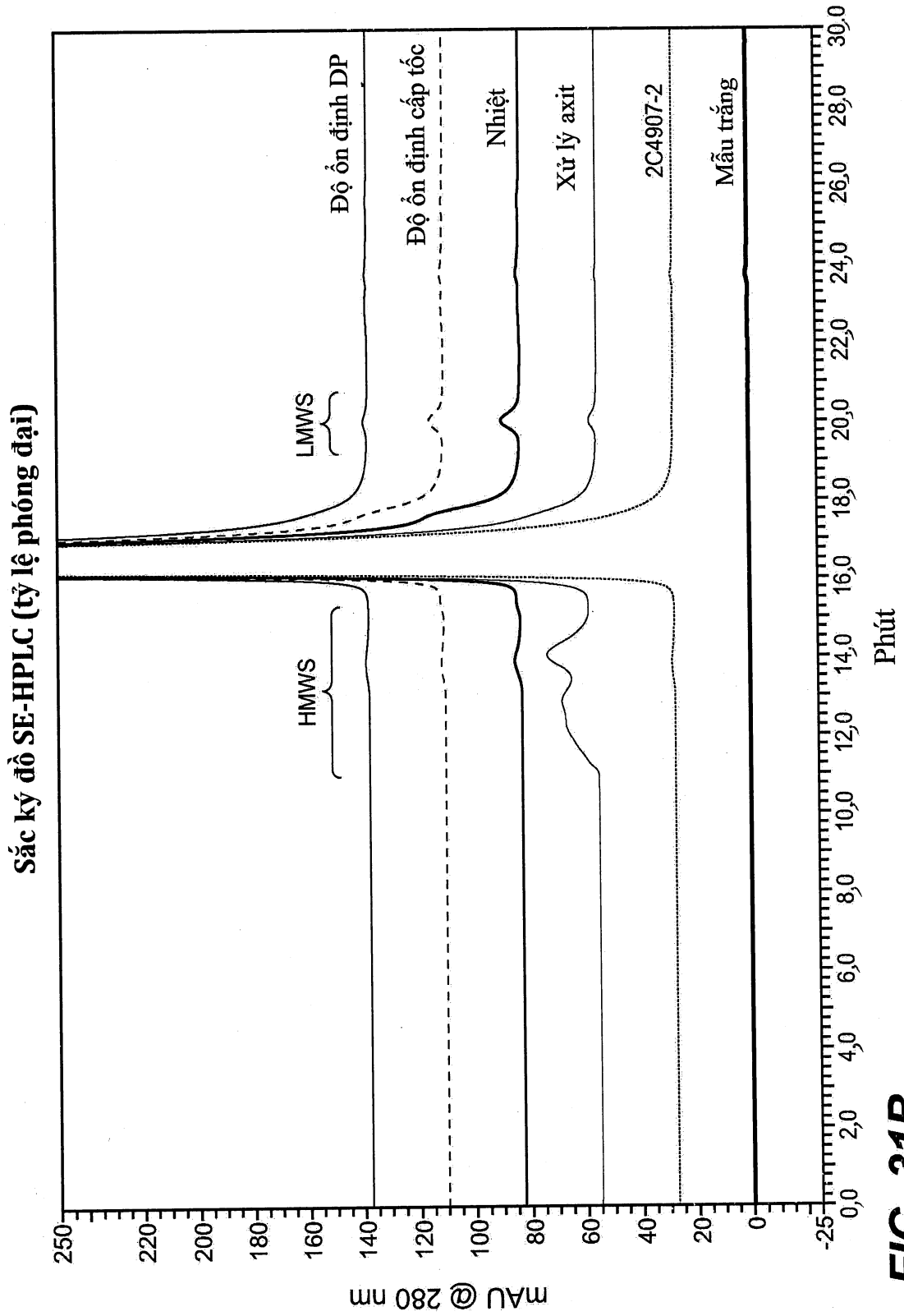


FIG. 31A

**FIG. 31B**

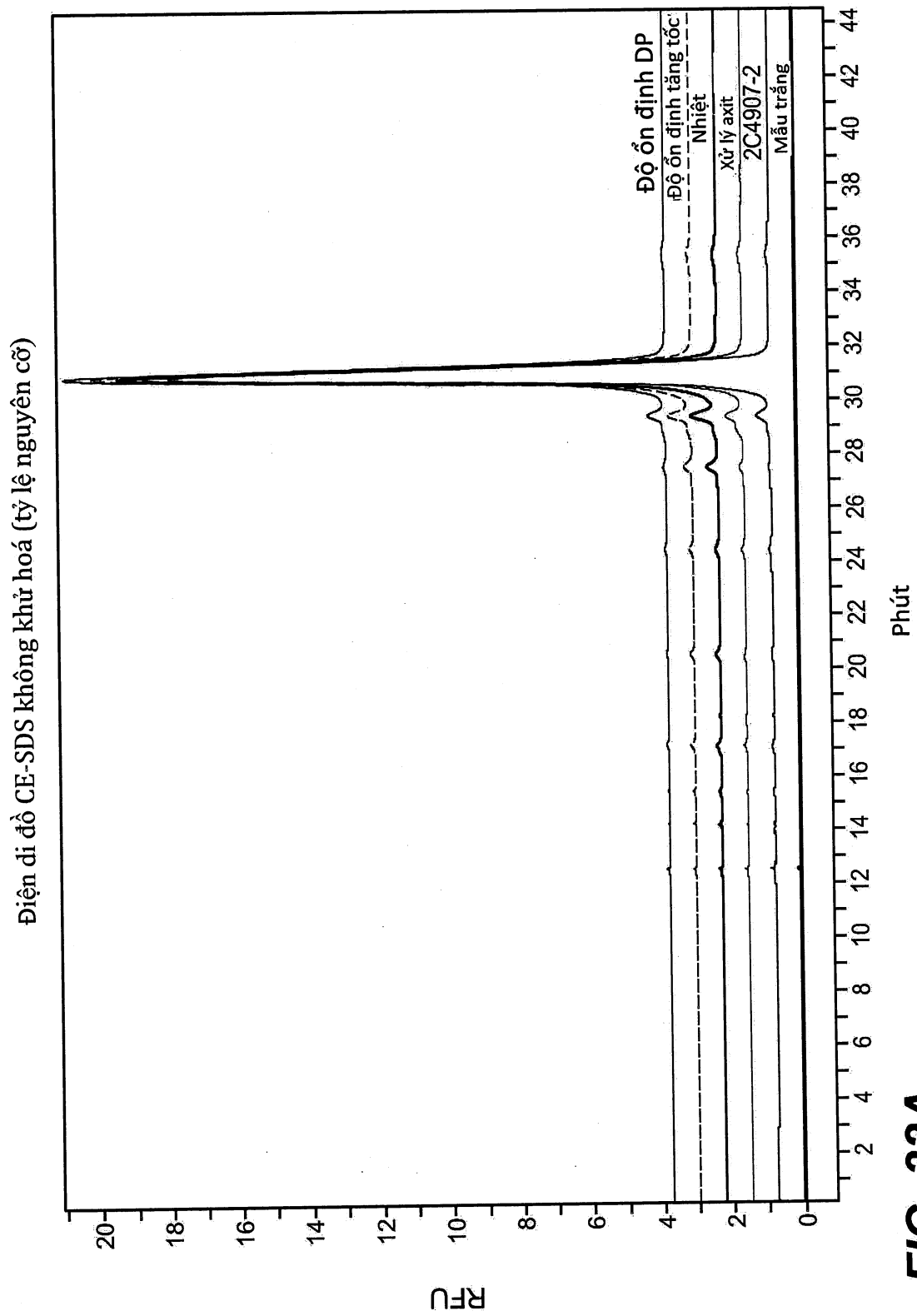


FIG. 32A

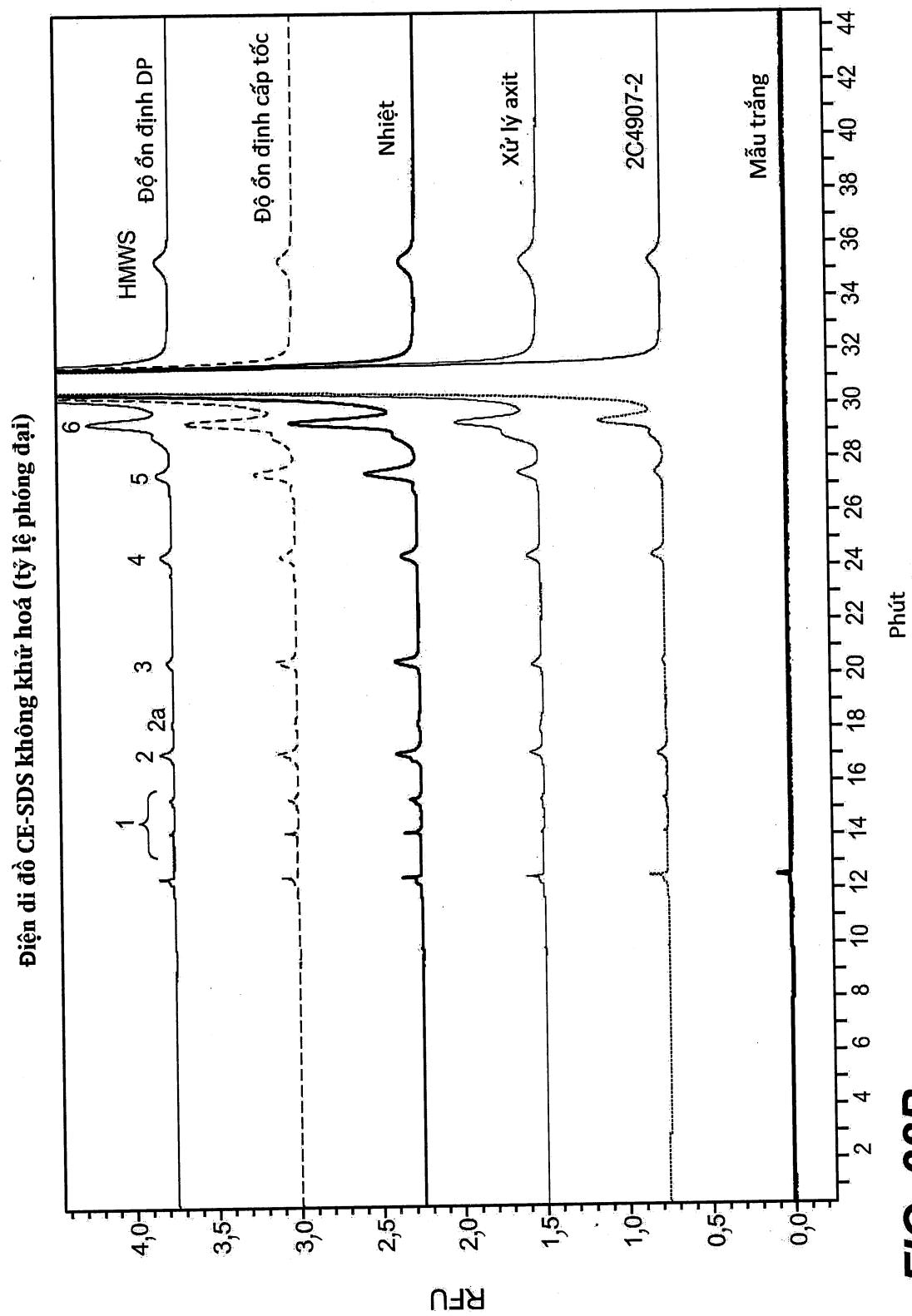


FIG. 32B

Điện di đồ CE-SDS khử hoá (tỷ lệ nguyên cốt)

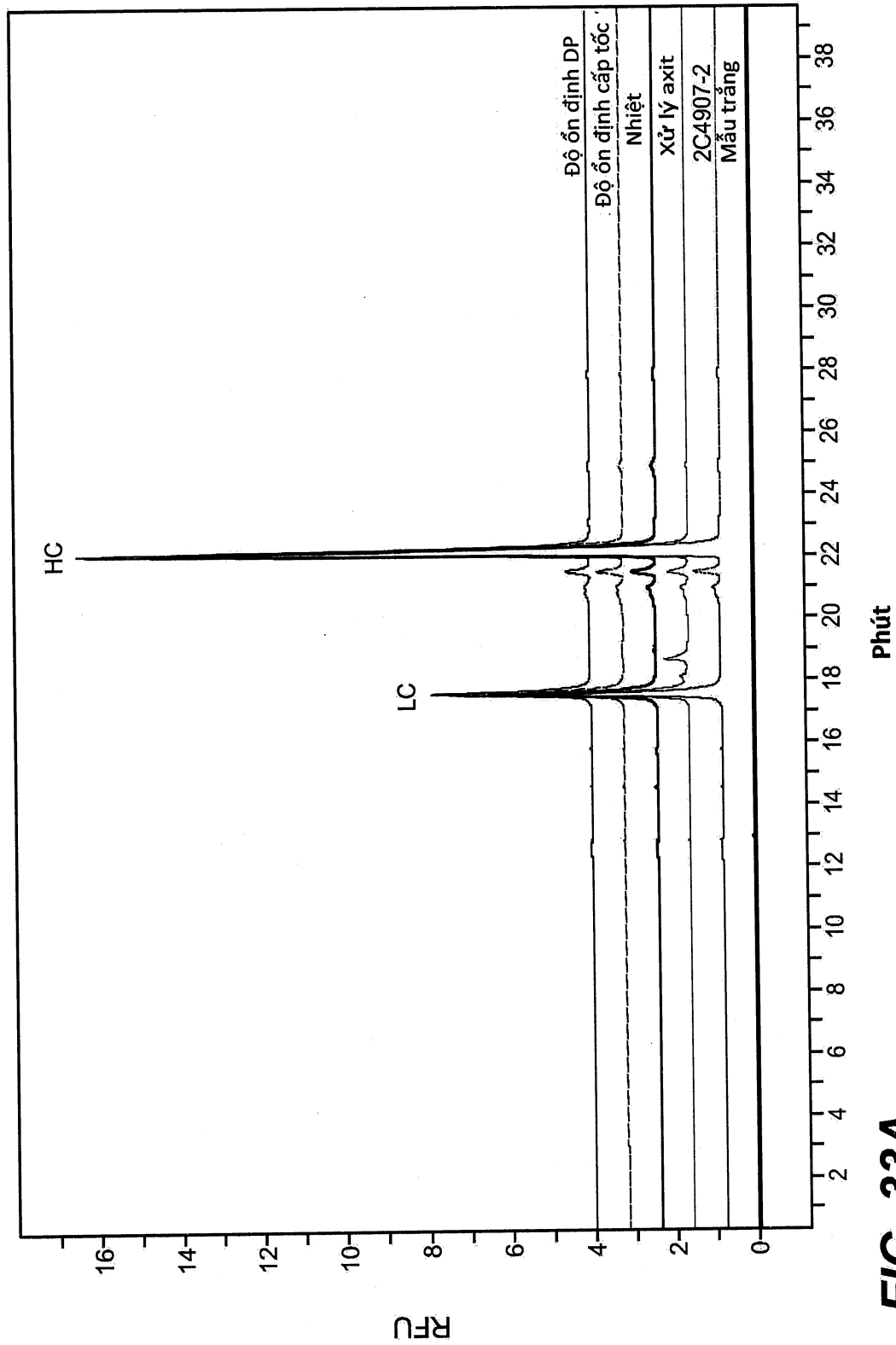
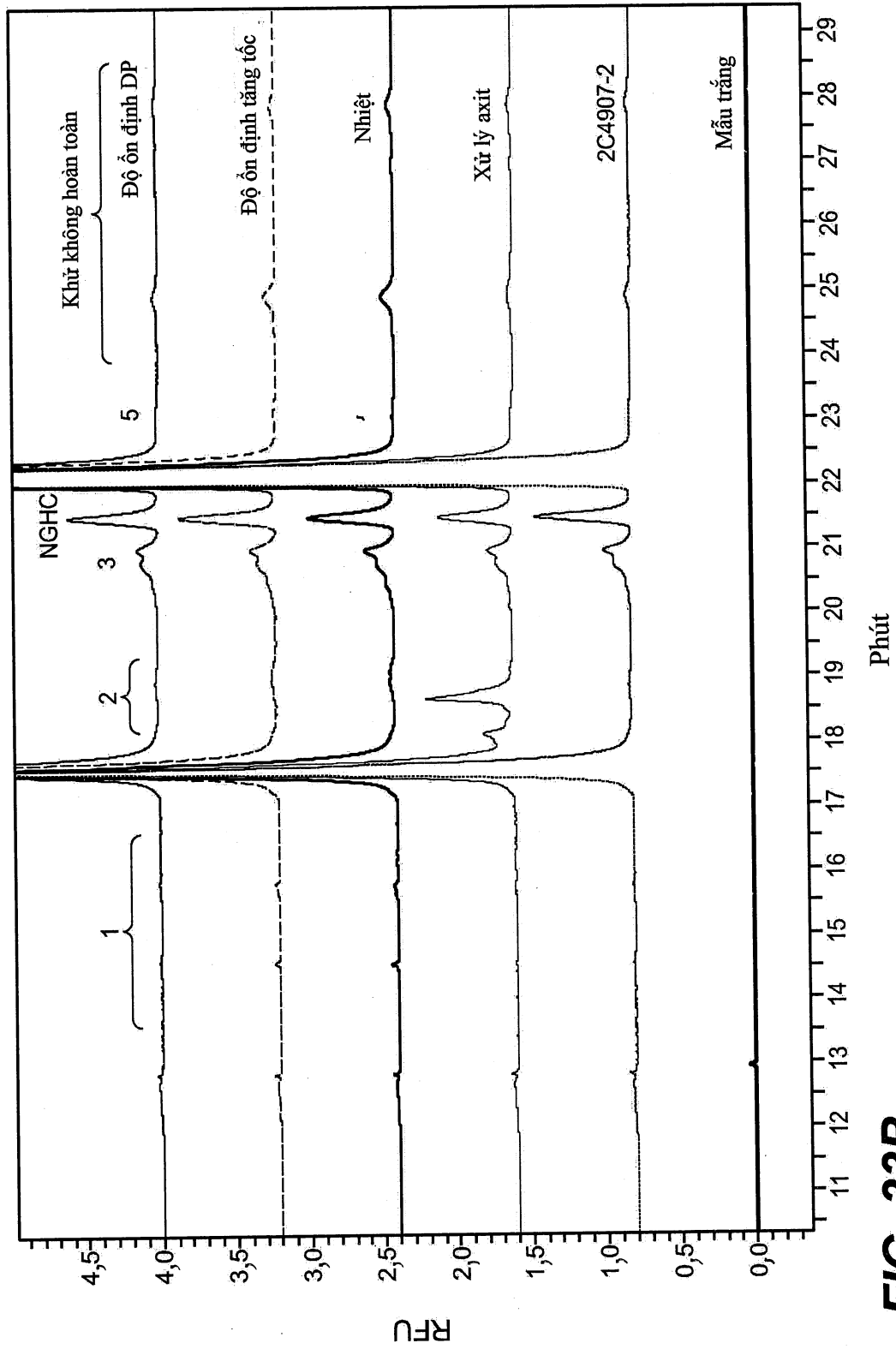


FIG. 33A

Điện di đồ CE-SDS khử hoá (tỷ lệ phóng đại)

**FIG. 33B**

So sánh các điện di đồ CE-SDS không khử hoá và CE-SDS
khử hoá cho mẫu được xử lý bằng axit (tỷ lệ phóng đại)

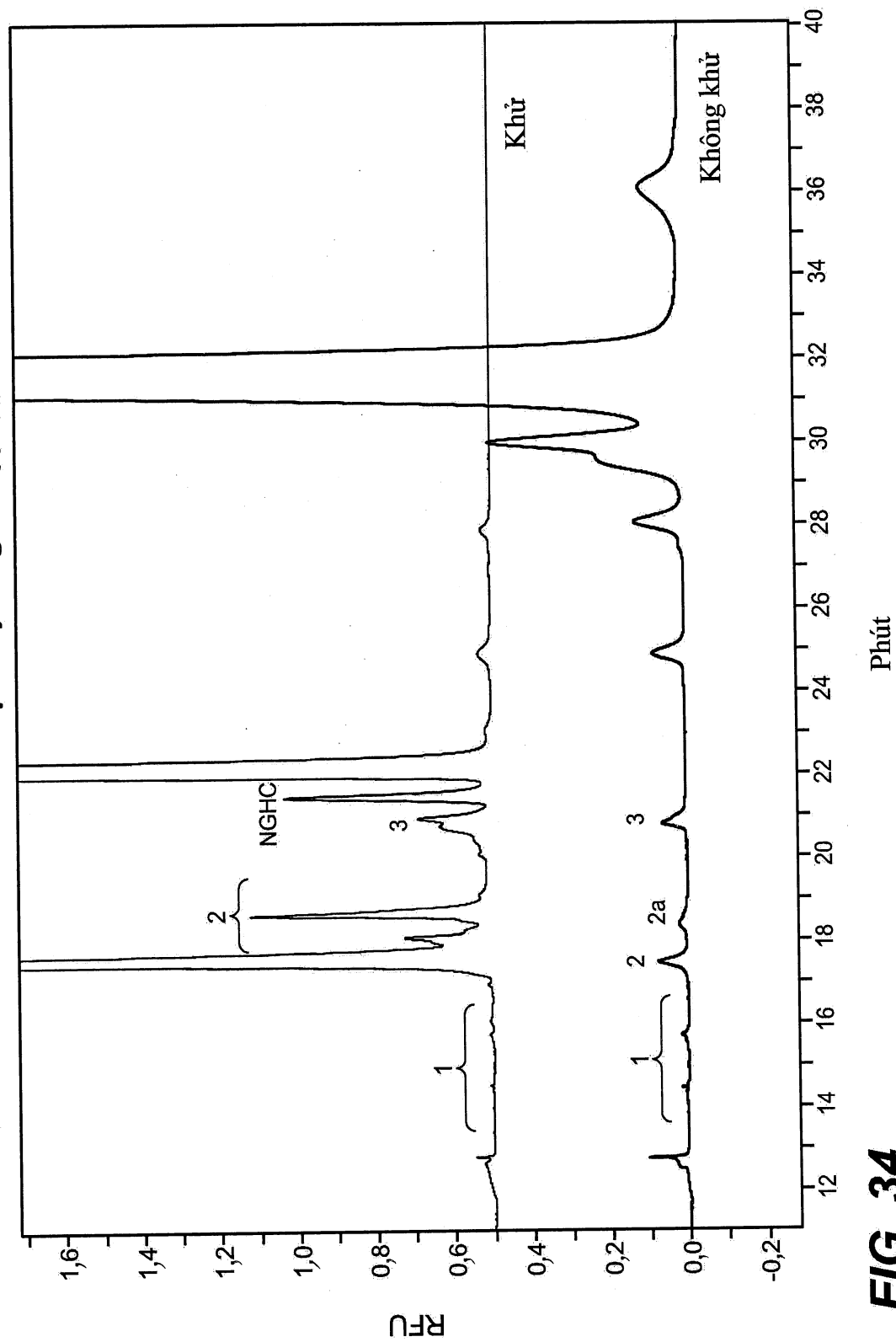
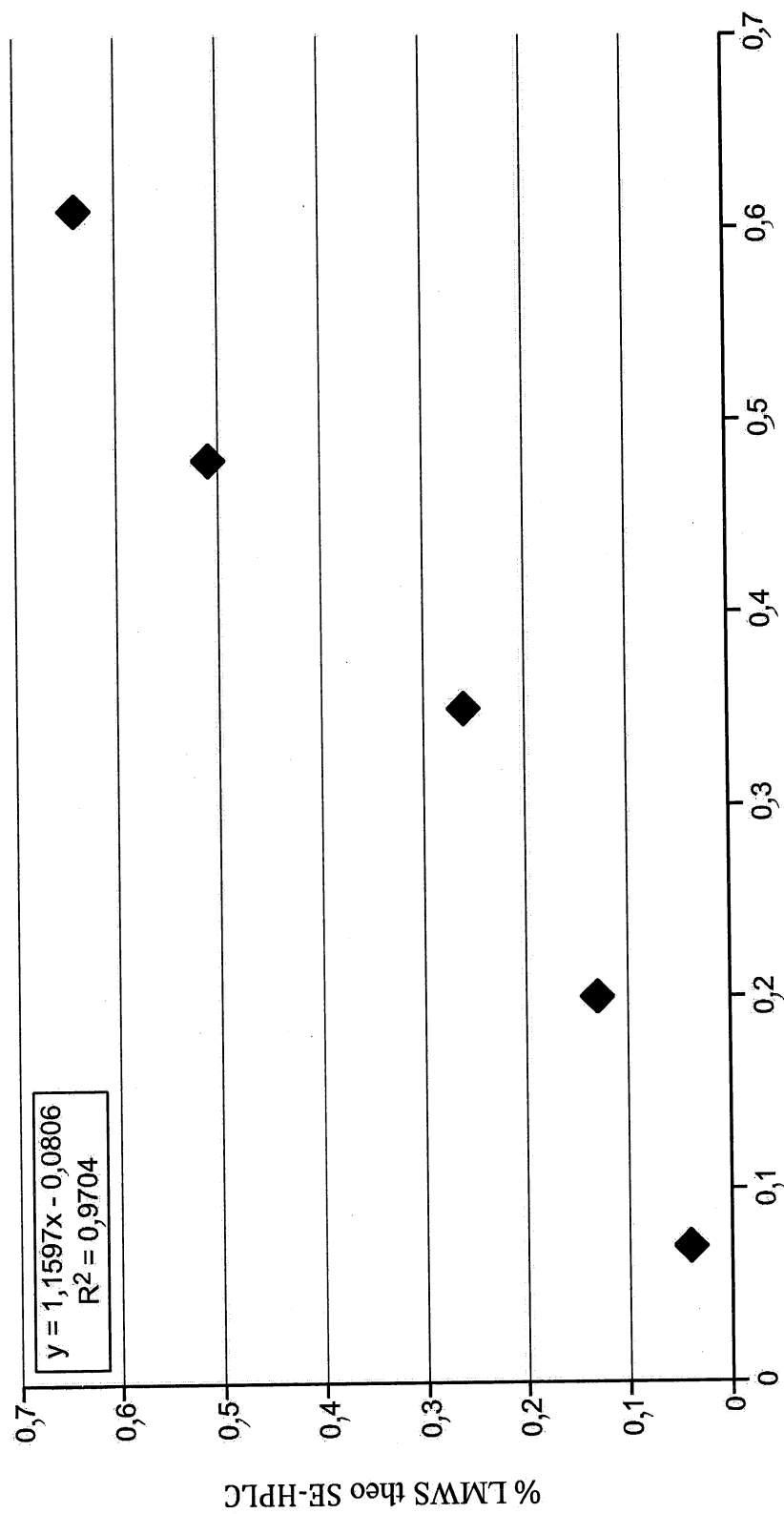


FIG. 34

Tương quan định lượng Fab giữa CE-SDS không khử hoá và SE-HPLC



Pic 3 (Fab) theo CE-SDS không khử

FIG. 35

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENENTECH, INC.
 GENNARO, LYNN A.
 KAO, YUNG-HSIANG
 ZHANG, YONGHUA

<120> BIẾN THỂ PERTUZUMAB, CHẾ PHẨM CHỨA BIẾN THỂ PERTUZUMAB, VÀ DƯỢC
 PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

<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
      65                                70                                75

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
      80                                85                                90

Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
      95                                100                               105

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
      110                               115                               120

Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
      125                               130                               135

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
      140

```

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp

```

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

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp

```
<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 10

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

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

200

205

210

Arg Gly Glu Cys

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 12

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

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 15

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

<210> 16

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa tốt hơn nếu là D hoặc S

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 19

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> Xaa tốt hơn nếu là R hoặc L

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> Xaa tốt hơn nếu là Y hoặc E

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> Xaa tốt hơn nếu là T hoặc S

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

 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

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

 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp

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

 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
5