(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) **1-0051349**

(51)[2020.01] **A61K 47/68**

(13) **B**

(21) 1-2022-02096

(22) 08/09/2020

(86) PCT/US2020/049772 08/09/2020

(87) WO 2021/046549 11/03/2021

(30) 62/897,036 06/09/2019 US; 62/941,405 27/11/2019 US; 62/948,143 13/12/2019 US; 62/959,857 10/01/2020 US; 62/966,500 27/01/2020 US; 62/970,491 05/02/2020 US; 62/984,705 03/03/2020 US; 62/988,304 11/03/2020 US; 63/032,488 29/05/2020 US; 63/062,377 06/08/2020 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/09/2022 414A

(73) CIDARA THERAPEUTICS, INC. (US)
6310 Nancy Ridge Drive, Suite 101, San Diego, CA 92121, United States of America

(72) BALKOVEC, James, M. (US); BENSEN, Daniel, C. (US); BORCHARDT, Allen (US); BRADY, Thomas, P. (US); CHEN, Zhi-Yong (CN); COLE, Jason (AU); DO, Quyen-Quyen, Thuy (US); DOEHRMANN, Simon (DE); JIANG, Wanlong (US); LAM, Thanh (US); NONCOVICH, Alain (US); TARI, Leslie, W. (US).

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

(54) THỂ LIÊN HỢP VÀ TẬP HỢP CỦA CÁC THỂ LIÊN HỢP

(21) 1-2022-02096

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp điều trị lây nhiễm virut bao gồm các thể liên hợp chứa chất ức chế neuraminidaza của virut (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của nó) được liên kết với monome Fc, miền Fc, và peptit liên kết Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết albumin. Cụ thể là, các thể liên hợp này có thể được sử dụng trong điều trị lây nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp chứa chất ức chế neuraminidaza của virut (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của nó) được liên kết với monome Fc, miền Fc, và peptit liên kết Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết albumin. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến tập hợp của các thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhu cầu về các phương pháp điều trị kháng virut mới cho bệnh cúm là rất quan trọng và đặc biệt quan trọng trong lĩnh vực y tế. Virut cúm, tác nhân gây ra bệnh cúm, hoặc bệnh cảm cúm, là nguyên nhân gây ra 3-5 triệu trường hợp bệnh nặng hàng năm và khoảng 500.000 ca tử vong trên toàn thế giới. Trong khi hầu hết mọi người hồi phục hoàn toàn khỏi bệnh cúm trong khoảng một đến hai tuần, thì những người khác lại phát triển các biến chứng đe dọa tính mạng, chẳng hạn như viêm phổi. Vì vậy, bệnh cúm có thể gây chết người, đặc biệt là đối với người trẻ, người già hoặc người bị bệnh mãn tính. Những người có hệ thống miễn dịch yếu hoặc bị tổn thương, chẳng hạn như những người bị lây nhiễm HIV giai đoạn nặng hoặc bệnh nhân cấy ghép, những người có hệ thống miễn dịch bị ức chế về mặt y tế để ngăn chặn đào thải cơ quan cấy ghép, có nhiều nguy cơ bị các biến chứng liên quan đến bệnh cúm. Phụ nữ mang thai và trẻ nhỏ cũng có nguy cơ bị biến chứng cao.

Việc phát triển các phương pháp điều trị kháng virut cho bệnh cúm vẫn đang là một thách thức không ngừng. Một số tác nhân kháng virut cúm đã được phê duyệt để sử dụng trong phòng khám, và những tác nhân này đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh mức độ nghiêm trọng của bệnh và kiểm soát đại dịch trong khi vắc-xin được điều chế. Tuy nhiên, các chủng kháng thuốc đã xuất hiện đối với các chất ức chế được sử dụng phổ biến nhất.

Các tác nhân kháng virut cúm chủ yếu nhắm vào các protein có trên bề mặt của hạt virut cúm. Vỏ của virut cúm chứa hai glycoprotein chiếm ưu thế miễn dịch là

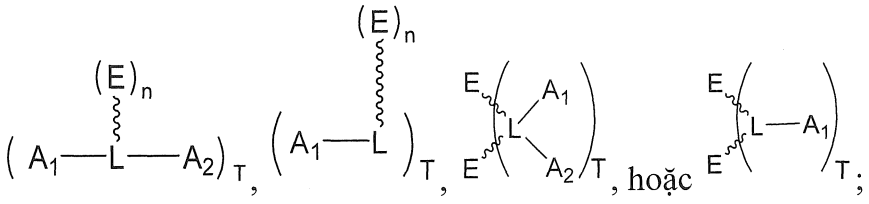
hemagglutinin và neuraminidaza, đóng vai trò quan trọng trong việc lây nhiễm và lây lan virut. Hemagglutinin có tác dụng gắn virut vào tế bào vật chủ thông qua sự tương tác của nó với các axit sialic trên bề mặt, nhờ đó bắt đầu xâm nhập. Neuraminidaza là enzym exo-glycosidaza phân cắt các axit sialic (các gốc axit neuraminic cuối) khỏi các cấu trúc glycan trên bề mặt của tế bào vật chủ bị lây nhiễm, giải phóng các virut thế hệ con cháu và cho phép virut này lây lan từ tế bào vật chủ sang các tế bào xung quanh không bị lây nhiễm. Do đó, sự ức chế neuraminidaza được coi là mục tiêu dược lý đối với thuốc kháng virut. Các chất ức chế neuraminidaza virut được sử dụng để giảm sự lây lan của virut đã được xác định, bao gồm oseltamivir (Tamiflu ™), zanamivir (Relenza ™) và peramivir (Rapivab™).

Tuy nhiên, bệnh cúm ở thể nhận cấy ghép vẫn có đặc điểm là sự đào thải virut kéo dài, gia tăng khả năng phát triển các chủng kháng thuốc. Cần có các liệu pháp mới hữu hiệu hơn để điều trị bệnh cúm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

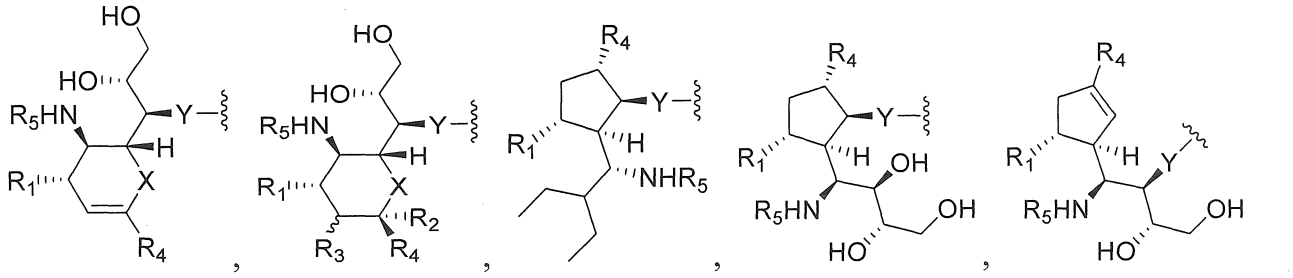
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp, chế phẩm và phương pháp ức chế sự sinh trưởng của virut, và phương pháp điều trị các lây nhiễm virut. Cụ thể, các thể liên hợp như vậy chứa monome hoặc dime của gốc ức chế neuraminidaza của virut cúm (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của nó) được liên hợp với monome Fc, miền Fc, peptit liên kết Fc, protein albumin, hoặc peptit liến kết protein albumin. Chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của nó) trong các thể liên hợp hướng đích neuraminidaza trên bề mặt của hạt virut. Monome Fc hoặc miền Fc trong các thể liên hợp liên kết với FcγRs (ví dụ, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, và FcγRIIIb) trên tế bào miễn dịch, ví dụ, bạch cầu trung tính, để hoạt hóa chức năng thực bào và chức năng hiệu ứng, như tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC - antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), do đó các hạt virut sẽ bị các tế bào miễn dịch nuốt chửng và phá hủy và tăng cường hơn nữa hoạt tính kháng virut của các thể liên hợp. Albumin hoặc peptit liên kết albumin có thể kéo dài thời gian bán rã của thể liên hợp, ví dụ, bằng cách liên kết albumin với thụ thể Fc mới sinh tuần hoàn. Các chế phẩm như vậy là hữu ích trong phương pháp ức chế sự sinh trưởng của virut và trong phương pháp điều trị các lây nhiễm virut, như lây nhiễm virut cúm A, virut cúm B và virut cúm C.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2):

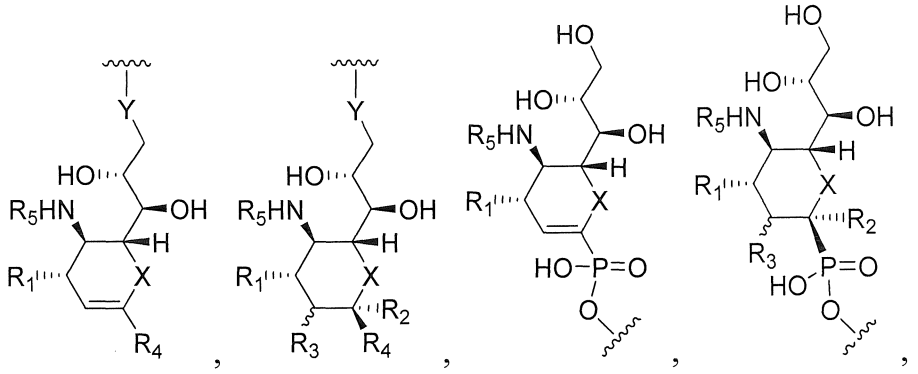


(D-I) (M-I) (1) (2)

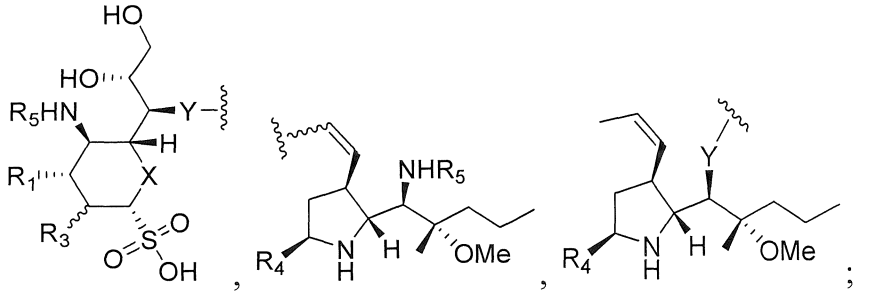
trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII):



(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV) (A-V)



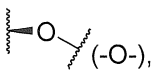
(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)



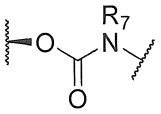
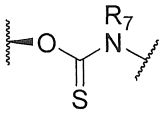
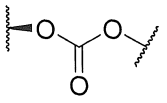
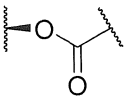
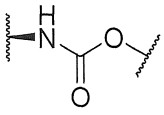
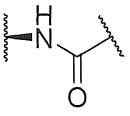
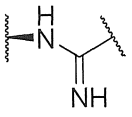
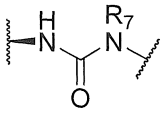
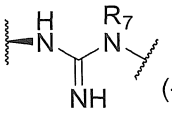
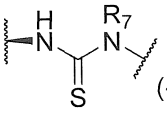
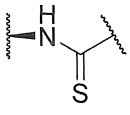
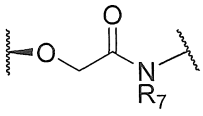
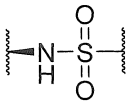
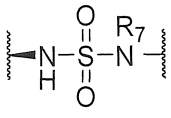
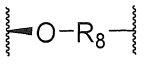
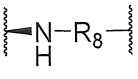
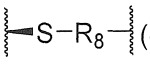
(A-X) (A-XI) (A-XII)

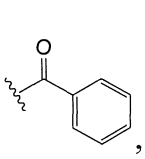
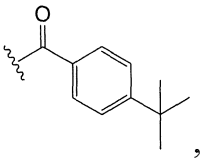
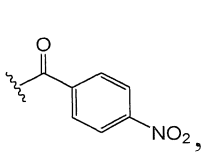
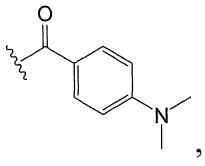
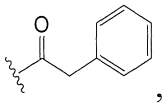
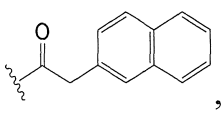
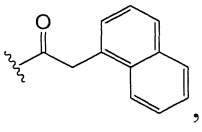
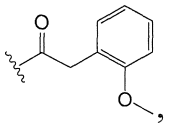
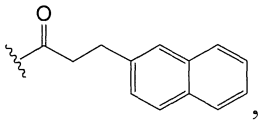
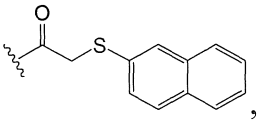
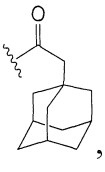
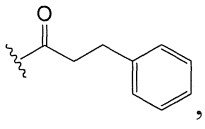
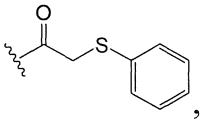
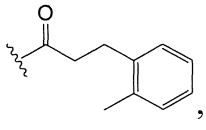
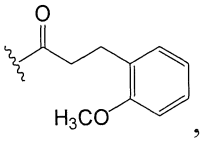
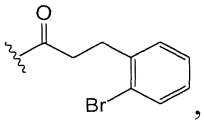
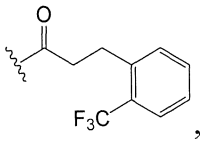
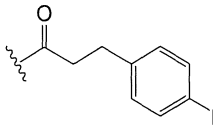
trong đó R_1 được chọn từ -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, và $-NHC(=NH)NHR_6$; mỗi R_2 và R_3 được chọn độc lập từ -H, -OH, -F, -Cl, và -Br; R_4 được chọn từ $-CO_2H$,

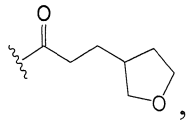
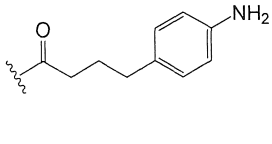
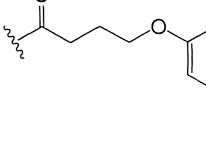
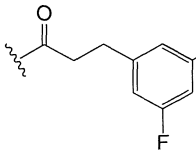
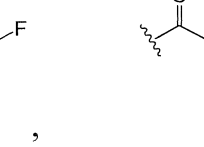
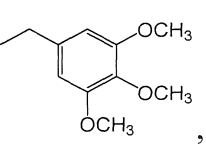
-P(=O)(OH)$_2$, -SO$_3$H; R$_5$ được chọn từ -COCH$_3$, -COCF$_3$, -SO$_2$CH$_3$; X được chọn từ -O- và -S-; Y được chọn từ

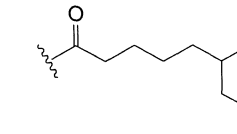
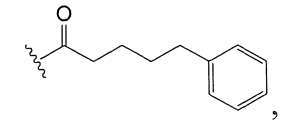

(-O-),

(-S-),

(-NR$_7$-),

(-O(C=O)NR$_7$-),

(-O(C=S)NR$_7$-),

(-O(C=O)O-),

(-O(C=O)-),

(-NH(C=O)O-),

(-NH(C=O)-),

(-NH(C=NH)-),

(-NH(C=O)NR$_7$-),

(-NH(C=NH)NR$_7$-),

(-NH(C=S)NR$_7$-),

(-NH(C=S)-),

(-OCH$_2$(C=O)NR$_7$-),

(-NH(SO$_2$)-),

(-NH(SO$_2$)NR$_7$-),

(-OR$_8$-),

(-NR$_8$-), và

(-SR$_8$-);

R$_6$ được chọn từ

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

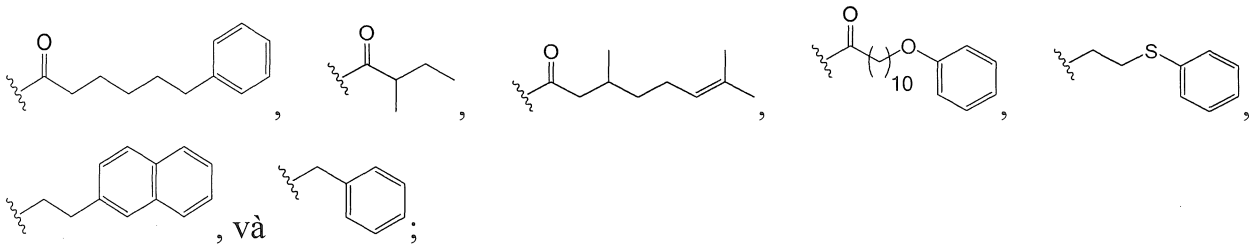
,

,

,

,

,

,

,



R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; R_8 được chọn từ C3-C20 heteroxycloalkyl, C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

n là 1 hoặc 2;

mỗi E chứa monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với E và với mỗi Y của mỗi A_1 hoặc mỗi A_1 và A_2;

T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, và

mỗi đường lượn sóng trong các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2) chỉ ra rằng L được gắn cộng hóa trị với mỗi E;

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, n là 1 và mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

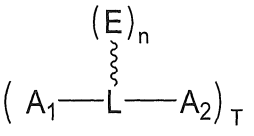
Theo một số phương án, n là 2 và mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), trong đó các monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc;

L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E và với mỗi Y hoặc mỗi A_1 và/hoặc A_2;

T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và mỗi đường lượn sóng trong các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2) chỉ ra rằng L được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với mỗi E; hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L hoặc mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L hoặc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

Theo các phương án được ưu tiên của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, n là 2 và mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138). Trong thể liên hợp có hai monome miền Fc (ví dụ, thể liên hợp có công thức (1), công thức (2), công thức (D-I) trong đó n bằng 2, hoặc (M-I) trong đó n bằng 2), các monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc.

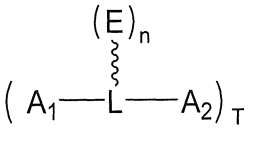
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I):



(D-I)

trong đó mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi A_1-L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong E và với mỗi A_1 và A_2; n là 1 hoặc 2 (ví dụ, khi n là 2, hai monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc); T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I):

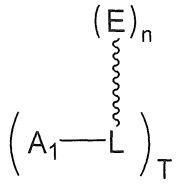


(D-I)

trong đó mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi A_1- L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E và với mỗi A_1 và A_2; n là 1 hoặc 2 (ví dụ, khi n là 2, hai monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc); T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

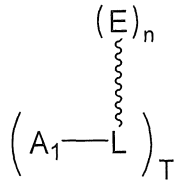
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):



(M-I)

trong đó mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong E và với A_1; n là 1 hoặc 2 (ví dụ, khi n là 2, hai monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc); T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ cấu trúc bất kỳ được mô tả bằng công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

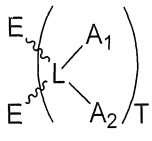
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):



(M-I)

trong đó mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E và với A_1; n là 1 hoặc 2 (ví dụ, khi n là 2, hai monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc); T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ cấu trúc bất kỳ được mô tả bằng công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (1):

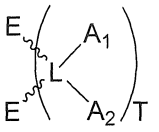


(1)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức từ (A-I) đến (A-XII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi A_1-L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong mỗi E và với mỗi A_1 và A_2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

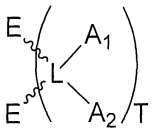
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (1):



(1)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi A_1-L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong mỗi E và với mỗi A_1 và A_2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (1):



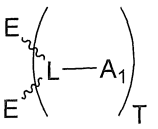
(1)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX);

mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi A_1-L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein bản lề trong mỗi E và với mỗi A_1 và A_2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

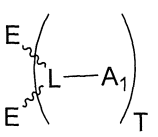
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (2):



(2)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh ở xystein bản lề trong E và với A_1; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai nguyên tử lưu huỳnh chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (2):

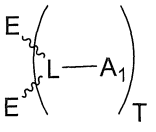


(2)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh ở xystein bản lề trong E và với A_1; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai nguyên tử lưu huỳnh chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (2):



(2)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138); L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh ở xystein bản lề trong E và với A_1; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và hai đường lượn sóng được nối với hai nguyên tử lưu huỳnh chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị (ví dụ, bằng liên kết hoặc yếu tố liên kết cộng hóa trị) với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề trong hai E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX).

Theo một số phương án trong số các phương án bất kỳ được đề cập ở trên, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138.

Theo một số phương án, ít nhất một cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) xystein bản lề của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, tức là, Cys10, Cys13, Cys16, hoặc Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 và Cys13 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, Cys10 và Cys16 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, Cys 30 và Cys18 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, Cys13 và Cys 36 trong

SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, Cys13 và Cys 38 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, và/hoặc Cys 36 và Cys 38 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, khi T là 2, cặp nguyên tử lưu huỳnh là (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với) Cys10 và Cys13 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 hoặc Cys 36 và Cys 38 trong SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh bao gồm một nguyên tử lưu huỳnh của xystein từ mỗi E, tức là, L-A cùng với nguyên tử lưu huỳnh mà nó được gắn vào tạo thành yếu tố liên kết giữa hai miền Fc (ví dụ, hai miền Fc bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11). Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương

ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10

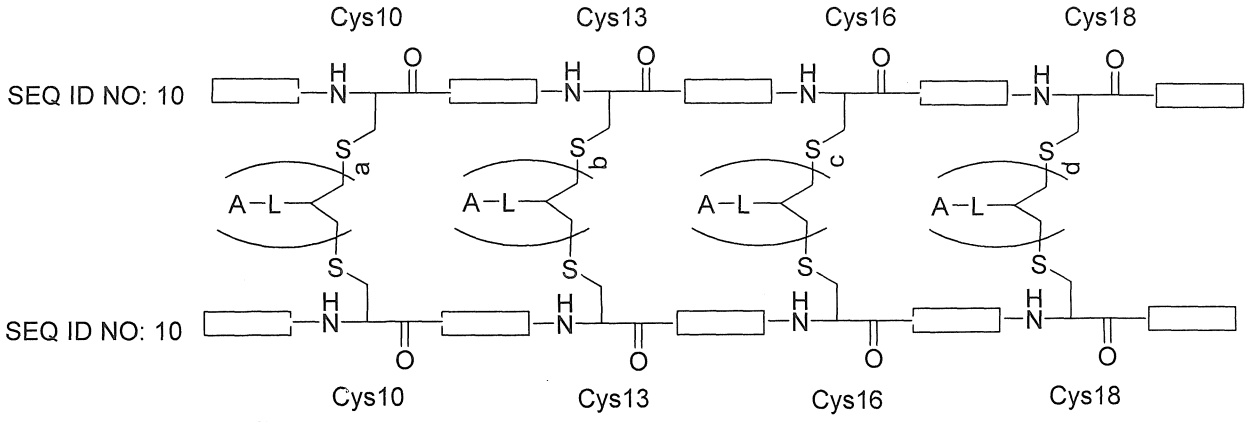
hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, khi T là 3, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 3, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 3, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E

khác. Theo một số phương án, khi T là 3, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, khi T là 3, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys16 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác; và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys18 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11 từ một E khác.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



trong đó mỗi a, b, c, và d độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a, b, c, hoặc d là 0, hai nguyên tử lưu huỳnh tạo thành liên kết disulfua.

Theo một số phương án, a là 1 và b, c, và d là 0. Theo một số phương án, a và b là 1 và c và d là 0. Theo một số phương án, a và c là 1 và b và d là 0. Theo một số phương án, a và d là 1 và b và c là 0. Theo một số phương án, a, b, và c là 1 và d là 0. Theo một số phương án, a, b, và d là 1 và c là 0. Theo một số phương án, a, c, và d là 1 và b là 0. Theo một số phương án, b và c là 1 và a và d là 0. Theo một số phương án, b và d là 1 và a và c là 0. Theo một số phương án, b, c, và d là 1 và a là 0. Theo một số phương án, c và d là 1 và a và b là 0. Theo một số phương án, a, b, c, và d là 1.

Theo một số phương án, mỗi E bao gồm trình tự MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4).

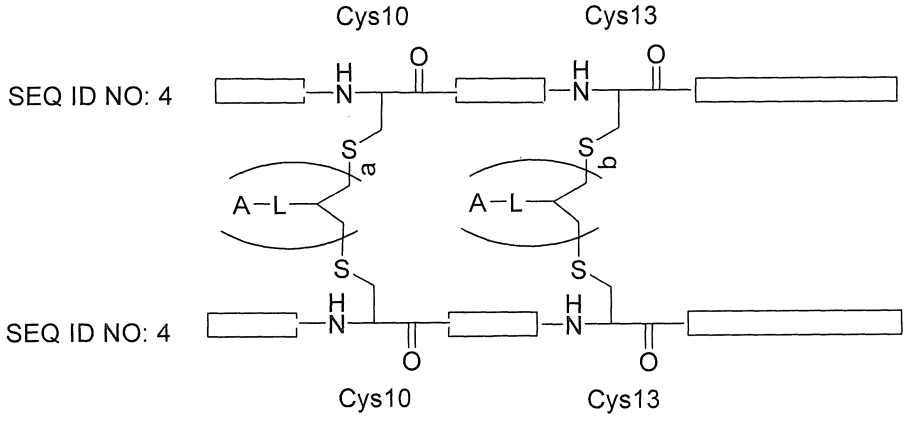
Theo một số phương án, mỗi E bao gồm trình tự MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33).

Theo một số phương án, ít nhất một cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) xystein bản lề của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33, tức là, Cys10 và/hoặc Cys13. Theo một số phương án, cặp nguyên

tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 và Cys13 trong SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33.

Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh bao gồm một nguyên tử lưu huỳnh của xystein từ mỗi E, tức là, L-A cùng với nguyên tử lưu huỳnh mà nó được gắn vào tạo thành yếu tố liên kết giữa hai miền Fc (ví dụ, hai miền Fc bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33). Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E khác. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 33 từ một E khác.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:

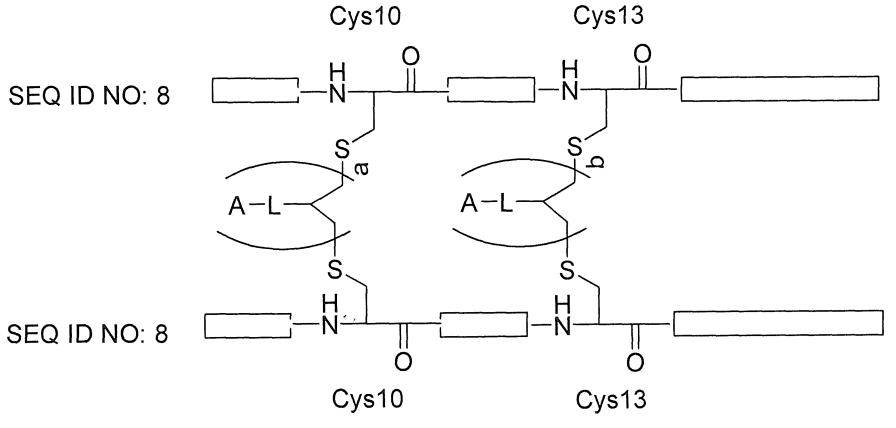


trong đó mỗi a và b độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a hoặc b là 0, hai nguyên tử lưu huỳnh tạo thành liên kết disulfua. Theo một số phương án, a là 1 và b là 0. Theo một số phương án, a là 0 và b là 1. Theo một số phương án, a và b là 1.

Theo một số phương án, ít nhất một cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) xystein bản lề của SEQ ID NO: 8, tức là, Cys10 và/hoặc Cys13. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 và Cys13 trong SEQ ID NO: 8.

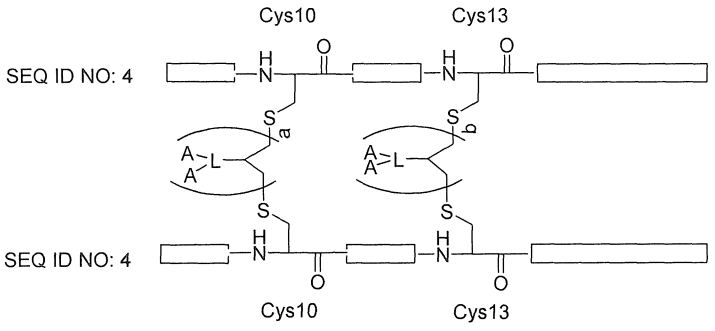
Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh bao gồm một nguyên tử lưu huỳnh của xystein từ mỗi E, tức là, L-A cùng với nguyên tử lưu huỳnh mà nó được gắn vào tạo thành yếu tố liên kết giữa hai miền Fc (ví dụ, hai miền Fc bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 8). Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 8 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 8 từ một E khác. Theo một số phương án, cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 8 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 8 từ một E khác. Theo một số phương án, khi T là 2, các cặp nguyên tử lưu huỳnh là nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 8 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys10 của SEQ ID NO: 8 từ một E khác và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 8 từ một E và nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của) Cys13 của SEQ ID NO: 8 từ một E khác.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



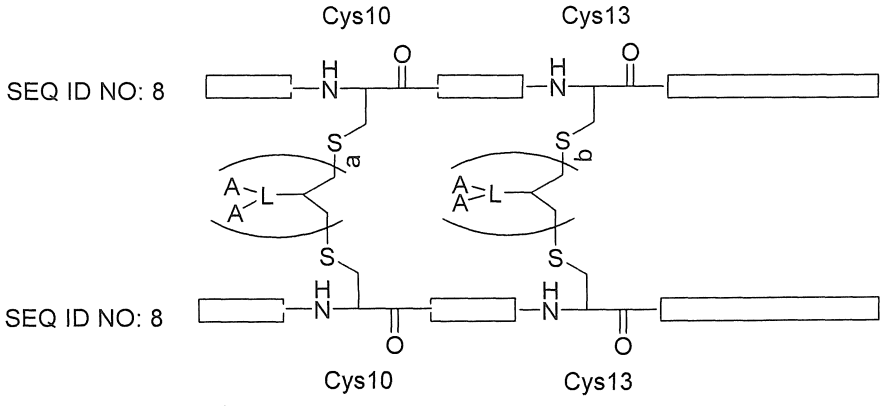
trong đó mỗi a và b độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a hoặc b là 0, hai nguyên tử lưu huỳnh tạo thành liên kết disulfua. Theo một số phương án, a là 1 và b là 0. Theo một số phương án, a là 0 và b là 1. Theo một số phương án, a và b là 1.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



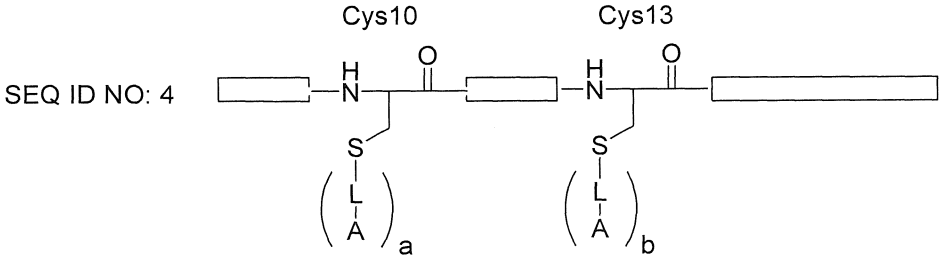
trong đó mỗi a và b độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a hoặc b là 0, hai nguyên tử lưu huỳnh tạo thành liên kết disulfua. Theo một số phương án, a là 1 và b là 0. Theo một số phương án, a là 0 và b là 1. Theo một số phương án, a và b là 1.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



trong đó mỗi a và b độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a hoặc b là 0, hai nguyên tử lưu huỳnh tạo thành liên kết disulfua. Theo một số phương án, a là 1 và b là 0. Theo một số phương án, a là 0 và b là 1. Theo một số phương án, a và b là 1.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:

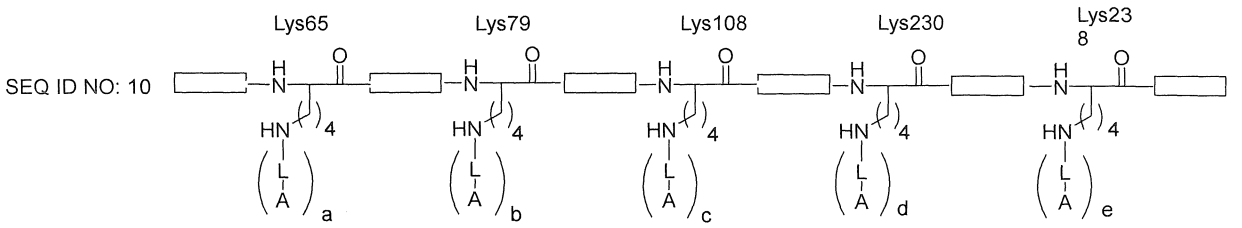


trong đó mỗi a và b độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a hoặc b là 0, nguyên tử lưu huỳnh là thiol. Theo một số phương án, a là 1 và b là 0. Theo một số phương án, a là 0 và b là 1. Theo một số phương án, a và b là 1.

Theo một số phương án của ba khía cạnh trước đó, nguyên tử nitơ là nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt, ví dụ, nguyên tử nitơ tương ứng với (ví dụ, nguyên tử nitơ của) Lys35, Lys63, Lys77, Lys79, Lys106, Lys123, Lys129, Lys181, Lys203, Lys228, hoặc Lys236

của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11. Theo một số phương án, nguyên tử nitơ là nguyên tử nitơ tương ứng với (ví dụ, nguyên tử nitơ của) Lys65, Lys79, Lys108, Lys230, và/hoặc Lys238 của SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11.

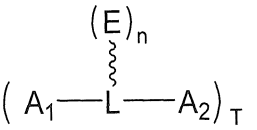
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



trong đó mỗi a, b, c, d, và e độc lập là 0 hoặc 1 và trong đó khi a, b, c, d, hoặc e là 0, hai nguyên tử nitơ là NH_2. Theo một số phương án, a là 1 và b, c, d, và e là 0. Theo một số phương án, b là 1 và a, c, d, và e là 0. Theo một số phương án, c là 1 và a, b, d, và e là 0. Theo một số phương án, d là 1 và a, b, c, và e là 0. Theo một số phương án, e là 1 và a, b, c, và d là 0. Theo một số phương án, a và b là 1 và c, d, và e là 0. Theo một số phương án, a và c là 1 và b, d, và e là 0. Theo một số phương án, a và d là 1 và b, c, và e là 0. Theo một số phương án, a và e là 1 và b, c, và d là 0. Theo một số phương án, b và c là 1 và a, d, và e là 0. Theo một số phương án, b và d là 1 và a, c, và e là 0. Theo một số phương án, b và e là 1 và a, c, và d là 0. Theo một số phương án, c và d là 1 và a, b, và e là 0. Theo một số phương án, c và e là 1 và a, b, và d là 0. Theo một số phương án, d và e là 1 và a, b, và c là 0. Theo một số phương án, a, b, và c là 1 và d và e là 0. Theo một số phương án, a, b, và d là 1 và c và e là 0. Theo một số phương án, a, b, và e là 1 và c và d là 0. Theo một số phương án, a, c, và d là 1 và b và e là 0. Theo một số phương án, a, c, và e là 1 và b và d là 0. Theo một số phương án, a, d, và e là 1 và b và c là 0. Theo một số phương án, b, c, và d là 1 và a và e là 0. Theo một số phương án, b, d, và e là 1 và a và c là 0. Theo một số phương án, c, d, và e là 1 và a và b là 0.

Theo một số phương án của các thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây, thể liên hợp tạo thành homodime bao gồm miền Fc. Theo một số phương án của các thể liên hợp được mô tả ở đây, E homodime hóa với một E khác để tạo thành miền Fc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng (D-I):

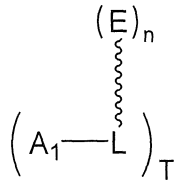


(D-I)

trong đó E bao gồm protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; L trong mỗi A_1-L-A_2 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị độc lập với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc bề mặt hoặc nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E và với mỗi A_1 và A_2; n là 1; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), và đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A_1-L-A_2 được gắn cộng hóa trị độc lập với nguyên tử lưu huỳnh của cxystein tiếp xúc với dung môi hoặc nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc với dung môi trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

Theo phương án được ưu tiên nêu trên, x là 2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):



(M-I)

trong đó E bao gồm protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; L trong mỗi L-A_1 là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị độc lập với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc bề mặt hoặc nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt trong E và với A_1; n là 1; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi L-A_1 được gắn cộng hóa trị độc lập với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc với dung môi hoặc nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc với dung môi trong E, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ cấu trúc bất kỳ được mô tả bằng công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi

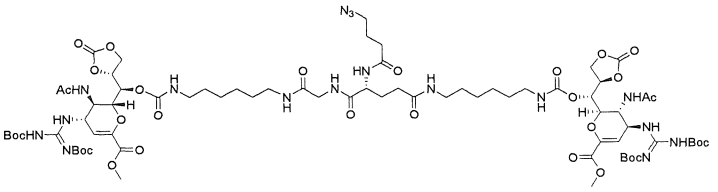
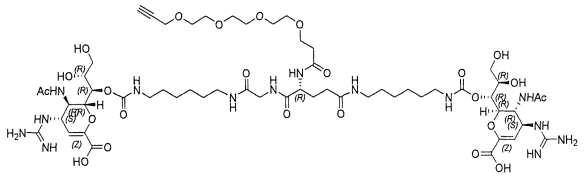
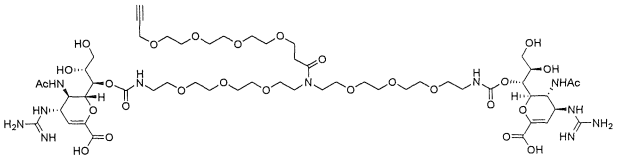
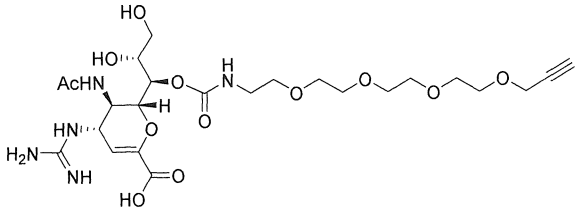
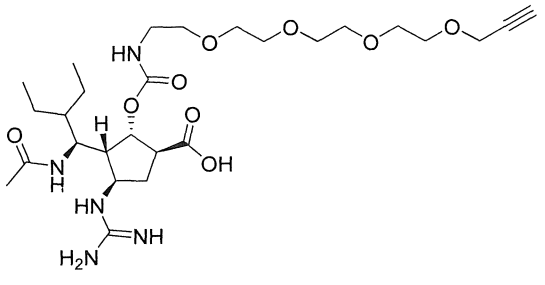
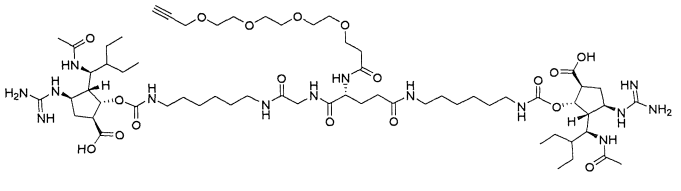
A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I). Theo phương án được ưu tiên nêu trên, x là 2.

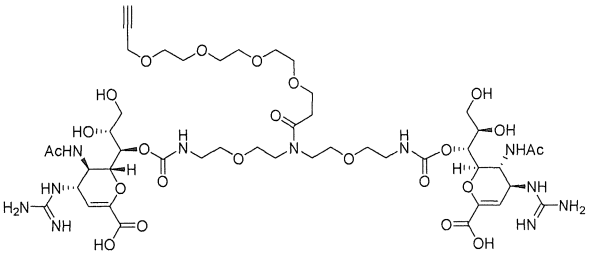
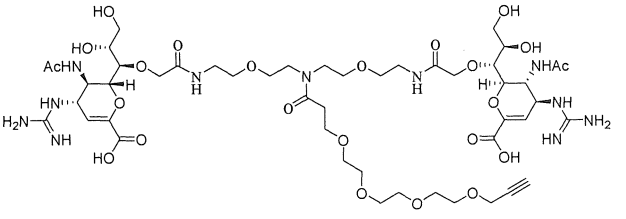
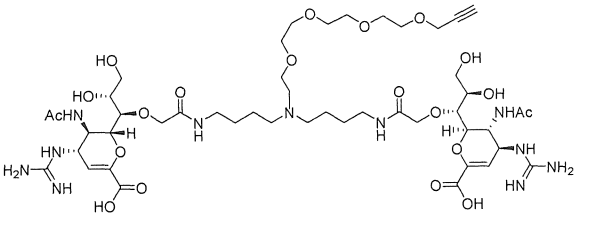
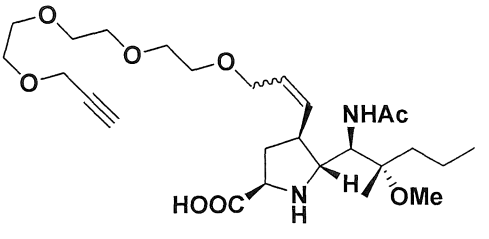
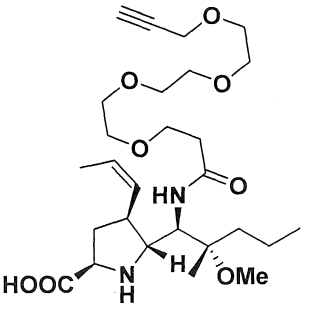
Theo một số phương án, mỗi E bao gồm protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141.

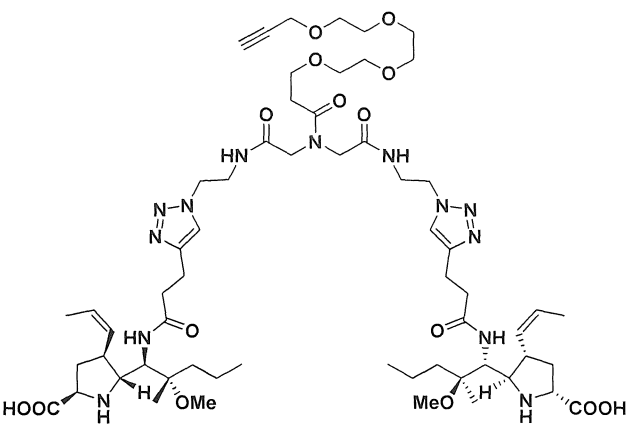
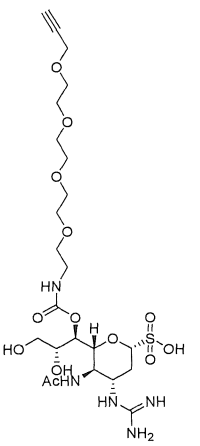
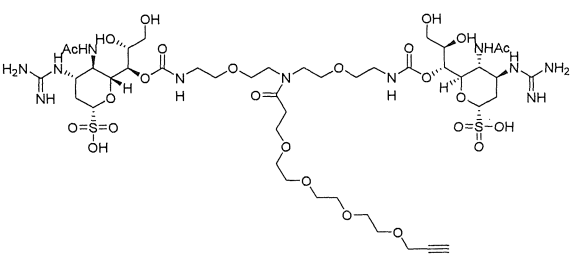
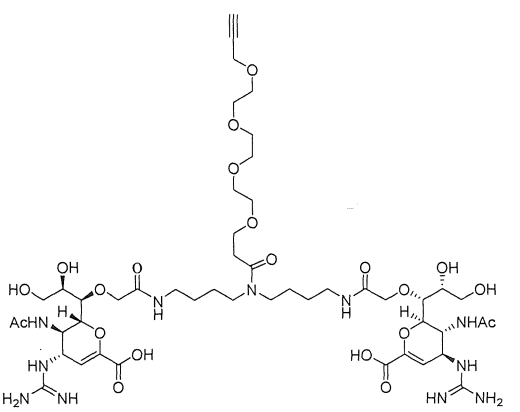
Theo một số phương án, T là 1 và L-A_1 được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với Cys34 của SEQ ID NO: 139.

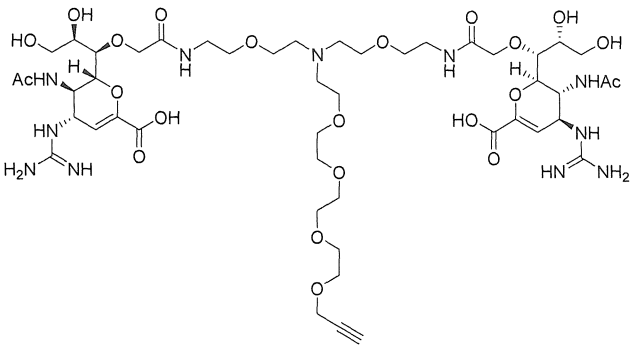
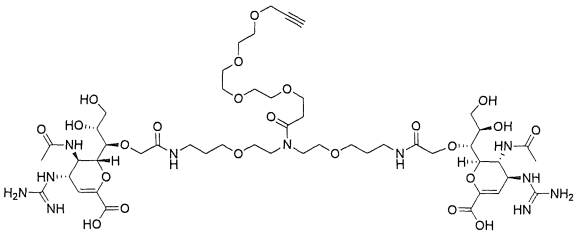
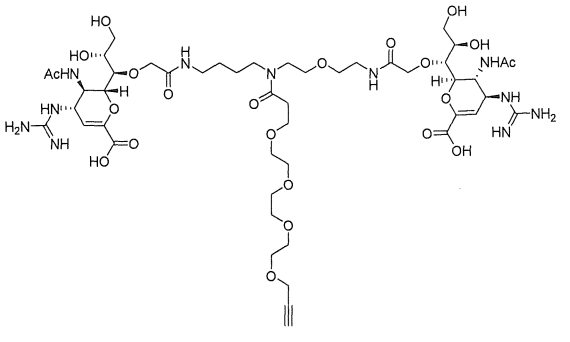
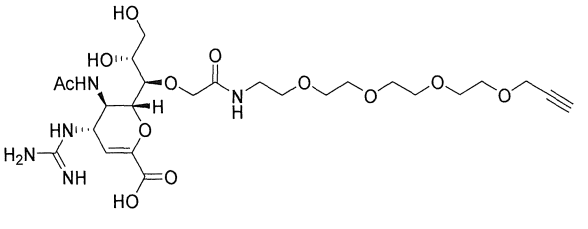
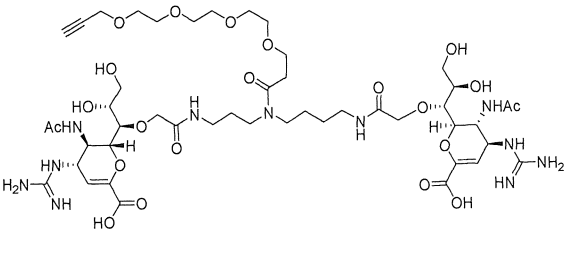
Các chất trung gian của Bảng 1a có thể được liên hợp với miền Fc hoặc monome miền Fc (ví dụ, bằng yếu tố liên kết) bằng các phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương pháp bất kỳ được mô tả hoặc được lấy làm ví dụ ở đây. Theo một số phương án, thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (1), (2), (D-I)-(D-XI), hoặc (M-I)-(M-XI)) bao gồm E, trong đó E là monome miền Fc hoặc miền Fc (ví dụ, monome miền Fc hoặc miền Fc, mỗi monome miền Fc độc lập có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138). Theo các phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều nguyên tử nitơ của một hoặc nhiều gốc lysin tiếp xúc bề mặt của E hoặc một hoặc nhiều nguyên tử lưu huỳnh của một hoặc nhiều xystein tiếp xúc bề mặt trong E được liên hợp cộng hóa trị với yếu tố liên kết (ví dụ, yếu tố liên kết PEG_2-PEG_{20}). Yếu tố liên kết được liên hợp với E có thể được tạo chức sao cho nó có thể phản ứng để tạo thành liên kết cộng hóa trị với Int bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, Int ở Bảng 1a). Theo các phương án được ưu tiên, E được liên hợp với yếu tố liên kết được tạo chức với nhóm azido và Int (ví dụ, Int ở Bảng 1a) được tạo chức với nhóm alkyn. Sự liên hợp (ví dụ, bằng hóa học click) của yếu tố liên kết azido của E và yếu tố liên kết alkyn của Int tạo thành thể liên hợp của sáng chế, ví dụ thể liên hợp được mô tả bằng công thức (5). Theo các phương án khác, E được liên hợp với yếu tố liên kết được tạo chức với nhóm alkyn và Int (ví dụ, Int ở Bảng 1a) được tạo chức với nhóm azido. Sự liên hợp (ví dụ, bằng hóa học click; xem, ví dụ, Fig. 103) của yếu tố liên kết alkyn của E và yếu tố liên kết azido của Int tạo thành thể liên hợp của sáng chế, ví dụ thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (1), (2), (D-I)-(D-XI), hoặc (M-I)-(M-XI).

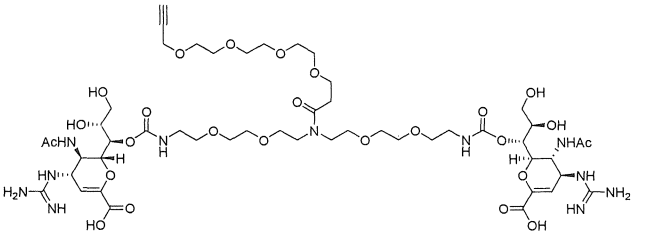
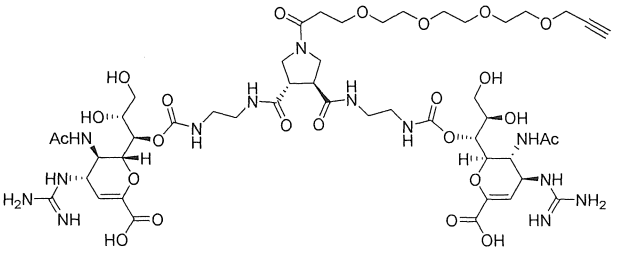
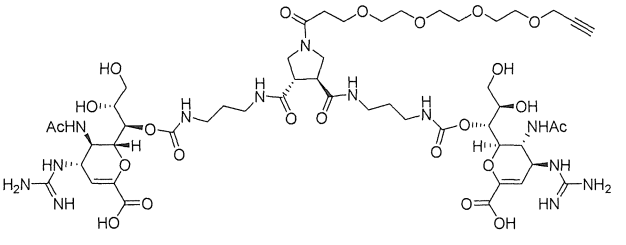
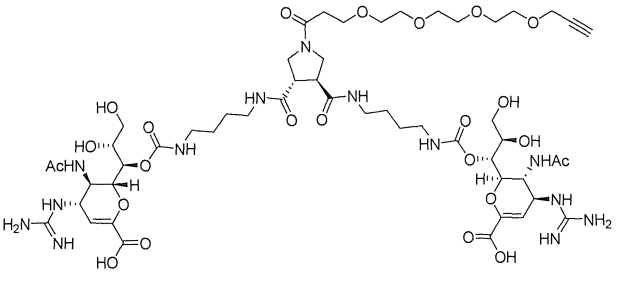
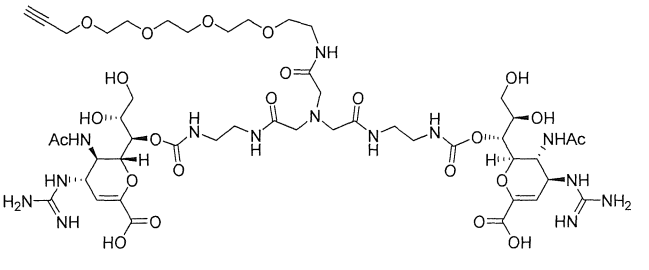
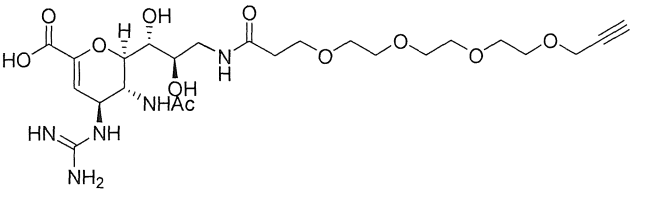
Bảng 1a: Các chất trung gian

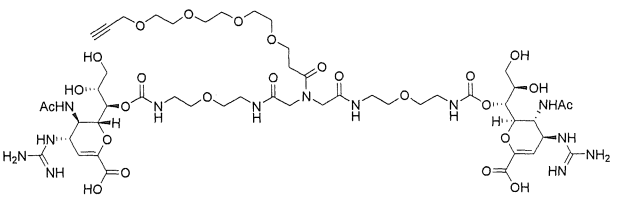
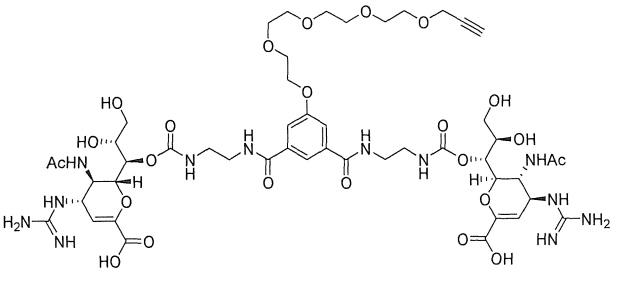
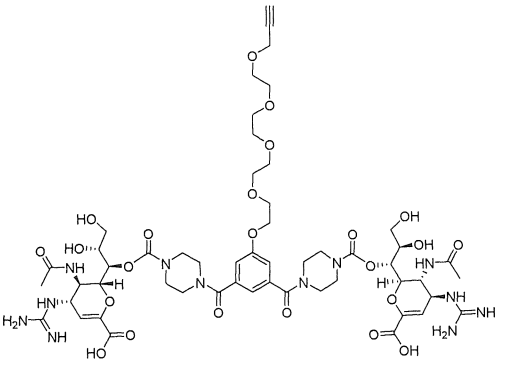
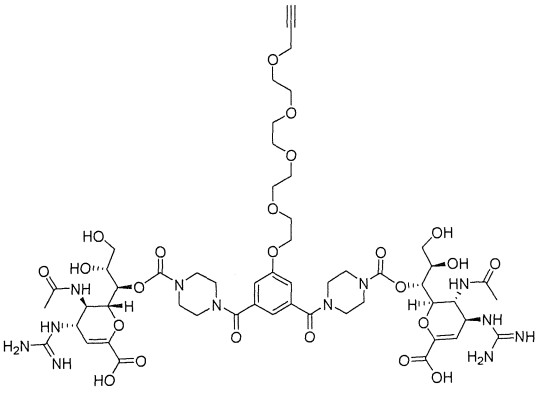
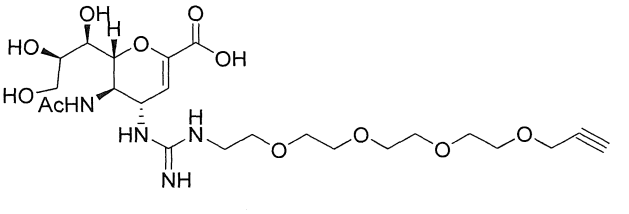
Chất trung gian	Cấu trúc
Int-1	
Int-2	
Int-3	
Int-4	
Int-5	
Int-6	

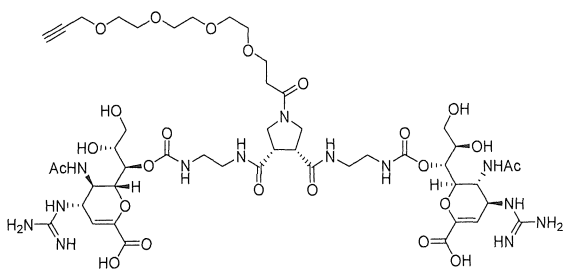
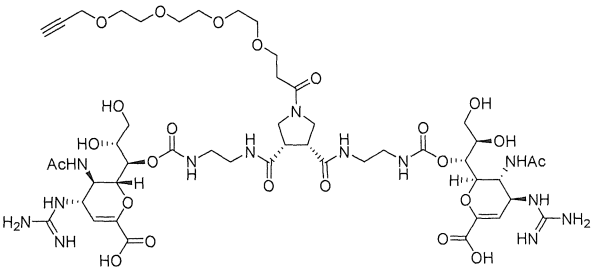
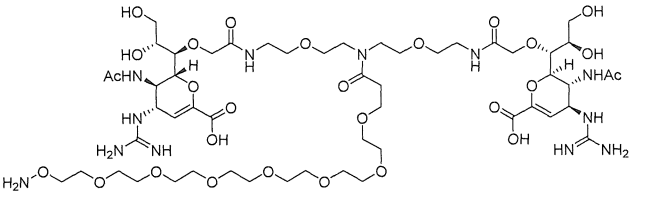
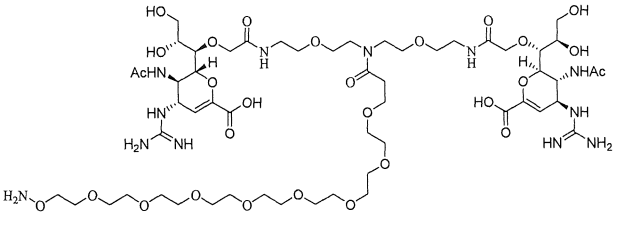
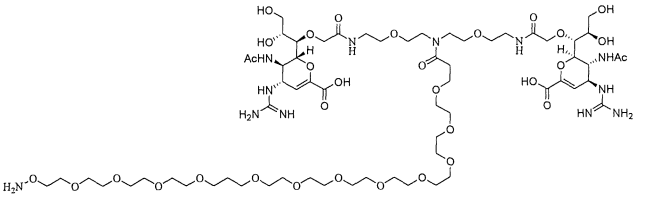
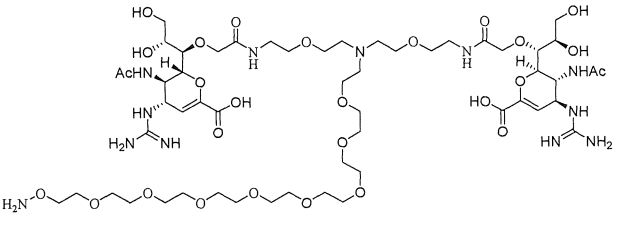
Int-7	
Int-9	
Int-12	
Int-13	
Int-14	

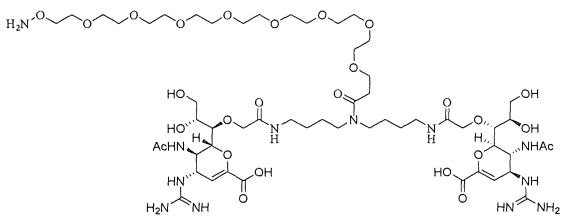
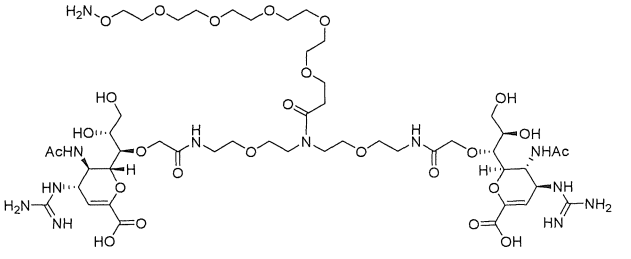
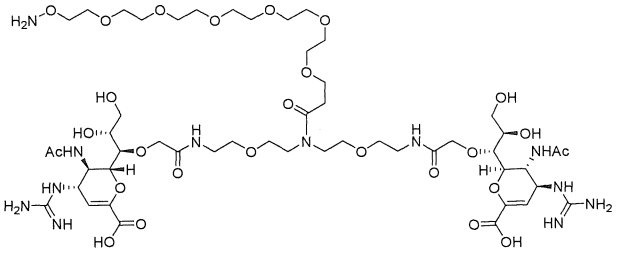
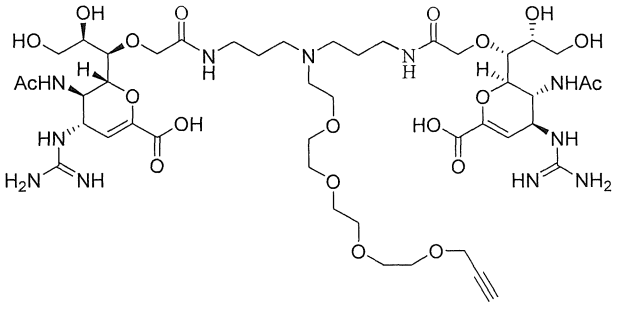
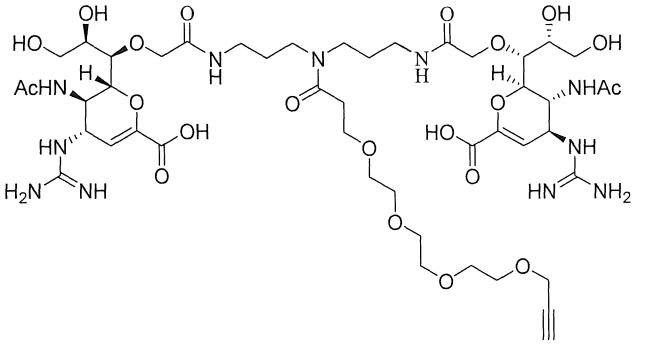
Int-15	
Int-16	
Int-17	
Int-18	

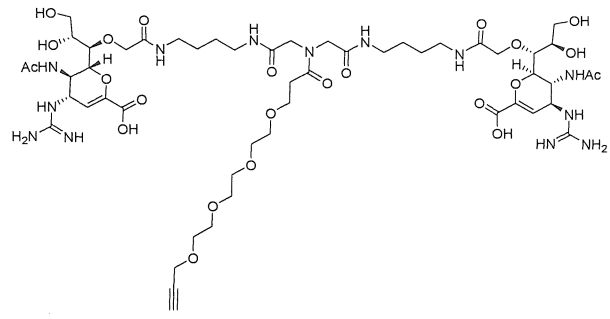
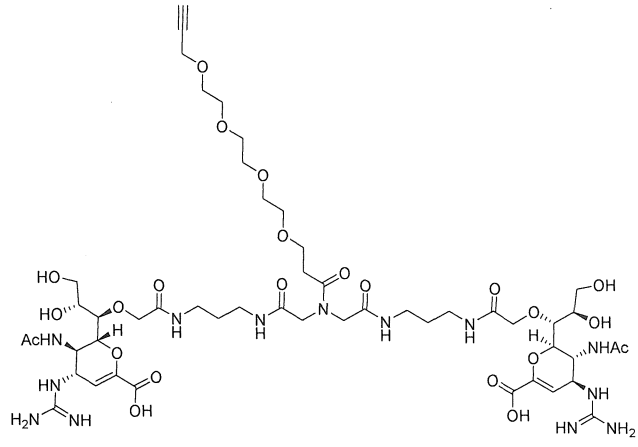
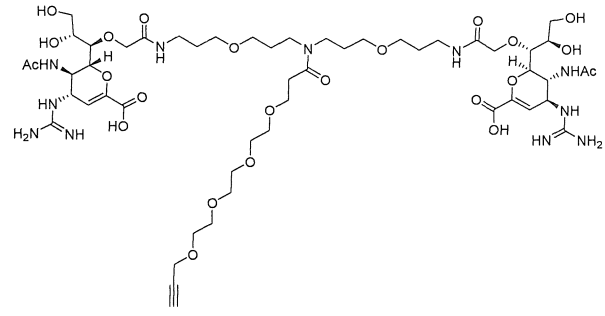
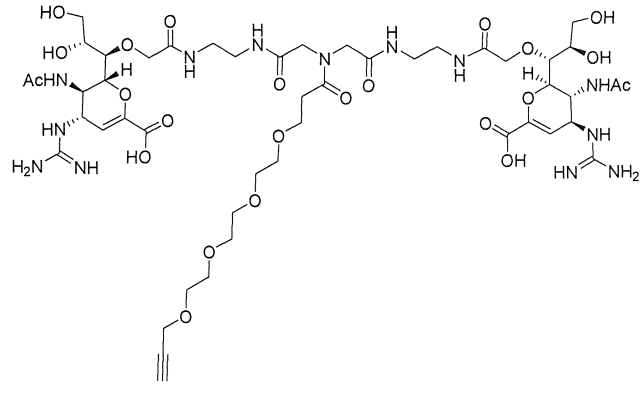
Int-19	
Int-20	
Int-21	
Int-22	
Int-23	

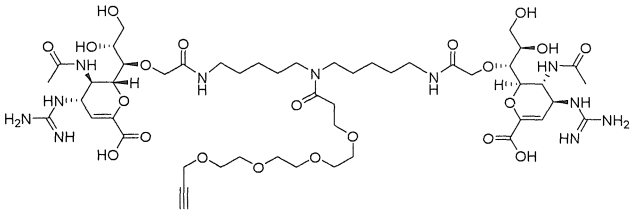
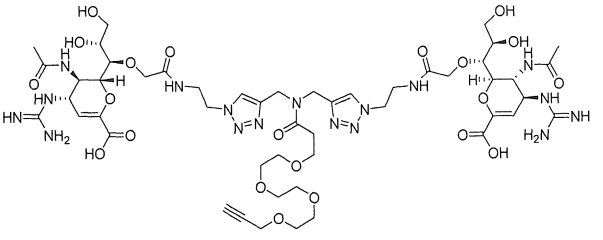
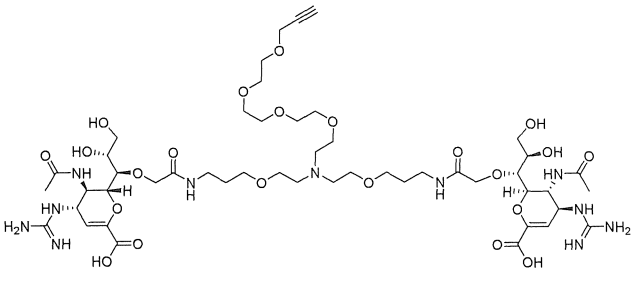
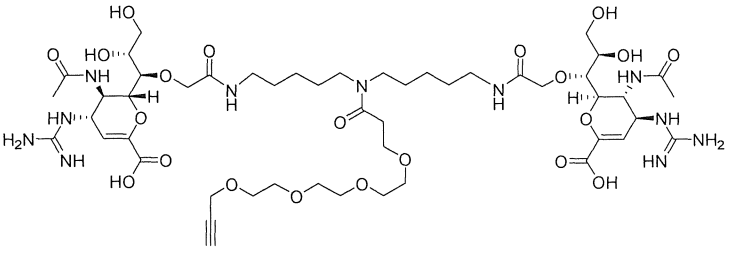
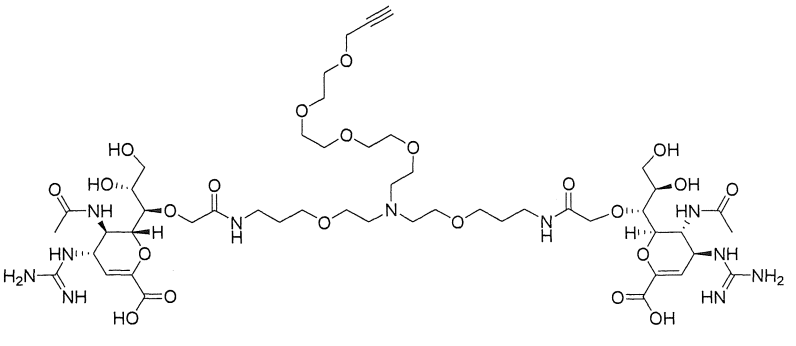
Int-24	
Int-25	
Int-26	
Int-27	
Int-28	
Int-30	

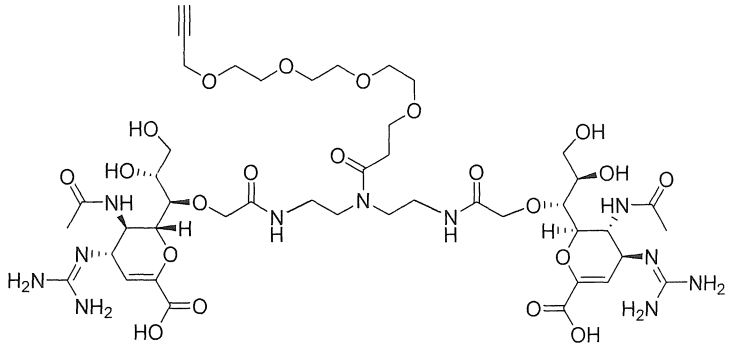
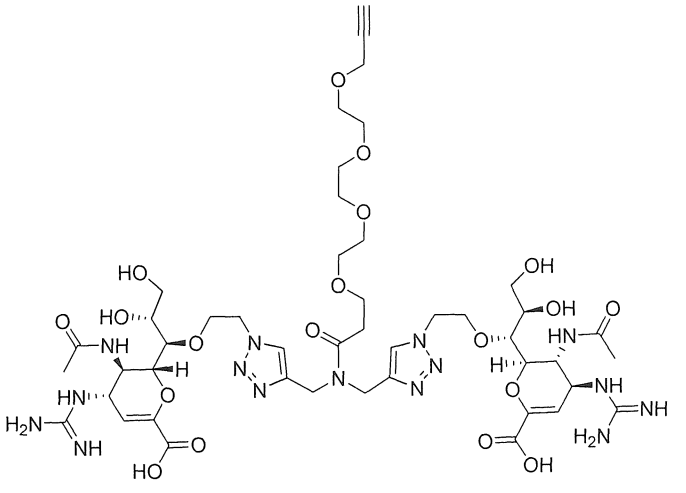
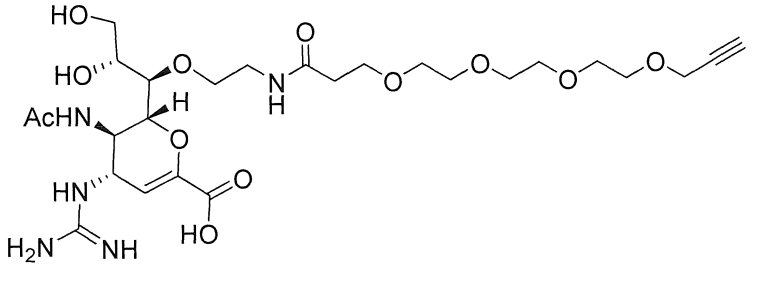
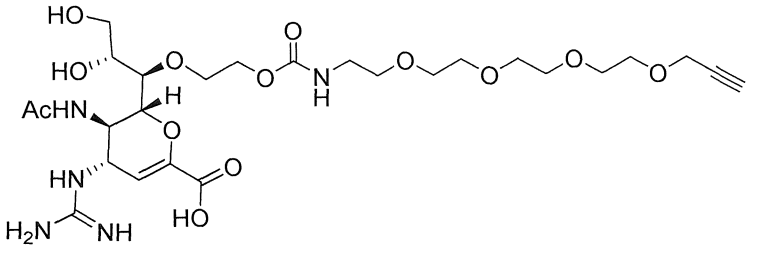
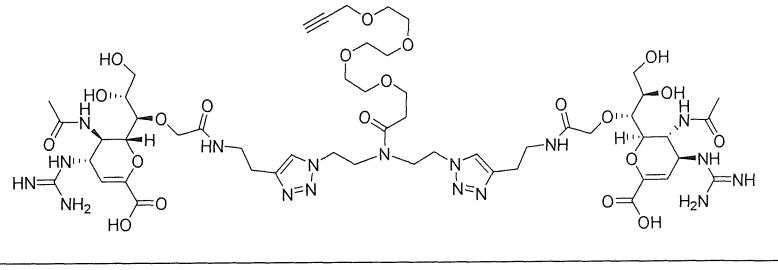
Int-31	
Int-34	
Int-38	
Int-39	
Int-40	

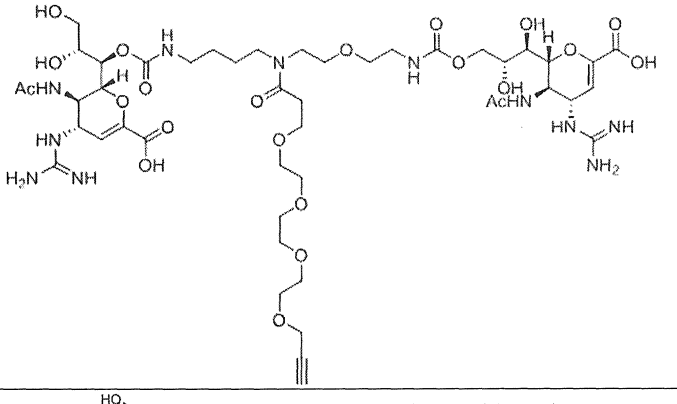
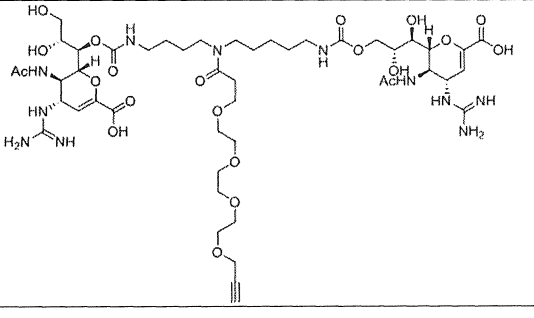
Int-42	
Int-43	
Int-44	
Int-45	
Int-46	
Int-47	

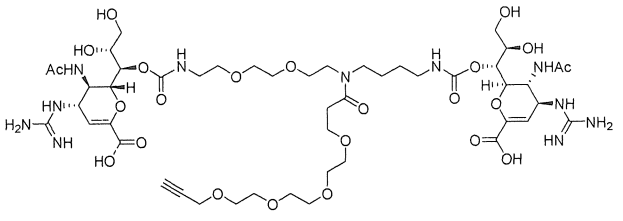
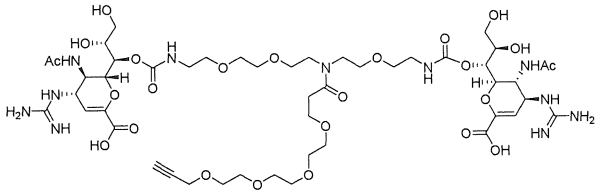
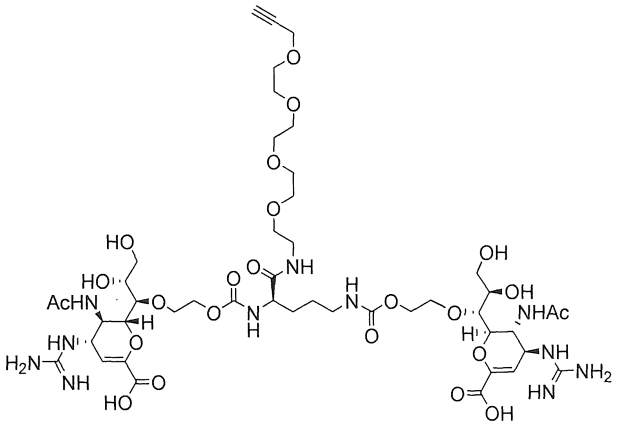
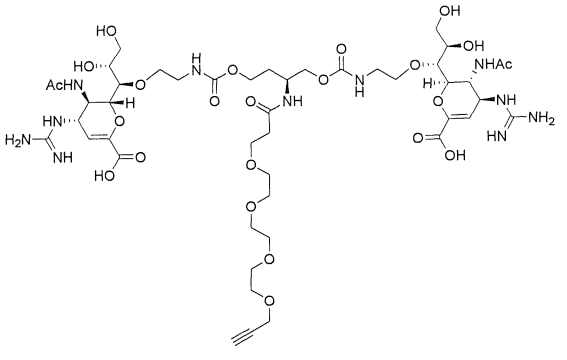
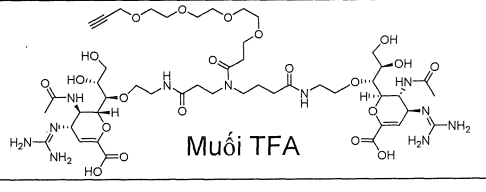
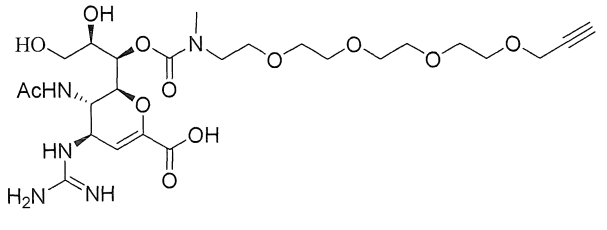
Int-48	
Int-49	
Int-50	
Int-52	
Int-53	

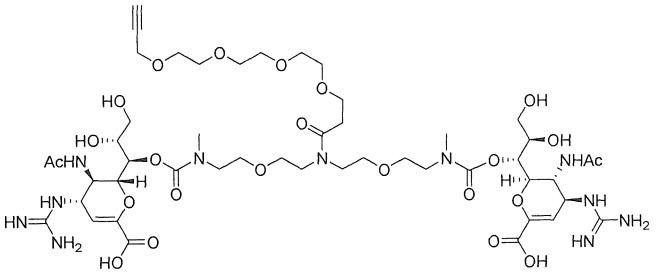
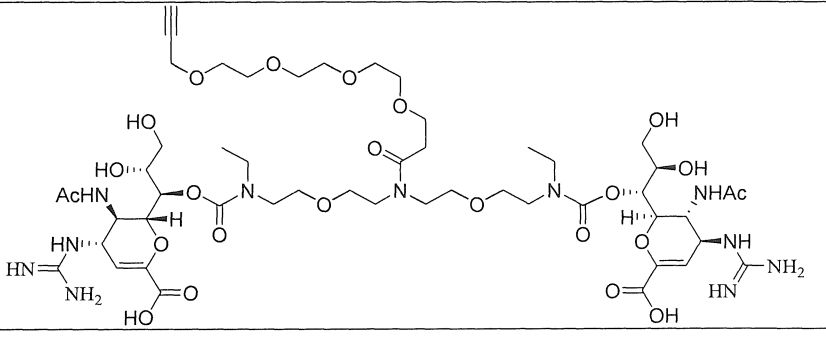
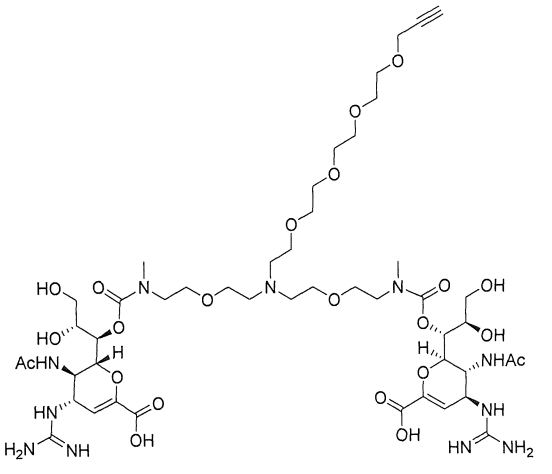
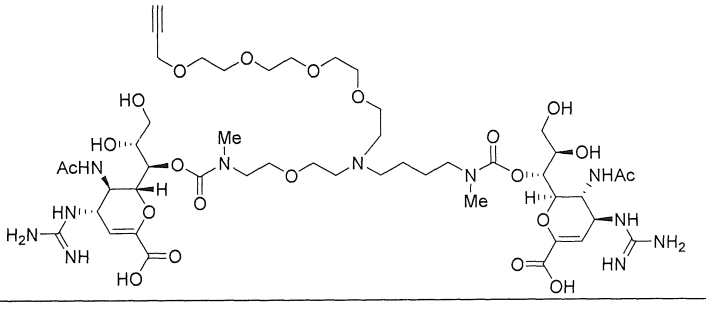
Int-54	
Int-55	
Int-57	
Int-58	

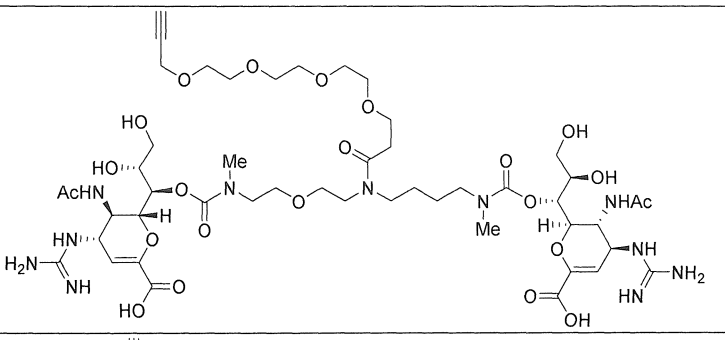
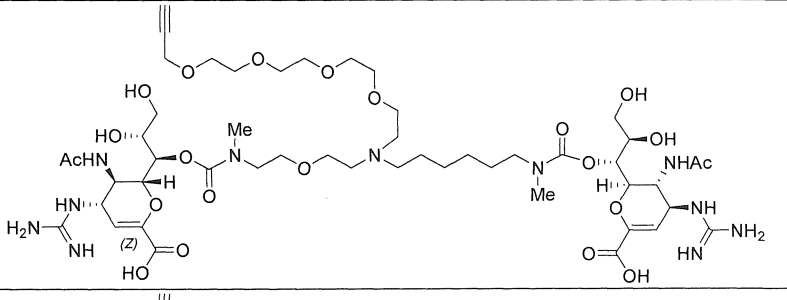
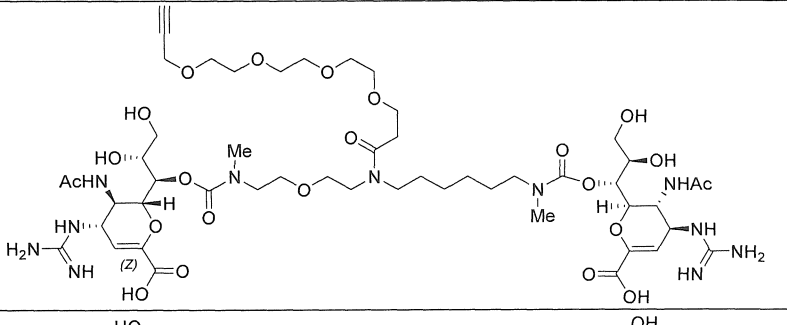
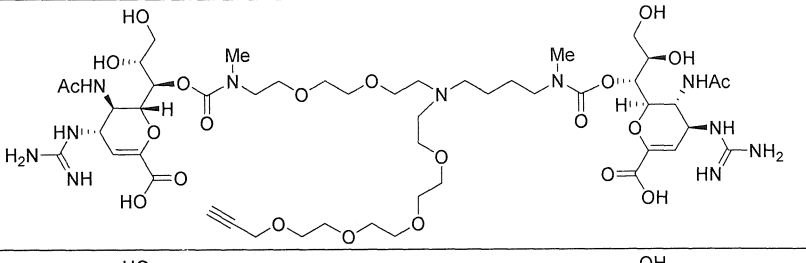
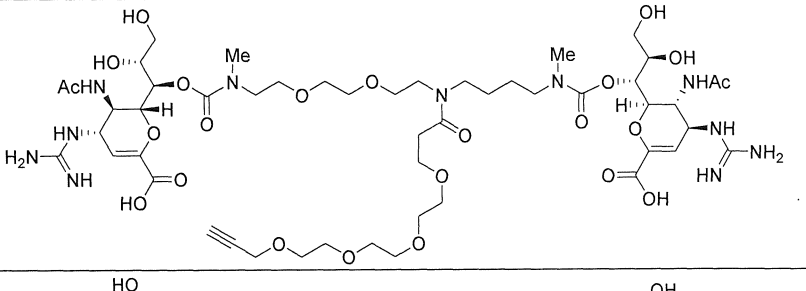
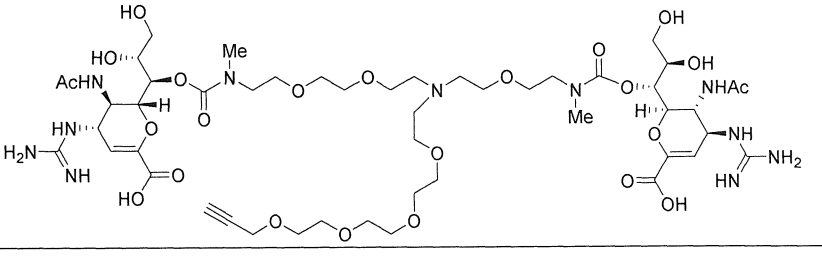
Int-59	
Int-60	
Int-61	
Int-62	
Int-63	

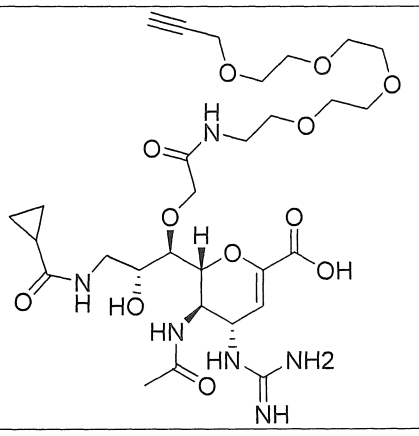
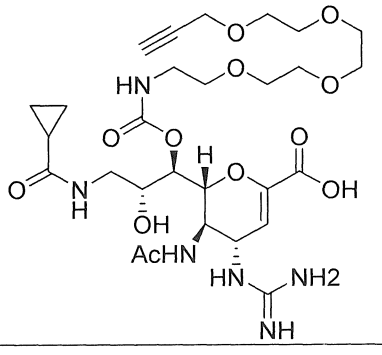
Int-64	
Int-65	
Int-67	
Int-68	
Int-69	

Int-70	
Int-71	
Int-72	
Int-73	
Int-74	

Int-75	
Int-76	
Int-77	
Int-78	
Int-79	 Muối TFA
Int-80	

Int-81	
Int-82	
Int-83	
Int-84	

Int-85	
Int-86	
Int-87	
Int-88	
Int-89	
Int-90	

Int-91	
Int-92	

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các thể liên hợp ở Bảng 1b. Mỗi thể liên hợp ở Bảng 1b tương ứng với thể liên hợp có công thức (M-I) hoặc công thức (D-I), như được chỉ ra. Các thể liên hợp ở Bảng 1b bao gồm các thể liên hợp được tạo ra bằng phản ứng cộng hóa trị của Int ở Bảng 1a với yếu tố liên kết mà lần lượt được liên hợp với E (ví dụ, monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc). Theo một số phương án, gốc phản ứng của Int (ví dụ, nhóm alkyn hoặc azido) phản ứng với nhóm phản ứng tương ứng (ví dụ, nhóm alkyn hoặc azido) của yếu tố liên kết (được thể hiện bằng L') được gắn cộng hóa trị với E, sao cho Int ở Bảng 1a được gắn cộng hóa trị với E. Như được thể hiện ở Bảng 1b, L' tương ứng với phần còn lại của L như được xác định ở (M-1) hoặc (D-I) (ví dụ, L' là yếu tố liên kết mà liên kết cộng hóa trị Int và E). Ví dụ, L' có thể bao gồm triazol (được tạo ra bằng phản ứng hóa học click giữa Int và yếu tố liên kết được liên hợp với E) và yếu tố liên kết (ví dụ, yếu tố liên kết PEG_2-PEG_{20}) mà lần lượt được liên hợp với chuỗi bên axit amin của E (xem, ví dụ, Fig. 103).

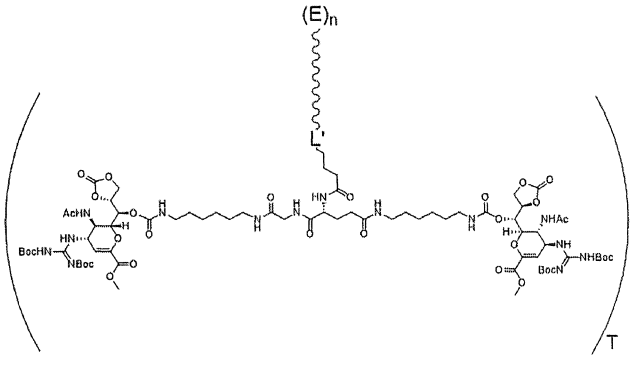
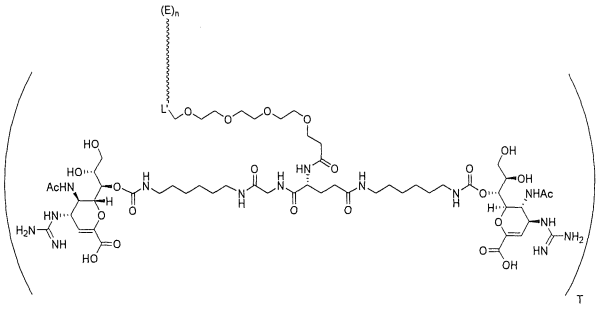
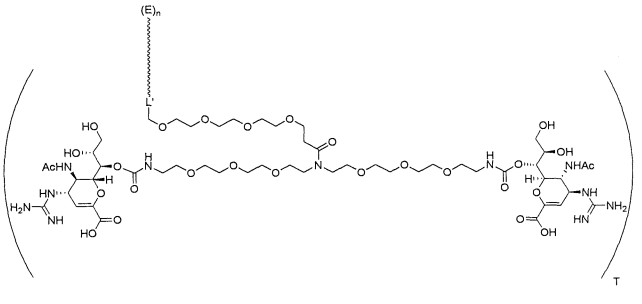
Theo một số phương án của thể liên hợp ở Bảng 1b, n là 1 hoặc 2. Khi n là 1, mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein

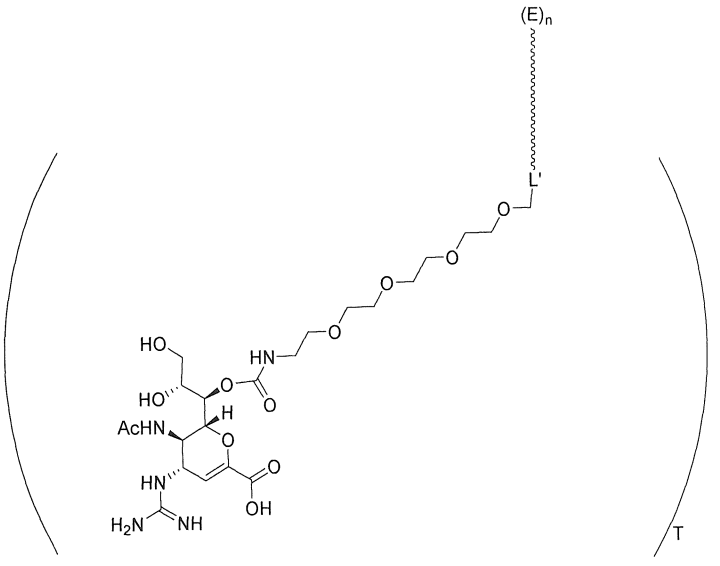
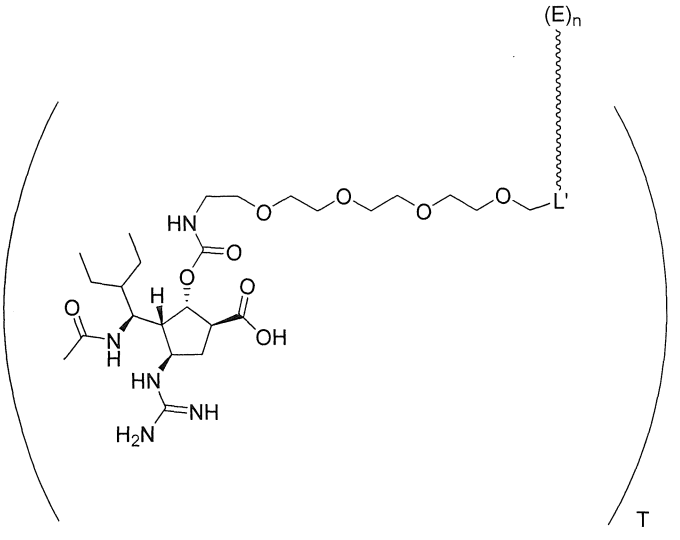
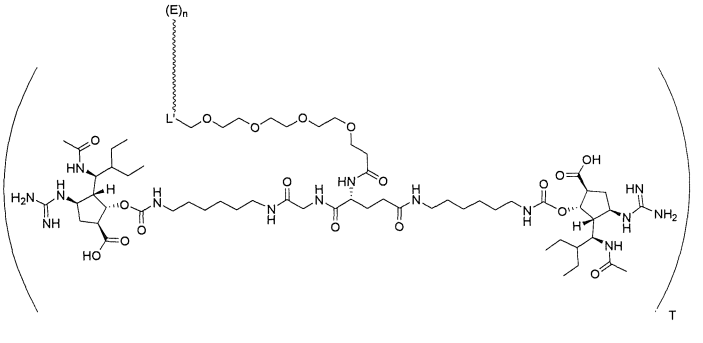
albumin, hoặc peptit liên kết Fc. Khi n là 2, mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), và các monome miền Fc dime hóa để tạo thành miền Fc.

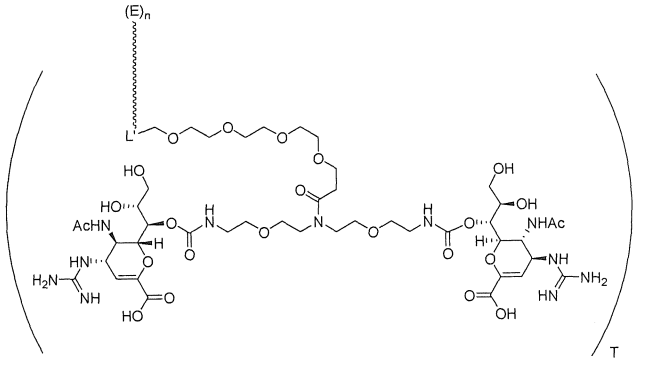
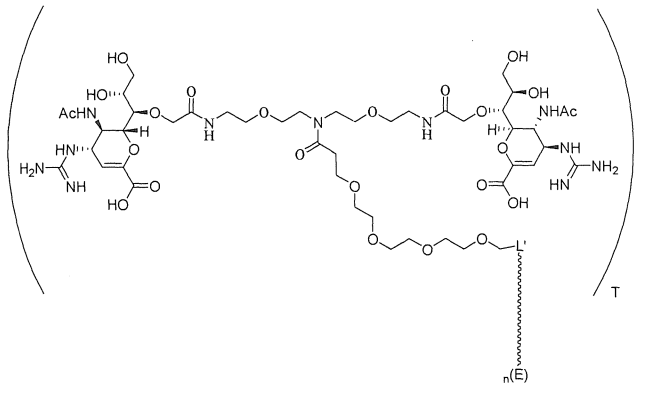
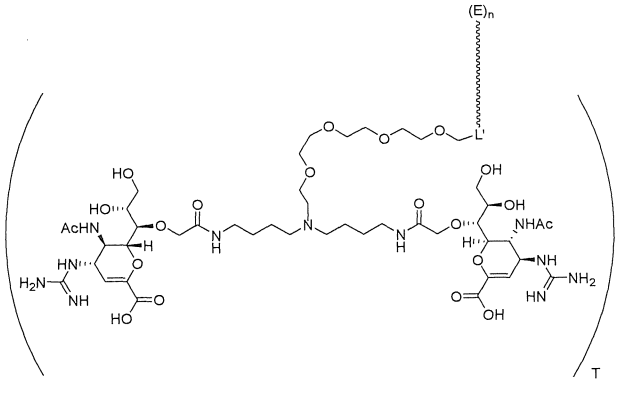
Theo một số phương án của thể liên hợp bất kỳ ở Bảng 1b, T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20). Sáng chế cũng đề xuất tập hợp các thể liên hợp bất kỳ ở Bảng 2 trong đó giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5). Theo một số phương án, giá trị trung bình của T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20. Theo các phương án nhất định, T trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, hoặc 10). Theo các phương án nhất định, T trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 5 (ví dụ, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, hoặc 5). Theo một số phương án, T trung bình nằm trong khoảng từ 5 đến 10 (ví dụ, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10). Theo một số phương án, T trung bình nằm trong khoảng từ 2,5 đến 7,5 (ví dụ, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, hoặc 7,5).

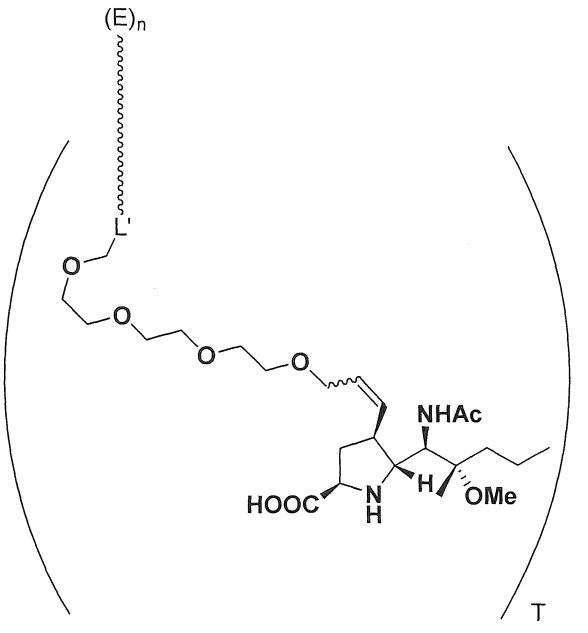
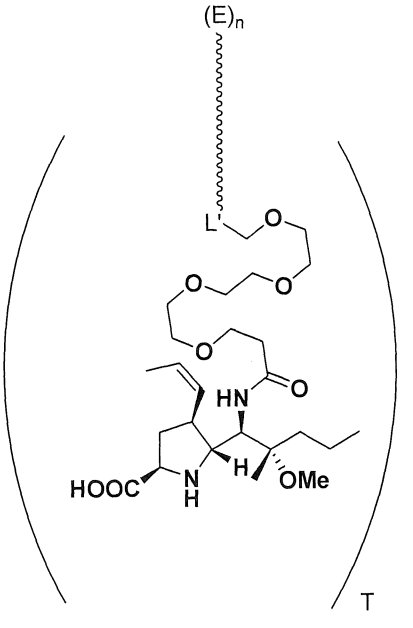
Đường lượn sóng trong các thể liên hợp ở Bảng 1b chỉ ra rằng mỗi L'-Int được gắn cộng hóa trị với chuỗi bên axit amin trong E (ví dụ, nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt hoặc nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc bề mặt trong E), hoặc muối dược dụng của nó.

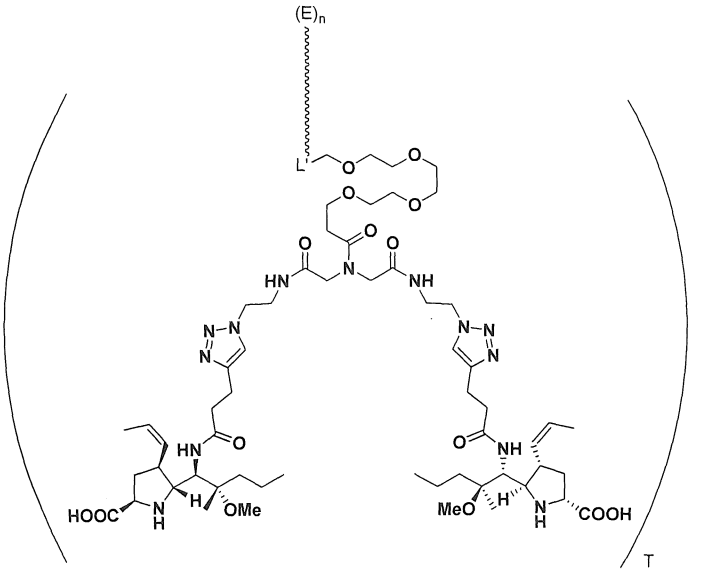
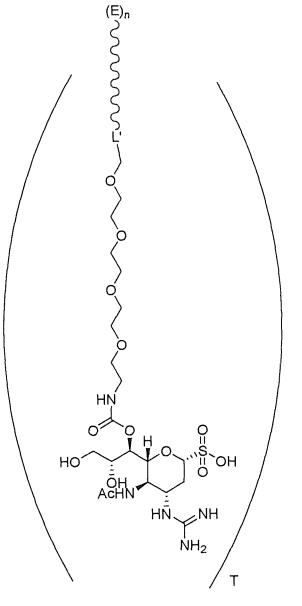
Bảng 1b: Các thể liên hợp tương ứng với các chất trung gian của Bảng 1a

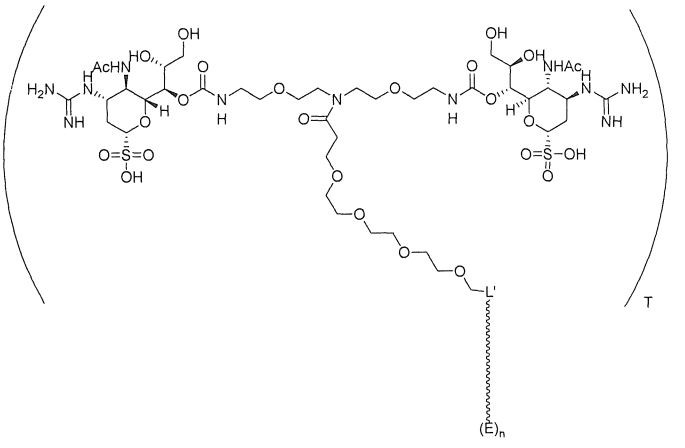
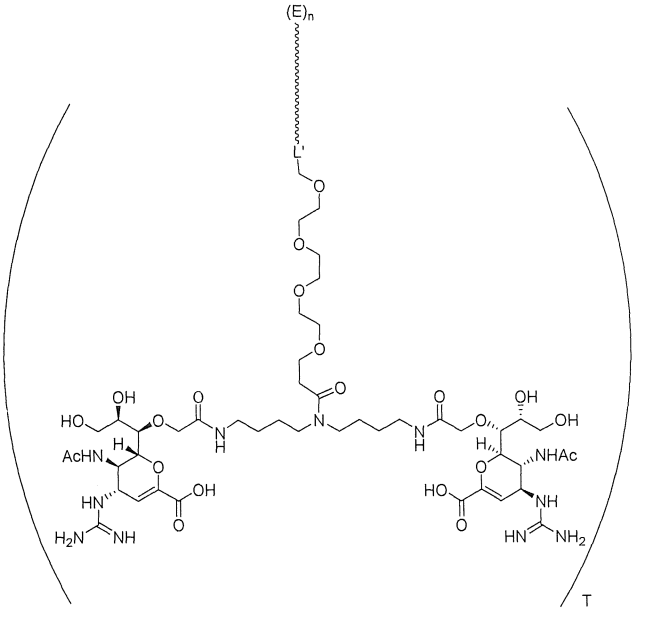
Chất trung gian tương ứng của Bảng 1a	Được mô tả bằng công thức	Cấu trúc thể liên hợp
Int-1	(D-I)	
Int-2	(D-I)	
Int-3	(D-I)	

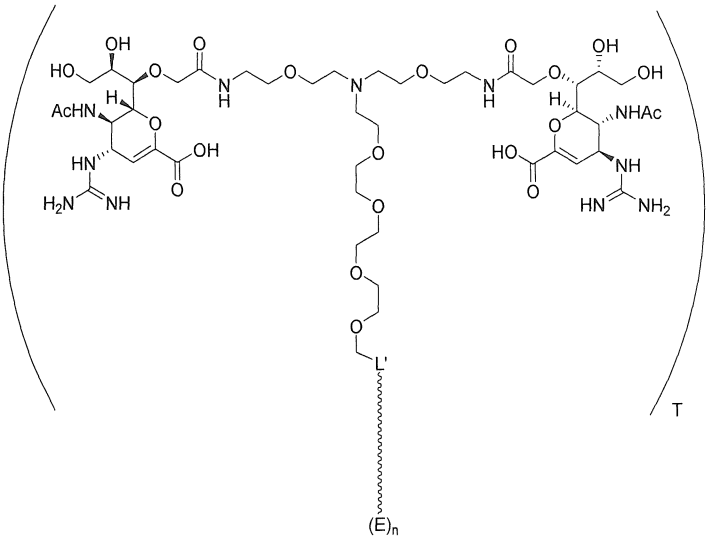
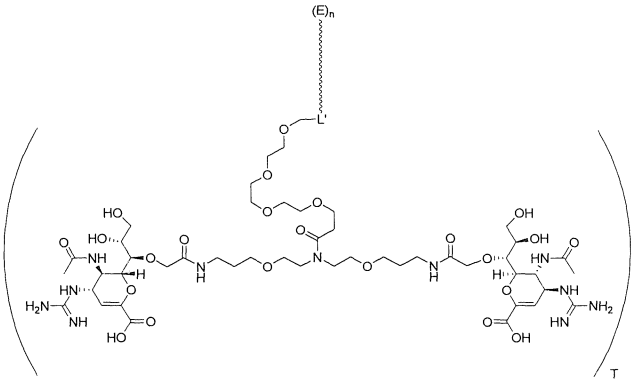
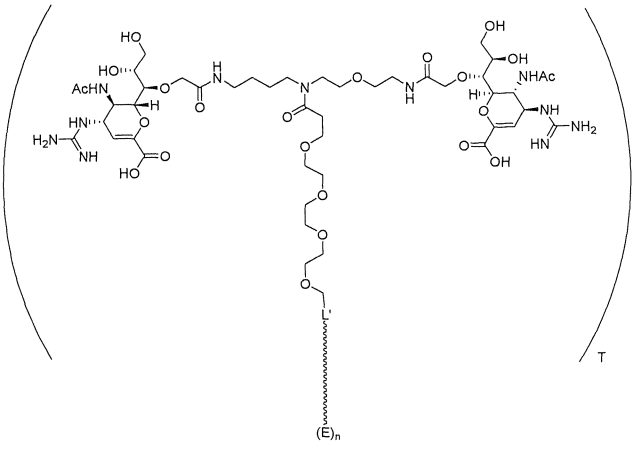
Int-4	(M-I)	
Int-5	(M-I)	
Int-6	(D-I)	

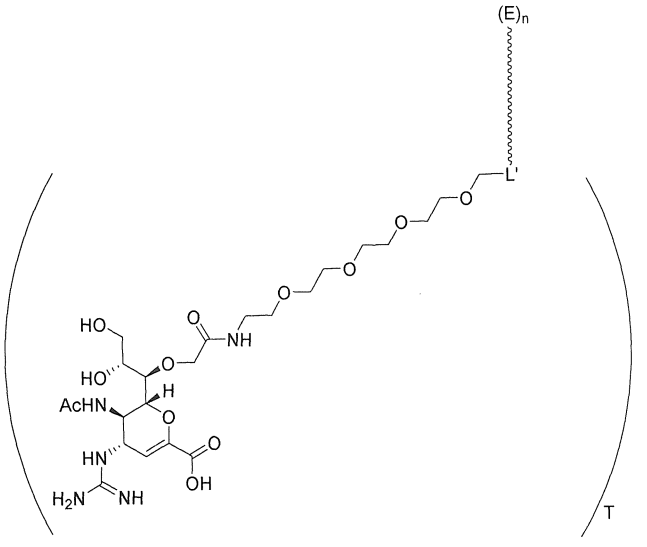
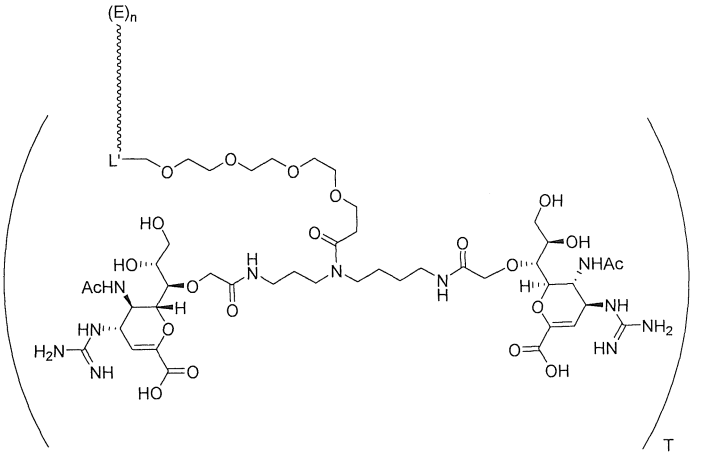
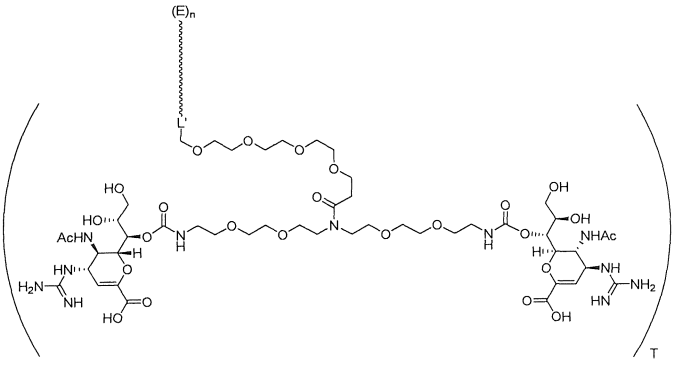
Int-7	(D-I)	
Int-9	(D-I)	
Int-12	(D-I)	

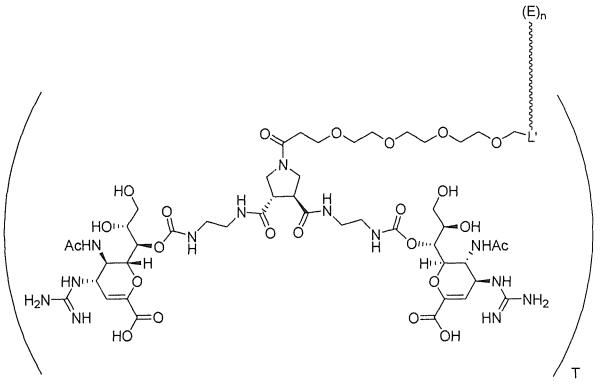
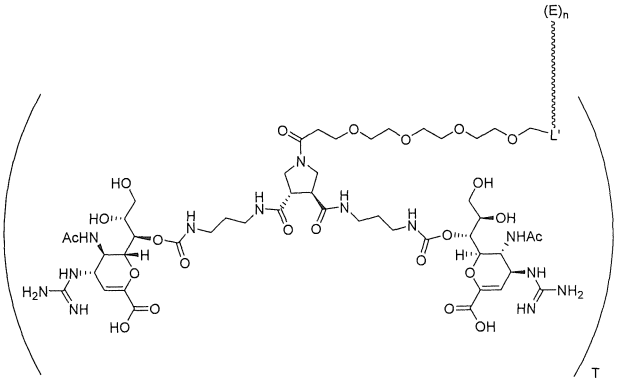
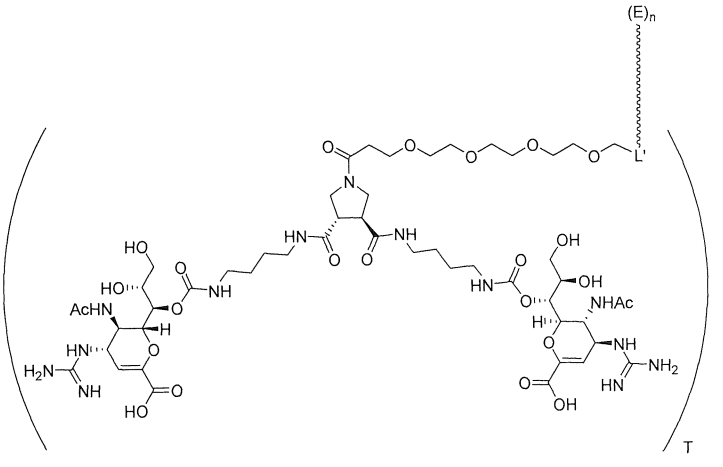
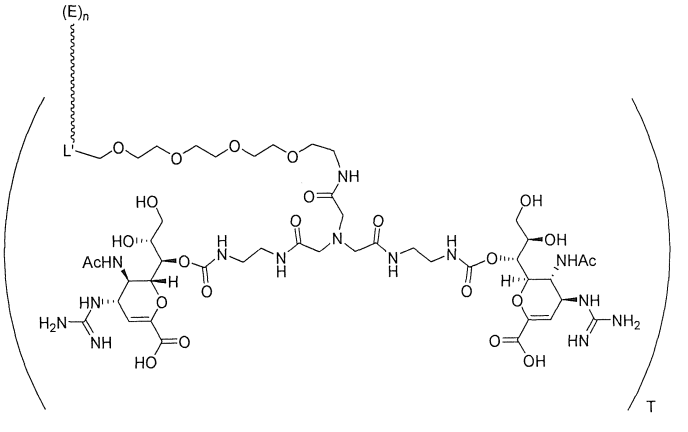
Int-13	(M-I)	
Int-14	(M-I)	

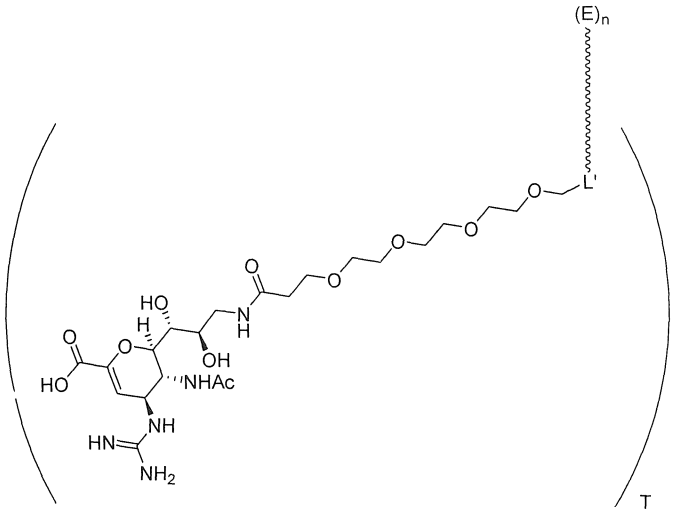
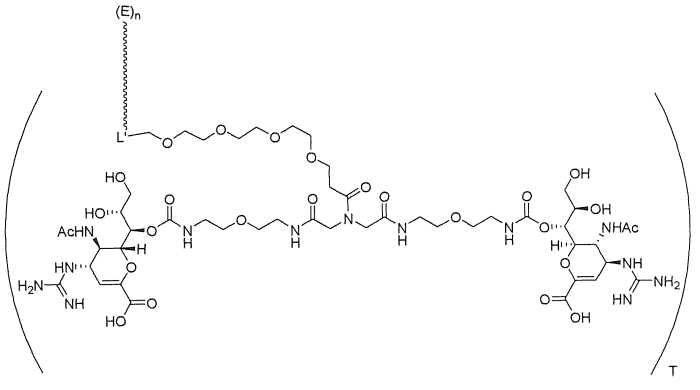
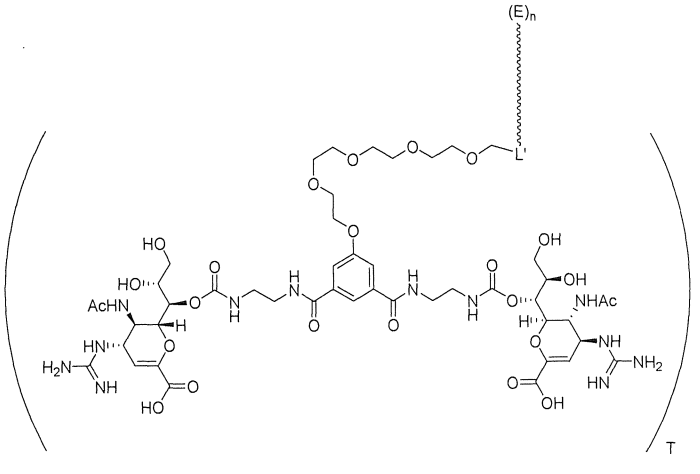
Int-15	(D-I)	
Int-16	(M-I)	

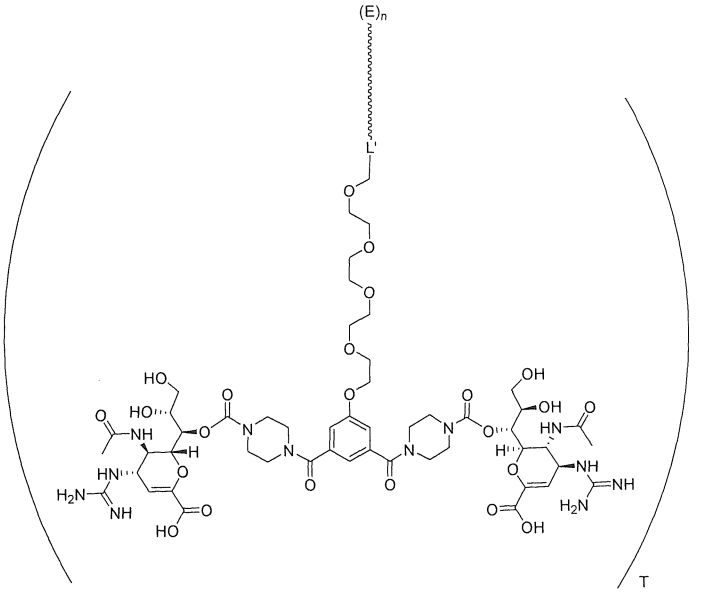
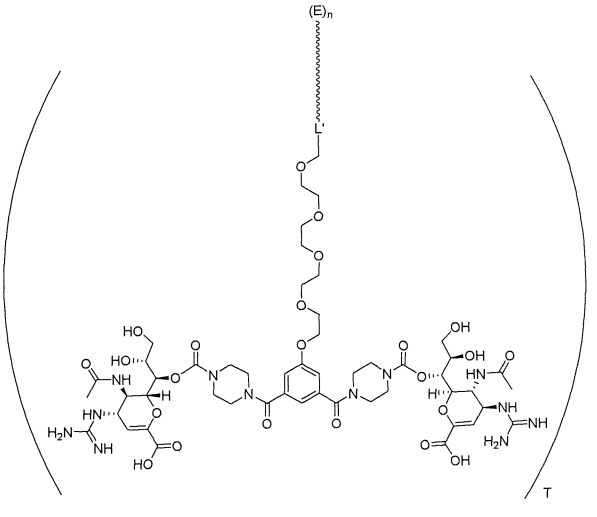
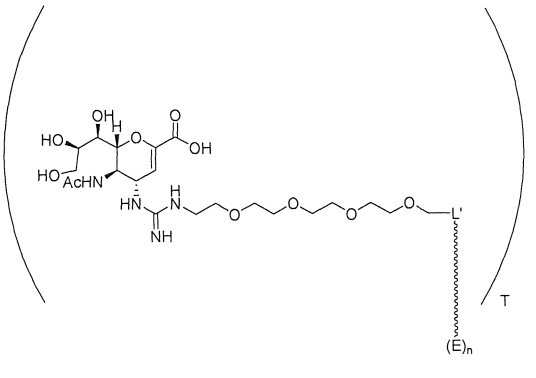
Int-17	(D-I)	
Int-18	(D-I)	

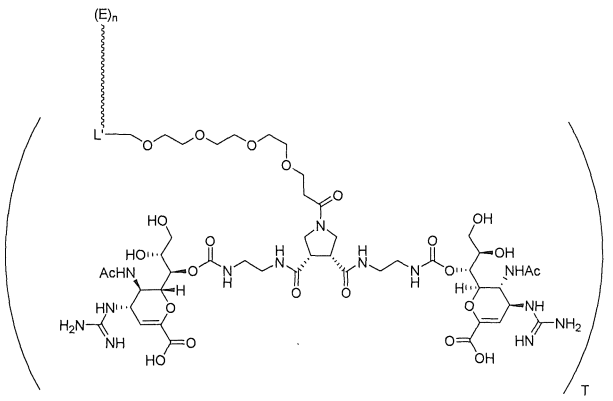
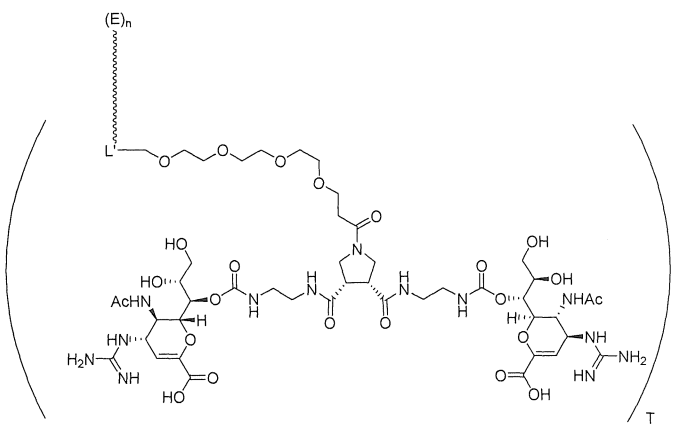
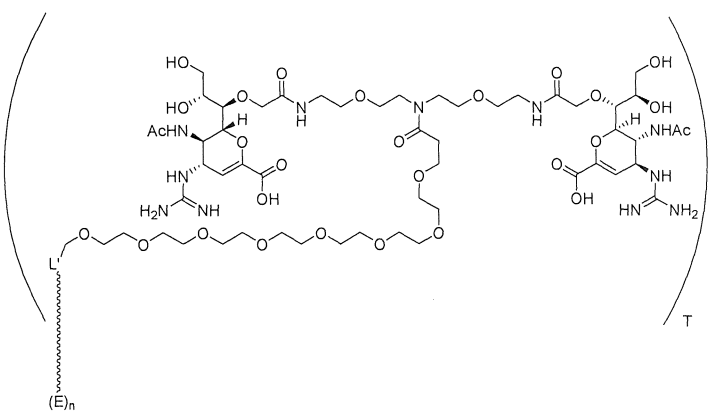
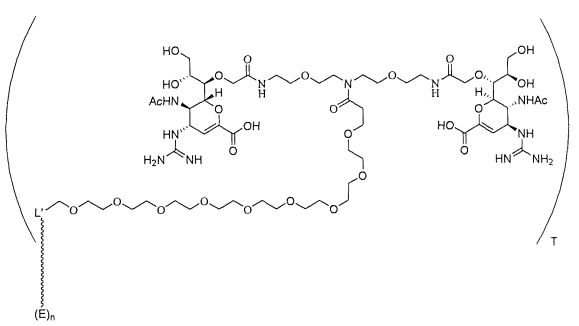
Int-19	(D-I)	
Int-20	(D-I)	
Int-21	(D-I)	

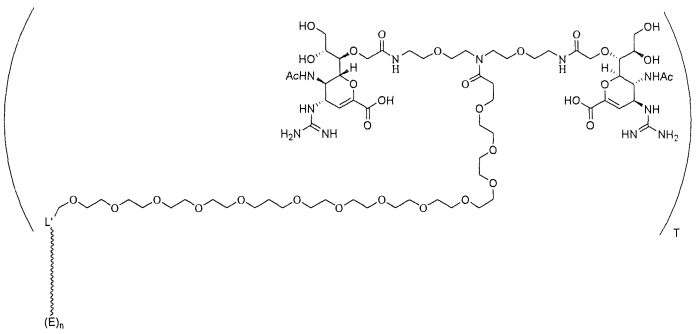
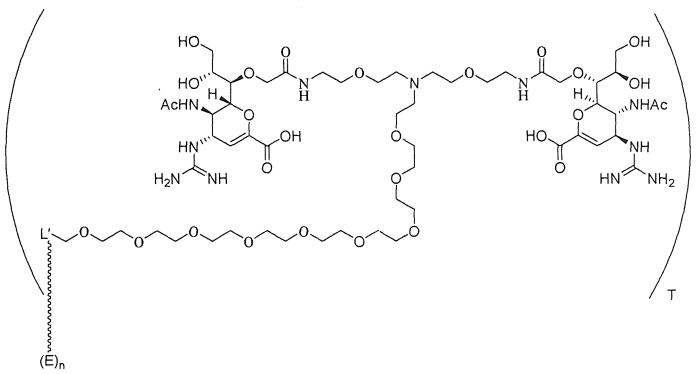
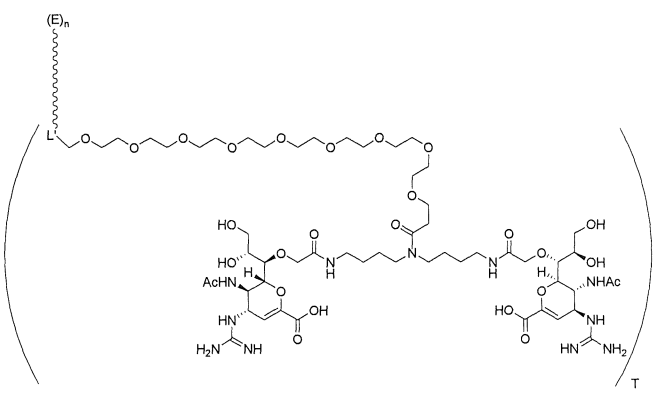
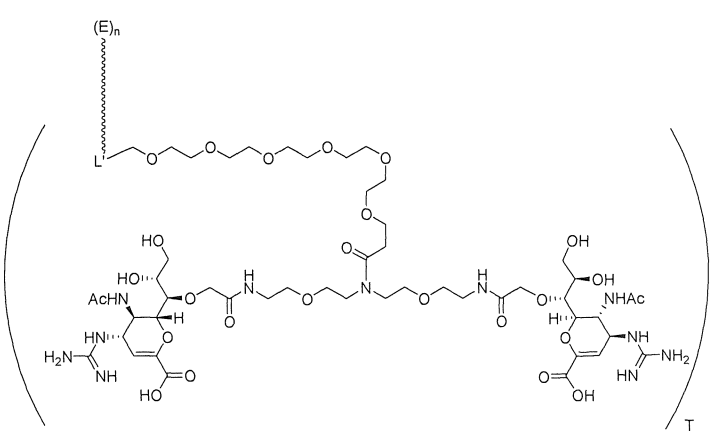
Int-22	(M-I)	
Int-23	(D-I)	
Int-24	(D-I)	

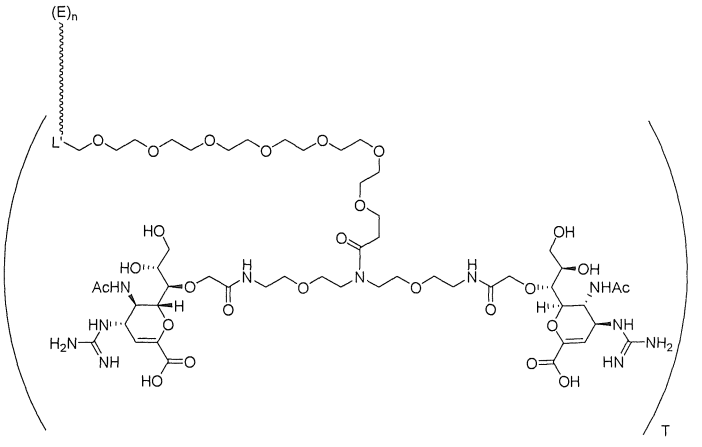
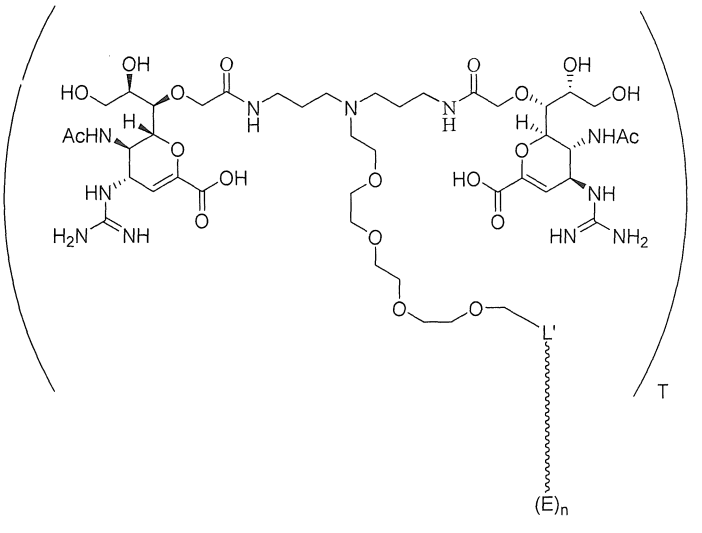
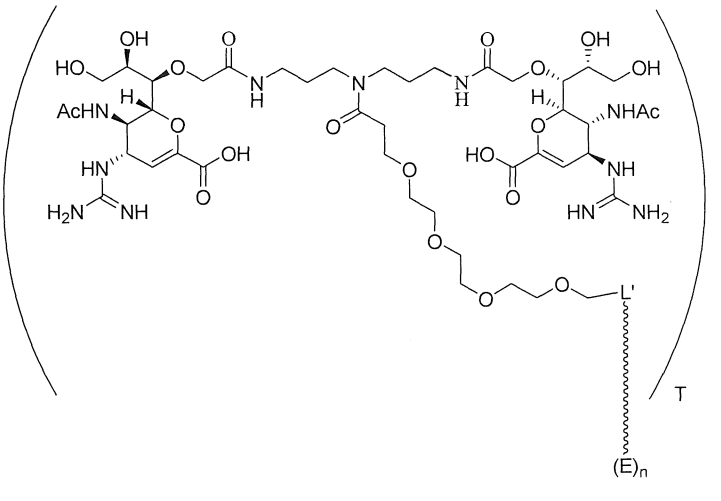
Int-25	(D-I)	
Int-26	(D-I)	
Int-27	(D-I)	
Int-28	(D-I)	

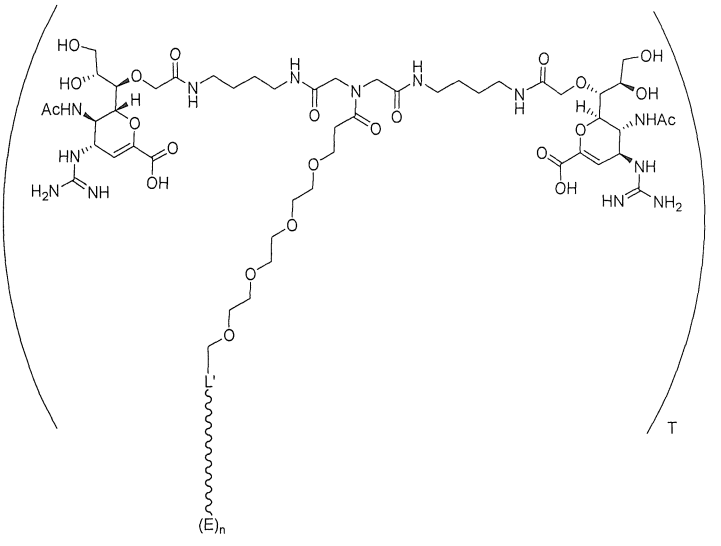
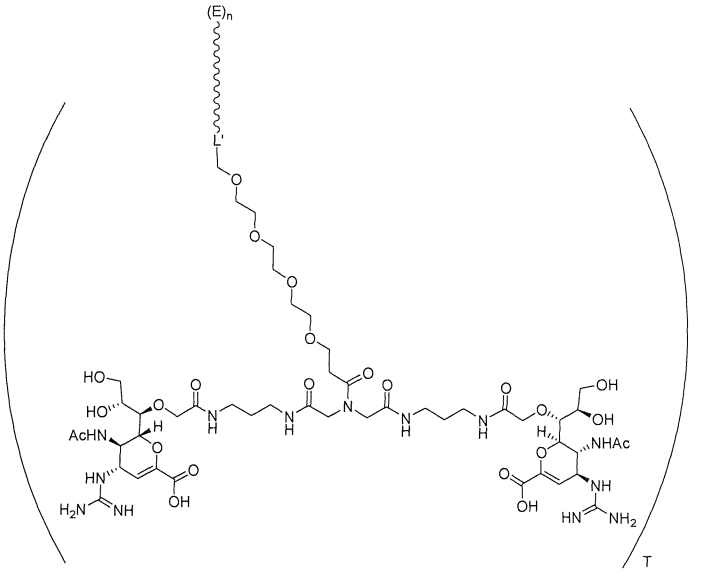
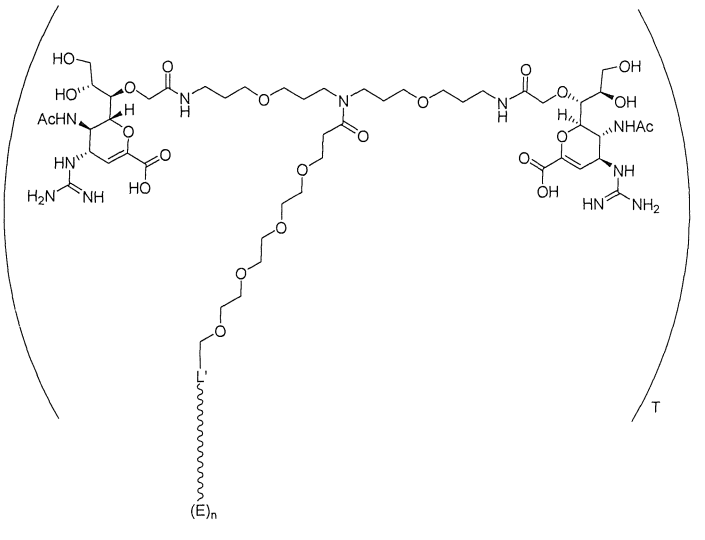
Int-30	(M-I)	
Int-31	(D-I)	
Int-34	(D-I)	

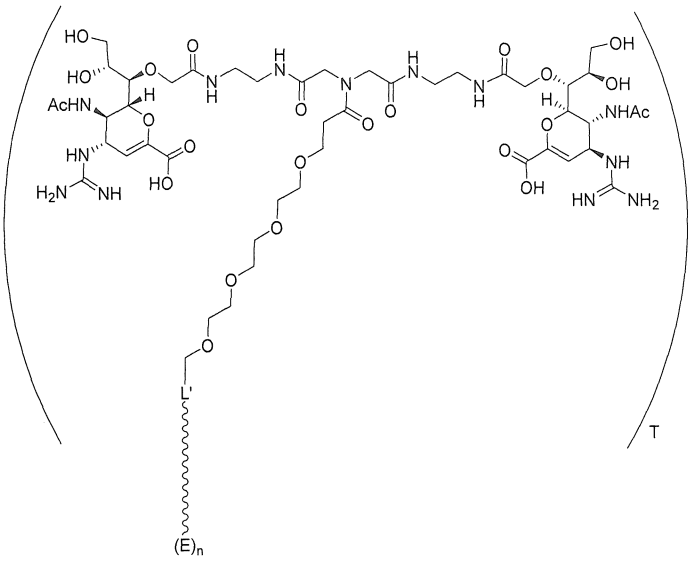
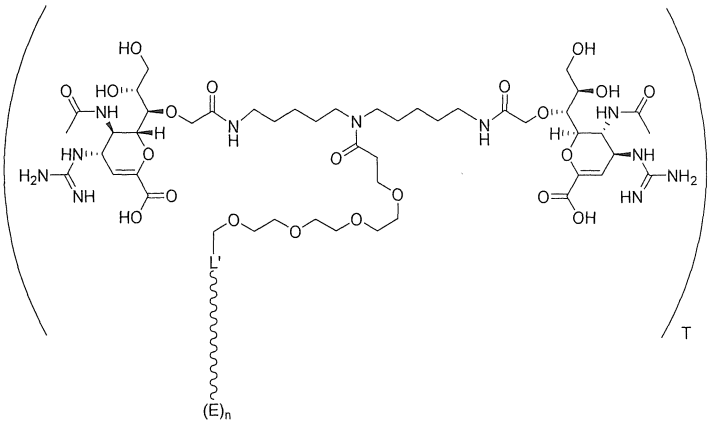
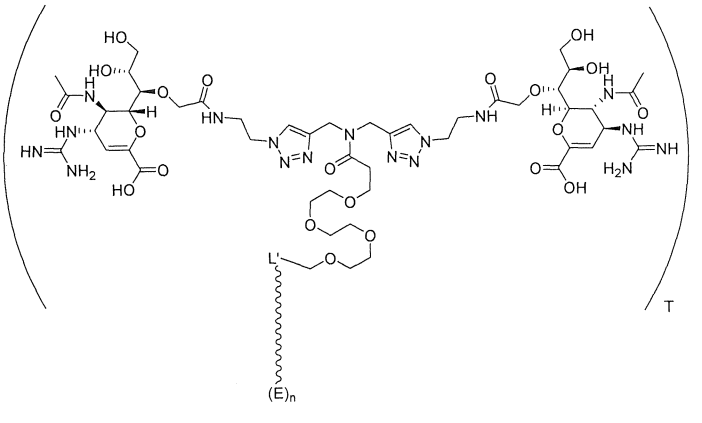
Int-38	(D-I)	
Int-39	(D-I)	
Int-40	(D-I)	

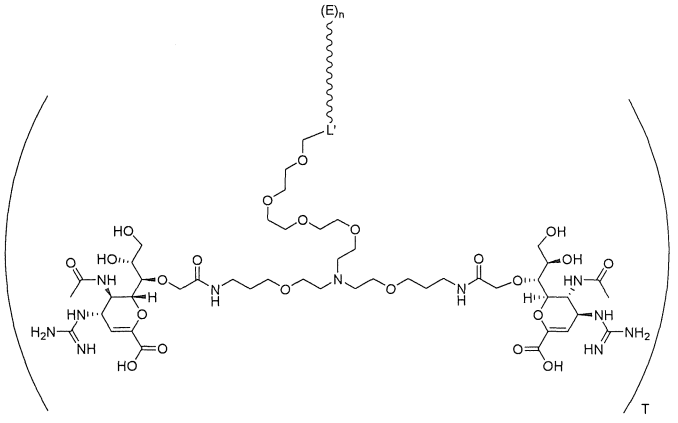
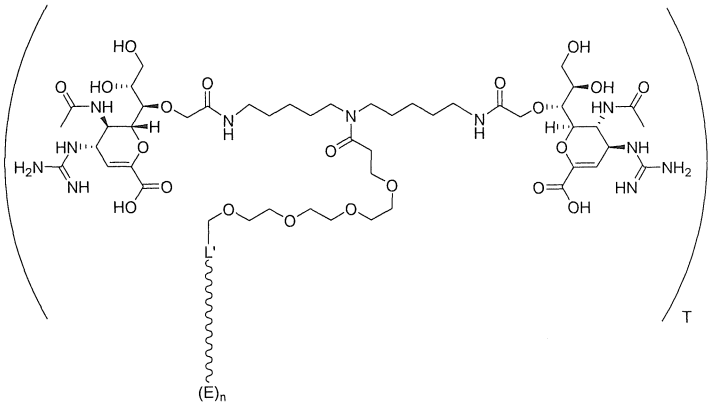
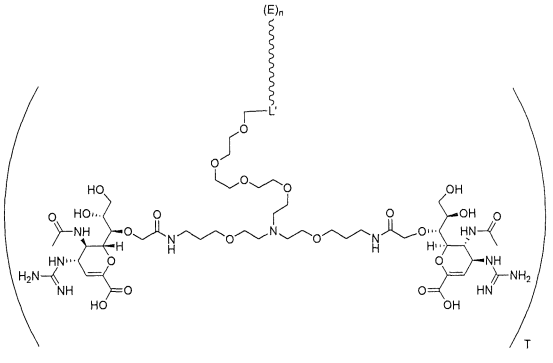
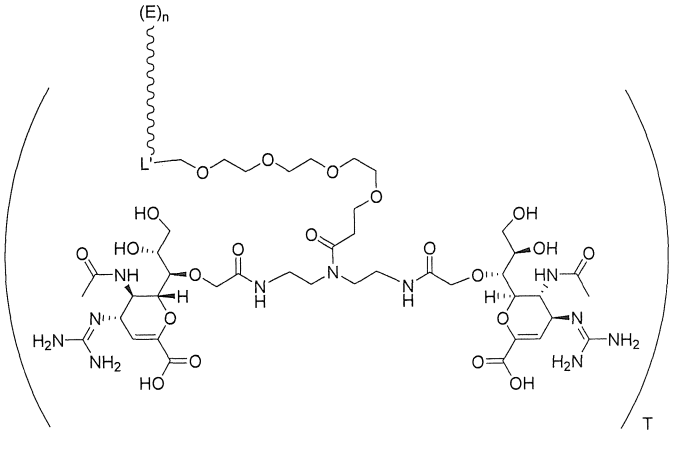
Int-42	(D-I)	
Int-43	(D-I)	
Int-44	(D-I)	
Int-45	(D-I)	

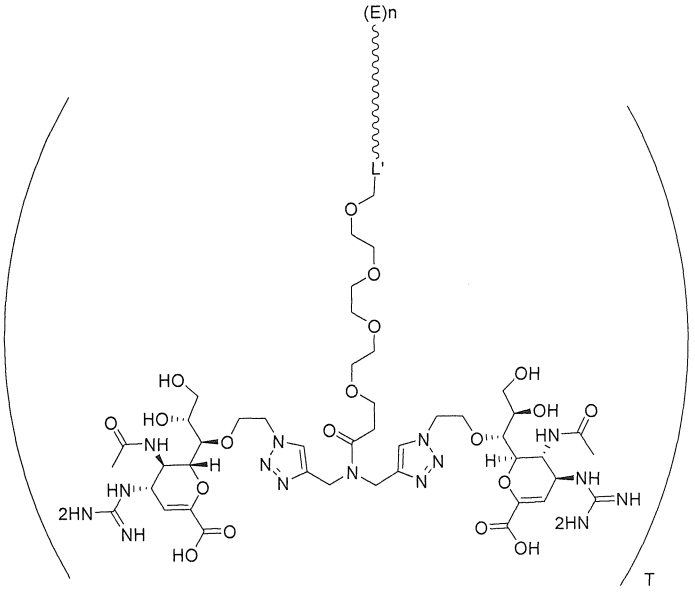
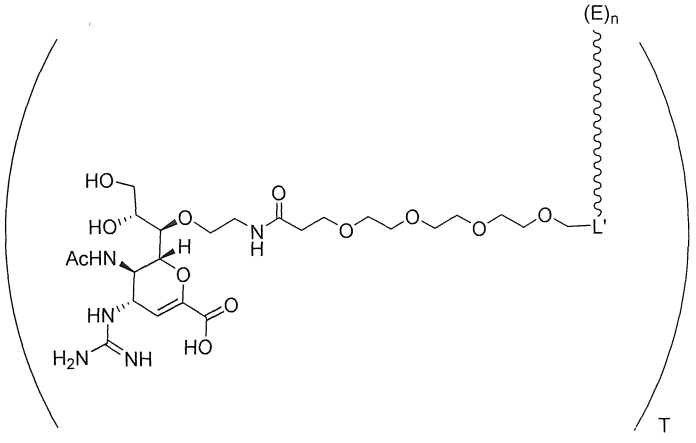
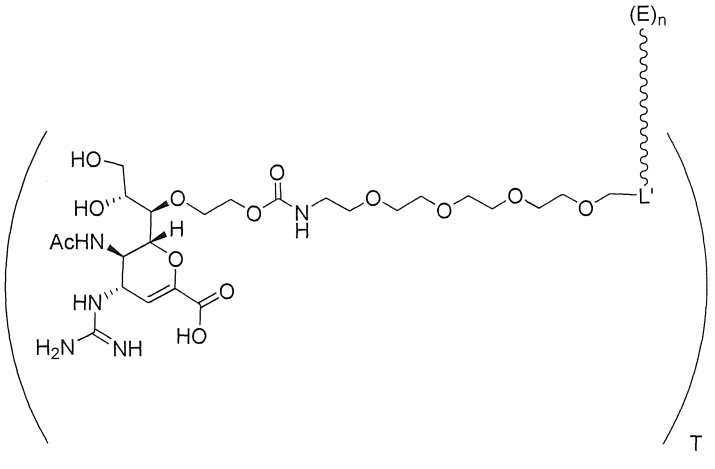
Int-46	(D-I)	
Int-47	(D-I)	
Int-48	(D-I)	
Int-49	(D-I)	

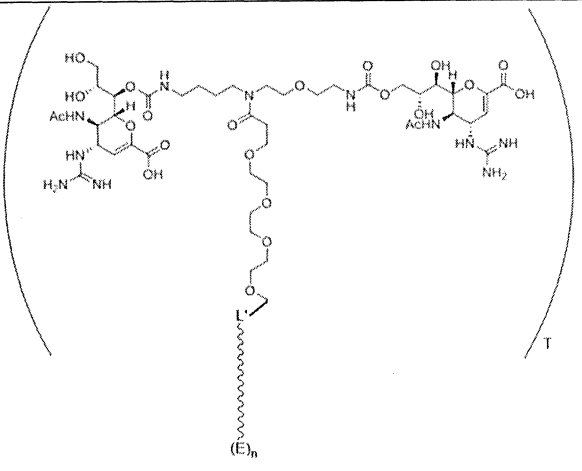
Int-50	(D-I)	
Int-52	(D-I)	
Int-53	(D-I)	

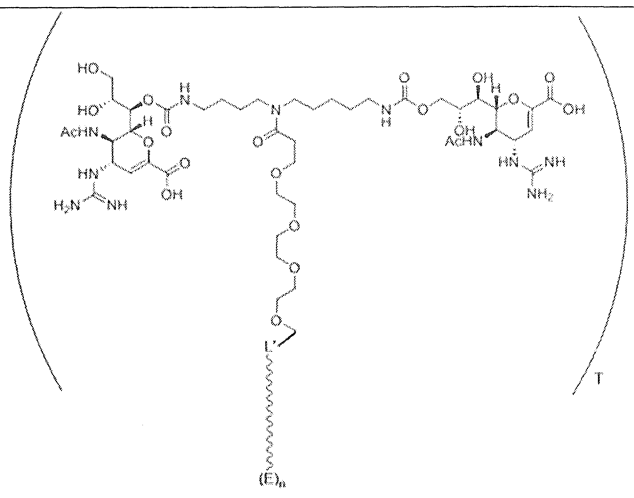
Int-54	(D-I)	
Int-55	(D-I)	
Int-57	(D-I)	

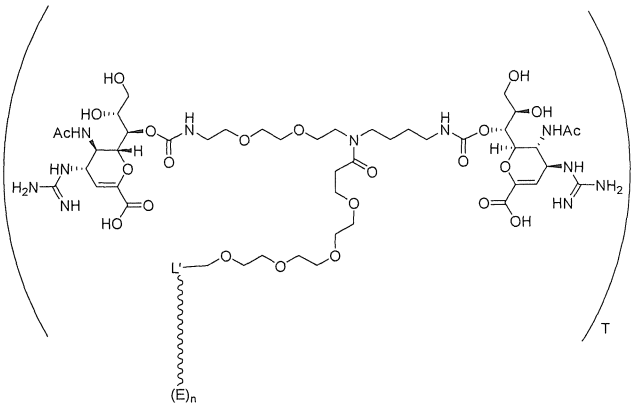
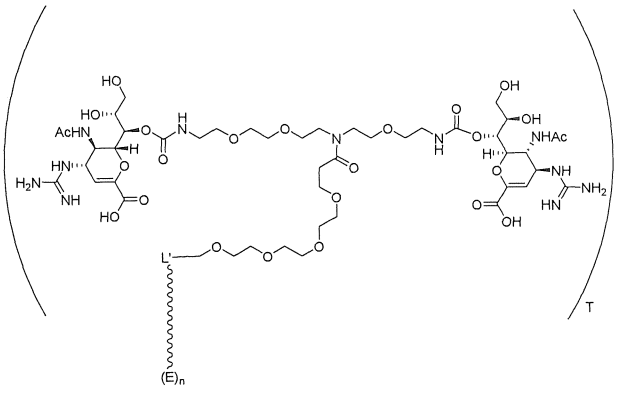
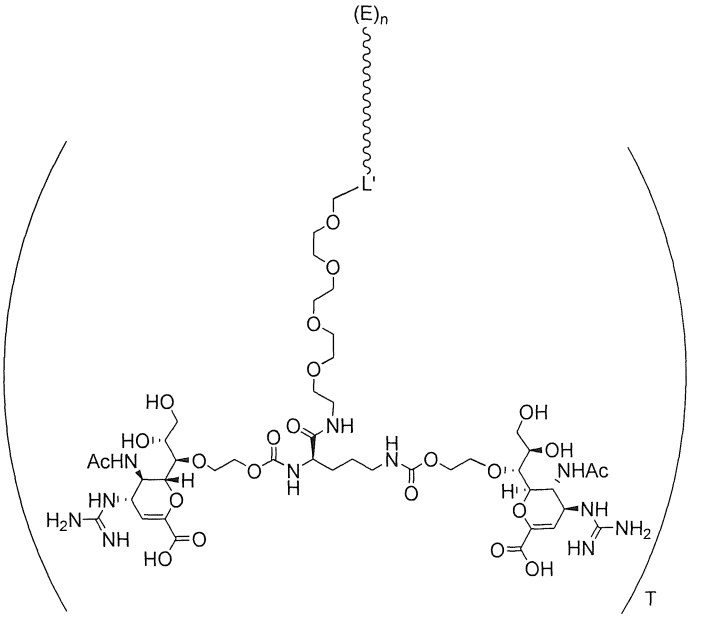
Int-58	(D-I)	
Int-59	(D-I)	
Int-60	(D-I)	

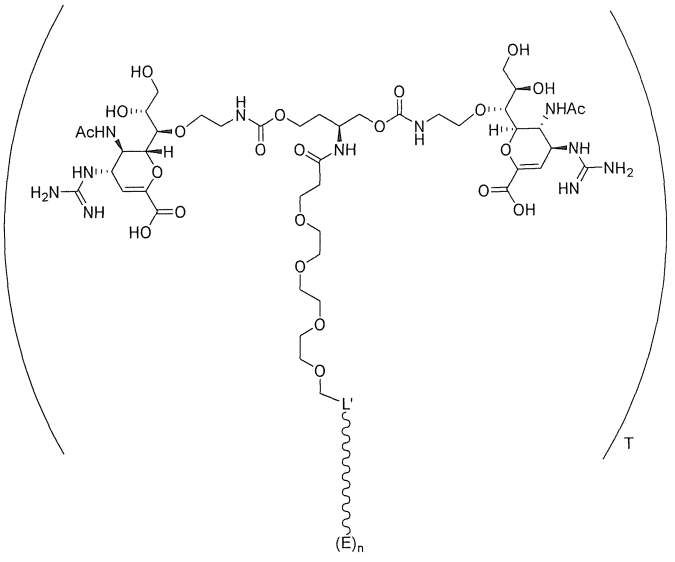
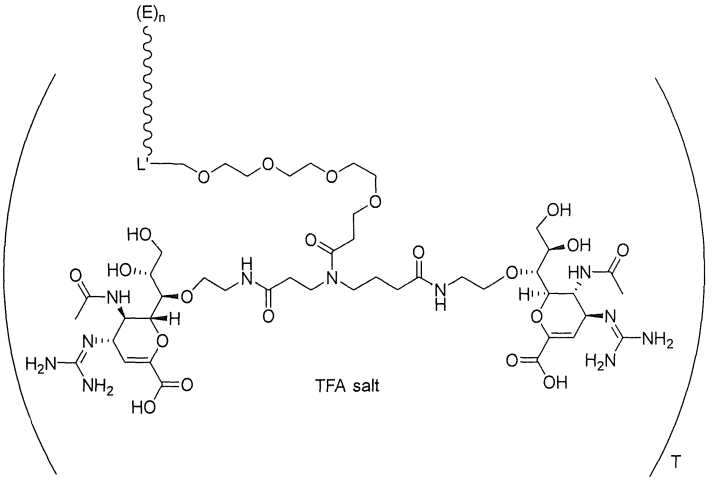
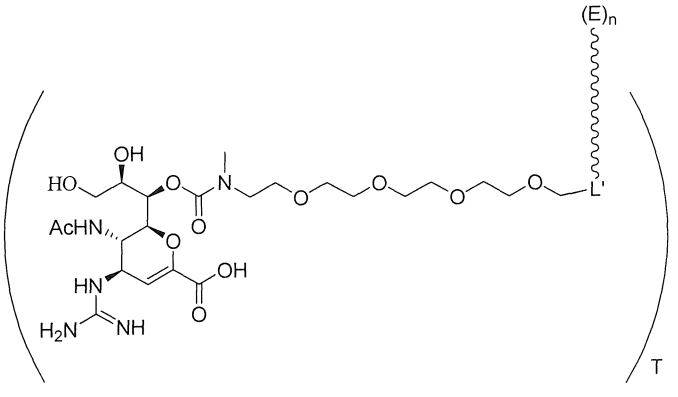
Int-61	(D-I)	
Int-62	(D-I)	
Int-63	(D-I)	
Int-64	(D-I)	

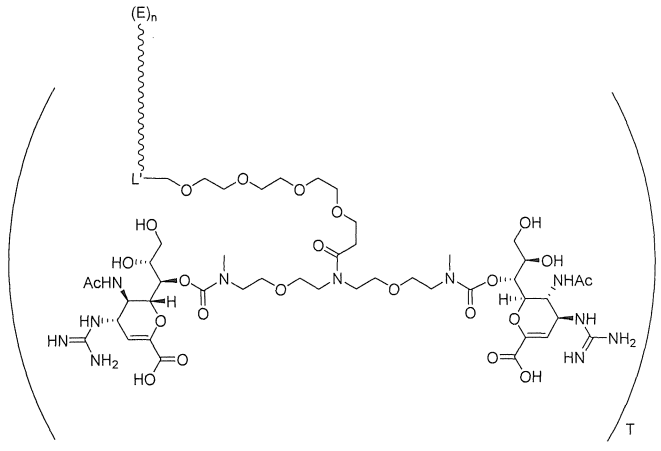
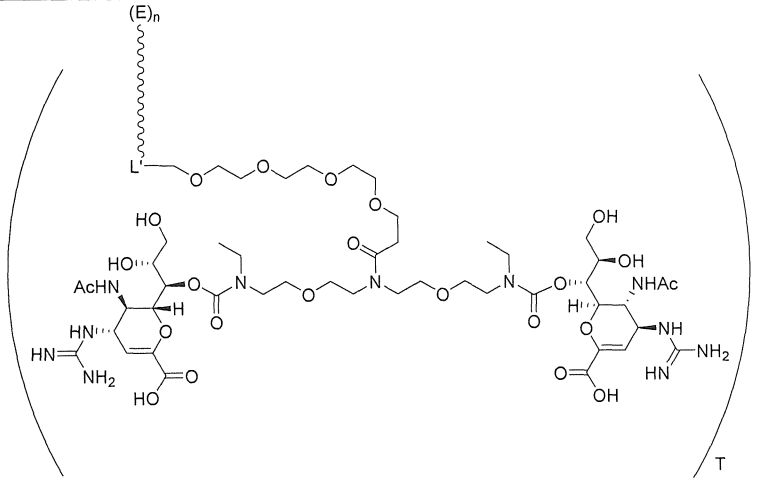
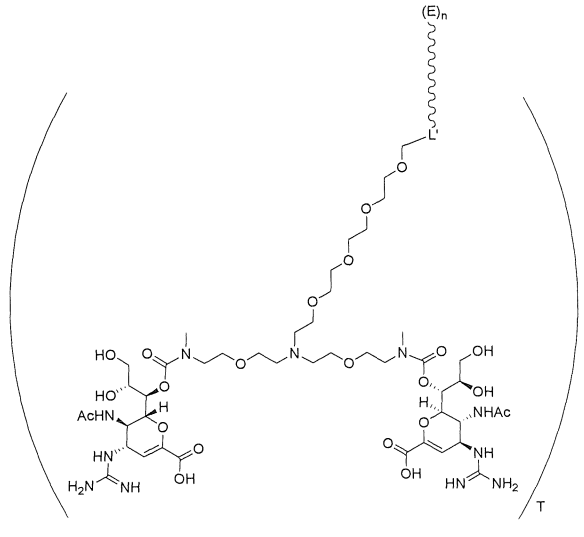
Int-65	(D-I)	
Int-67	(D-I)	
Int-68	(D-I)	

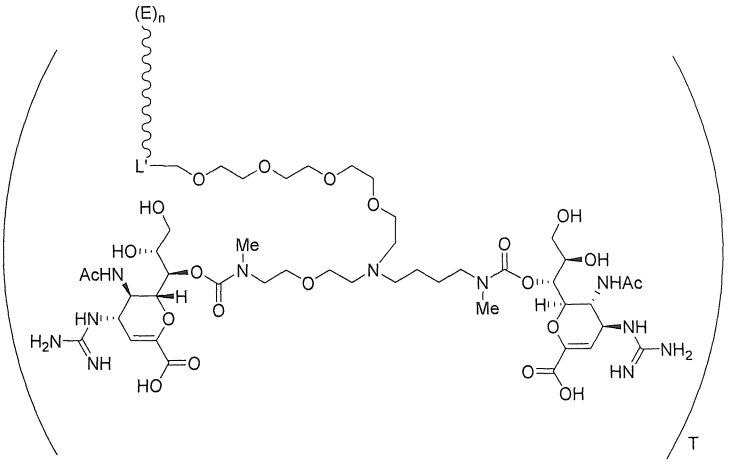
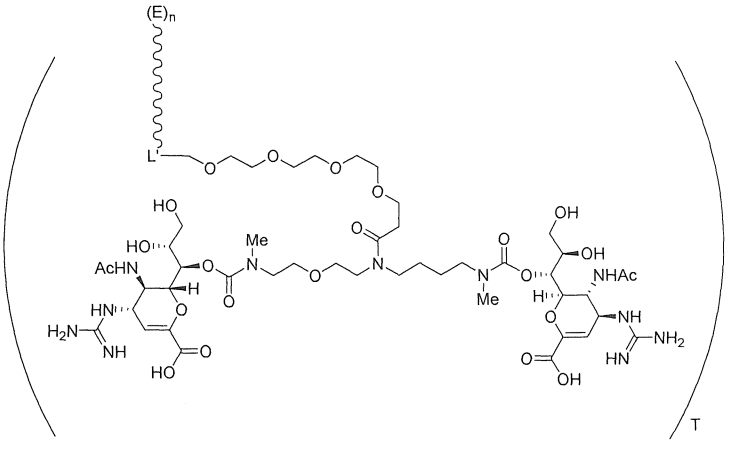
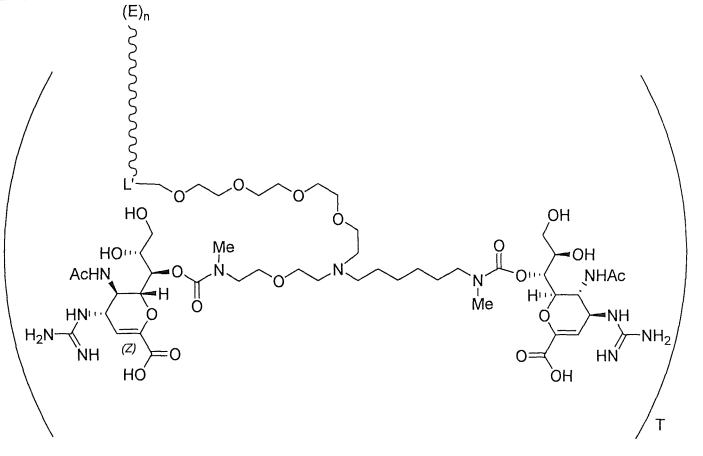
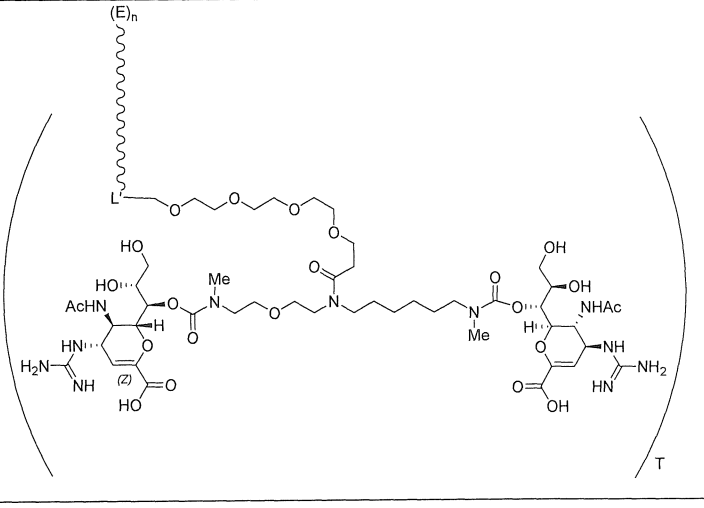
Int-69	(D-I)	
Int-70	(D-I)	
Int-71	(D-I)	

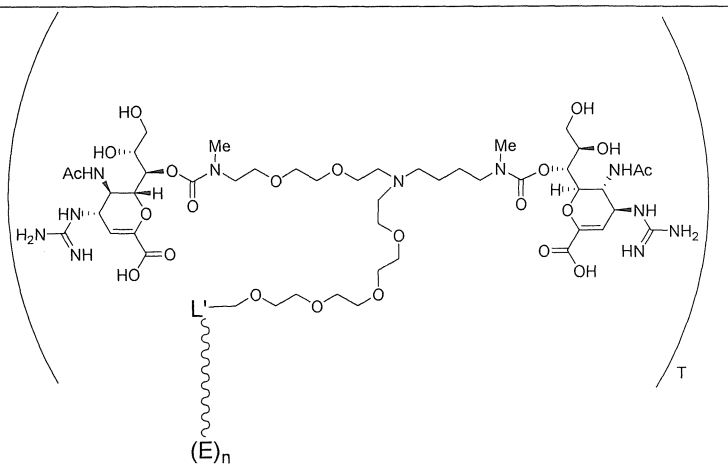
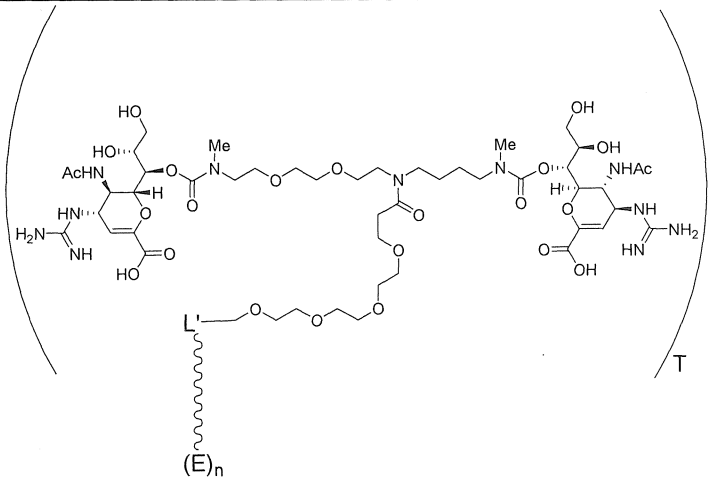
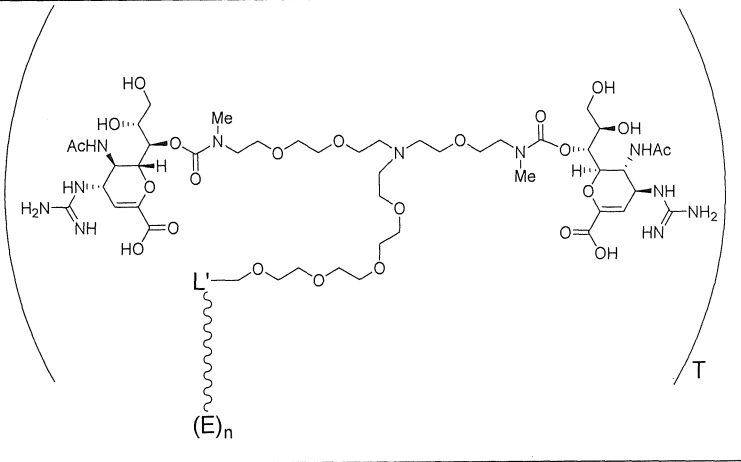
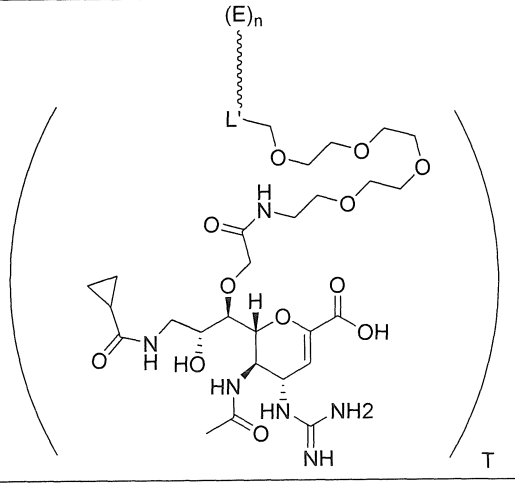
Int-72	(D-I)	
Int-73	(D-I)	
Int-74	(D-I)	

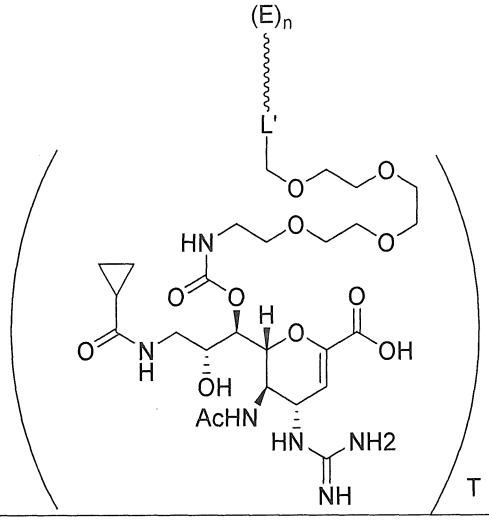
Int-75	(D-I)	
Int-76	(D-I)	
Int-77	(D-I)	

Int-78	(D-I)	
Int-79	(D-I)	
Int-80	(D-I)	

Int-81	(D-I)	
Int-82	(D-I)	
Int-83	(D-I)	

Int-84	(D-I)	
Int-85	(D-I)	
Int-86	(D-I)	
Int-87	(D-I)	

Int-88	(D-I)	
Int-89	(D-I)	
Int-90	(D-I)	
Int-91	(M-I)	

Int-92	(M-I)	

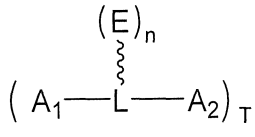
Theo một số phương án, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67 hoặc SEQ ID NO: 68. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67 hoặc SEQ ID NO: 68. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72 hoặc SEQ ID NO: 73. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72 hoặc SEQ ID NO: 73. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76 hoặc SEQ ID NO: 77. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76 hoặc SEQ ID NO: 77. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81 hoặc SEQ ID NO: 82. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81 hoặc SEQ ID NO: 82. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 86. Theo các phương án khác, mỗi E bao gồm monome miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 86.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp bao gồm (i) gốc thứ nhất, A_1; (ii) gốc thứ hai, A_2; (iii) monome miền Fc hoặc miền Fc; và (iv) yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với A_1 và A_2, và với monome miền Fc hoặc miền Fc; trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I). Theo phương án được ưu tiên nêu trên, x là 2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp bao gồm (i) gốc thứ nhất, Int; (ii) monome miền Fc hoặc miền Fc; và (iv) yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với Int, và với monome miền Fc hoặc miền Fc; trong đó mỗi Int được chọn độc lập từ chất trung gian bất kỳ trong số các chất trung gian của Bảng 1a.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp bao gồm (i) gốc thứ nhất, A_1; (ii) gốc thứ hai, A_2; (iii) protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; và (iv) yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với A_1 và A_2, và với protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I). Theo phương án được ưu tiên nêu trên, x là 2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I):

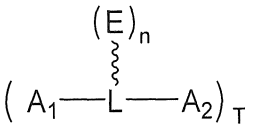


(D-I)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E, A_1, và A_2, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 và A_2 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

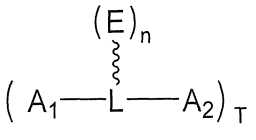
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I):



(D-I)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E, A_1, và A_2, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I):

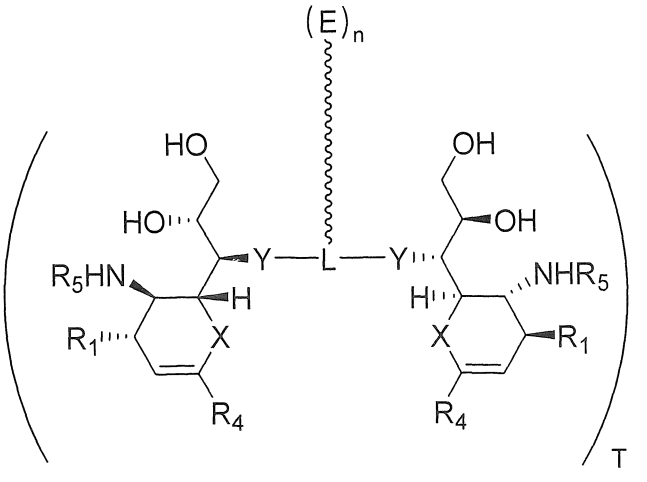


(D-I)

trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-

141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E, A_1, và A_2, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây).

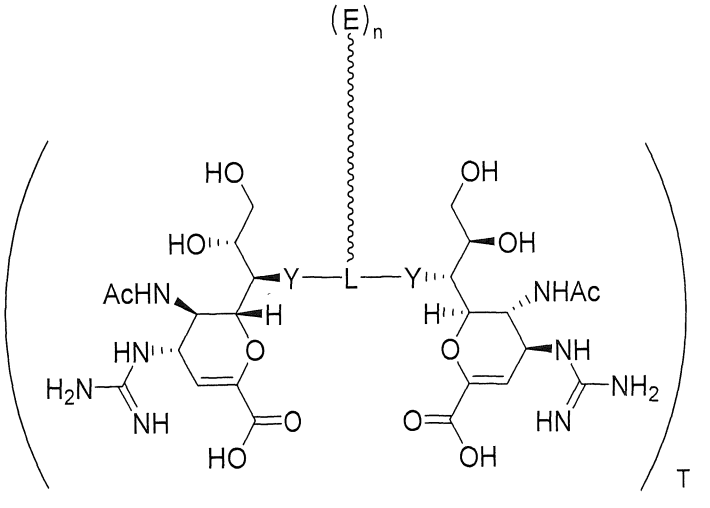
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II):



(D-II)

hoặc muối dược dụng của nó.

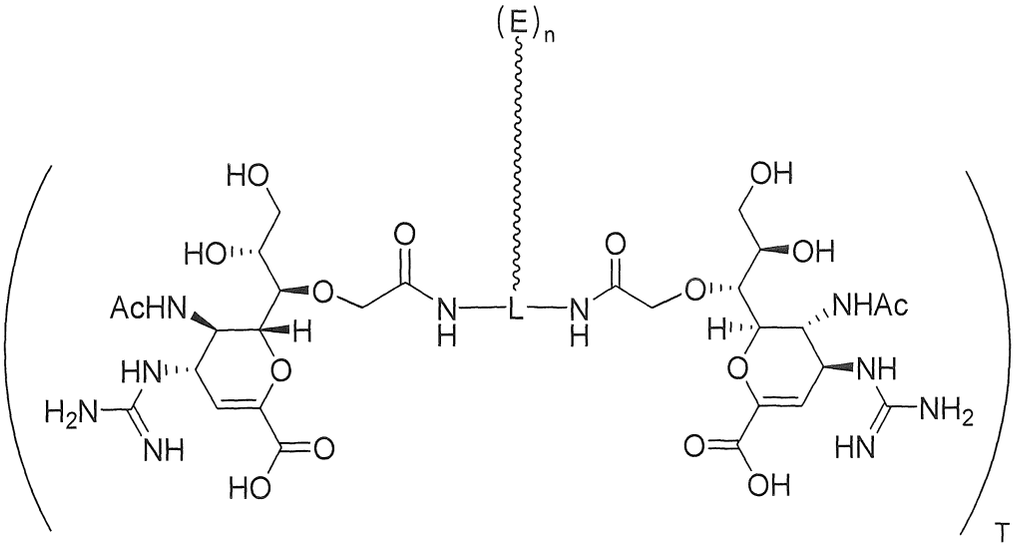
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-1):



(D-II-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

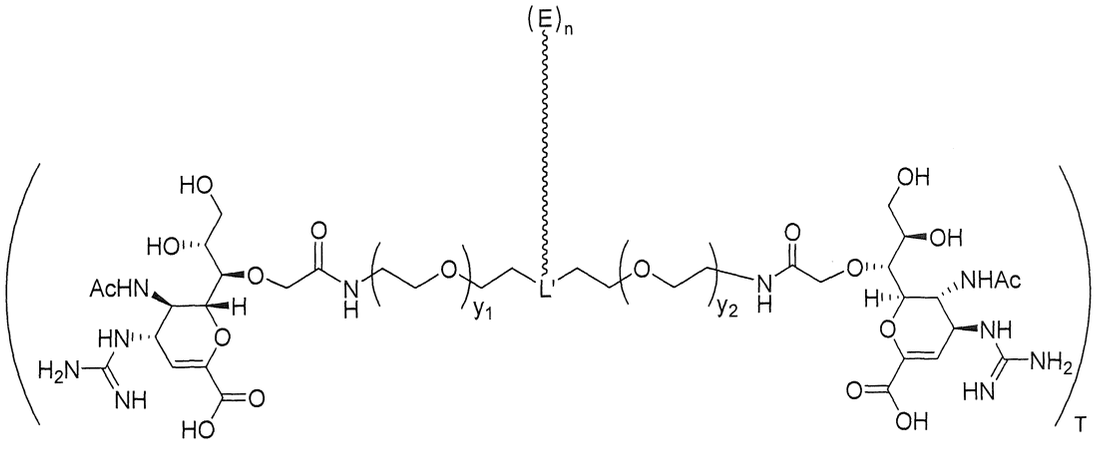
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-2):



(D-II-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

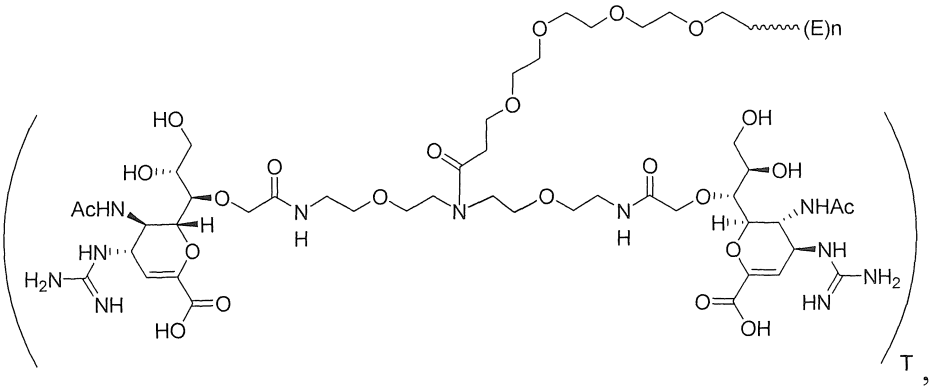
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-3):

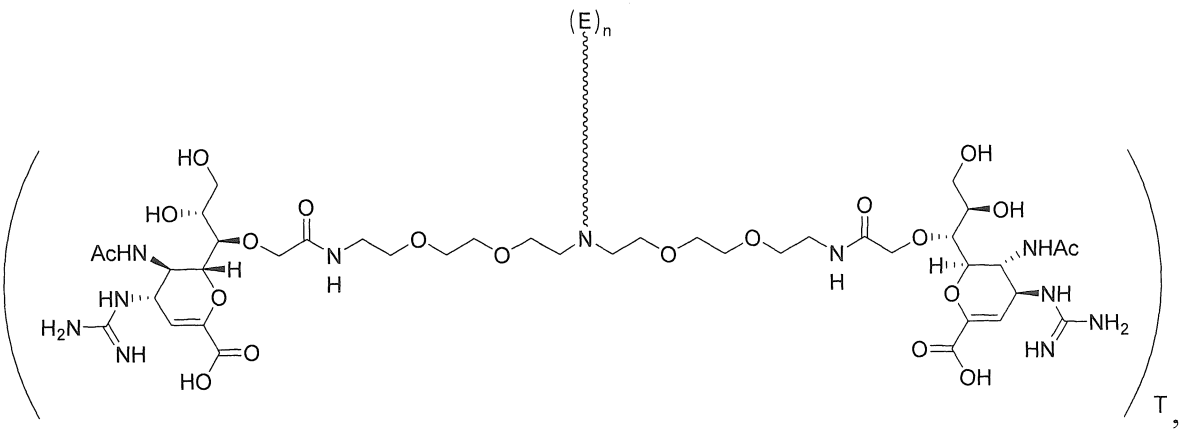


(D-II-3)

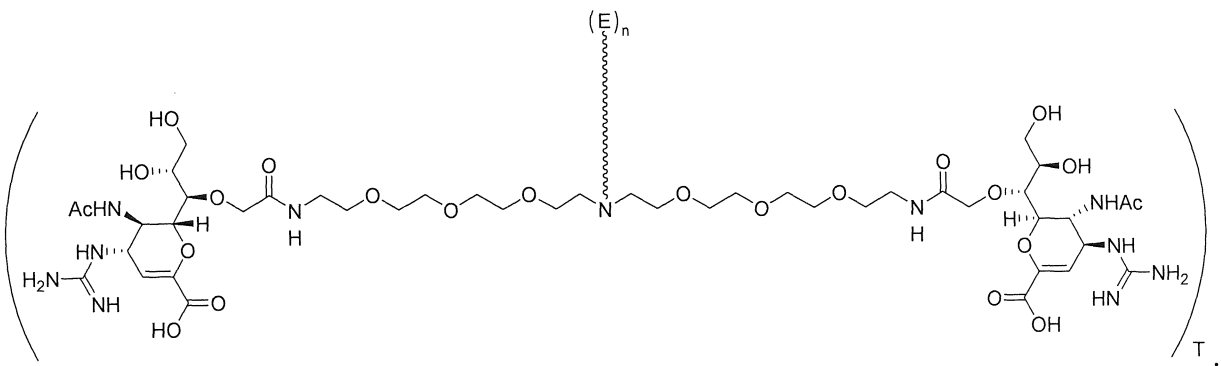
trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc được chọn từ:

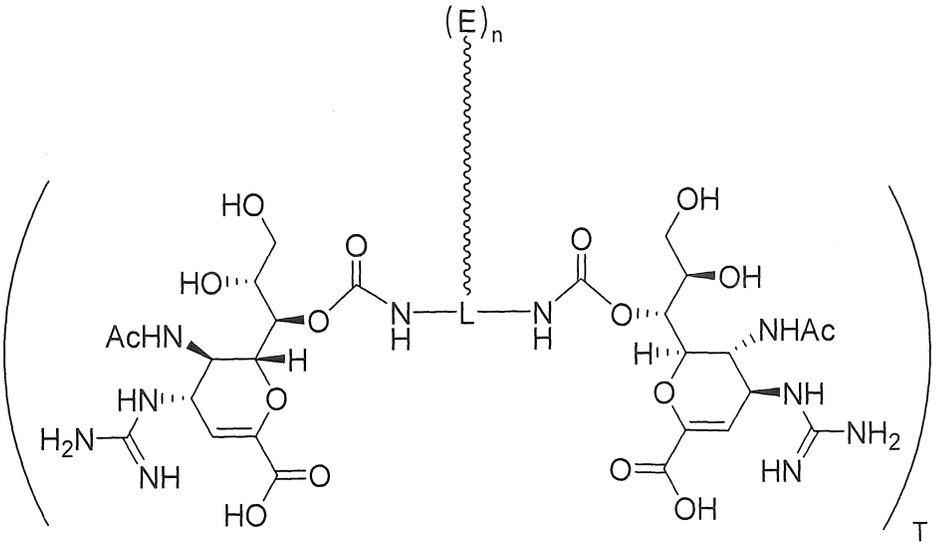




hoặc



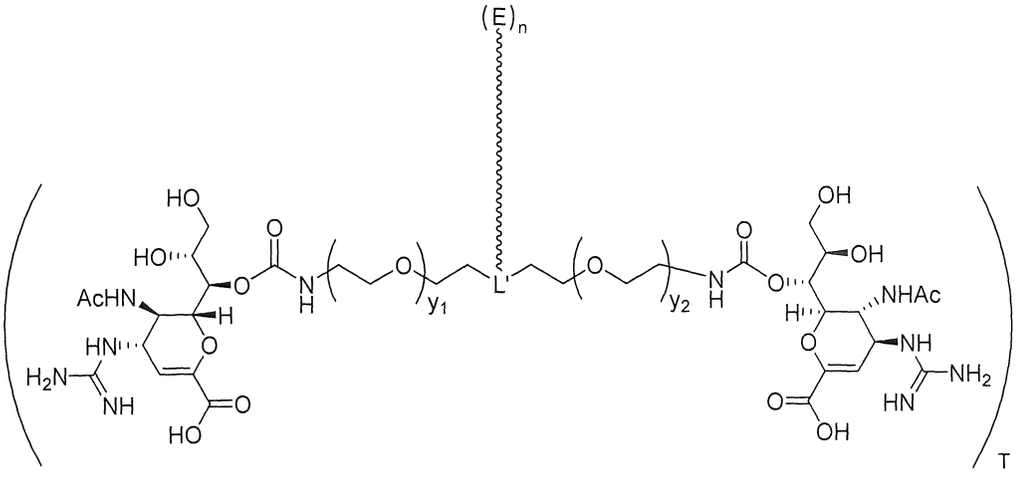
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-4):



(D-II-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

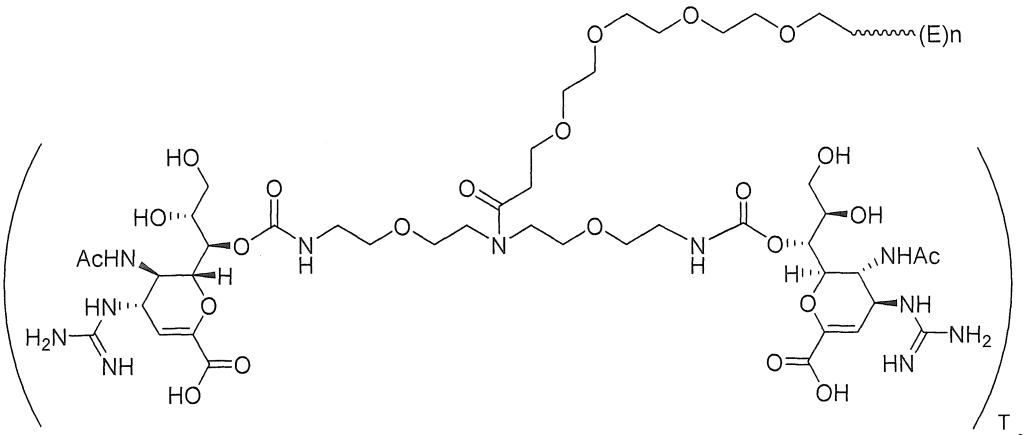
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-5):

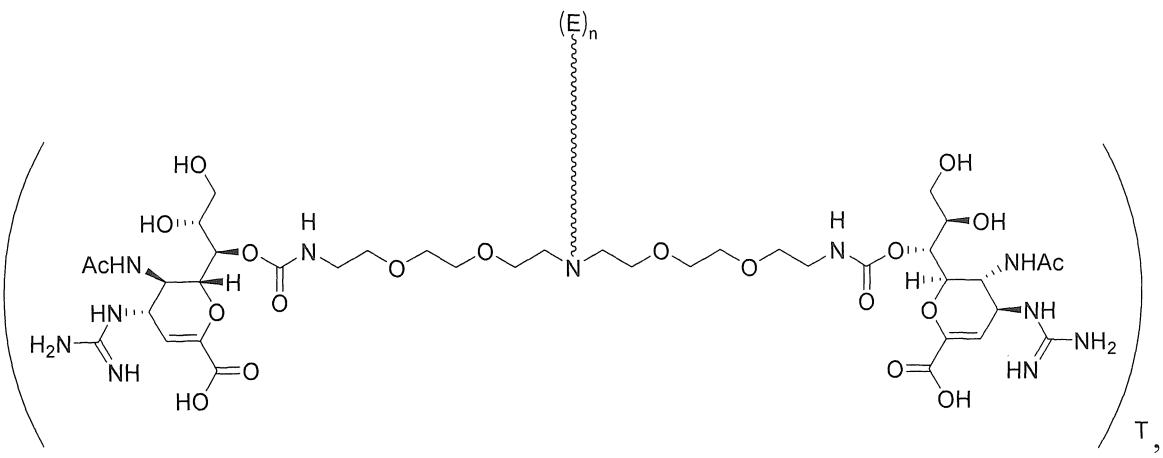


(D-II-5)

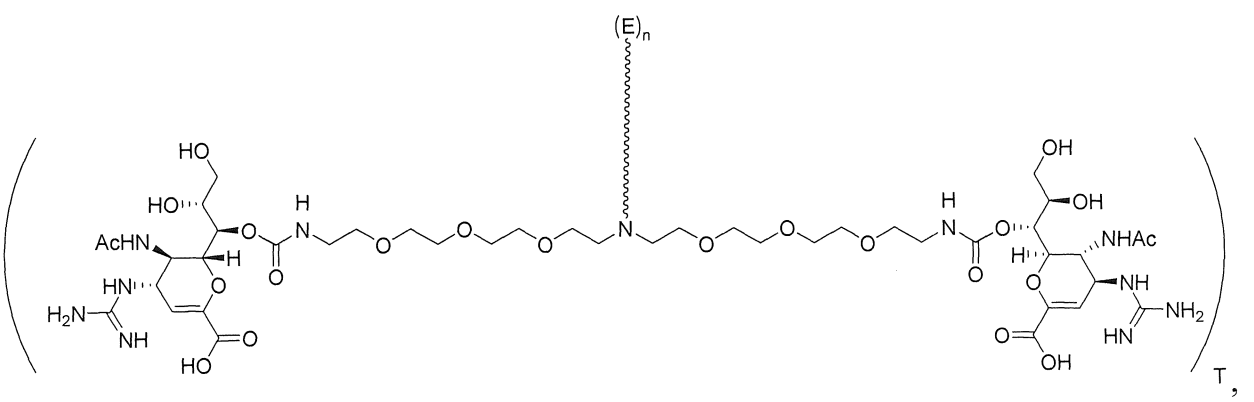
trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc được chọn từ:



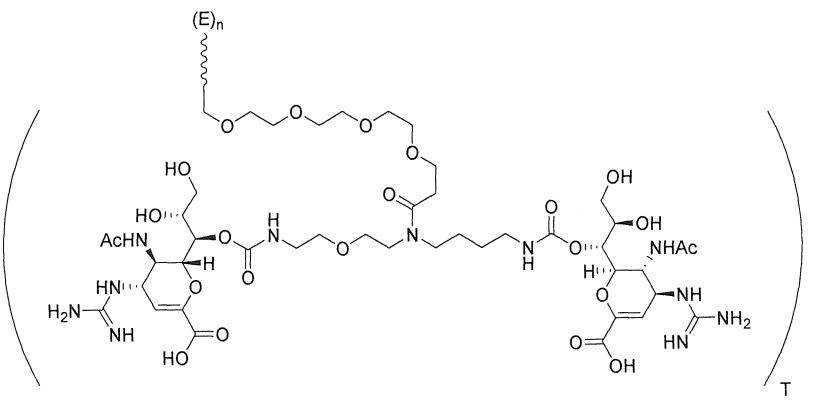


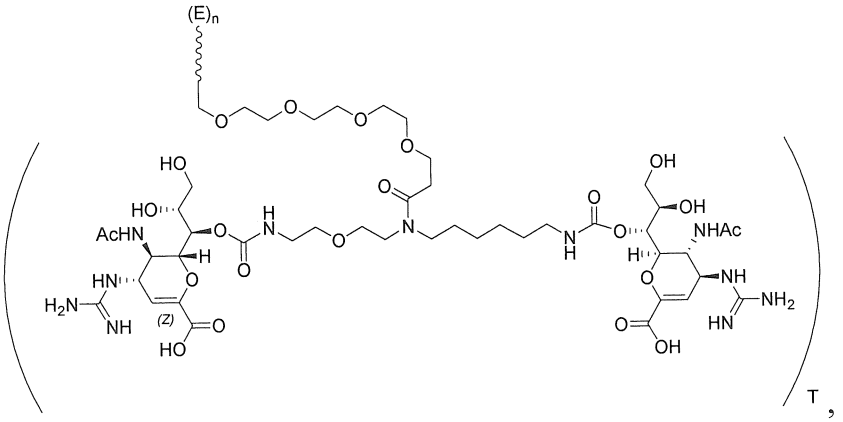
, hoặc

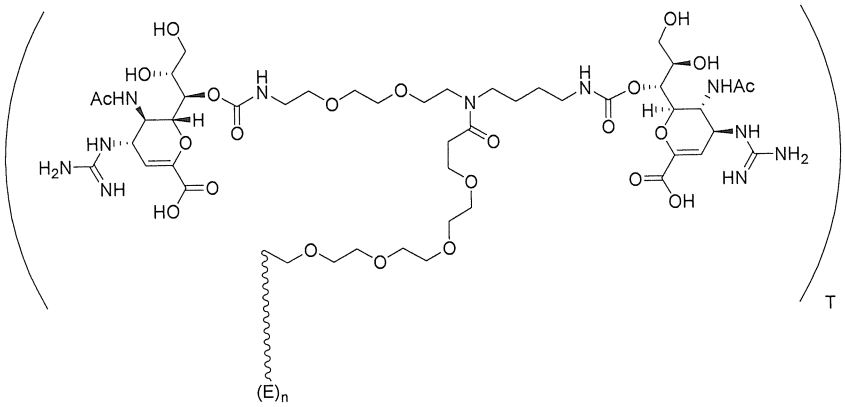


hoặc muối dược dụng của nó.

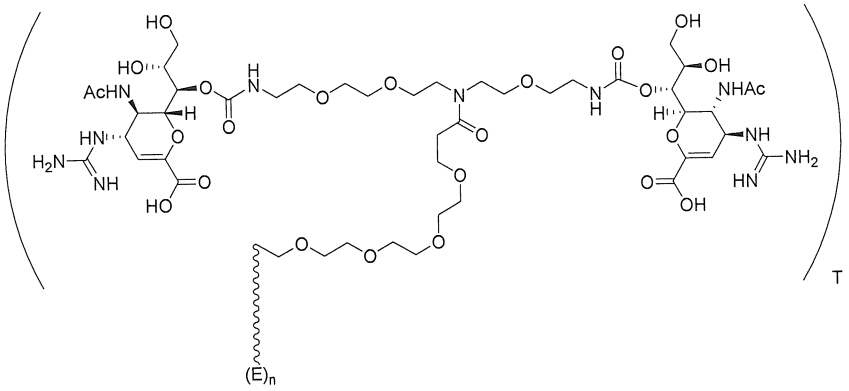
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc được chọn từ:







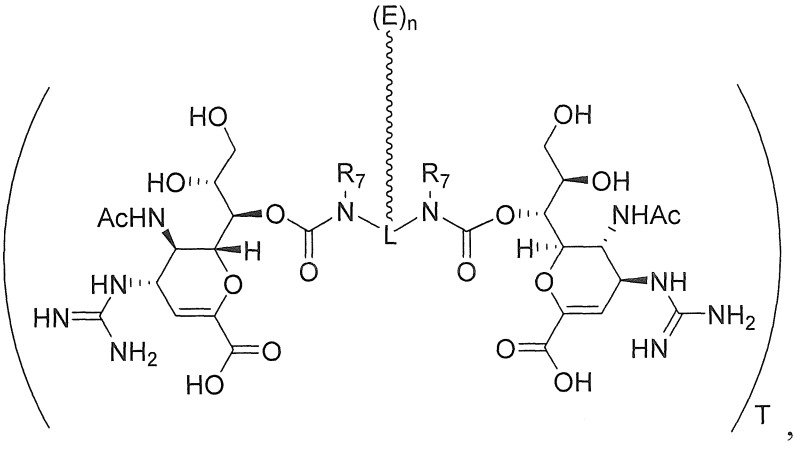
, hoặc



,

hoặc muối dược dụng của nó.

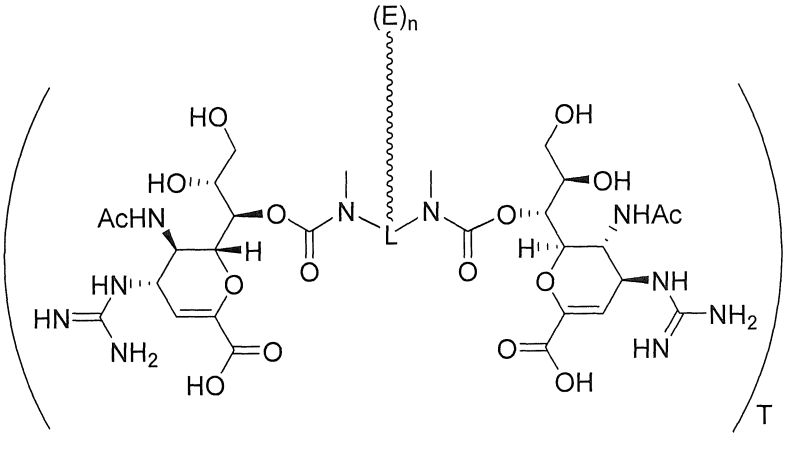
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-6):



(D-II-6)

trong đó R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, R_7 được chọn từ C1-C20 alkyl (ví dụ, metyl, etyl, propyl, hoặc butyl).

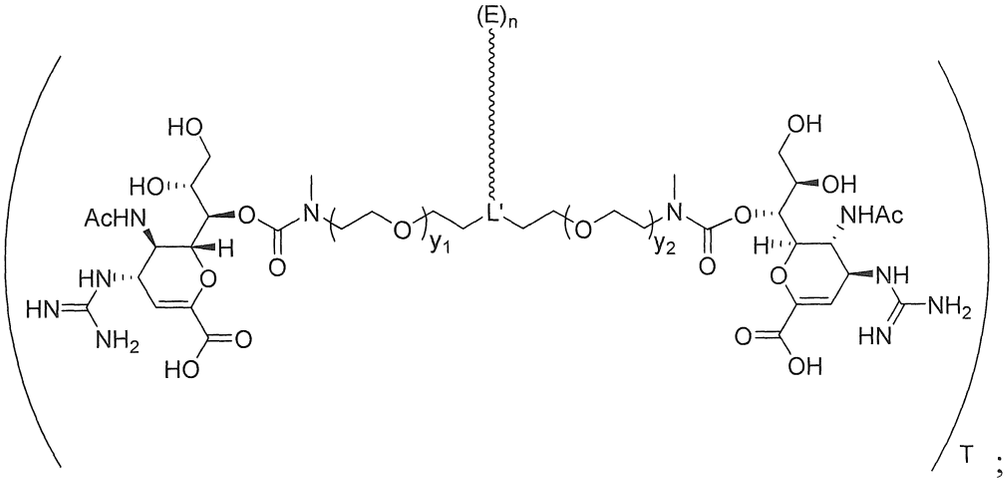
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-7):



(D-II-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

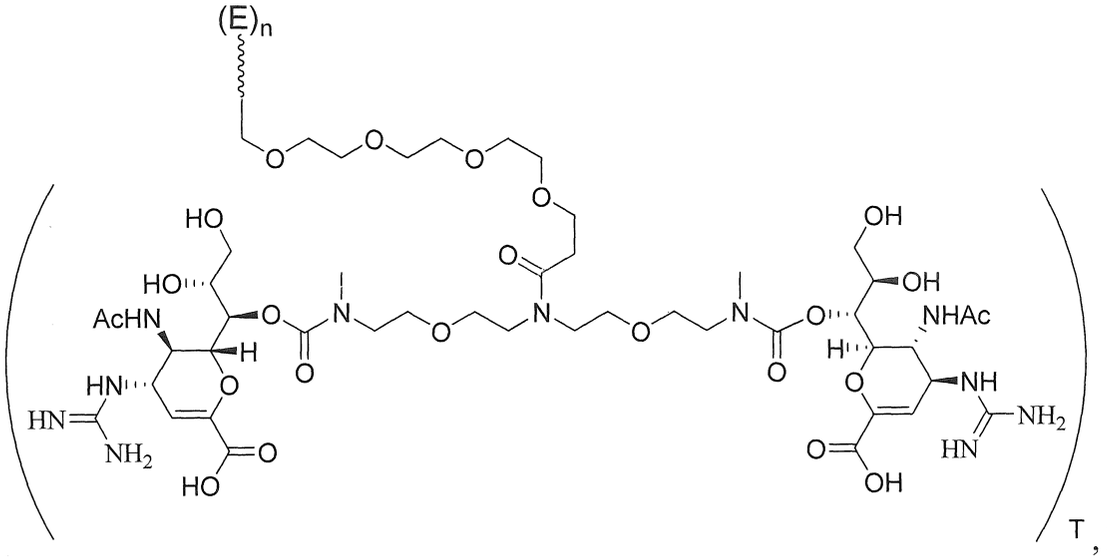
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-8):



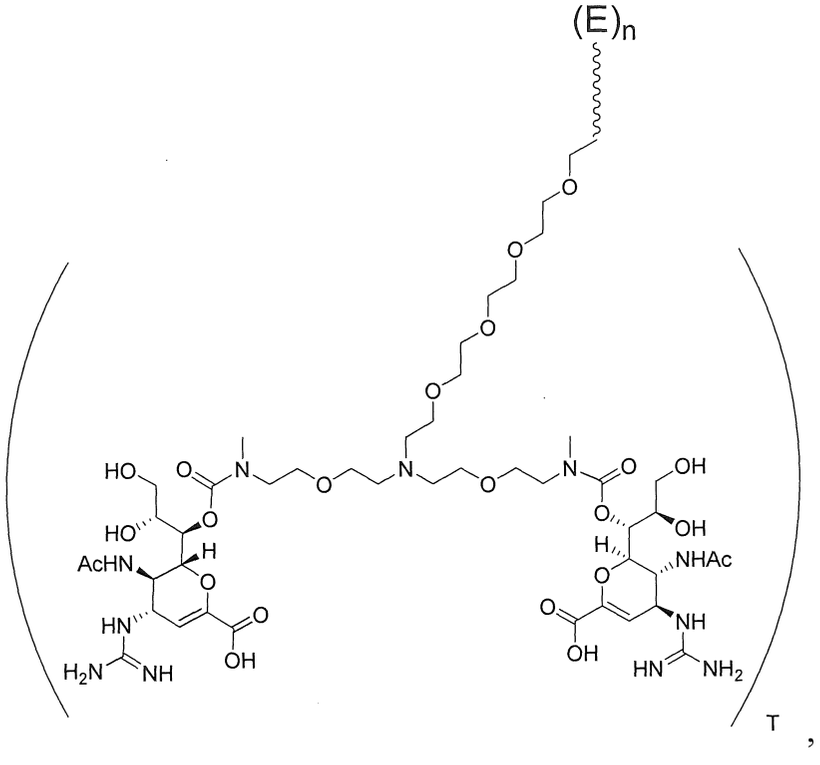
(D-II-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



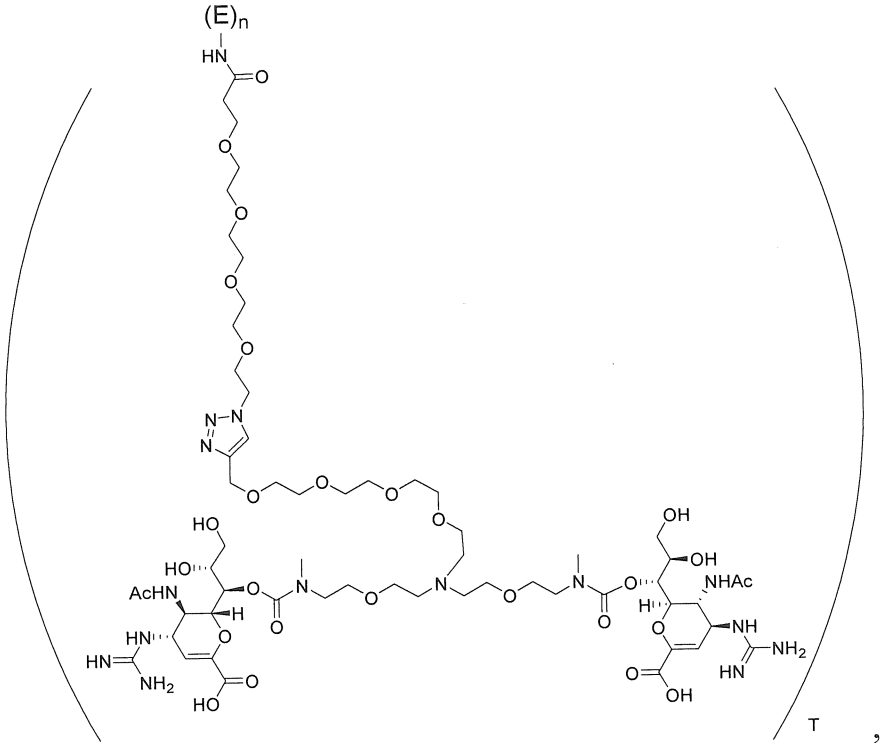
T , hoặc



T ,

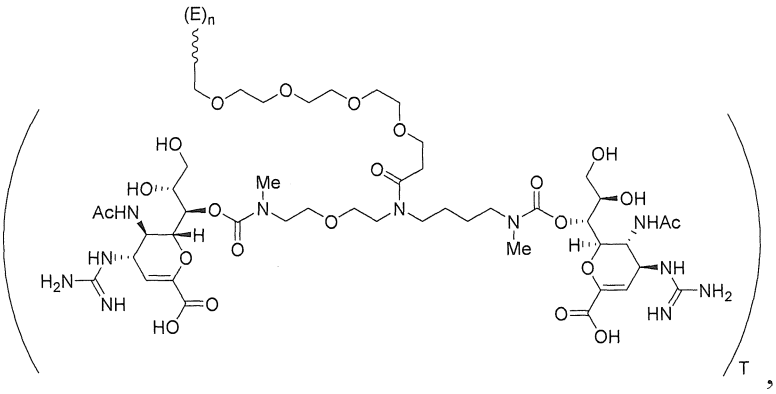
hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:

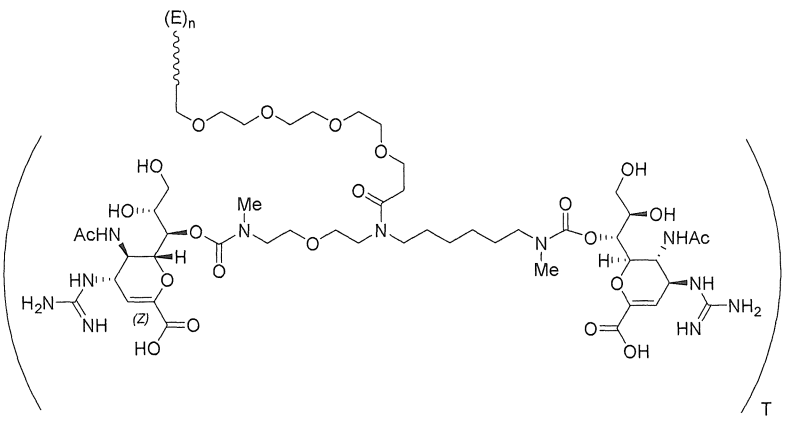


hoặc muối dược dụng của nó.

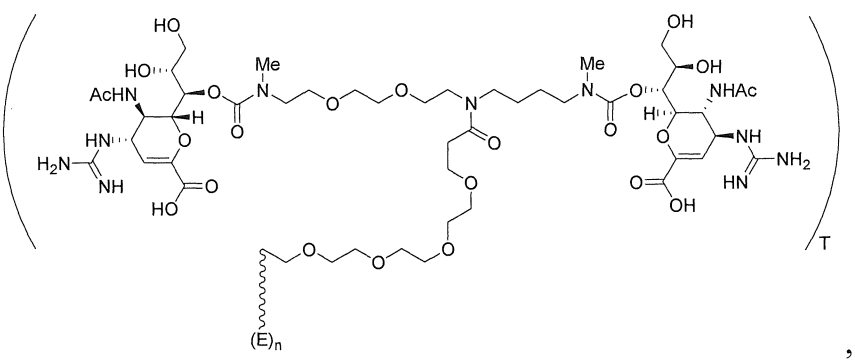
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



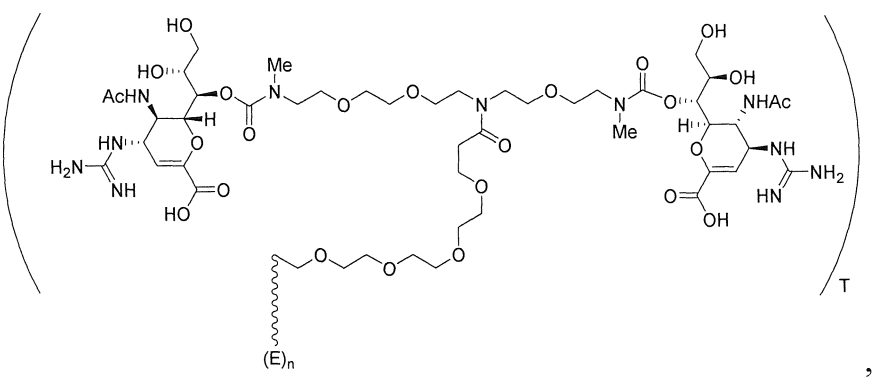
,



,



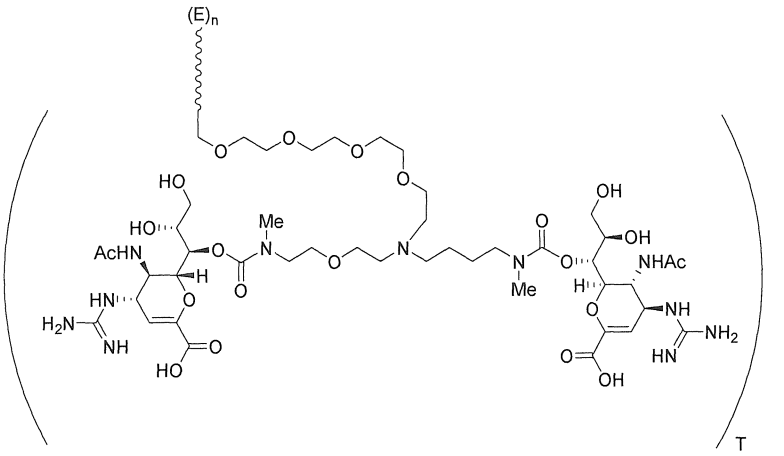
, hoặc



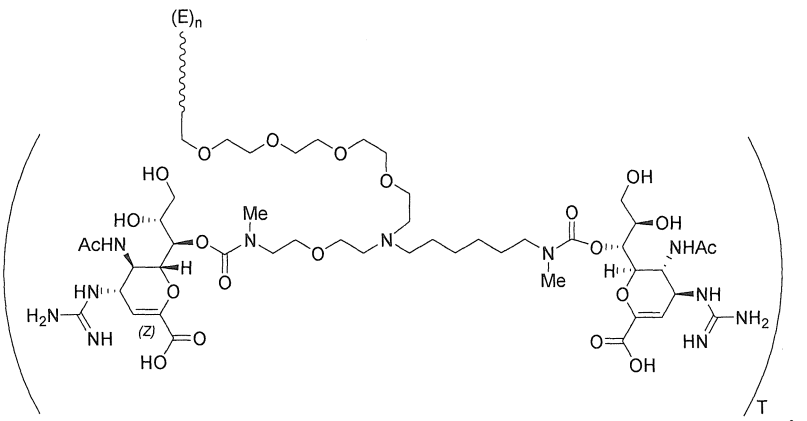
,

hoặc muối dược dụng của nó.

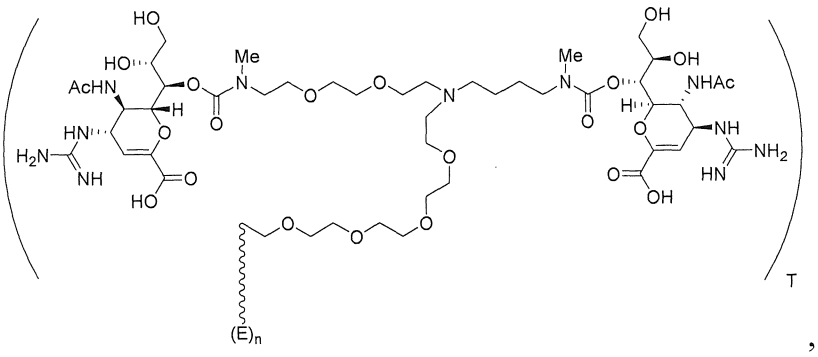
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



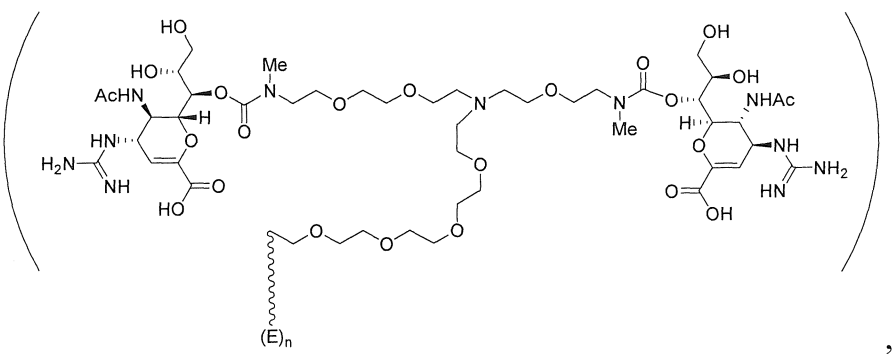
,



,



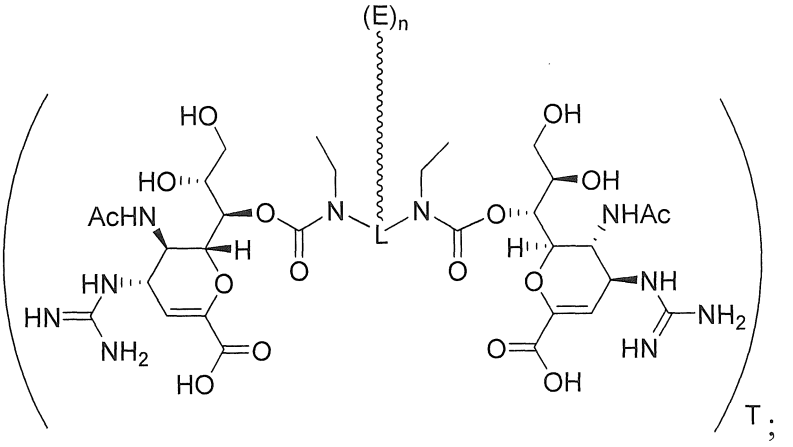
, hoặc



,

hoặc muối dược dụng của nó.

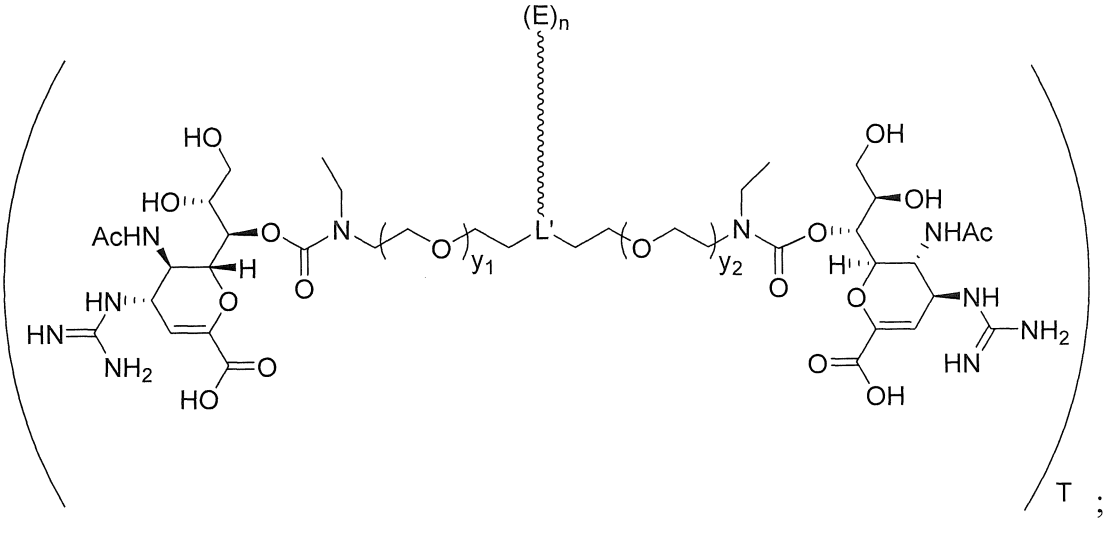
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-9):



(D-II-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

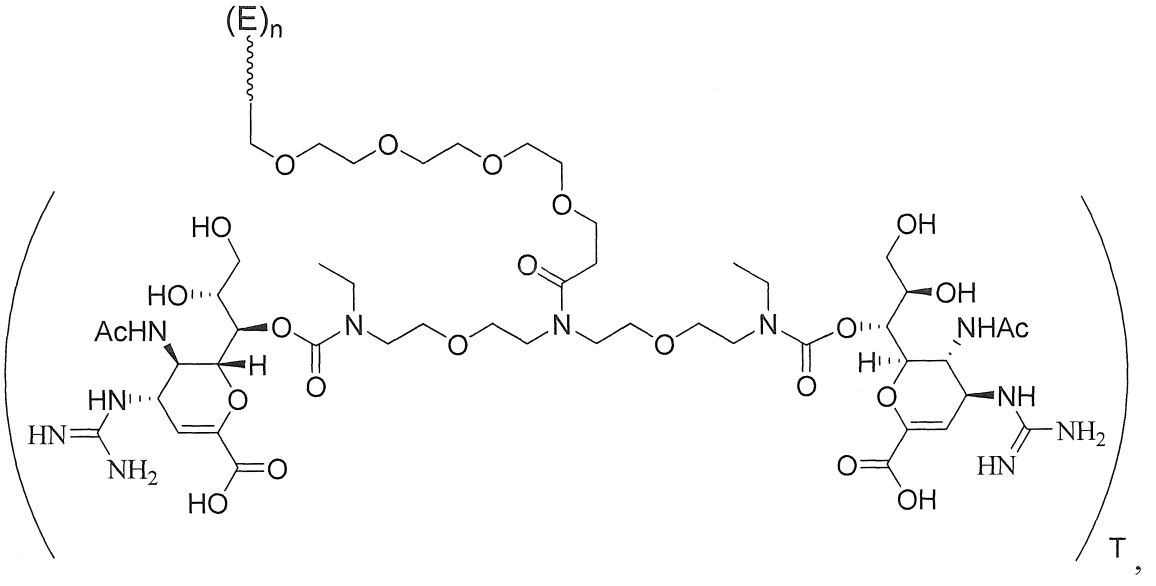
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-10):



(D-II-10)

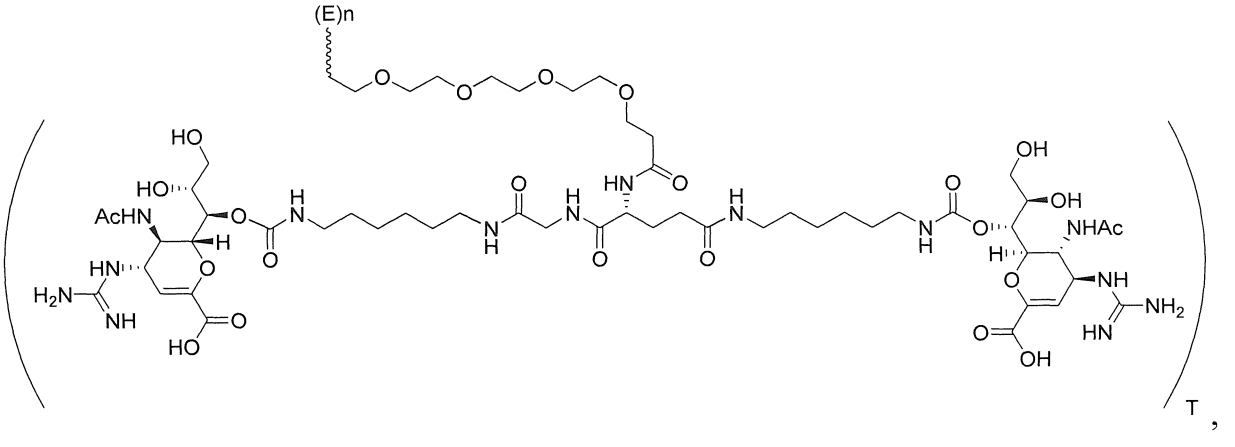
trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



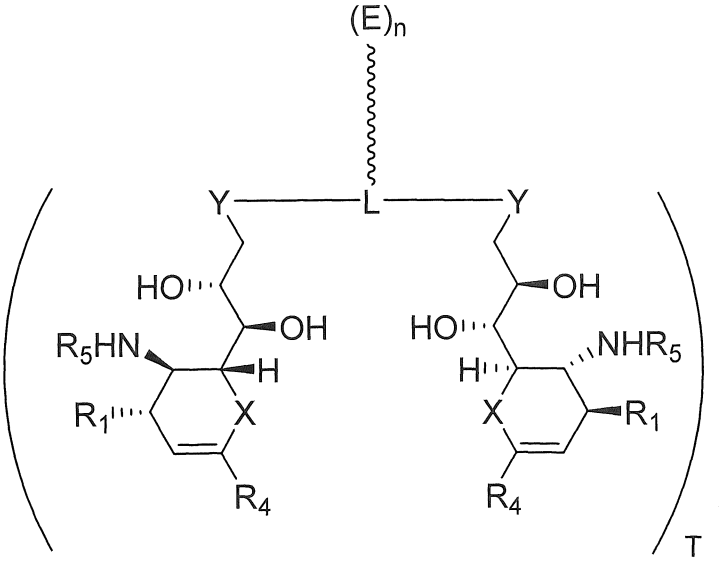
hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

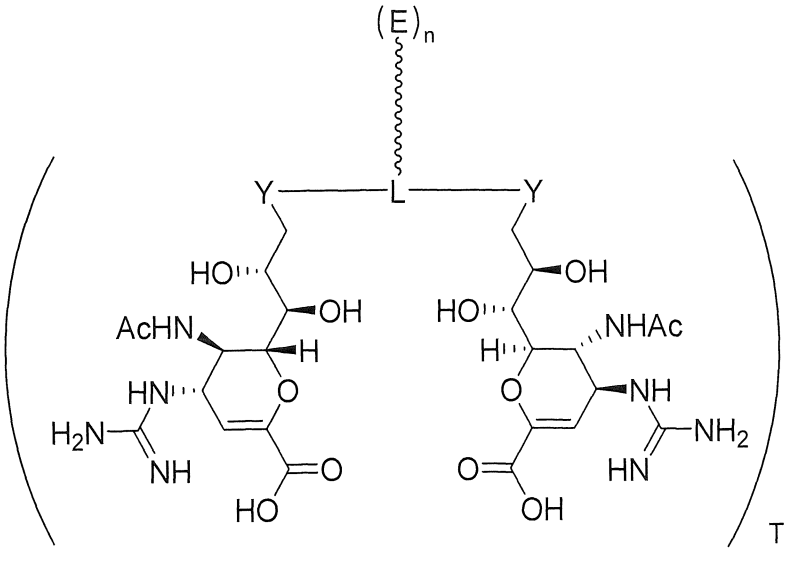
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III):



(D-III)

hoặc muối dược dụng của nó.

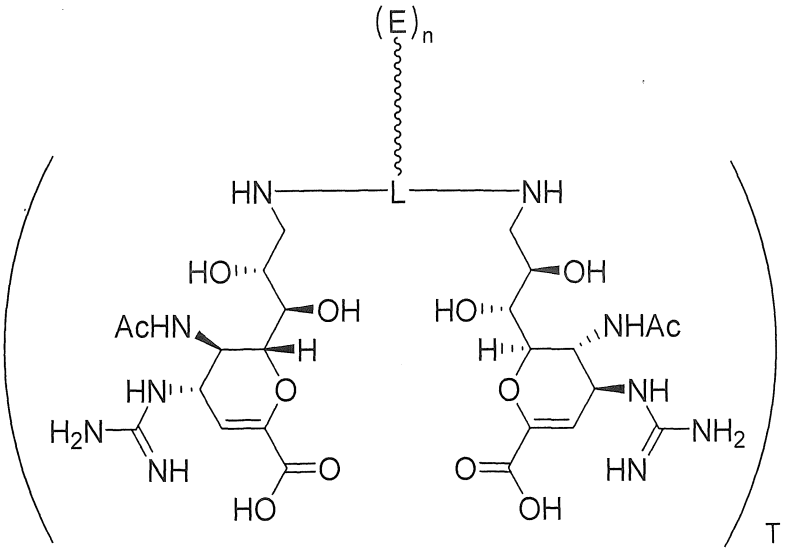
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-1):



(D-III-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

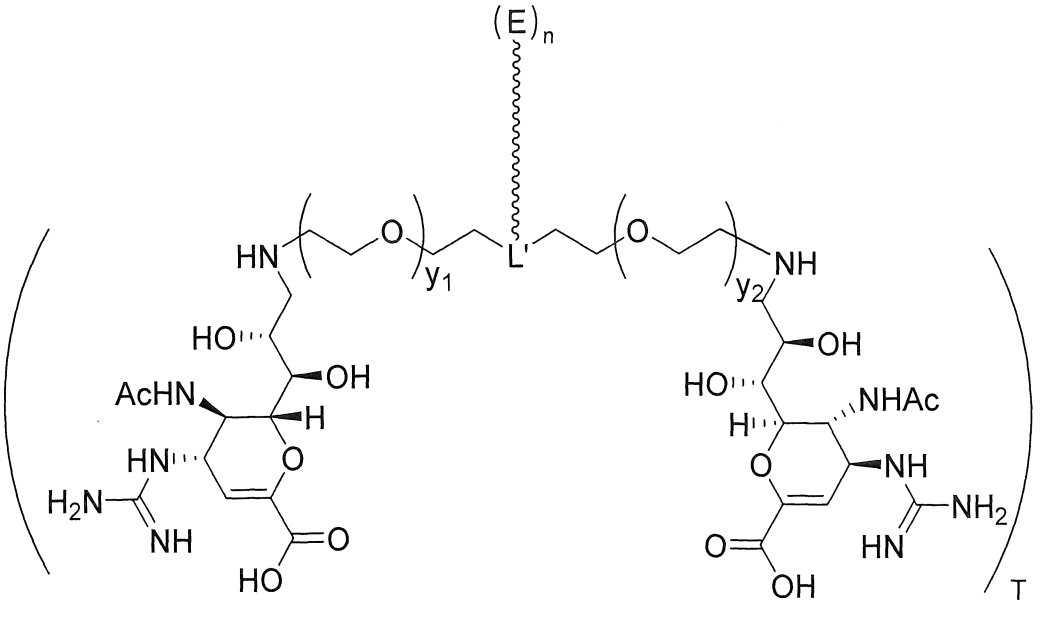
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-2):



(D-III-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

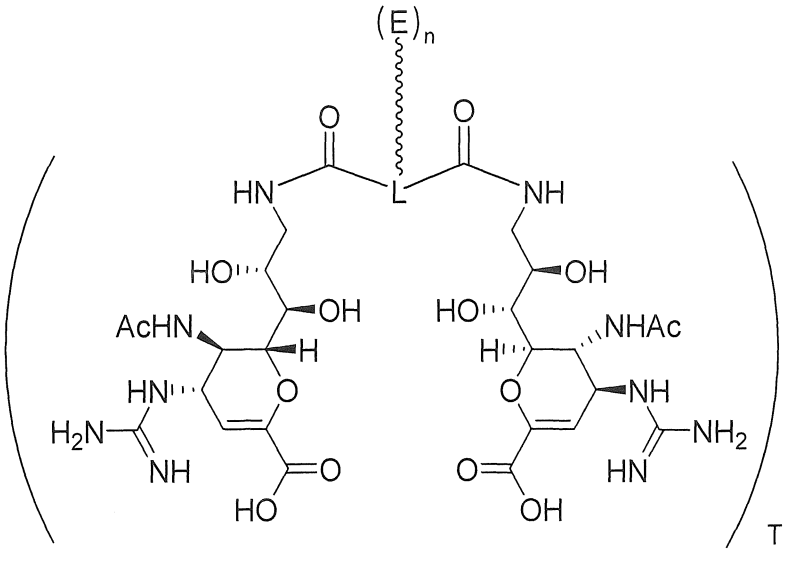
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-3):



(D-III-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

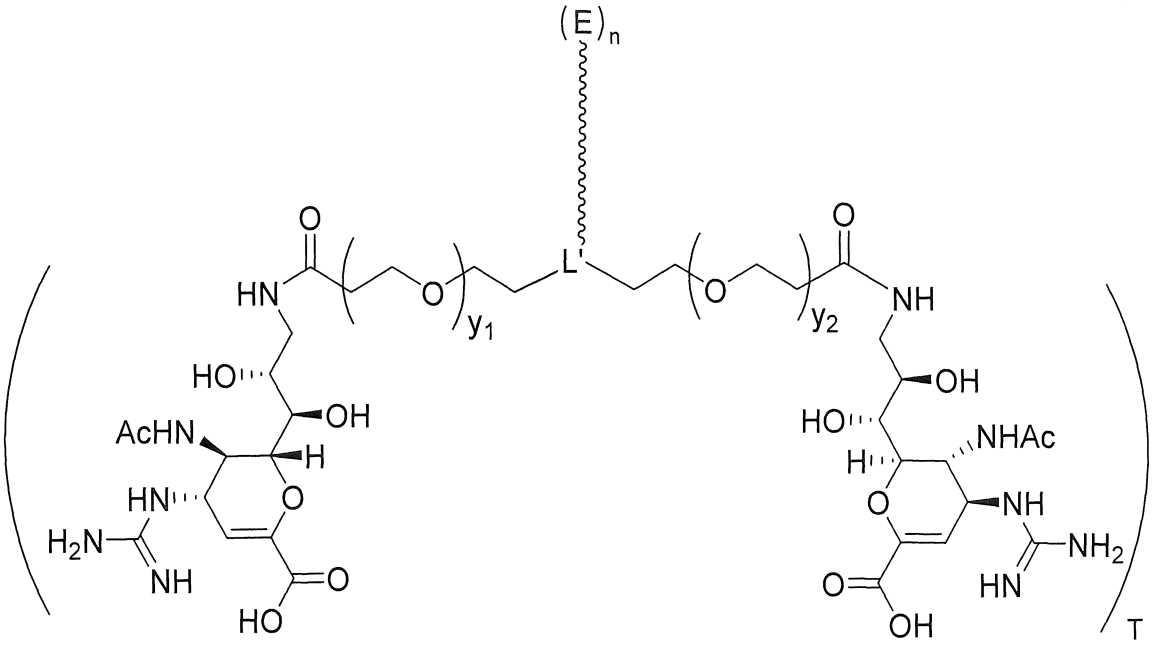
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-4):



(D-III-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

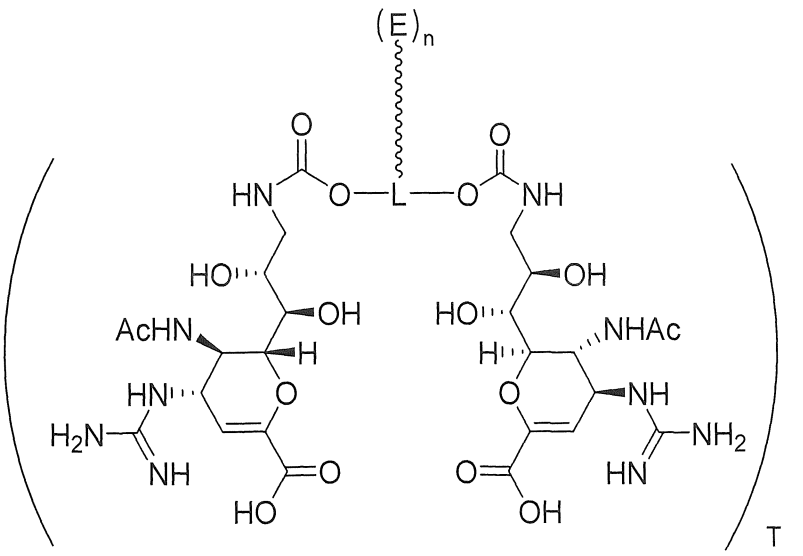
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-5):



(D-III-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

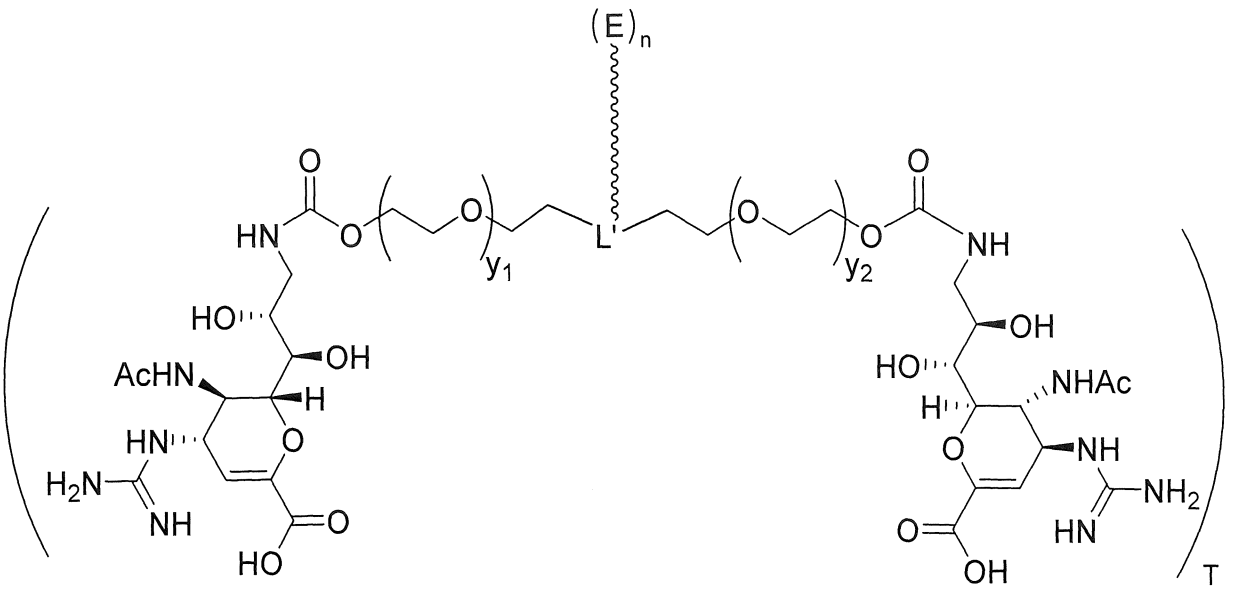
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-6):



(D-III-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

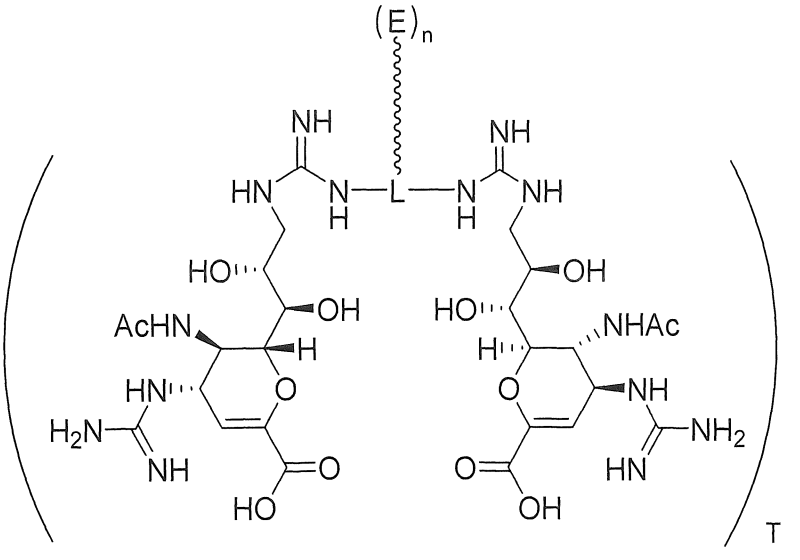
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-7):



(D-III-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

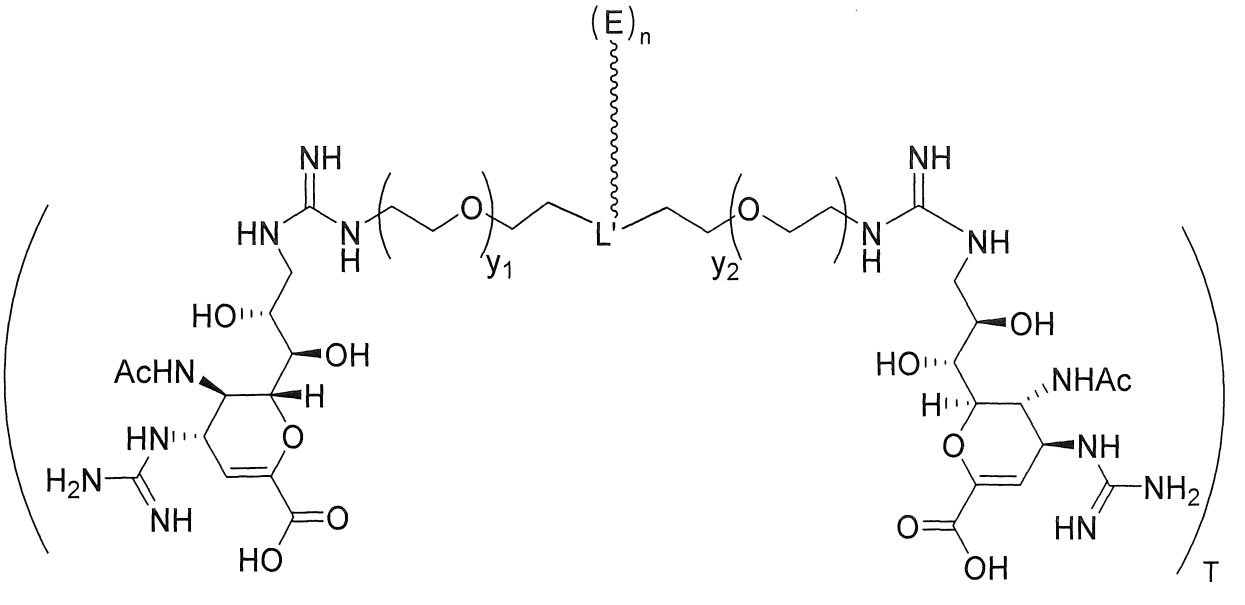
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-8):



(D-III-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

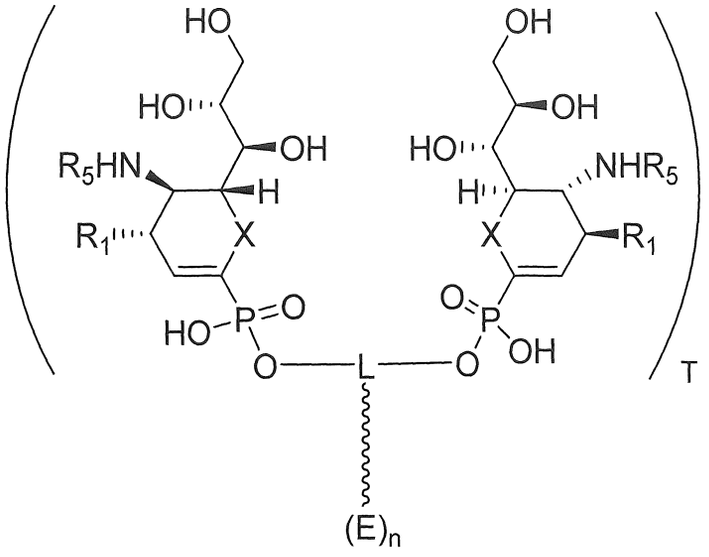
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-III-9):



(D-III-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

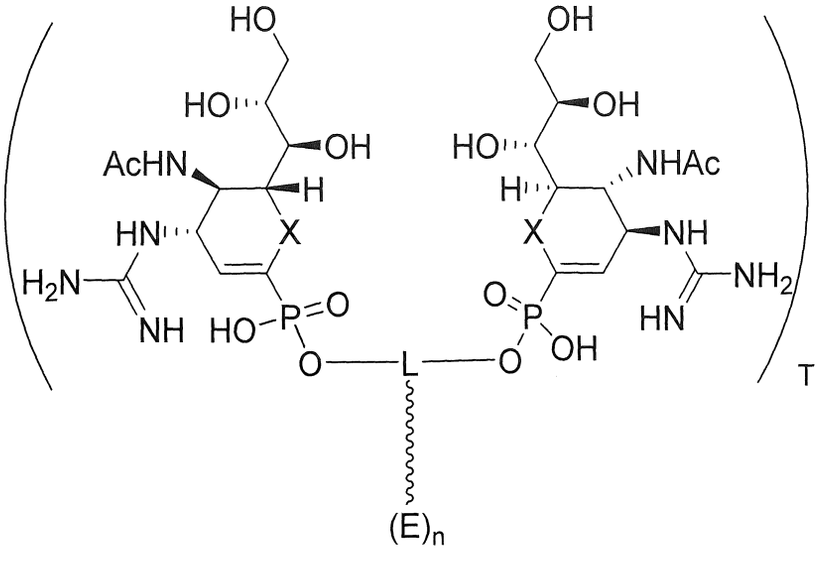
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IV):



(D-IV)

hoặc muối dược dụng của nó.

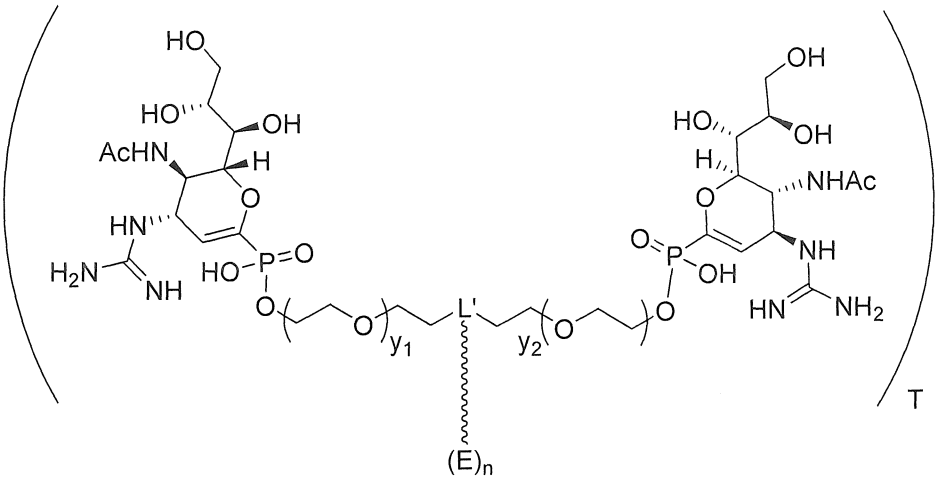
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IV-1):



(D-IV-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

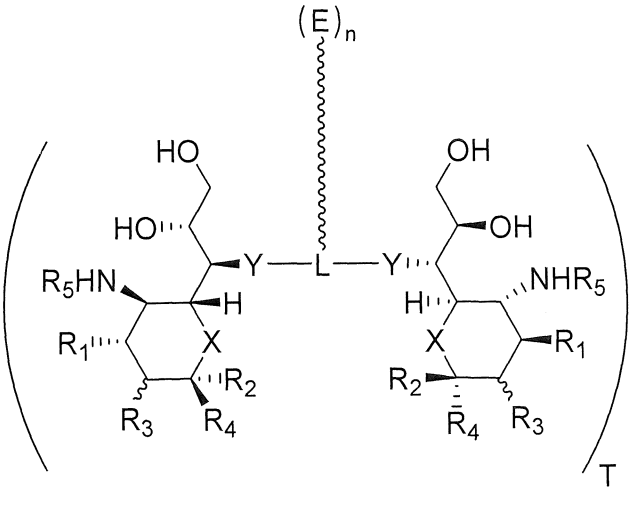
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IV-2):



(D-IV-2)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

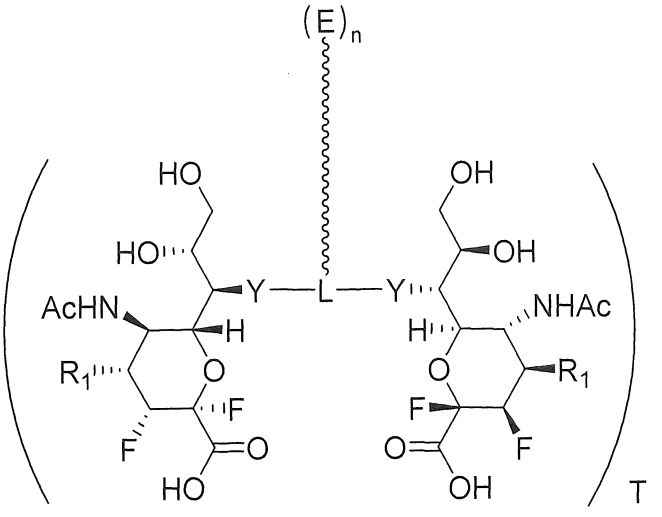
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V):



(D-V)

hoặc muối dược dụng của nó.

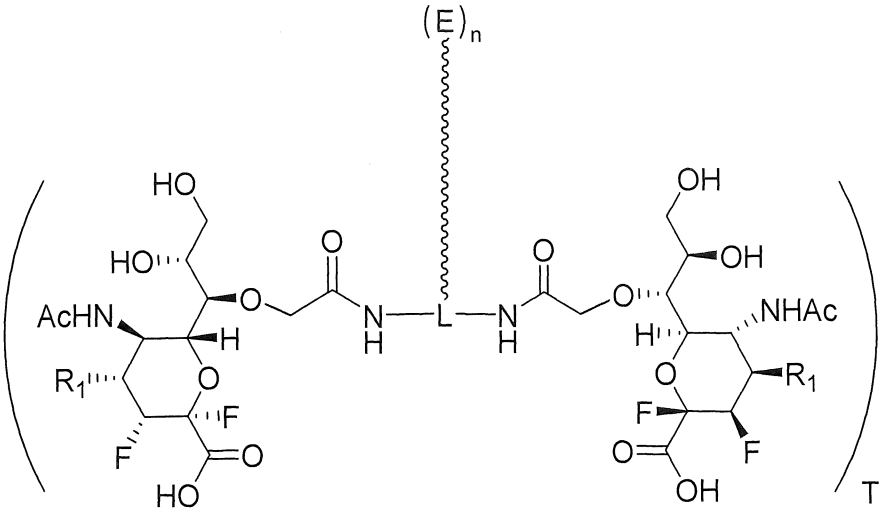
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-1):



(D-V-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

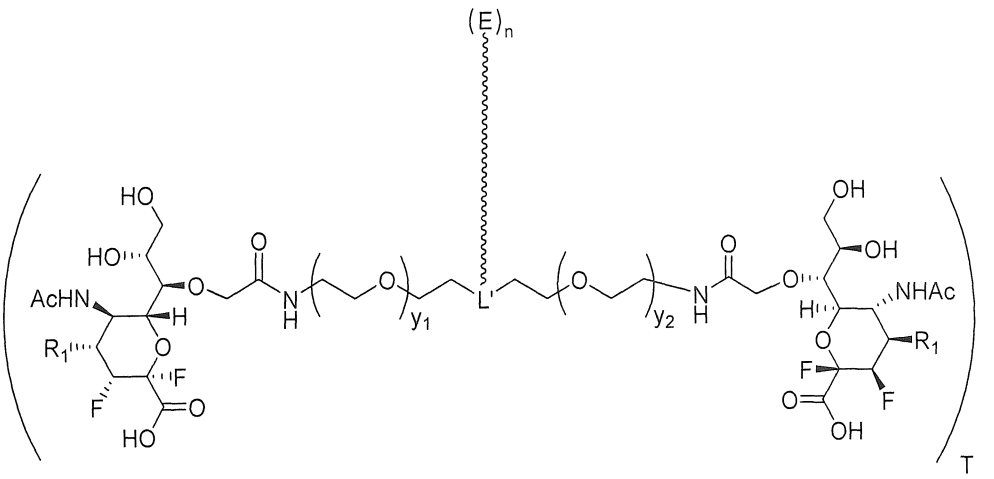
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-2):



(D-V-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

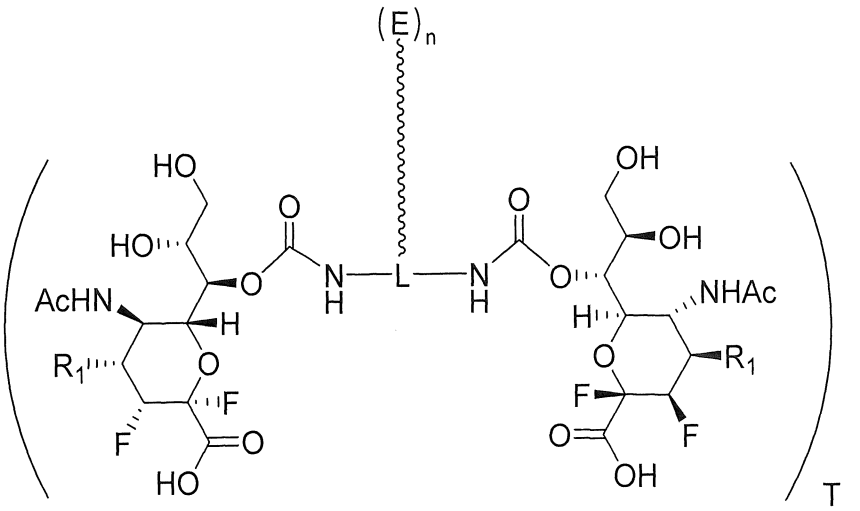
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-3):



(D-V-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

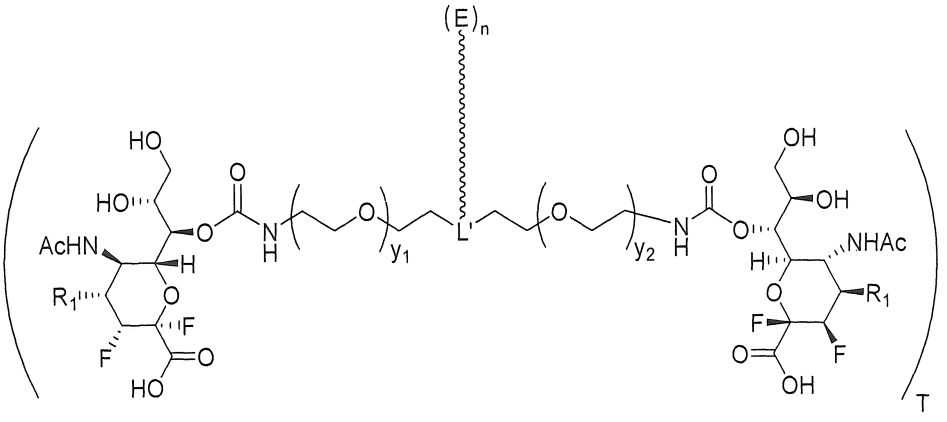
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-4):



(D-V-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

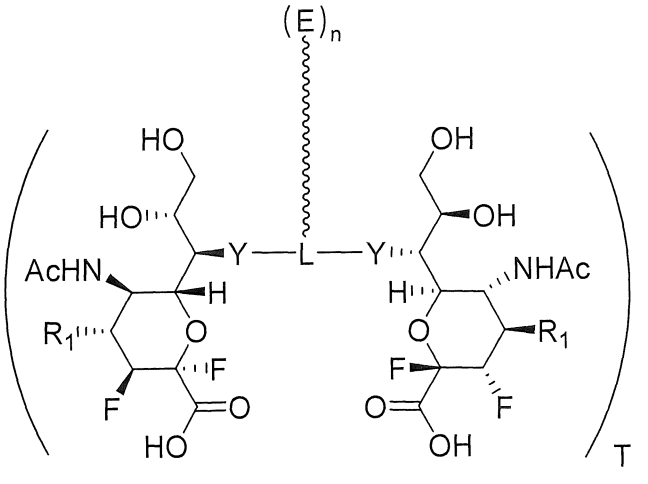
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-5):



(D-V-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

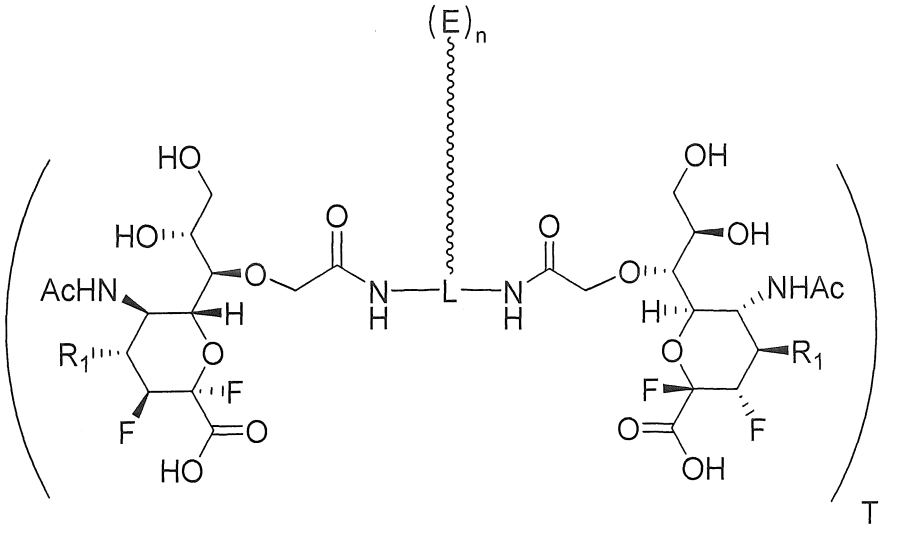
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-6):



(D-V-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

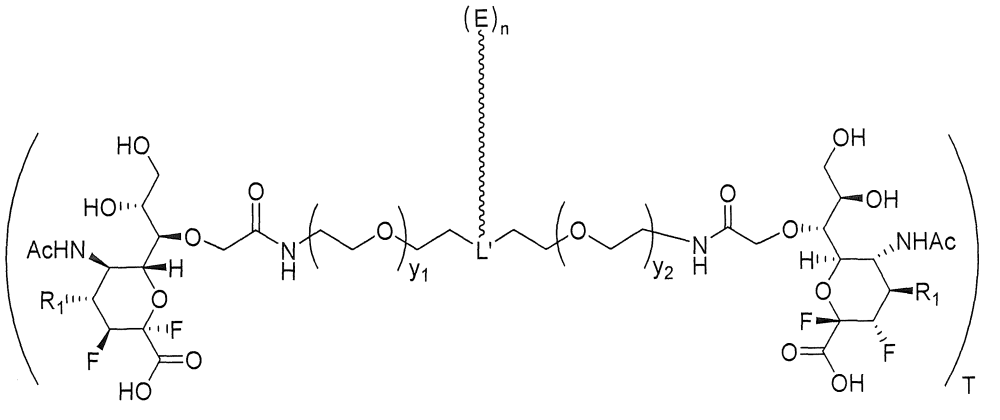
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-7):



(D-V-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

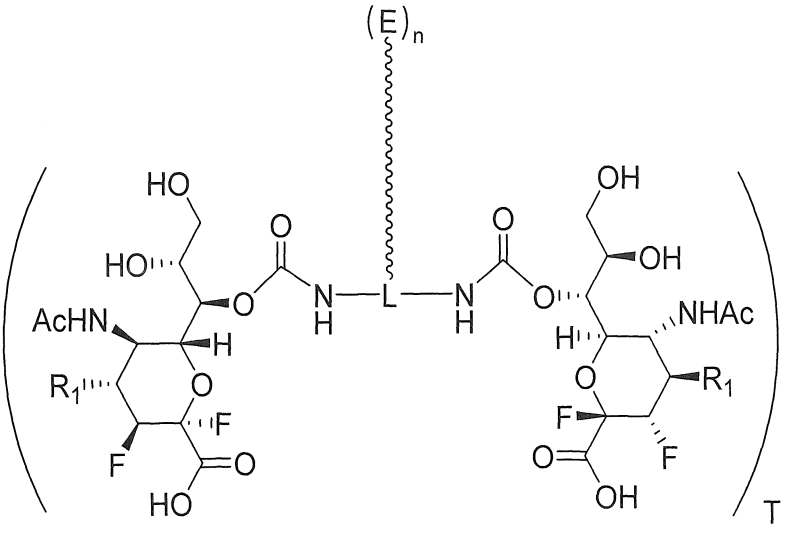
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-8):



(D-V-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

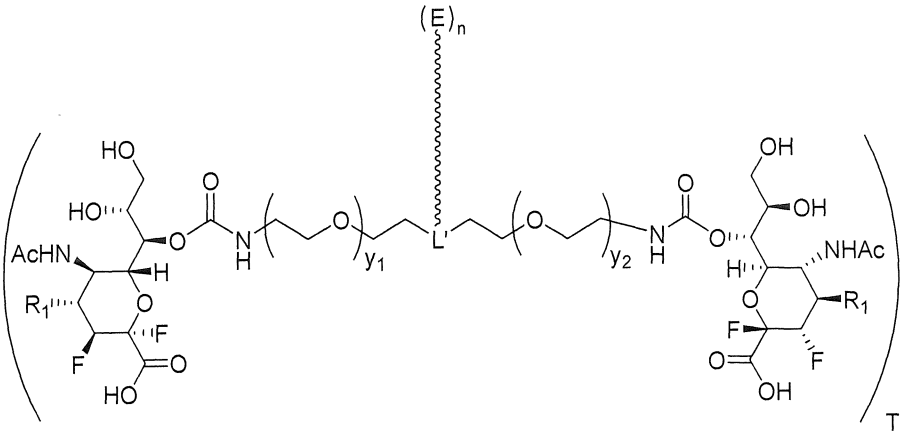
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-9):



(D-V-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

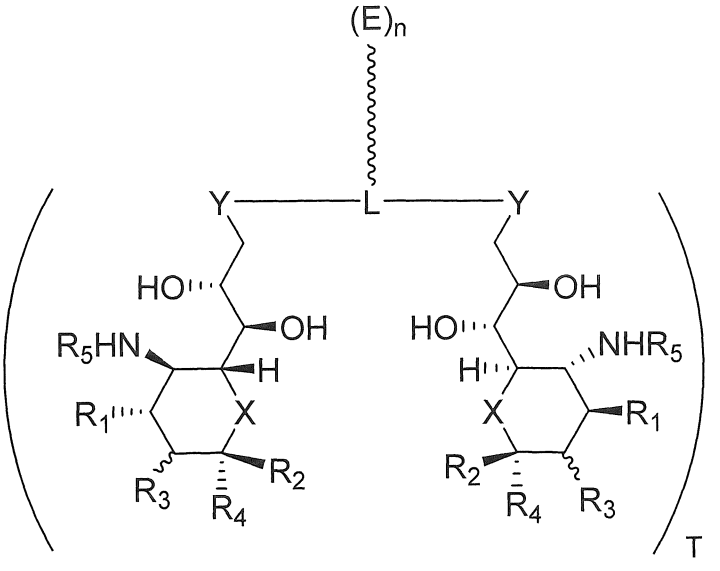
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-V-10):



(D-V-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

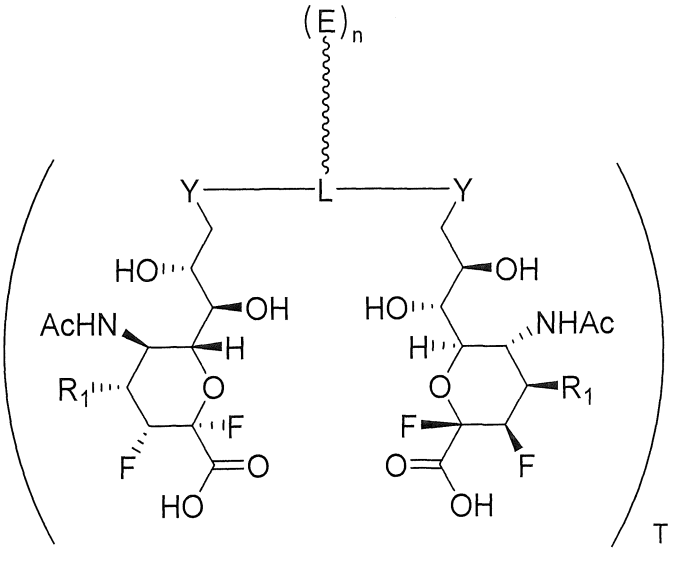
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI):



(D-VI)

hoặc muối dược dụng của nó.

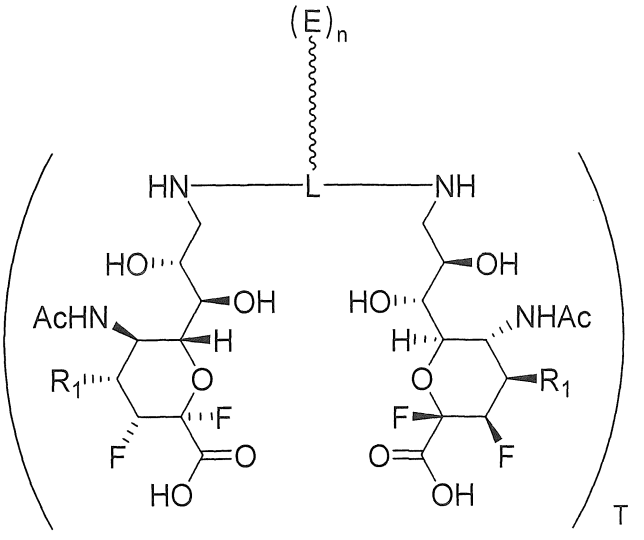
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-1):



(D-VI-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

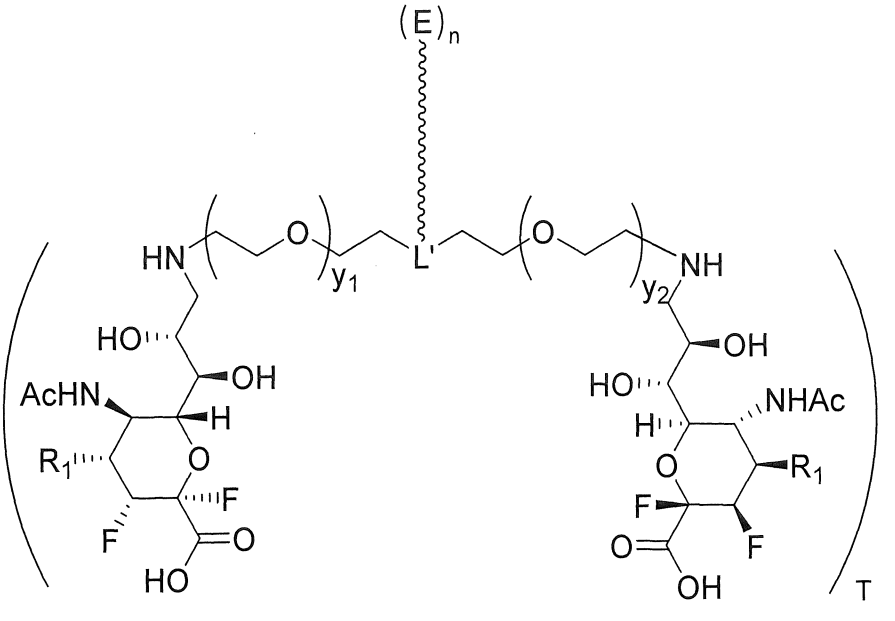
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-2):



(D-VI-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

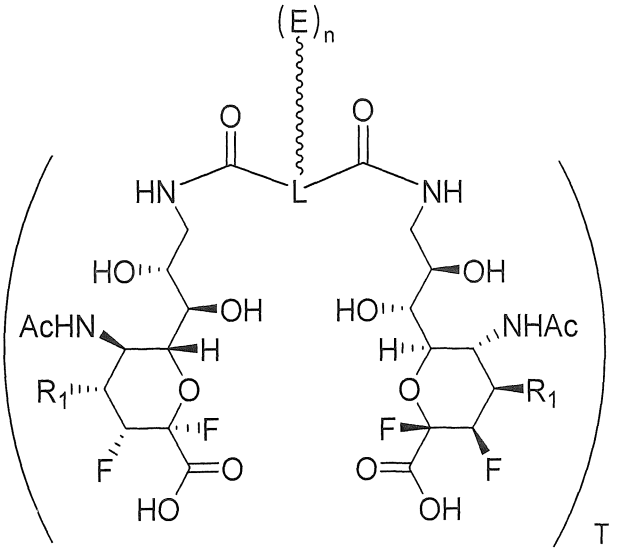
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-3):



(D-VI-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

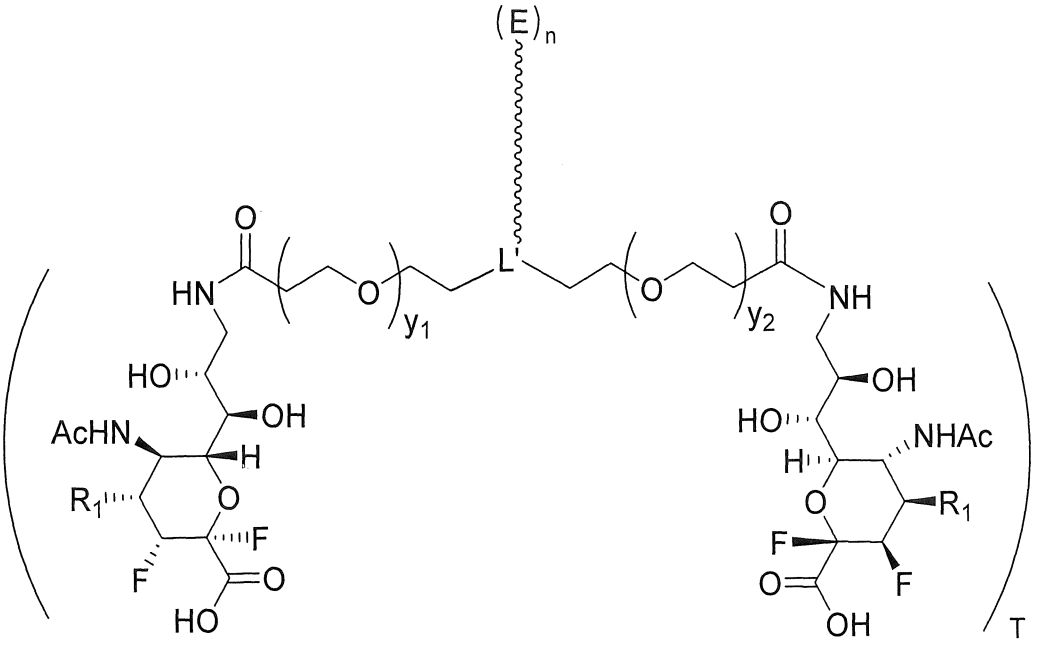
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-4):



(D-VI-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

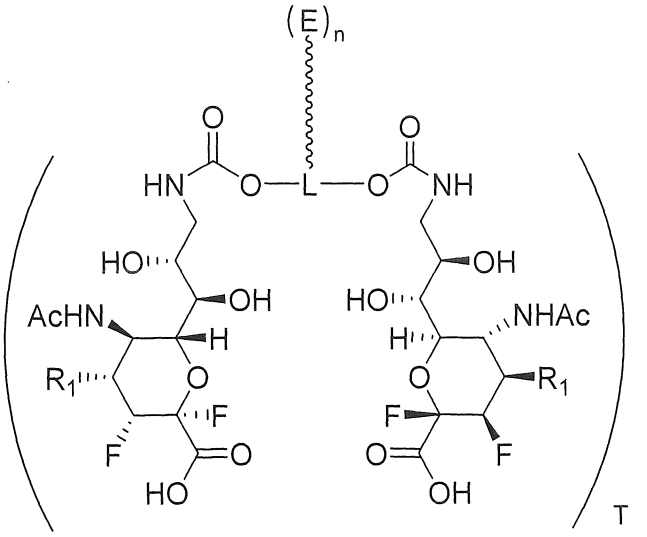
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-5):



(D-VI-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

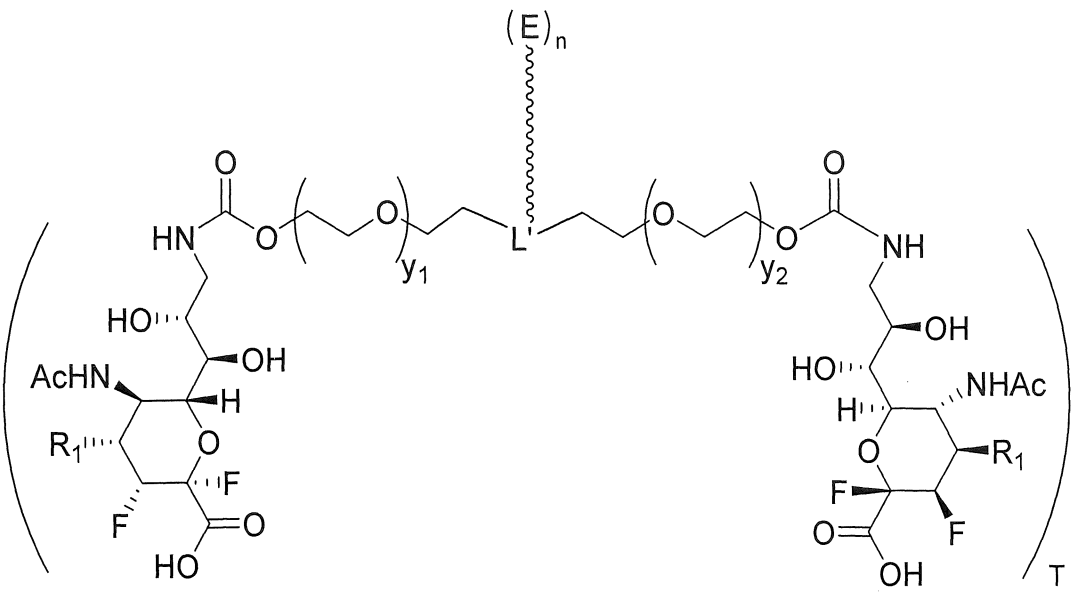
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-6):



(D-VI-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

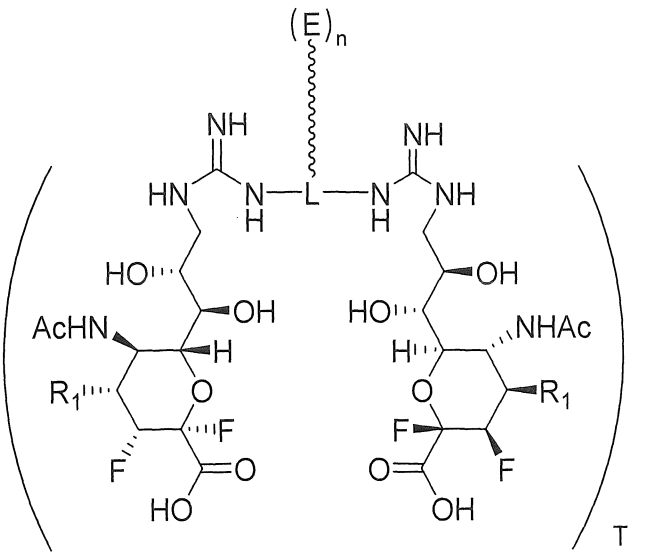
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-7):



(D-VI-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

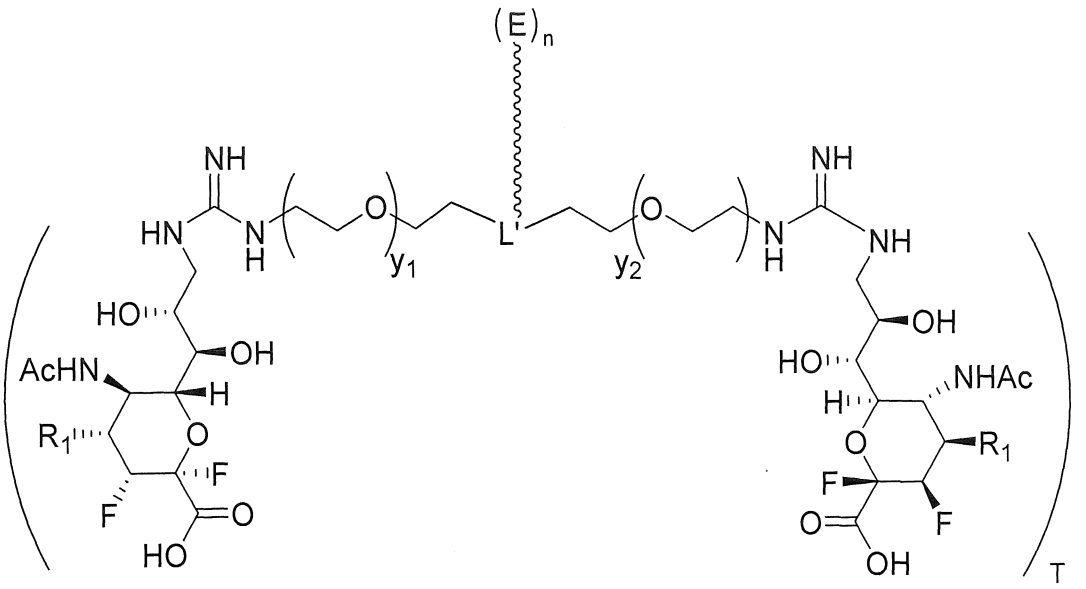
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-8):



(D-VI-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

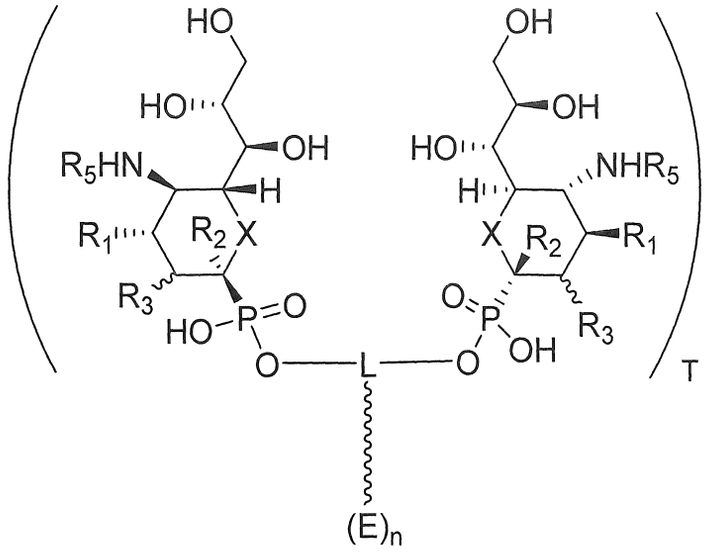
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VI-9):



(D-VI-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, mỗi y_1 và y_2 là 1, mỗi y_1 và y_2 là 2, hoặc mỗi y_1 và y_2 là 3.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VII):

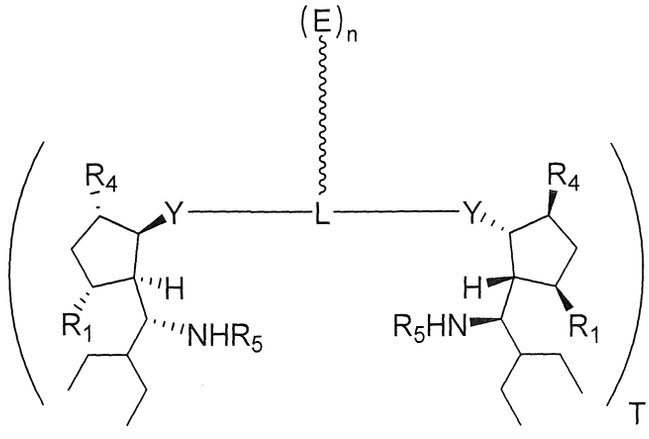


(D-VII)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là OH. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là NH_2. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là -NHC(=NH)NH_2 .

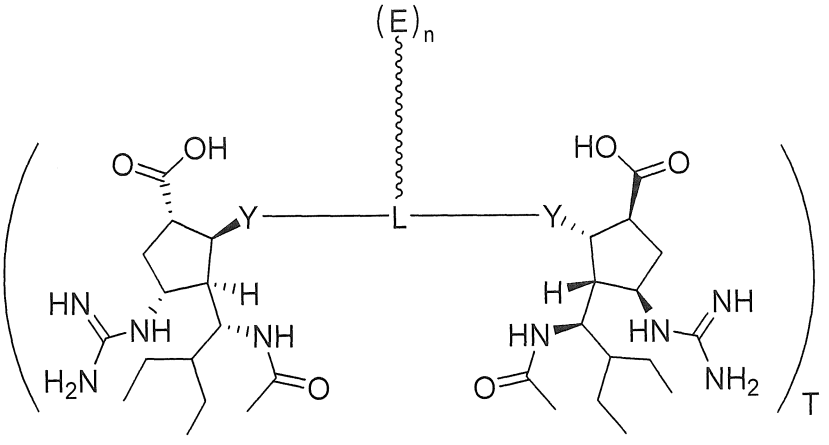
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII):



(D-VIII)

hoặc muối dược dụng của nó.

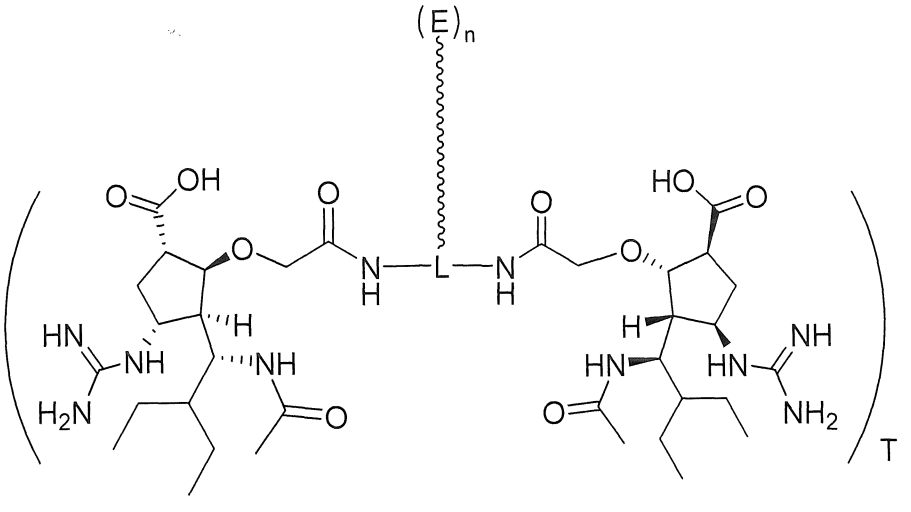
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-1):



(D-VIII-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

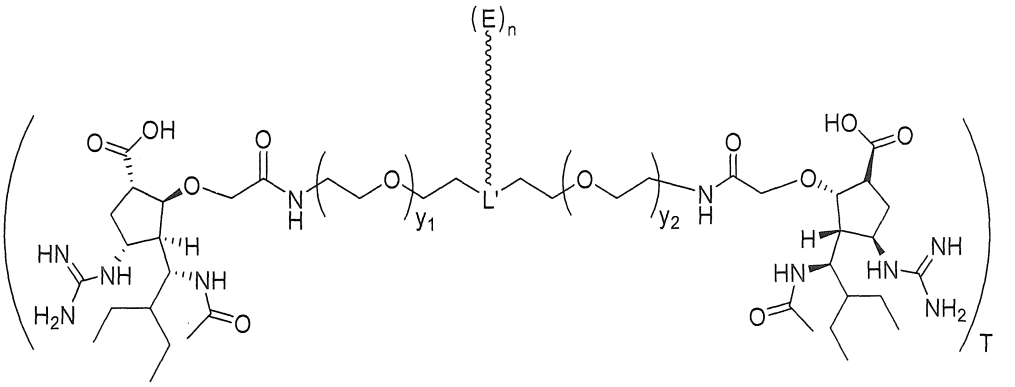
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-2):



(D-VIII-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

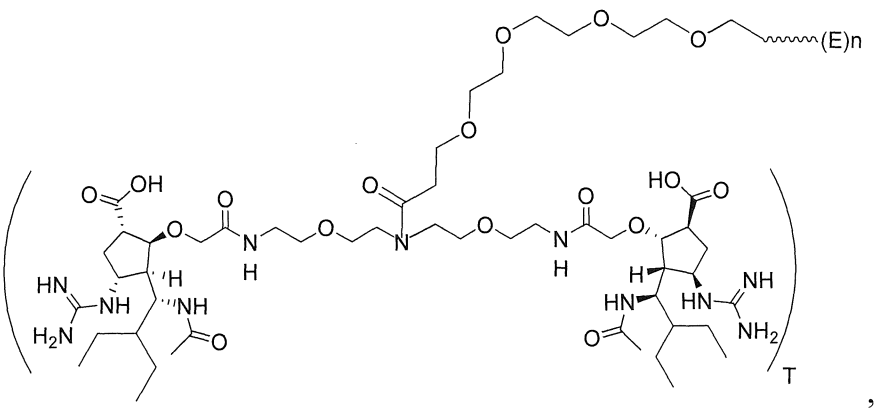
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-3):



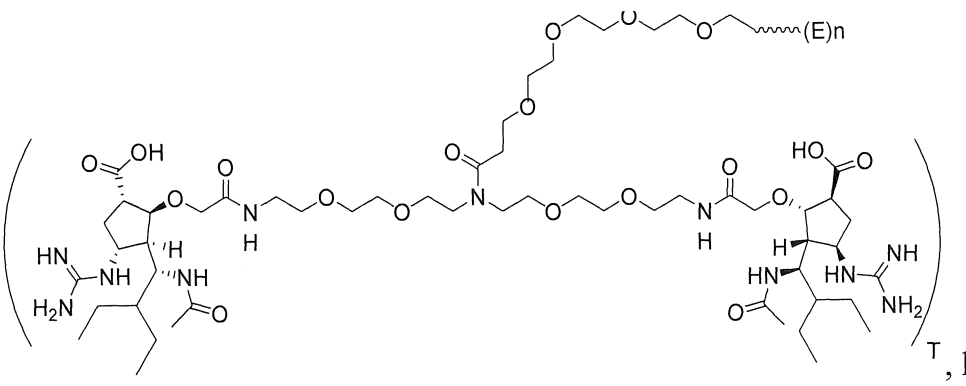
(D-VIII-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

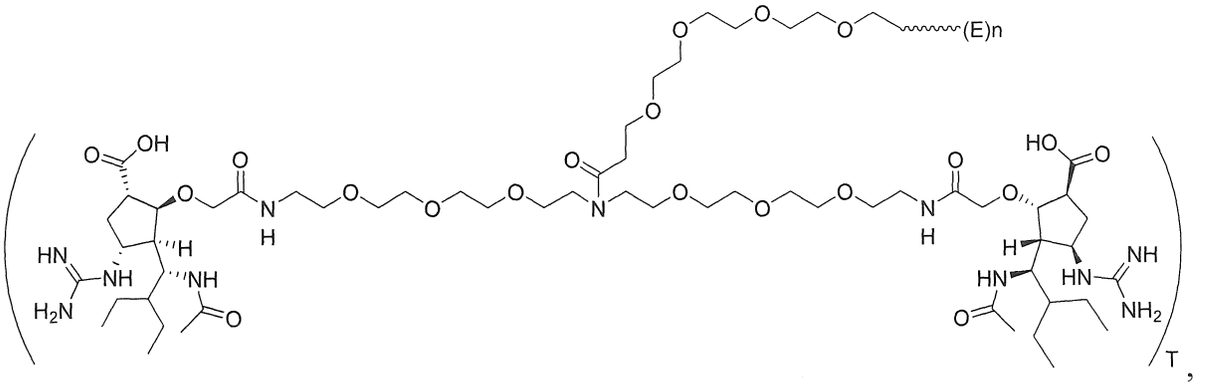
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc được chọn từ



,

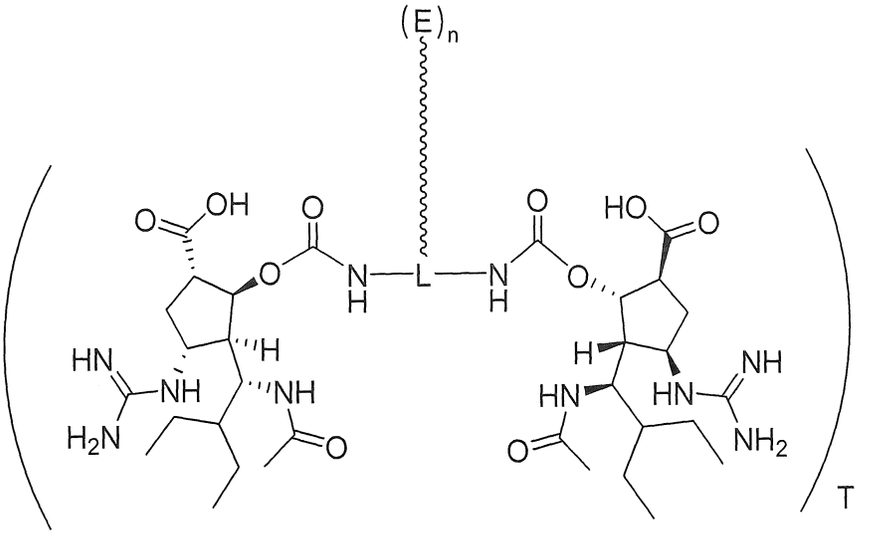


, hoặc



hoặc muối dược dụng của nó.

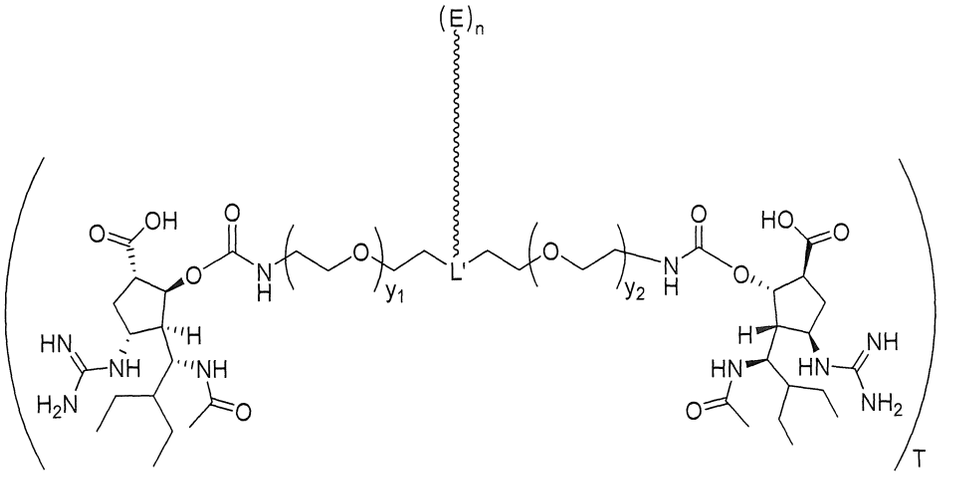
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-4):



(D-VIII-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-5):

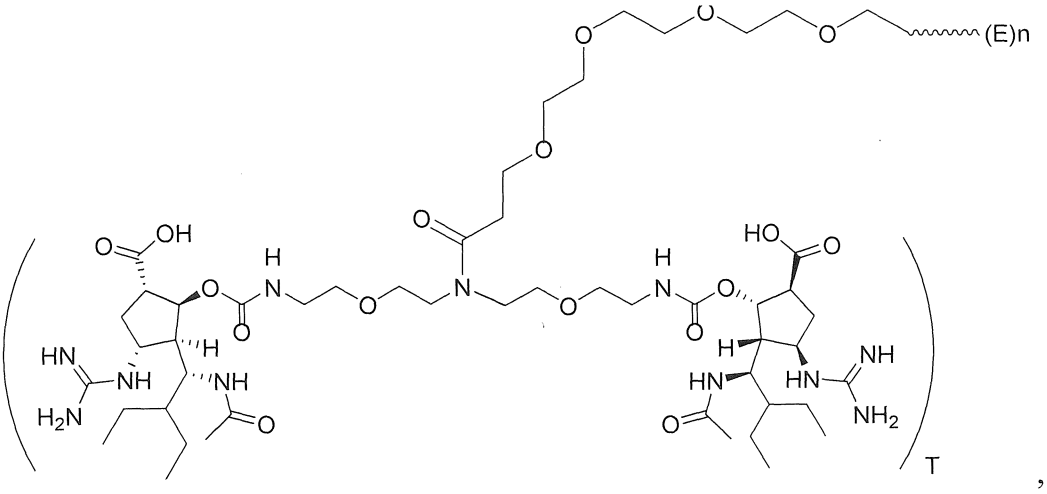


(D-VIII-5)

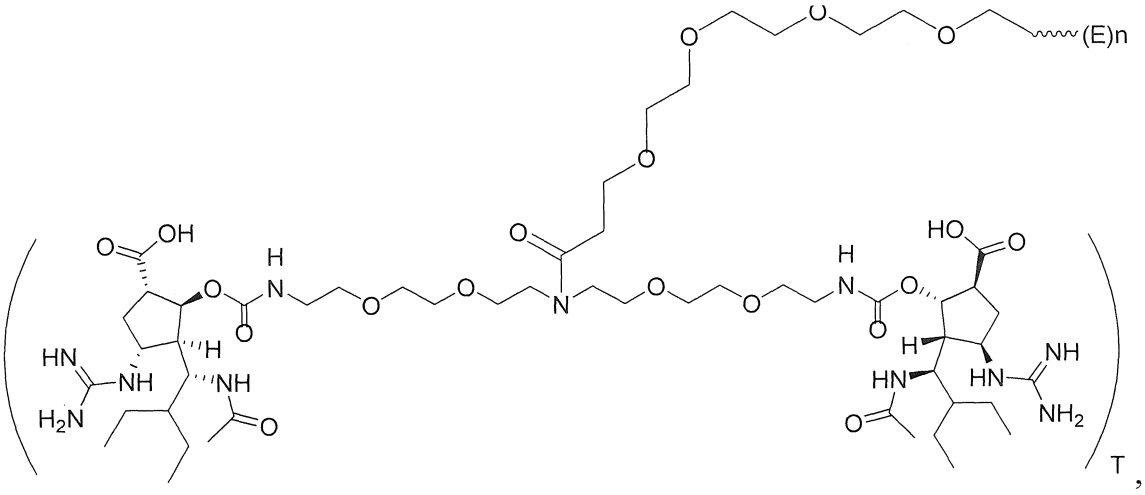
trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

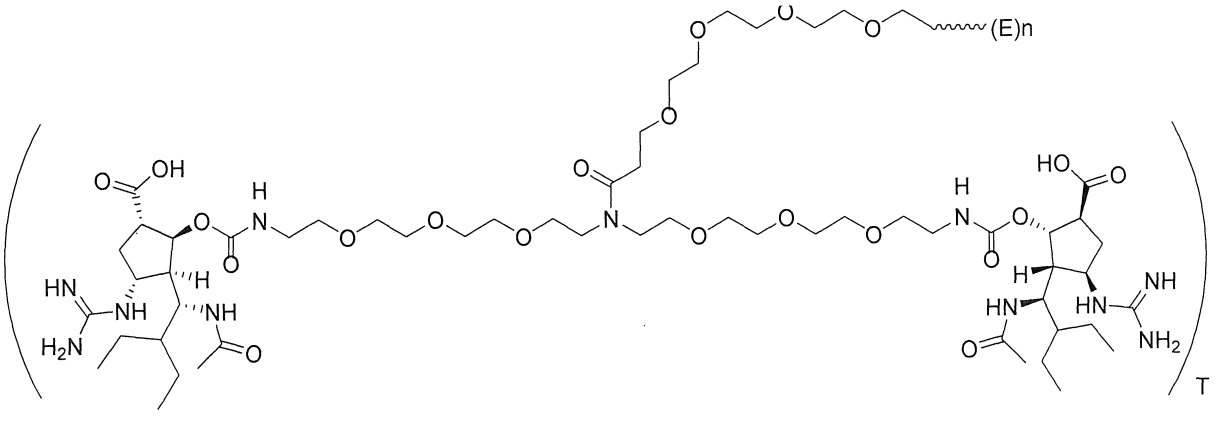
Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc được chọn từ:



,

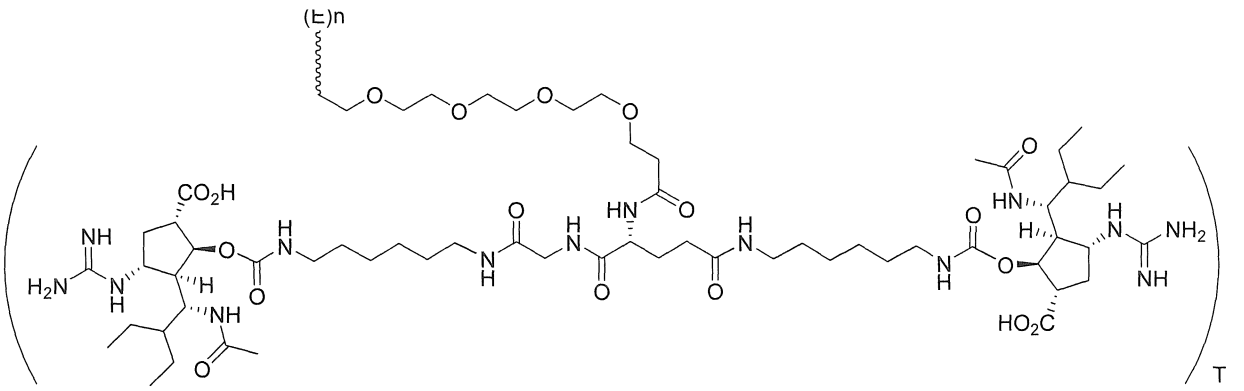


, hoặc



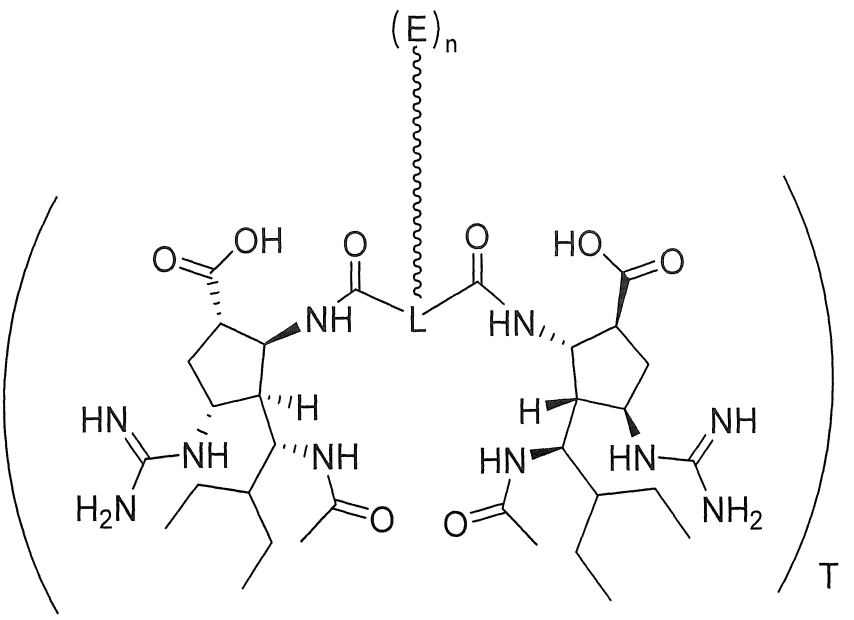
hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng cấu trúc



hoặc muối dược dụng của nó.

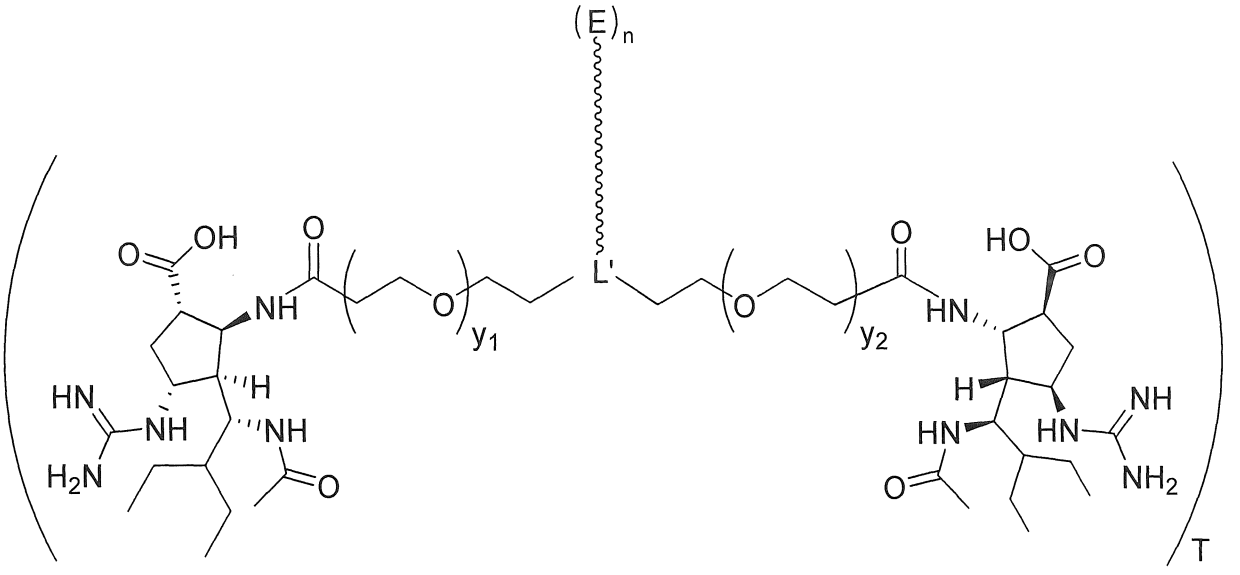
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-6):



(D-VIII-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

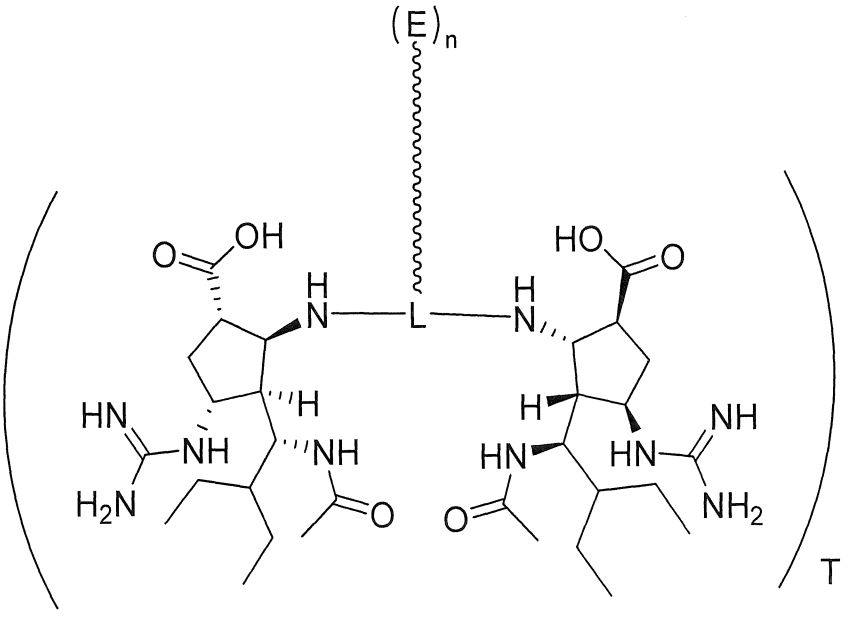
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-7):



(D-VIII-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

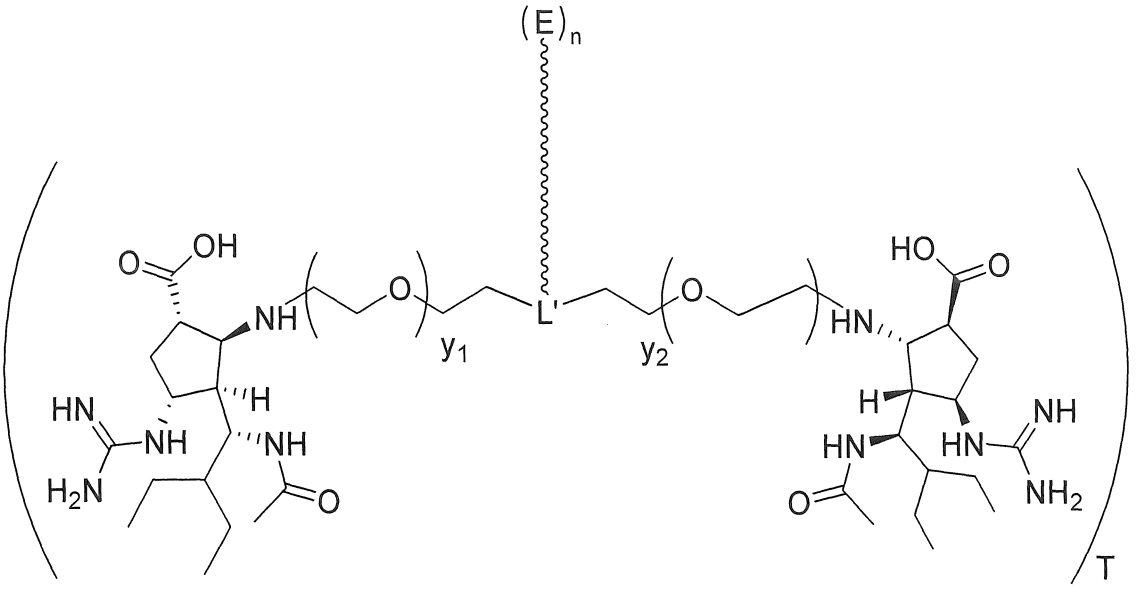
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-8):



(D-VIII-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

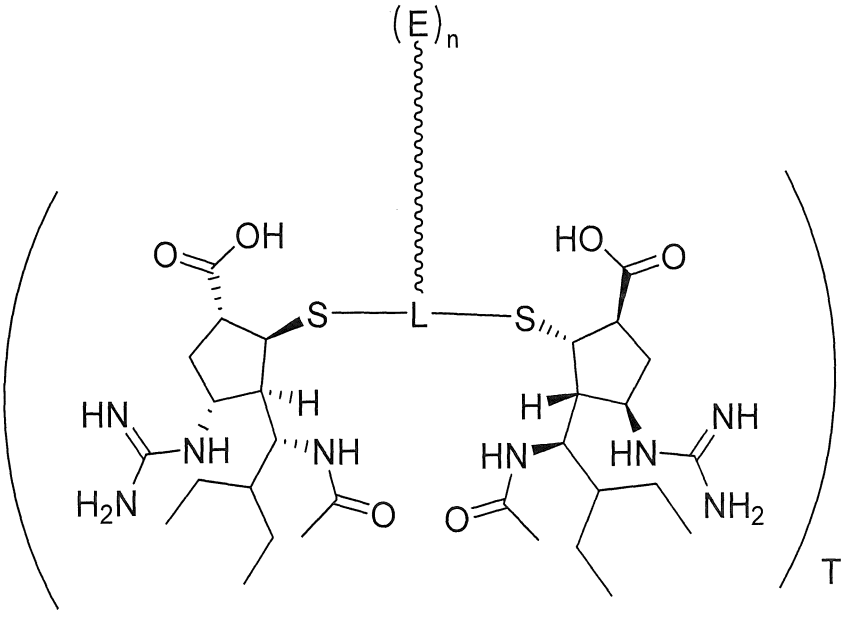
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-9):



(D-VIII-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

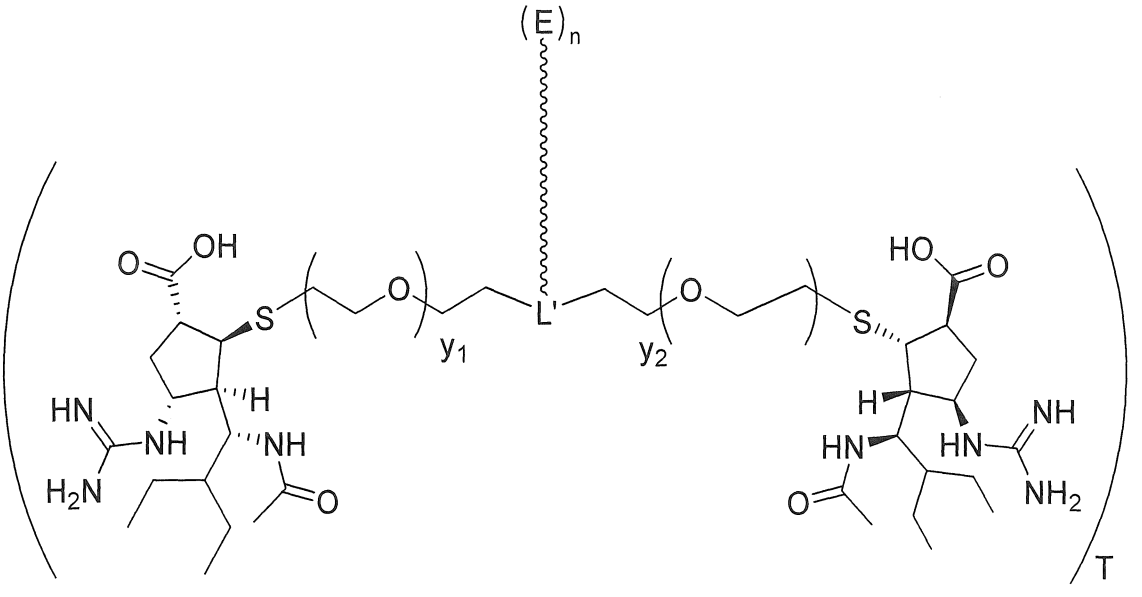
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-10):



(D-VIII-10)

hoặc muối dược dụng của nó.

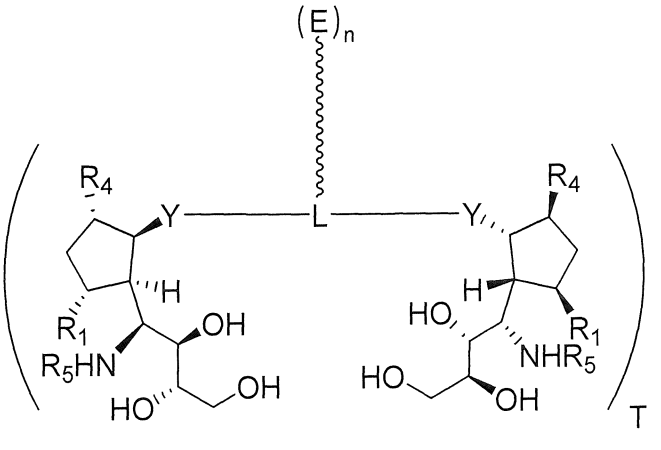
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-VIII-11):



(D-VIII-11)

trong đó L' là phần còn lại của L, và mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, mỗi y_1 và y_2 độc lập là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

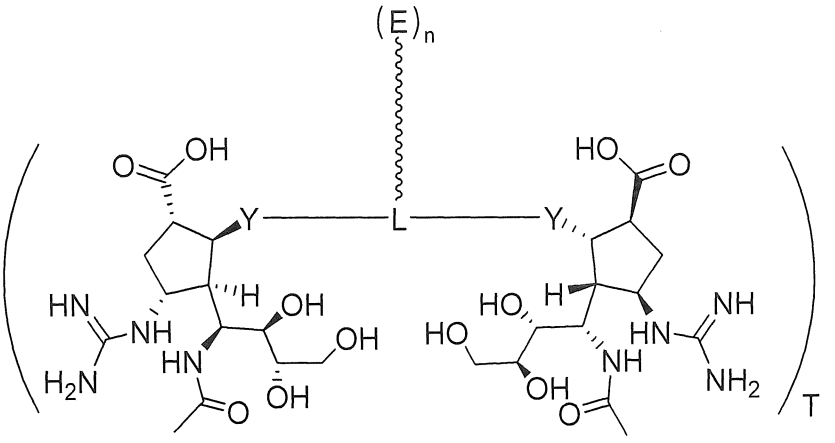
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX):



(D-IX)

hoặc muối dược dụng của nó.

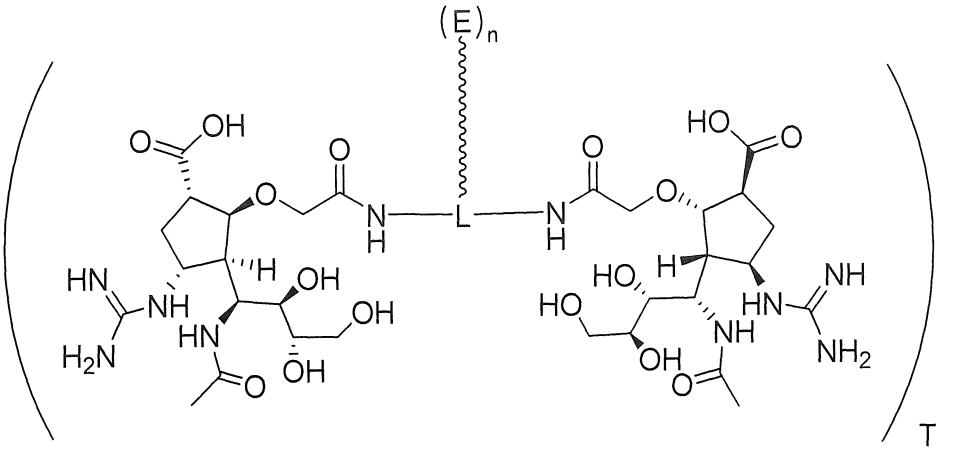
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-1):



(D-IX-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

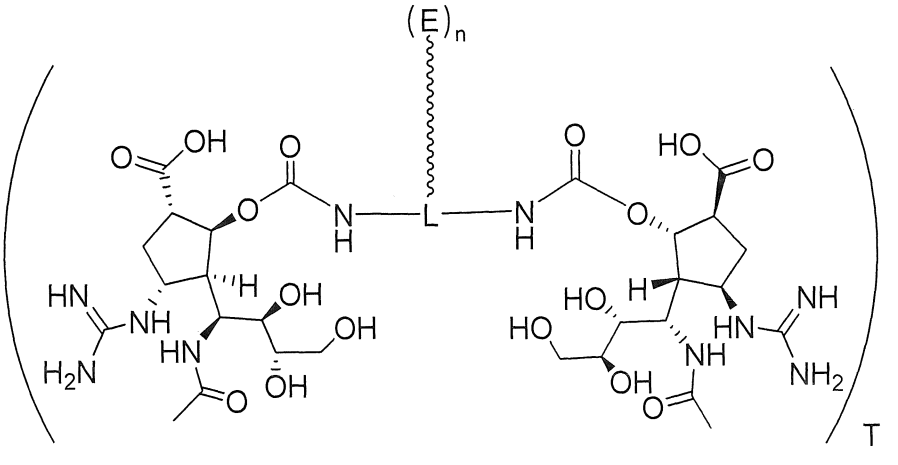
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-2):



(D-IX-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

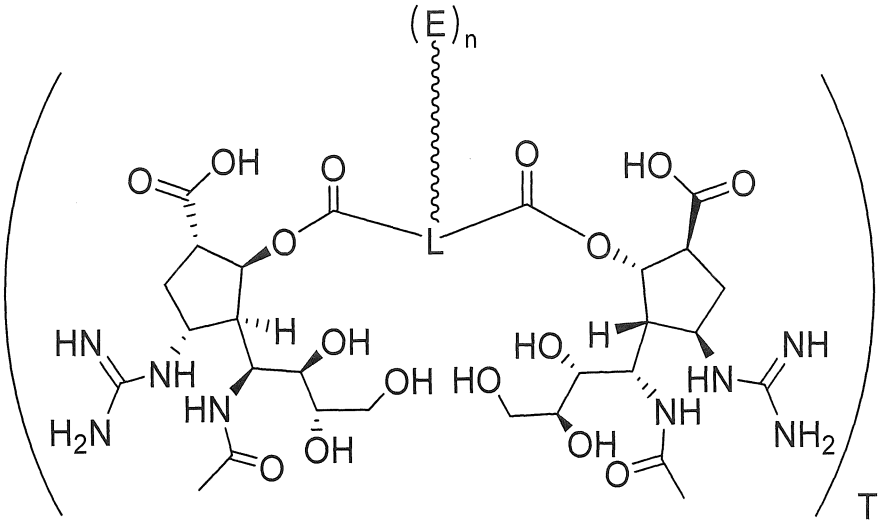
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-3):



(D-IX-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

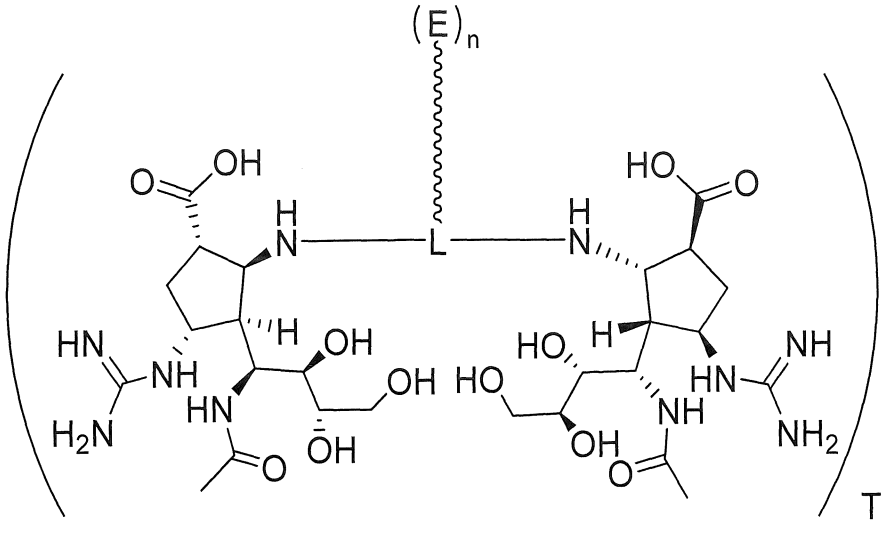
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-4):



(D-IX-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

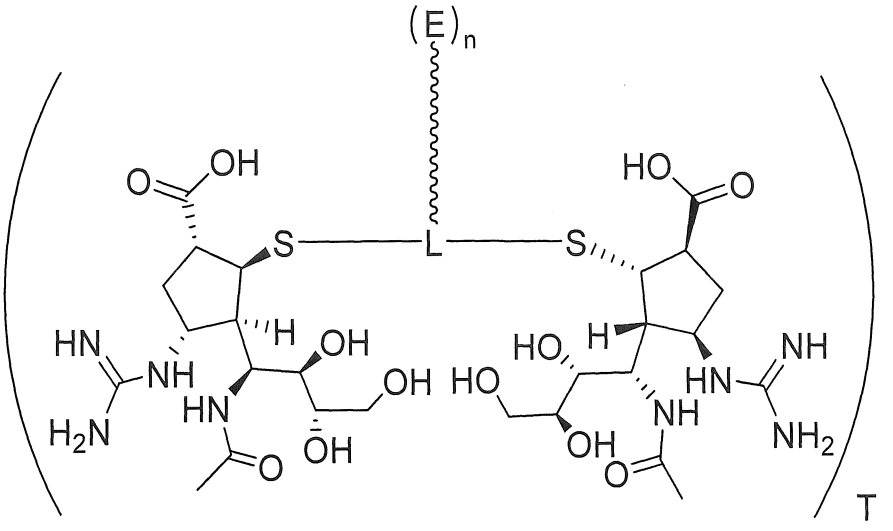
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-5):



(D-IX-5)

hoặc muối dược dụng của nó.

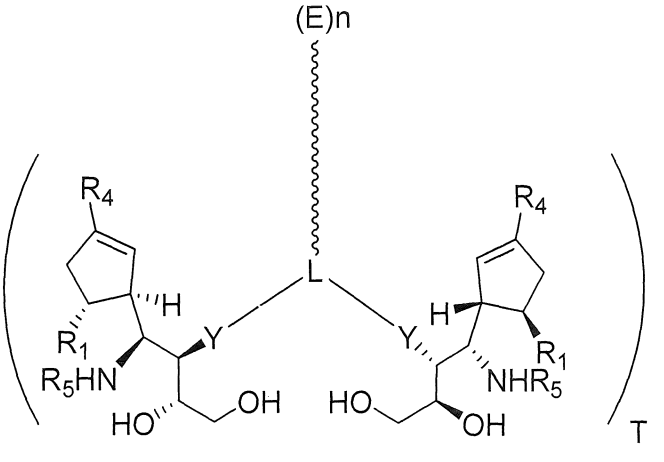
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-IX-6):



(D-IX-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

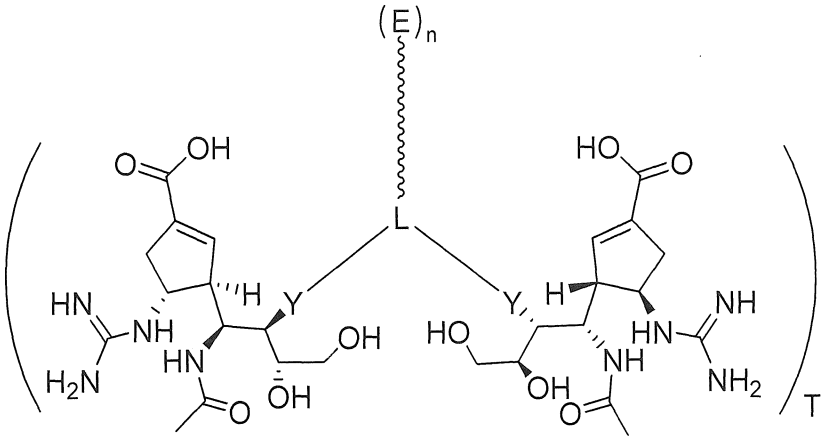
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-X):



(D-X)

hoặc muối dược dụng của nó.

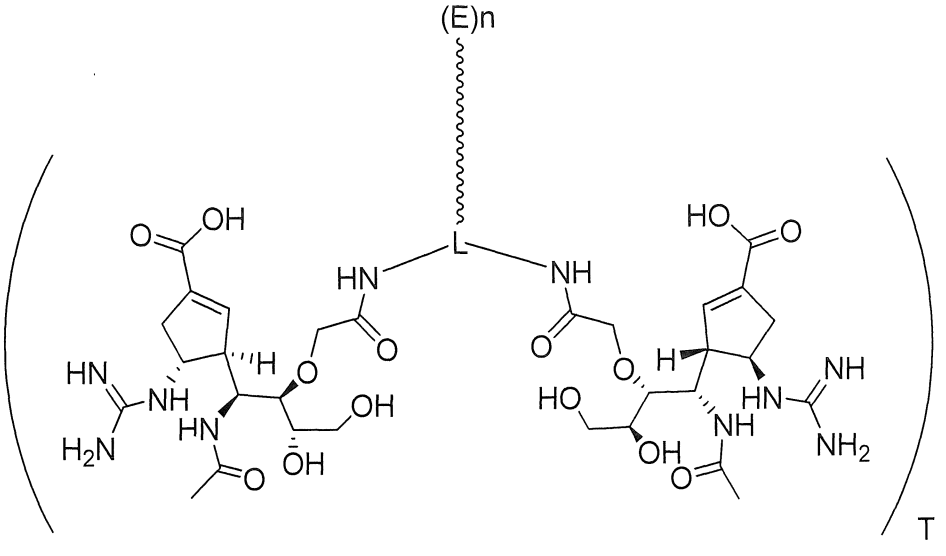
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-X-1):



(D-X-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

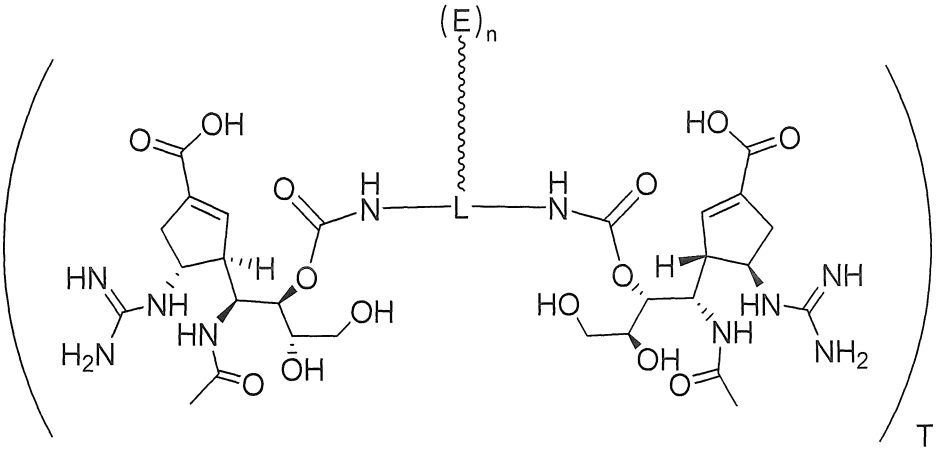
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-X-2):



(D-X-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-X-3):



(D-X-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

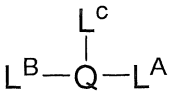
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý, O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino, trong đó R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, khung của L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-

C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý, O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino, trong đó R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L hoặc L' được thế oxo. Theo một số phương án, khung của L hoặc L' chứa không nhiều hơn 250 nguyên tử. Theo một số phương án, L hoặc L' có khả năng tạo thành liên kết amit, carbamat, sulfonyl, hoặc ure. Theo một số phương án, L hoặc L' là liên kết. Theo một số phương án, L hoặc L' là nguyên tử.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, mỗi L được mô tả bằng công thức (D-L-I):



(D-L-I)

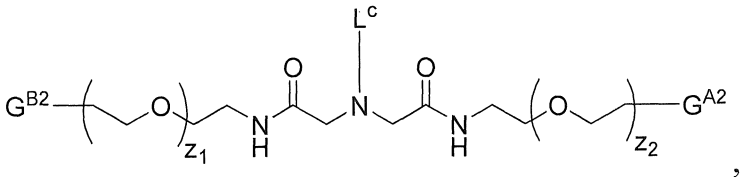
trong đó L^A được mô tả bằng công thức G^{A1}-$(Z^{A1})_{g1}$-$(Y^{A1})_{h1}$-$(Z^{A2})_{i1}$-$(Y^{A2})_{j1}$-$(Z^{A3})_{k1}$-$(Y^{A3})_{l1}$-$(Z^{A4})_{m1}$-$(Y^{A4})_{n1}$-$(Z^{A5})_{o1}$-G^{A2}; L^B được mô tả bằng công thức G^{B1}-$(Z^{B1})_{g2}$-$(Y^{B1})_{h2}$-$(Z^{B2})_{i2}$-$(Y^{B2})_{j2}$-$(Z^{B3})_{k2}$-$(Y^{B3})_{l2}$-$(Z^{B4})_{m2}$-$(Y^{B4})_{n2}$-$(Z^{B5})_{o2}$-G^{B2}; L^C được mô tả bằng công thức G^{C1}-$(Z^{C1})_{g3}$-$(Y^{C1})_{h3}$-$(Z^{C2})_{i3}$-$(Y^{C2})_{j3}$-$(Z^{C3})_{k3}$-$(Y^{C3})_{l3}$-$(Z^{C4})_{m3}$-$(Y^{C4})_{n3}$-$(Z^{C5})_{o3}$-G^{C2}; G^{A1} là liên kết được gắn với Q; G^{A2} là liên kết được gắn với A1; G^{B1} là liên kết được gắn với Q); G^{B2} là liên kết được gắn với A2; G^{C1} là liên kết được gắn với Q; G^{C2} là liên kết được gắn với E hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với E (ví dụ,

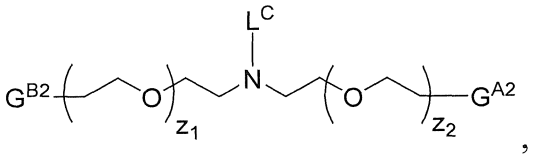
maleimit và xystein, amin và axit carboxylic được hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic được hoạt hóa và amin, isoxyanat và amin, azit và alkyn, và alken và tetrazin); mỗi Z^{A1}, Z^{A2}, Z^{A3}, Z^{A4}, Z^{A5}, Z^{B1}, Z^{B2}, Z^{B3}, Z^{B4}, Z^{B5}, Z^{C1}, Z^{C2}, Z^{C3}, Z^{C4}, và Z^{C5} độc lập là C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý; mỗi Y^{A1}, Y^{A2}, Y^{A3}, Y^{A4}, Y^{B1}, Y^{B2}, Y^{B3}, Y^{B4}, Y^{C1}, Y^{C2}, Y^{C3}, và Y^{C4} độc lập là O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino; R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý; mỗi g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3, và o3 độc lập là 0 hoặc 1; Q là nguyên tử nitơ, C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý.

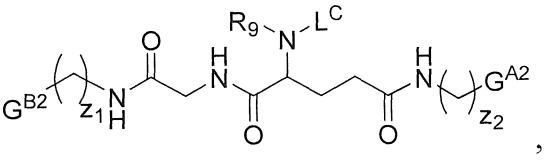
Theo một số phương án, L^C có thể có hai điểm gắn với miền Fc, peptit liên kết Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin (ví dụ, hai G^{C2}).

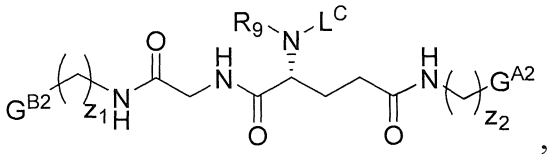
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L bao gồm yếu tố liên kết polyetylen glycol (PEG). Yếu tố liên kết PEG bao gồm yếu tố liên kết có cấu trúc đơn vị lặp lại $(-CH_2CH_2O-)_n$, trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 100. Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (M-I)-(M-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị dime chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể được chọn bất kỳ trong số các yếu tố liên kết từ PEG_2 đến PEG_{100} (ví dụ, PEG_2, PEG_3, PEG_4, PEG_5, PEG_5-PEG_{10}, PEG_{10}-PEG_{20}, PEG_{20}-PEG_{30}, PEG_{30}-PEG_{40}, PEG_{50}-PEG_{60}, PEG_{60}-PEG_{70}, PEG_{70}-PEG_{80}, PEG_{80}-PEG_{90}, PEG_{90}-PEG_{100}). Theo một số phương án, L^c bao gồm yếu tố liên kết PEG, trong đó L^C được gắn cộng hóa trị với mỗi Q và E.

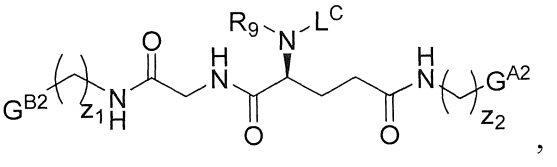
Theo một số phương án, L là

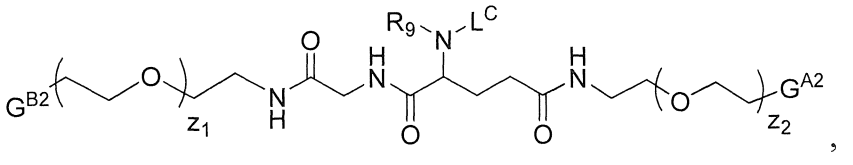

,

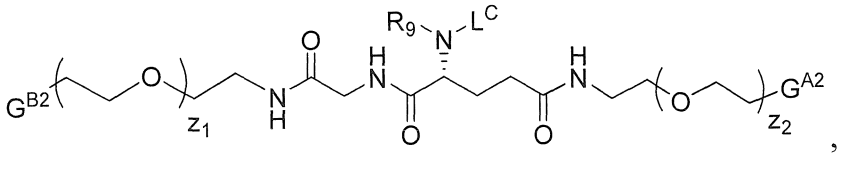

,

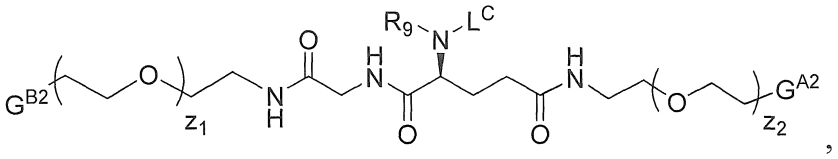

,

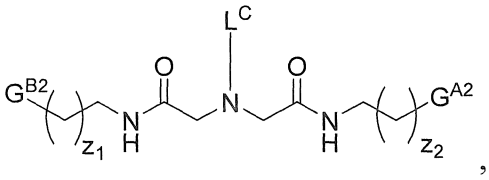

,

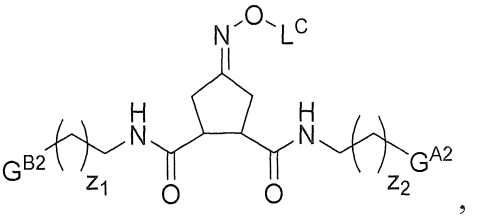

,

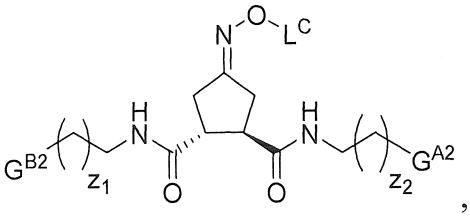

,

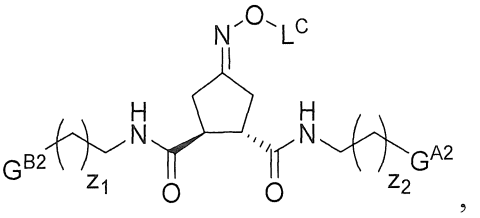

,

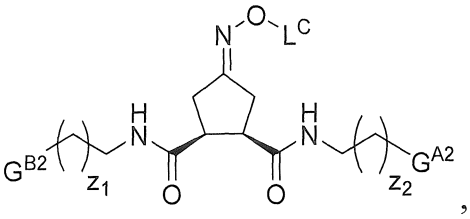


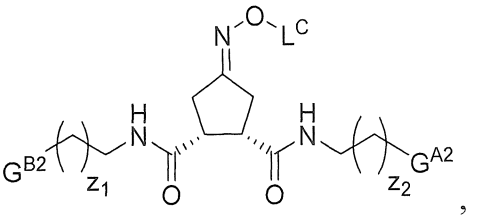


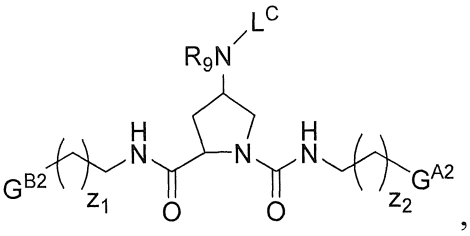


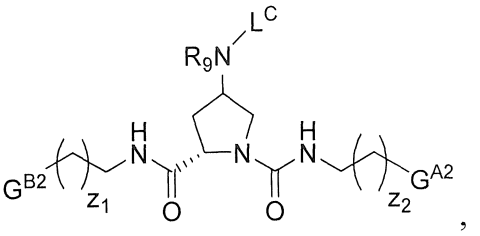


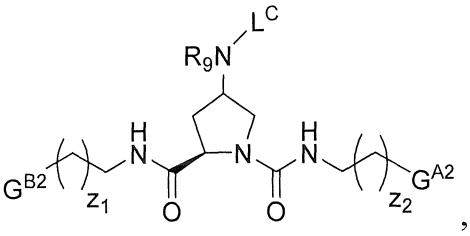


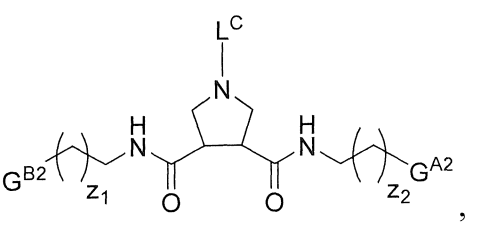


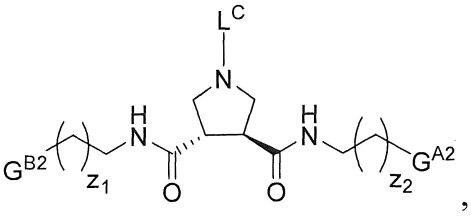


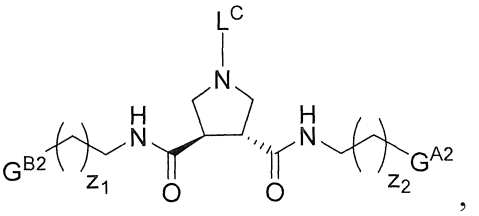


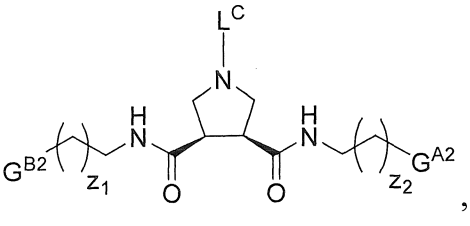


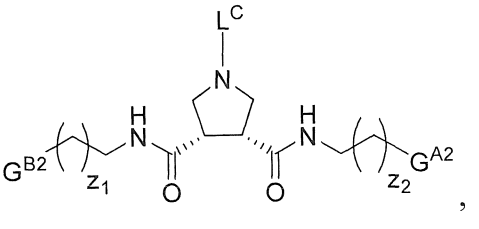


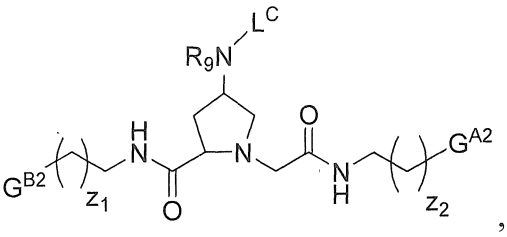


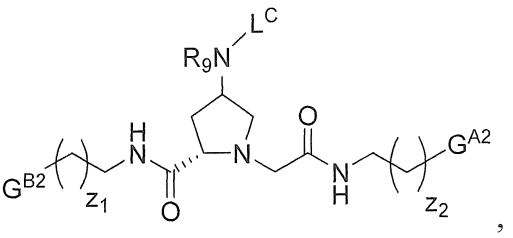


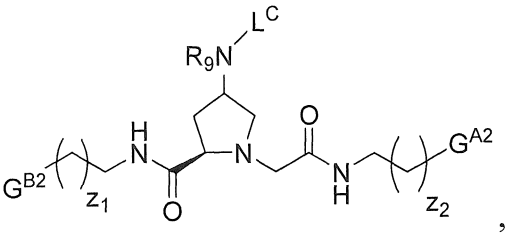


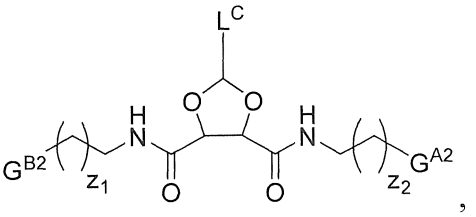


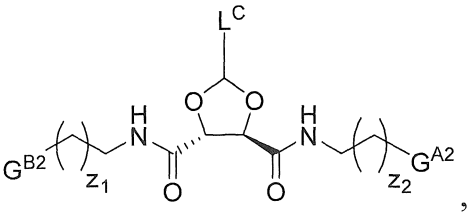


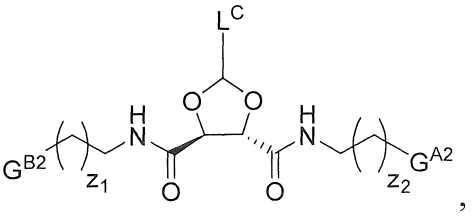

,

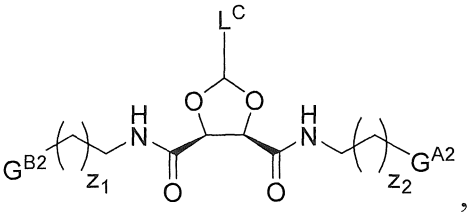

,

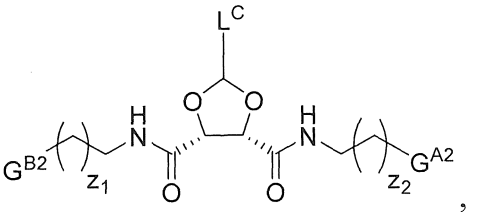

,

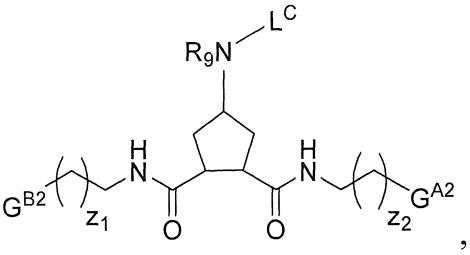

,

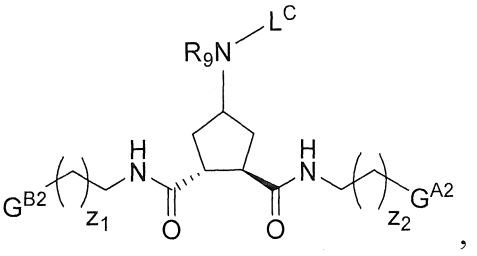

,

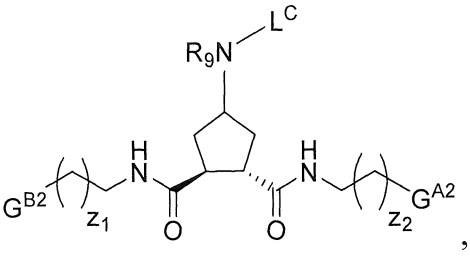

,

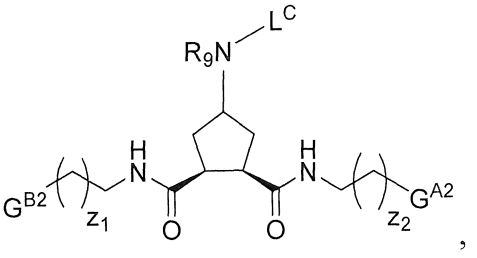

,

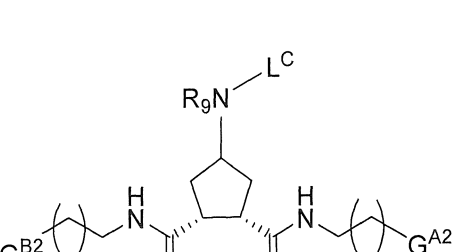

,

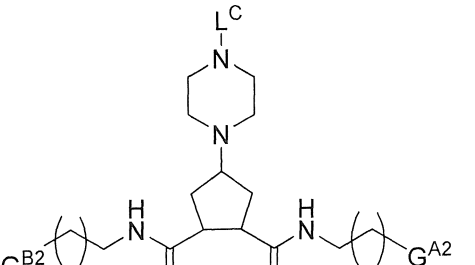

,


,


,

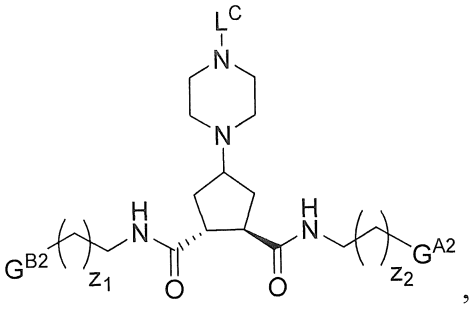
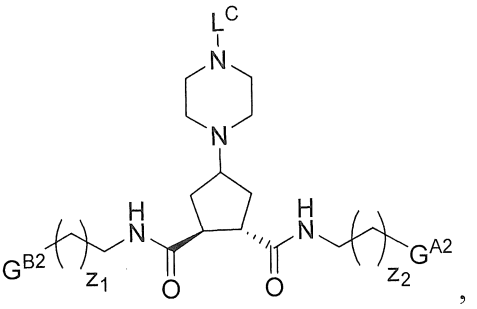
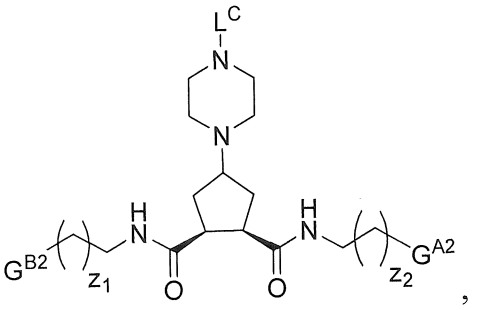
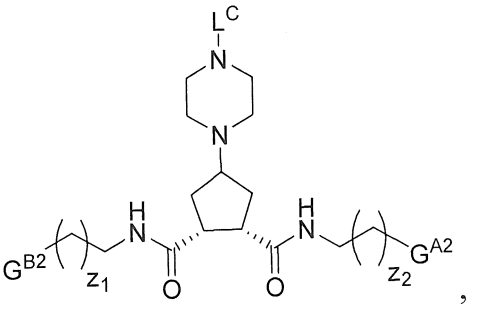
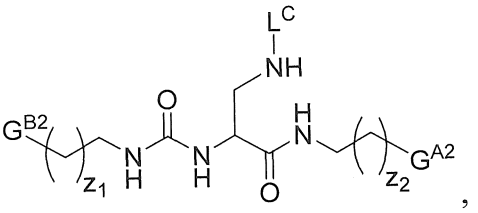
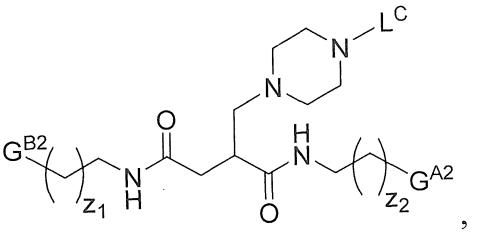
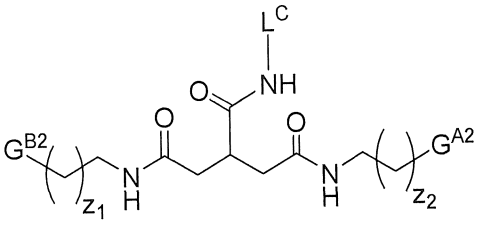
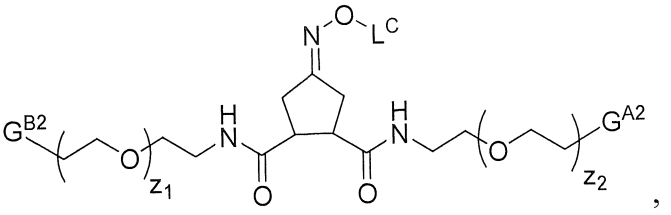
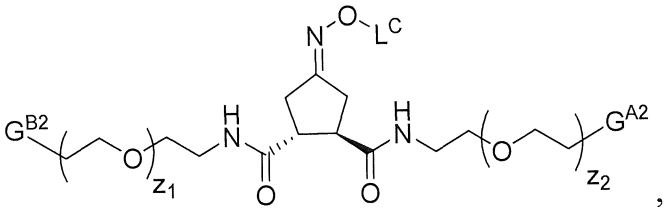
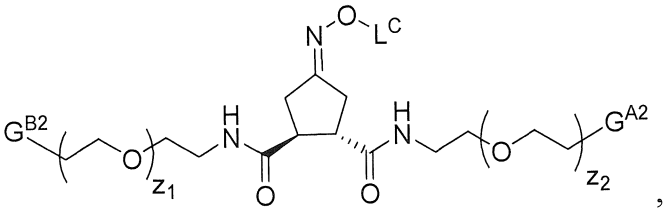
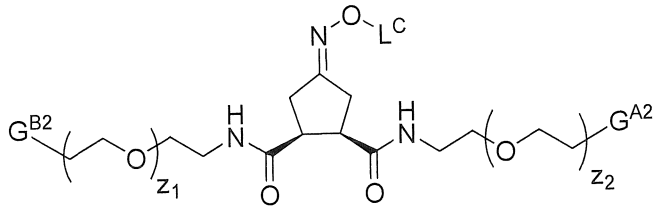

,

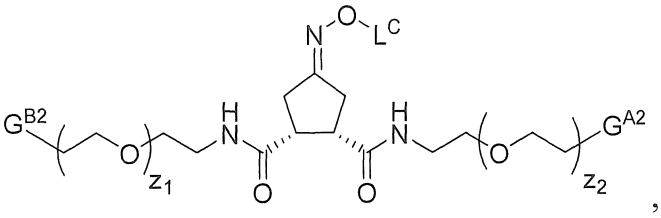

,


,

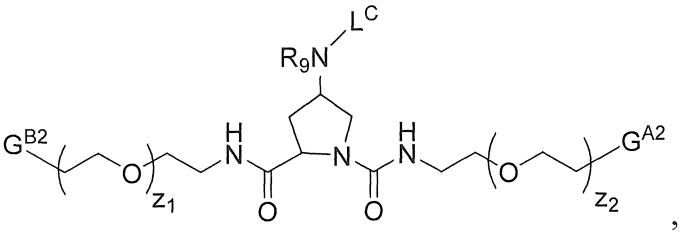
,

,

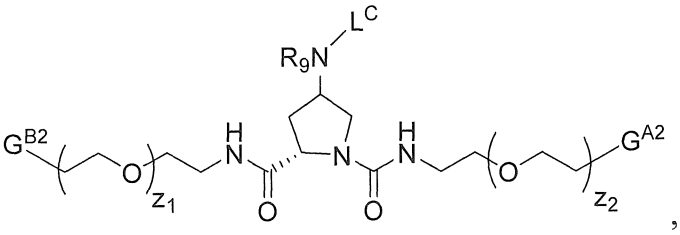

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



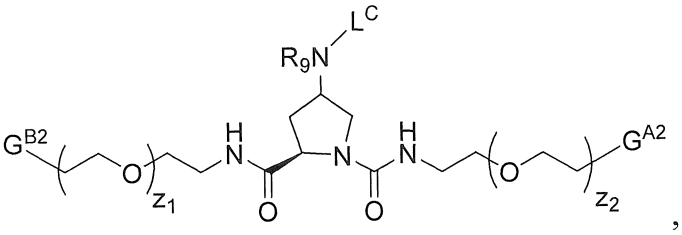
,



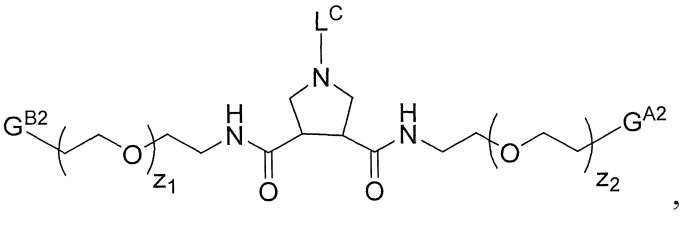
,



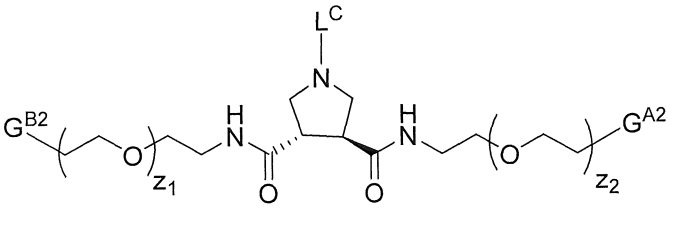
,



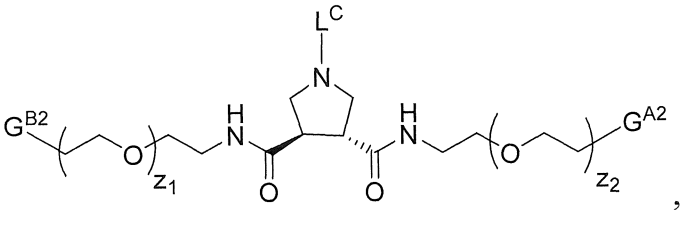
,



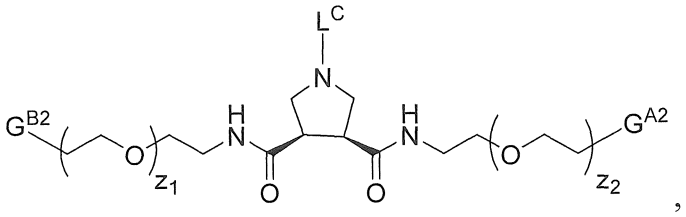
,



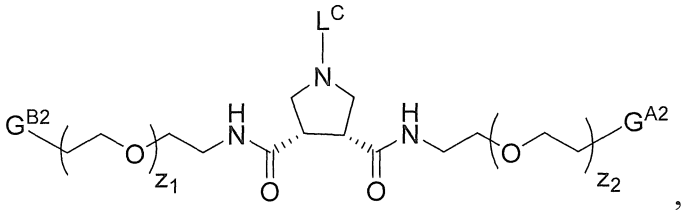
,



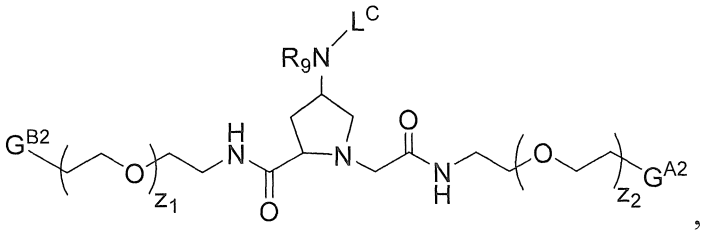
,



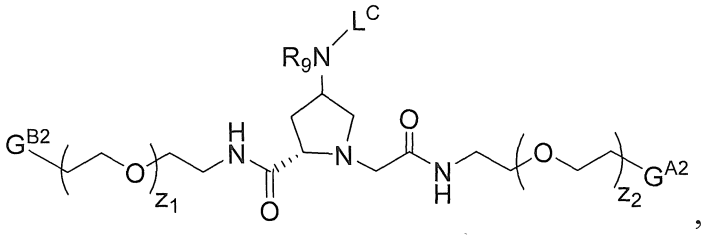
,



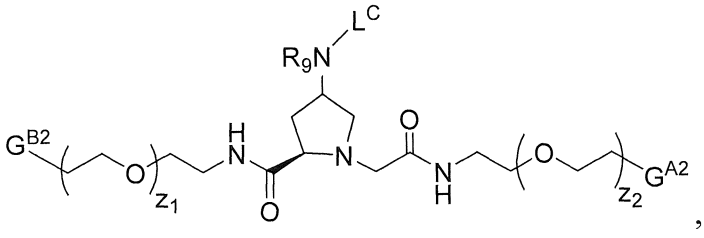
,



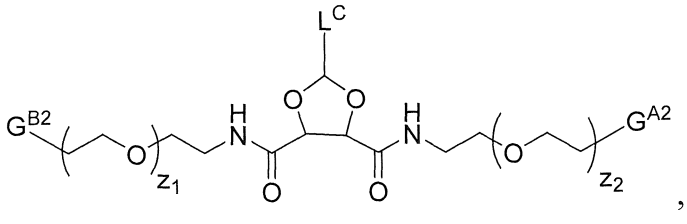
,



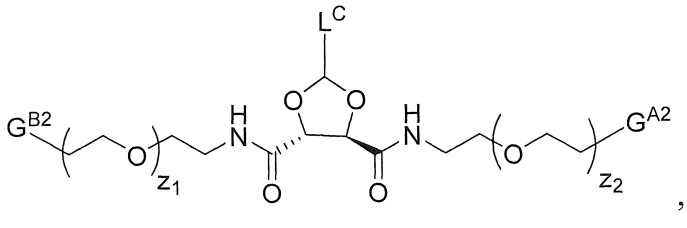
,



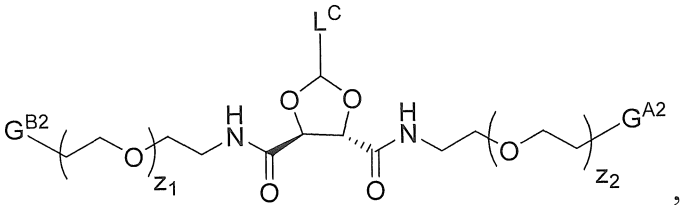
,



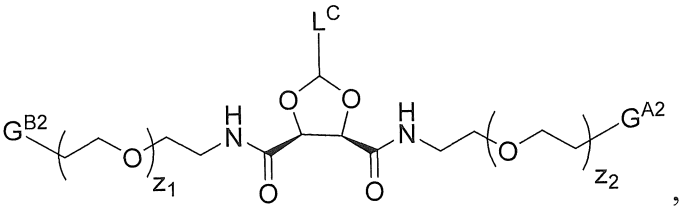
,



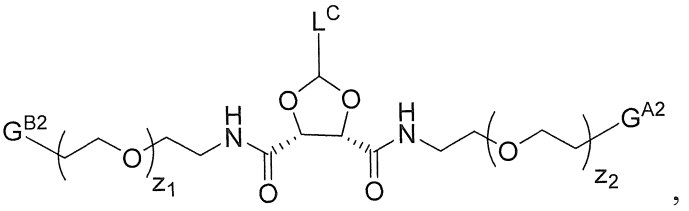
,



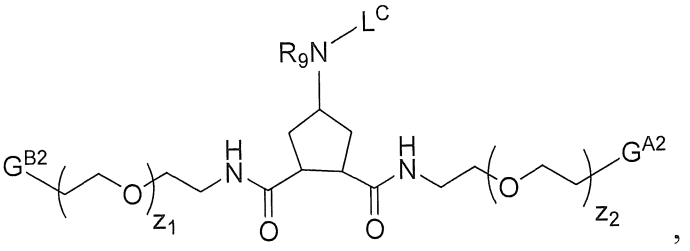
,



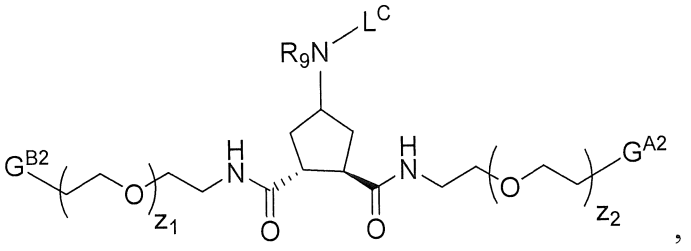
,



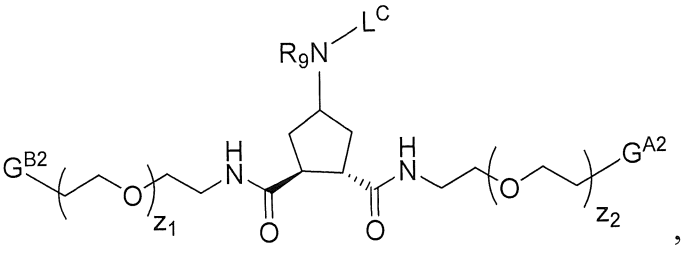
,



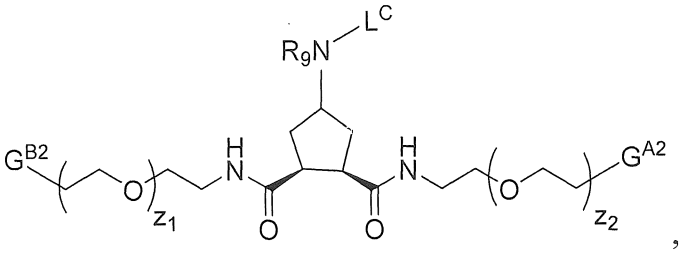
,



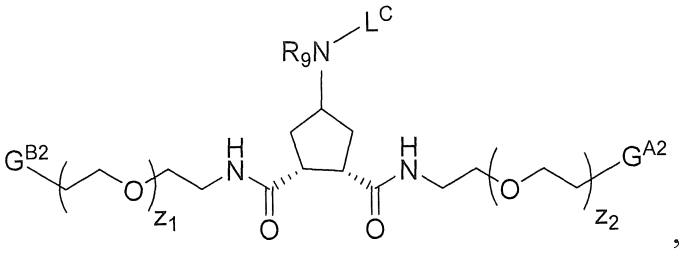
,



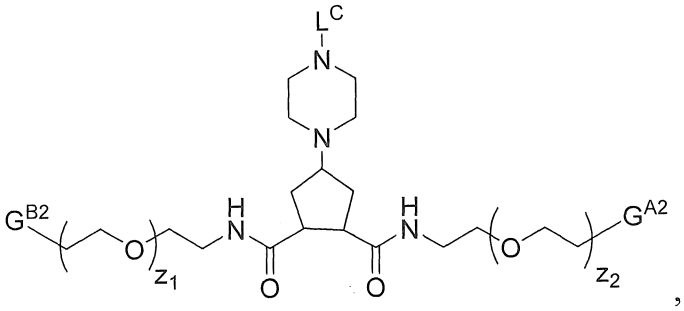
,



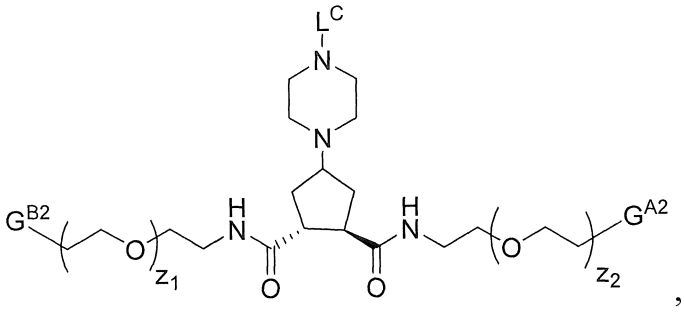
,



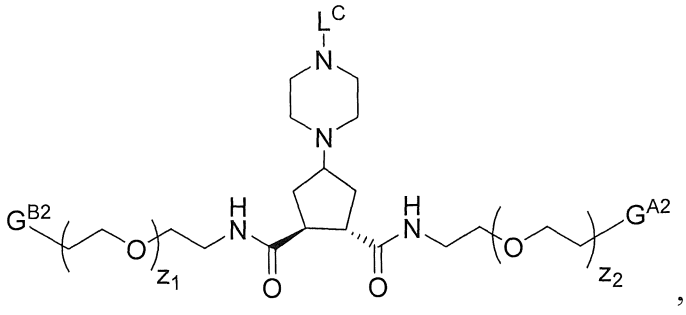
,



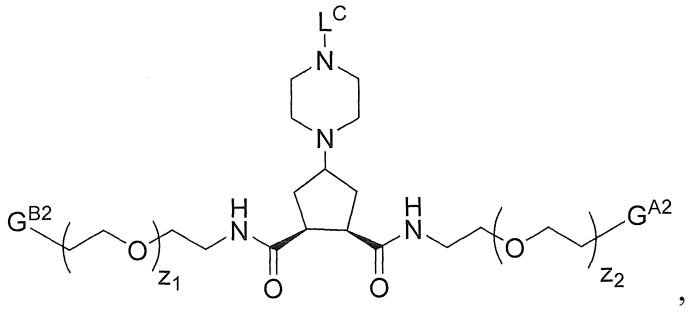
,



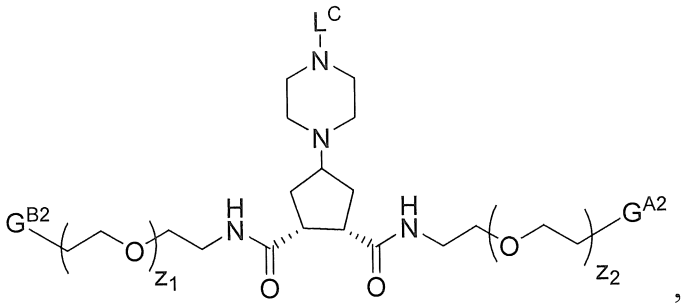
,

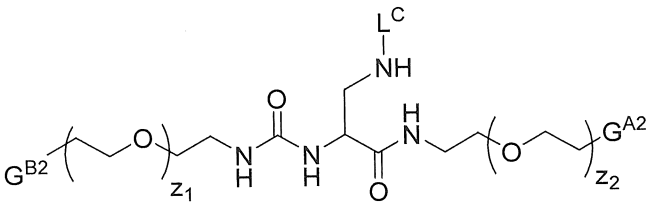


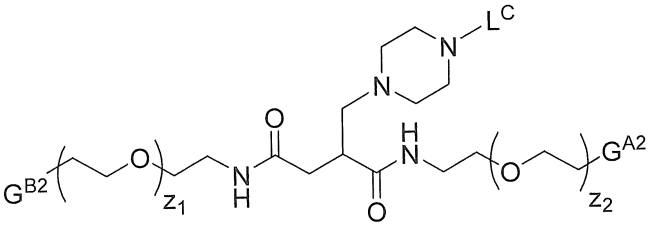
,

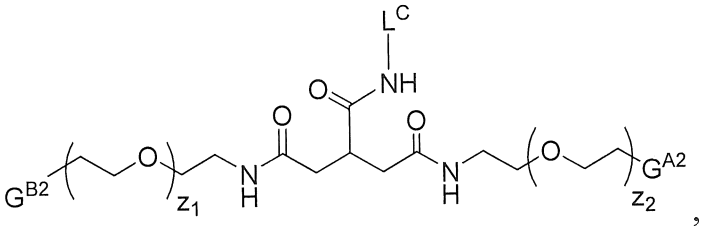


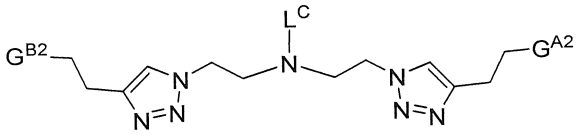
,

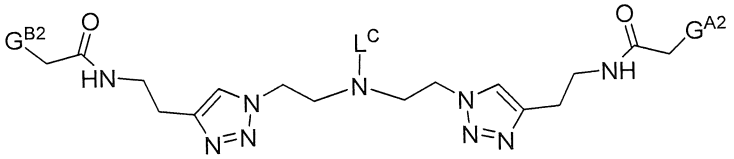


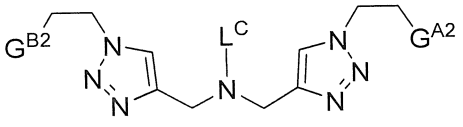


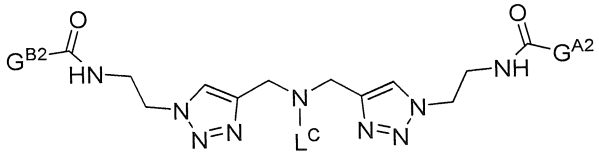


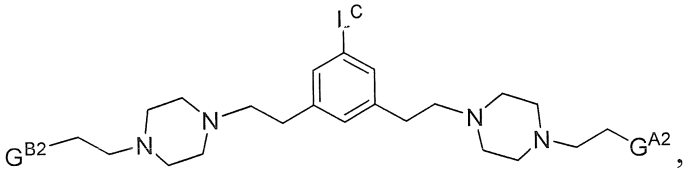


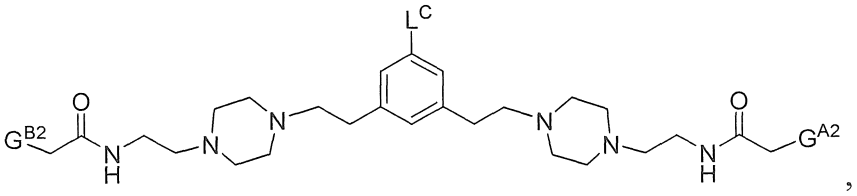


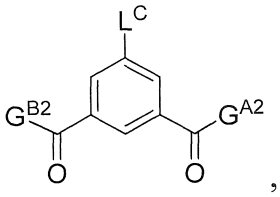


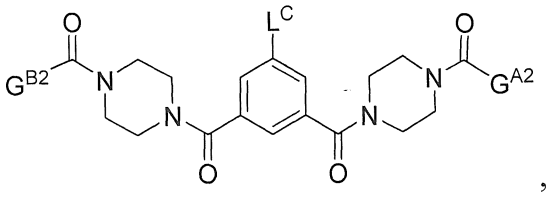


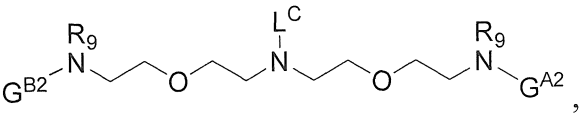


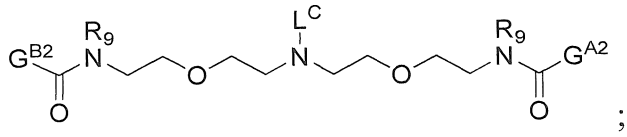


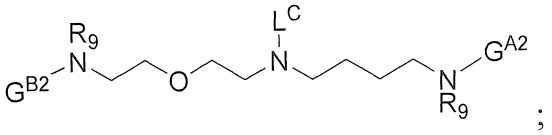

,

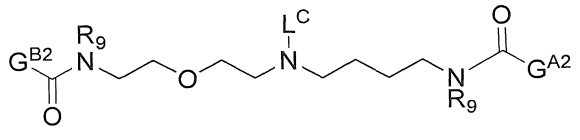

,

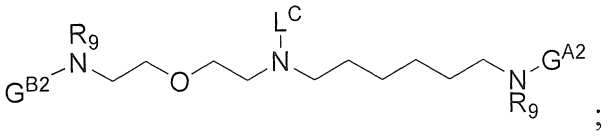

,

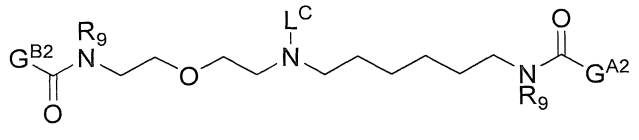

,

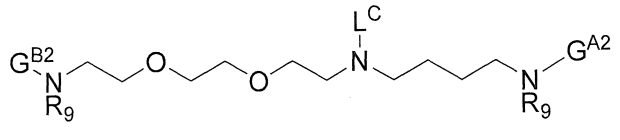

;

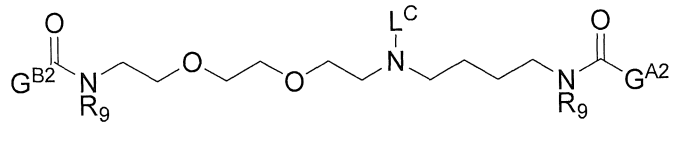

;

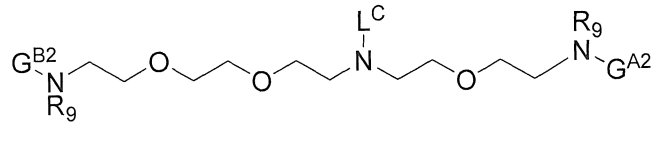

;

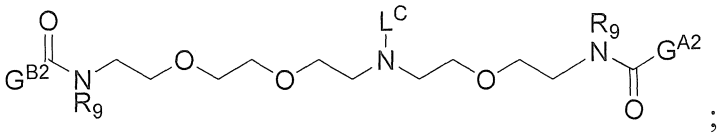

;

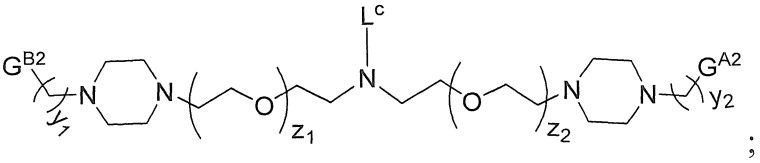

;

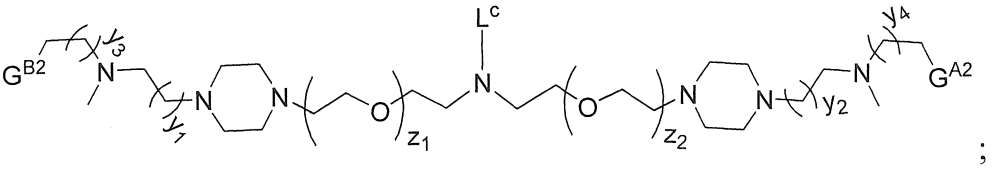

;

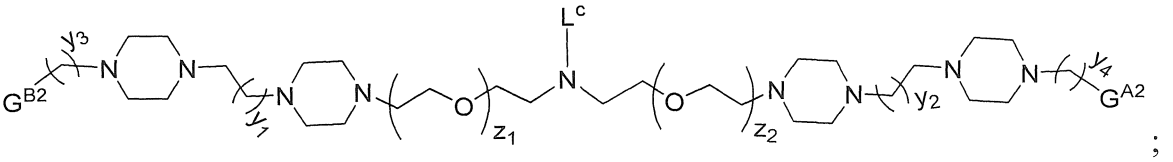

;


;


;

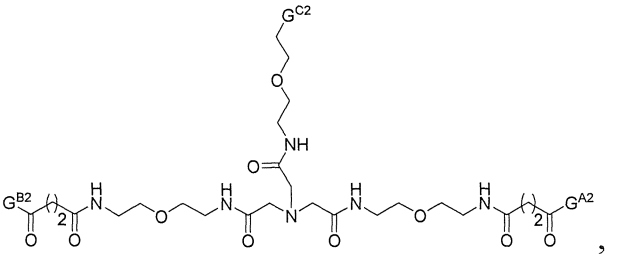

;

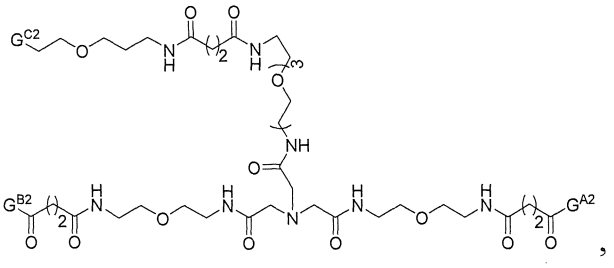

; hoặc

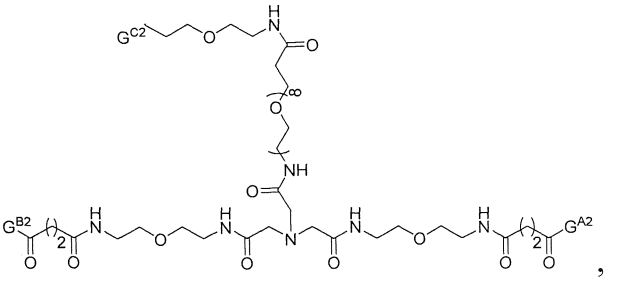

;

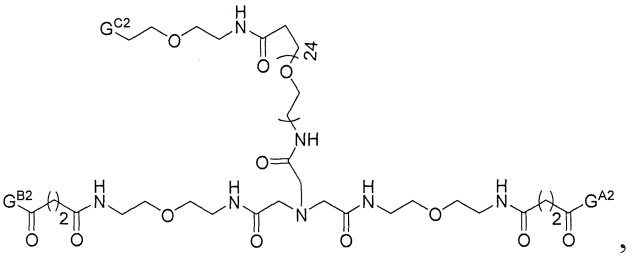
trong đó mỗi z_1 và z_2 là độc lập và là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20; và R_9 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

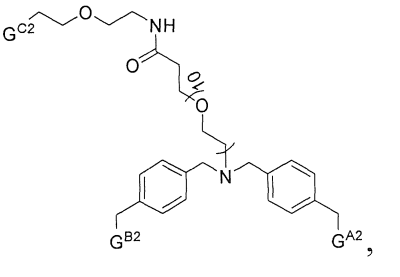
Theo một số phương án, L là

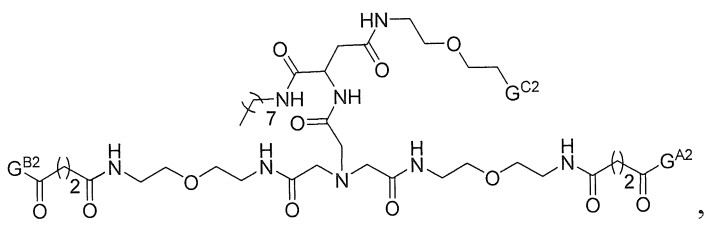
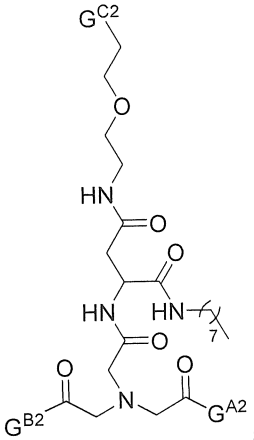
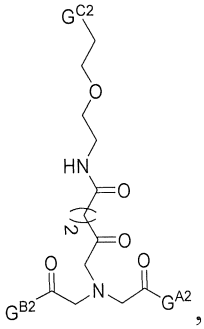
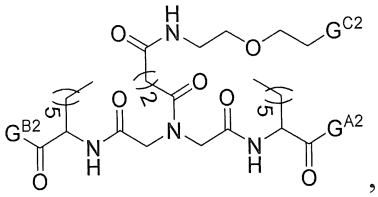
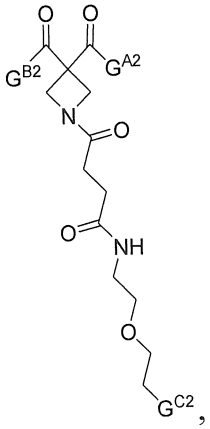
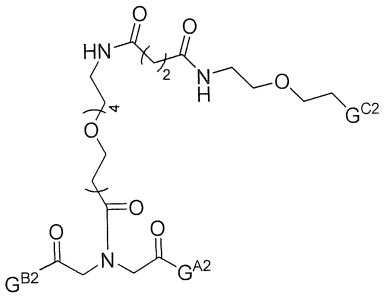
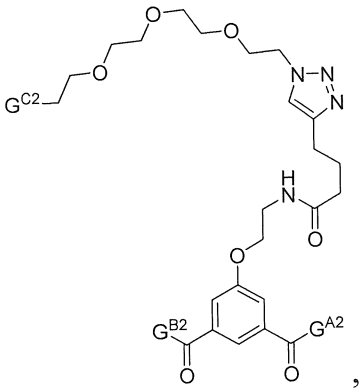
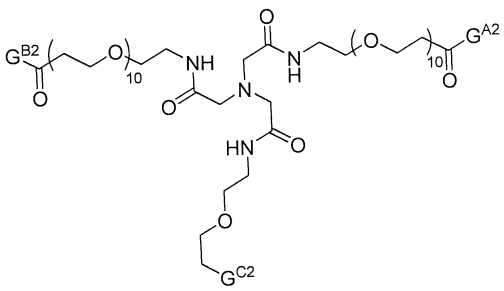
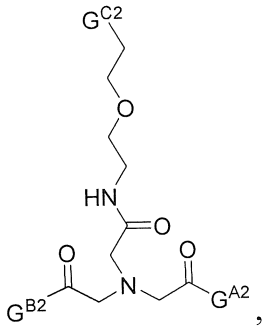
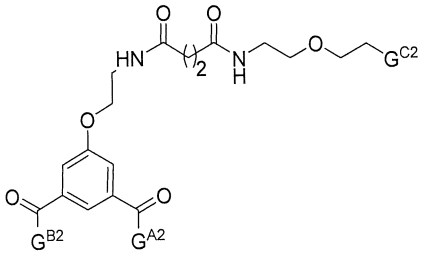
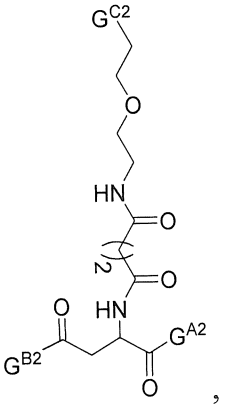
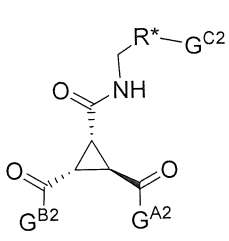
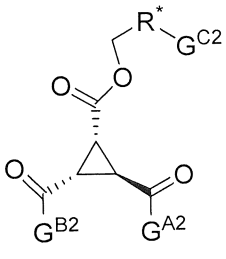

,

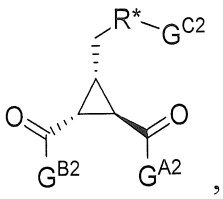
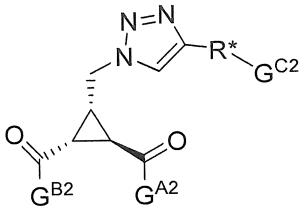
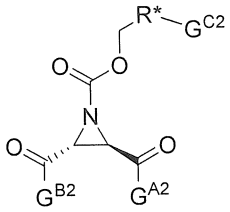
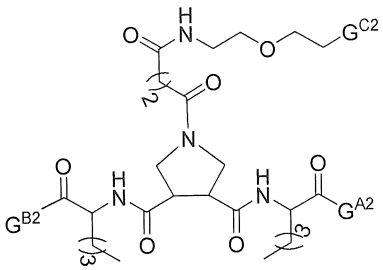
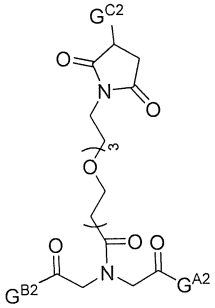
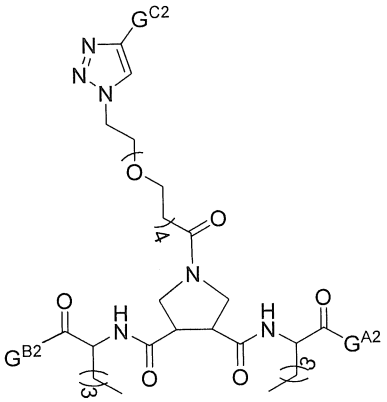
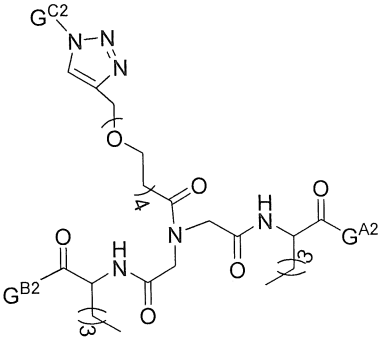
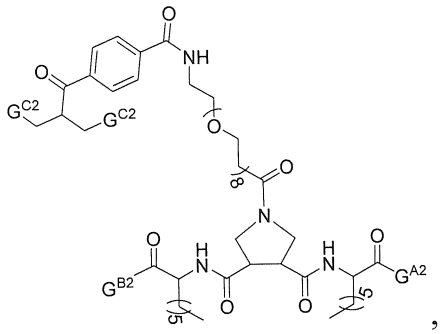
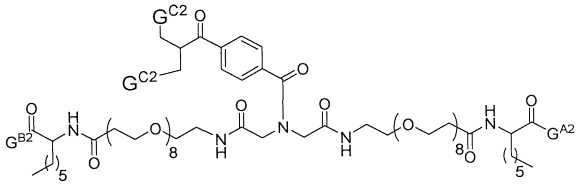
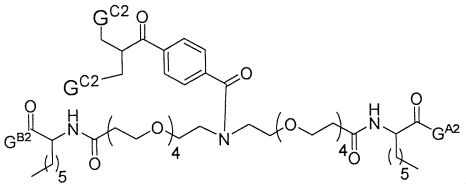
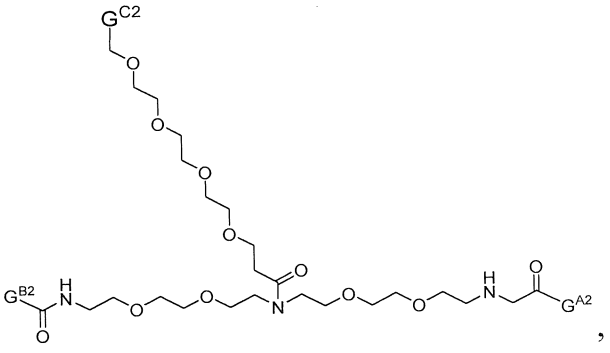
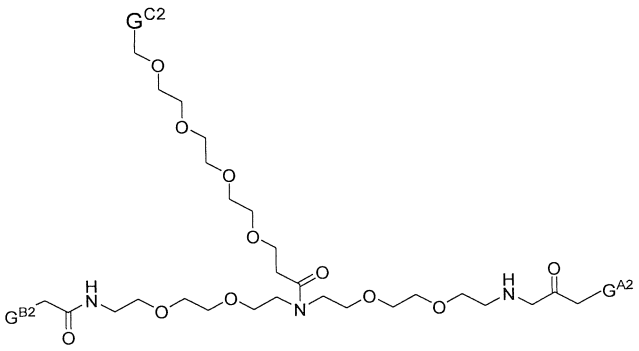
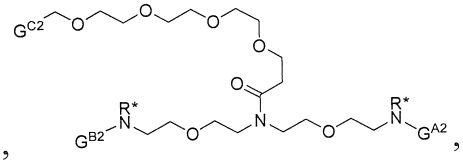

,

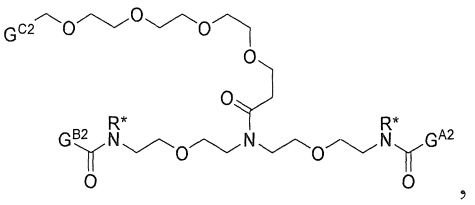

,

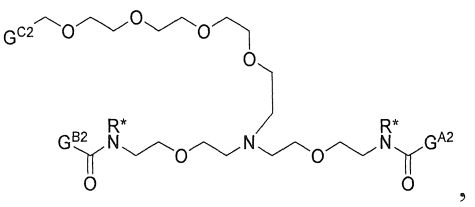

,

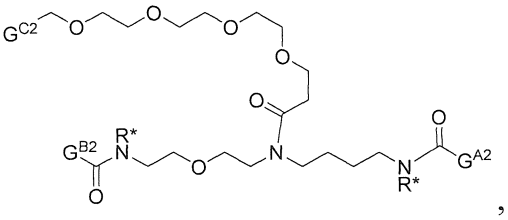

,

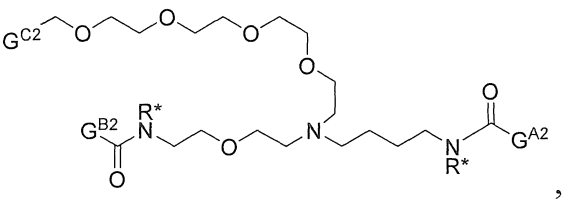

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

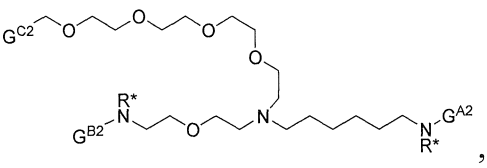

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

.

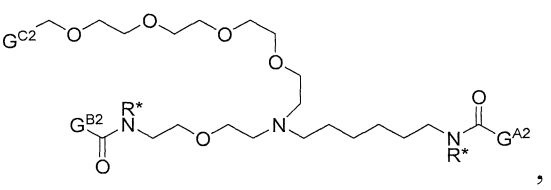

,

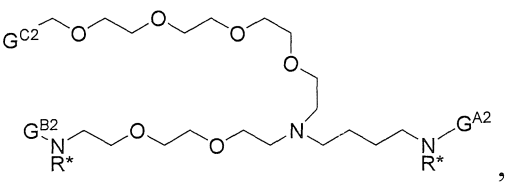

,

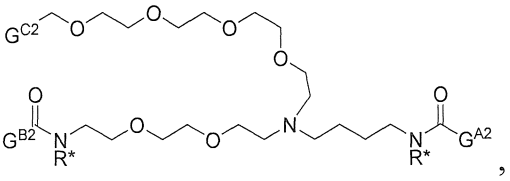

,

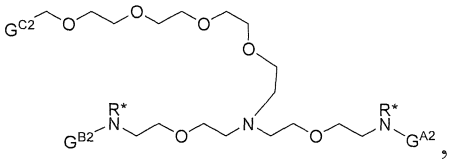

,

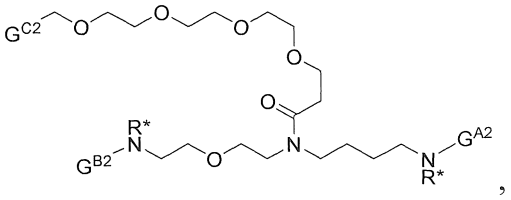

,

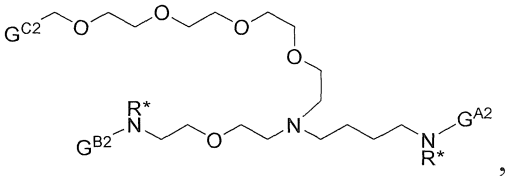

,

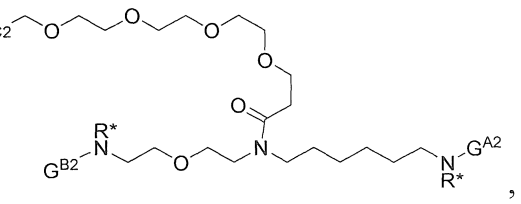

,


,

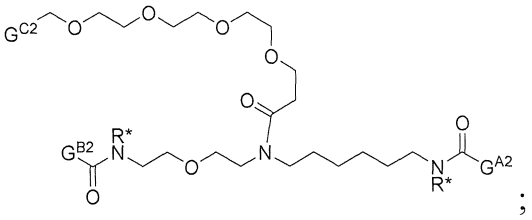

,

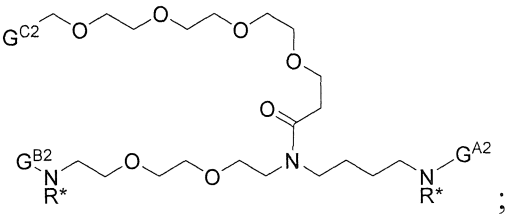

,

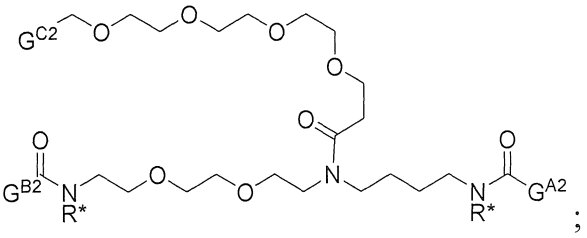

,

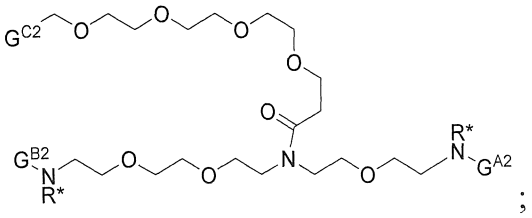

,

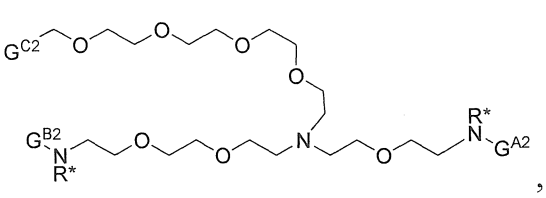
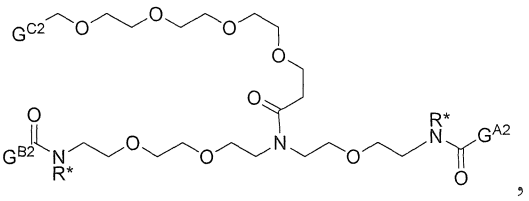
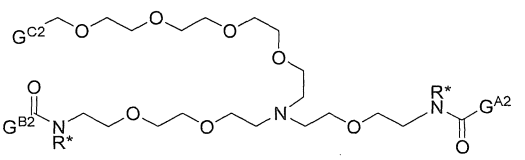
,


;

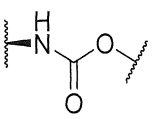

;

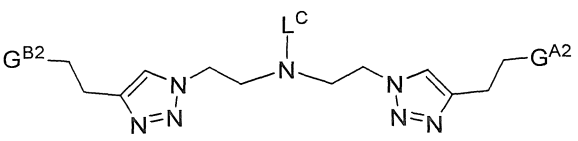

;

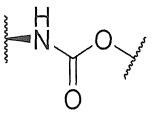

;

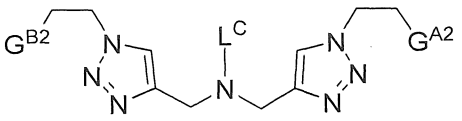




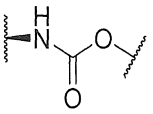
trong đó R* là liên kết hoặc bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý, O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, và imino, và trong đó R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý.

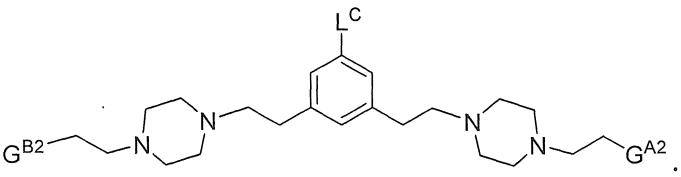
Theo một số phương án, Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:


.

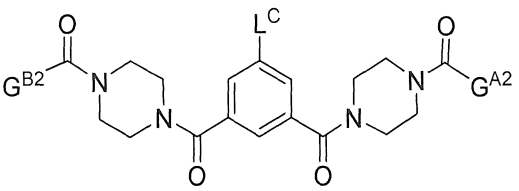
Theo một số phương án, Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:



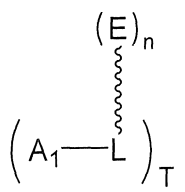
Theo một số phương án, Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:



Theo một số phương án, Y là:  (-O-) và L là:



Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):



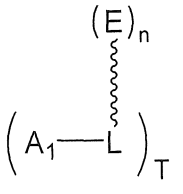
(M-I)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức từ (A-I) đến (A-XII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E và A_1, hoặc muối dược dụng

của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII). Theo một số phương án, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII). Theo các phương án khác, mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức (A-I).

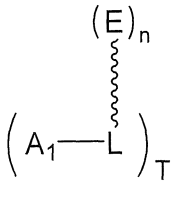
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):



(M-I)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E và A_1, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-V).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I):

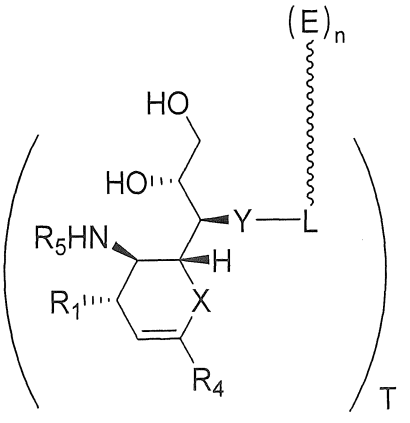


(M-I)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit

liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20); và L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với mỗi E và A_1, hoặc muối dược dụng của nó. Khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1 có thể được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-VI)-(A-IX).

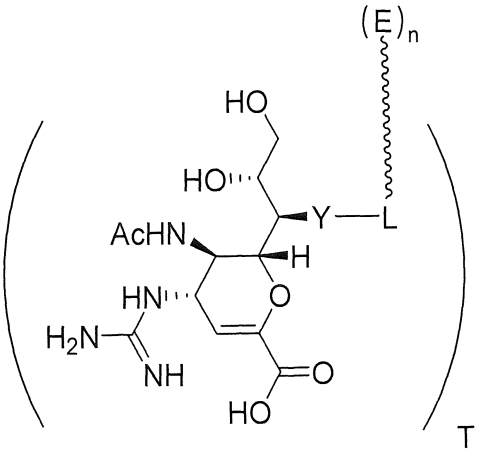
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II):



(M-II)

hoặc muối dược dụng của nó.

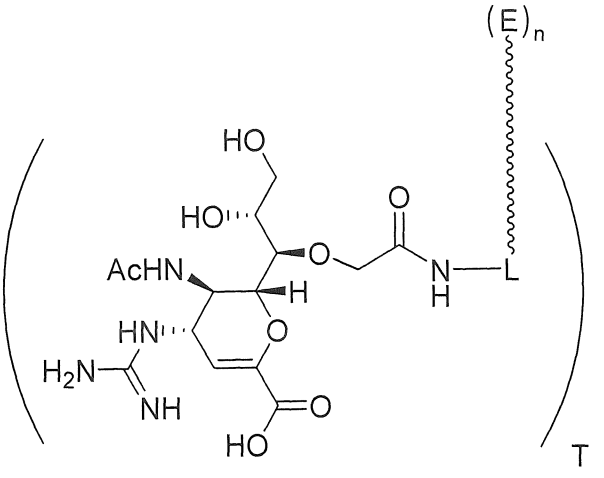
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-1):



(M-II-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

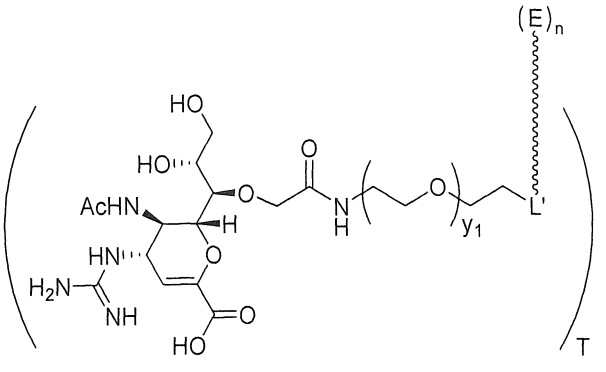
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-2):



(M-II-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

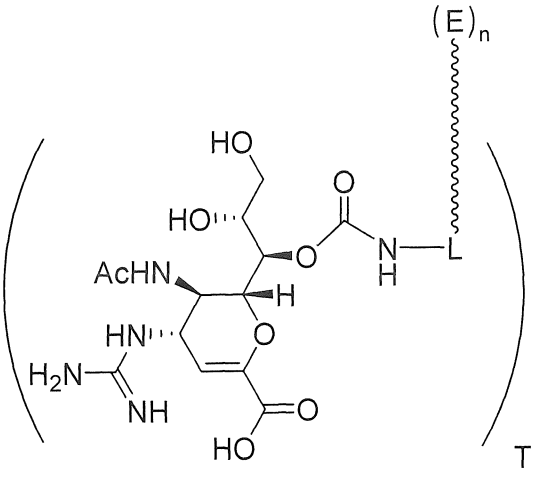
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-3):



(M-II-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

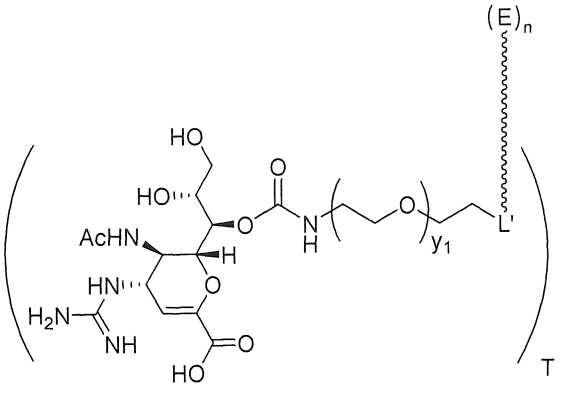
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-4):



(M-II-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

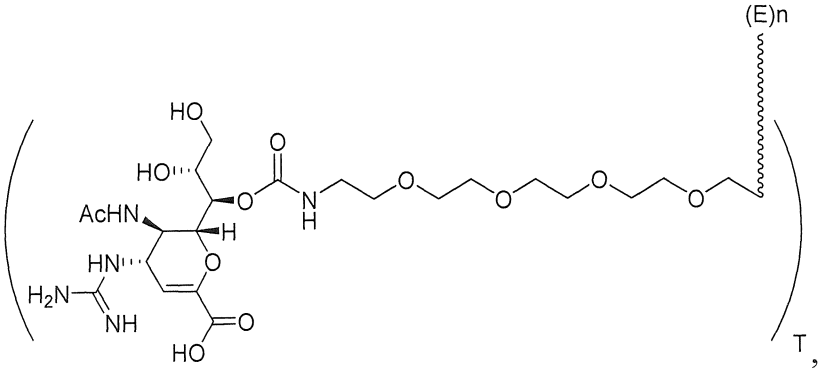
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-5):



(M-II-5)

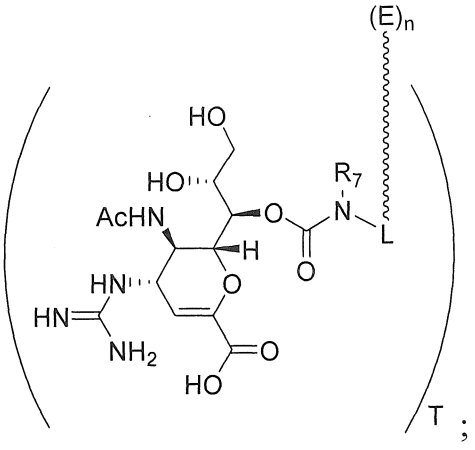
trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

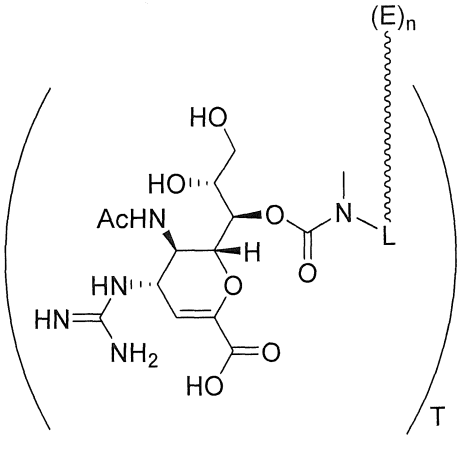
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-6):



(M-II-6)

trong đó R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, R_7 được chọn từ C1-C20 alkyl (ví dụ, metyl, etyl, propyl, hoặc butyl).

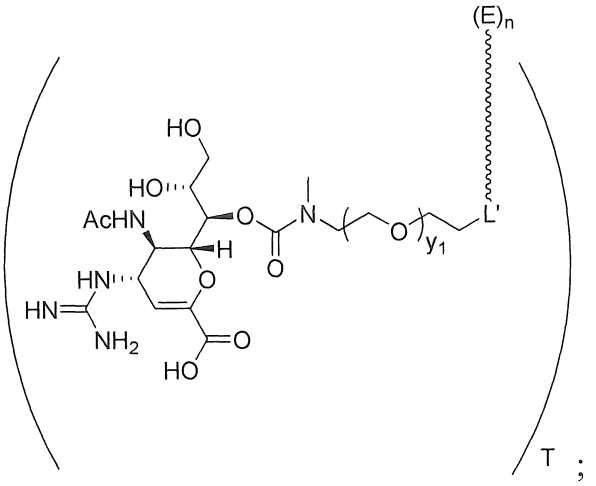
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-7):



(M-II-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

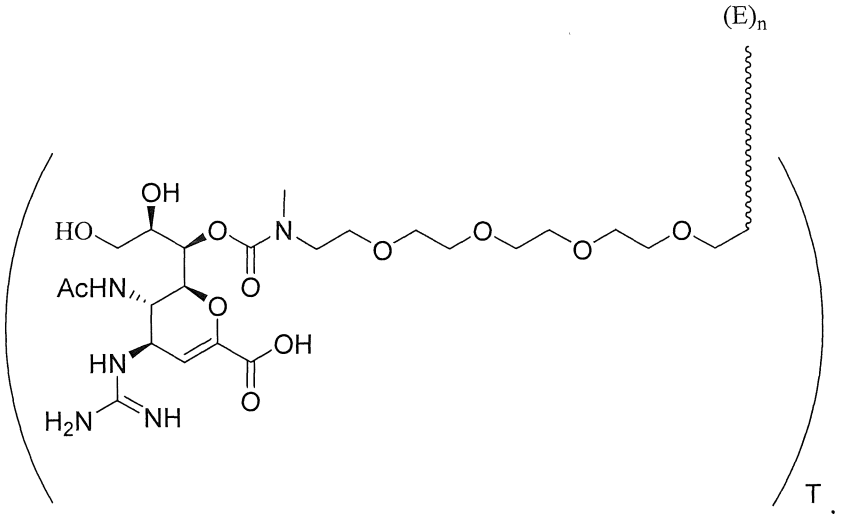
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-8):



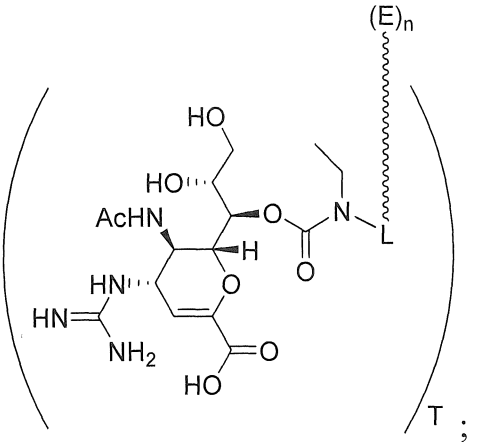
(M-II-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



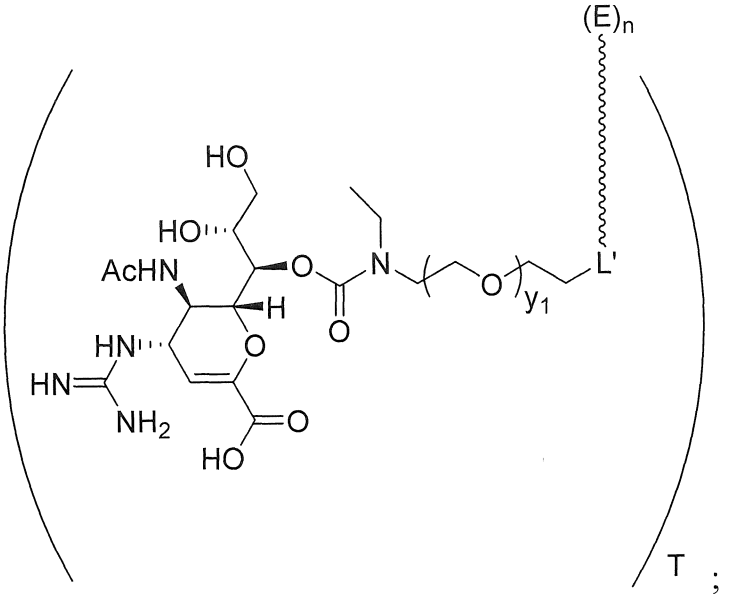
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-9):



(M-II-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

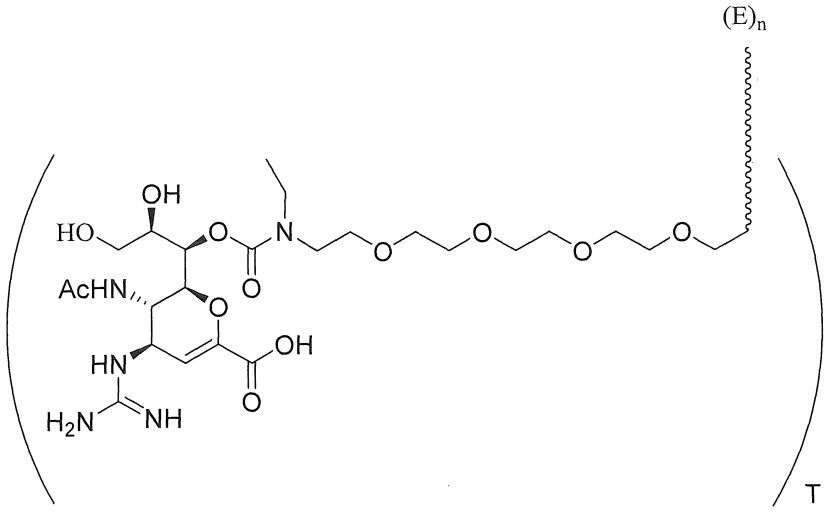
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-II-10):



(M-II-10)

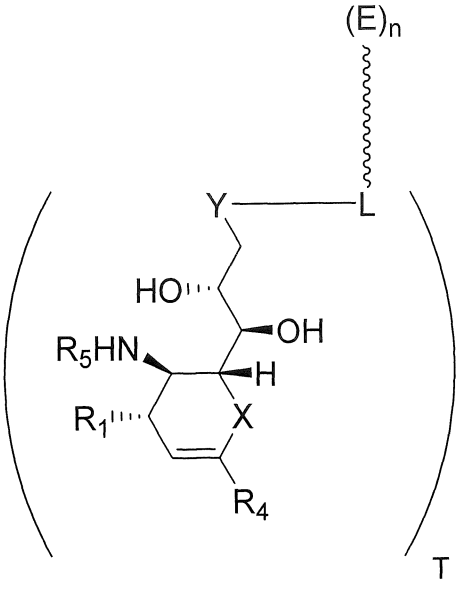
trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

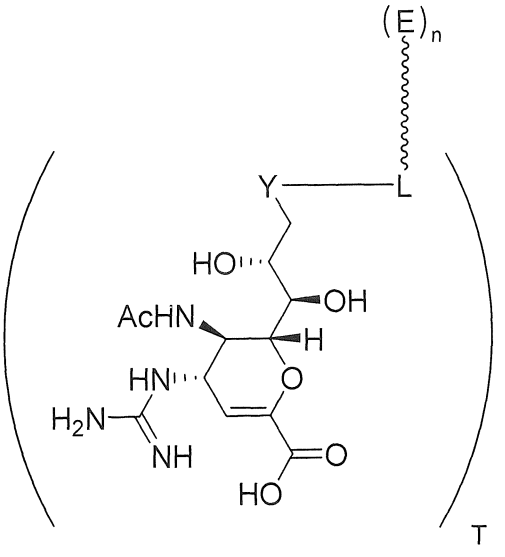
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III):



(M-III)

hoặc muối dược dụng của nó.

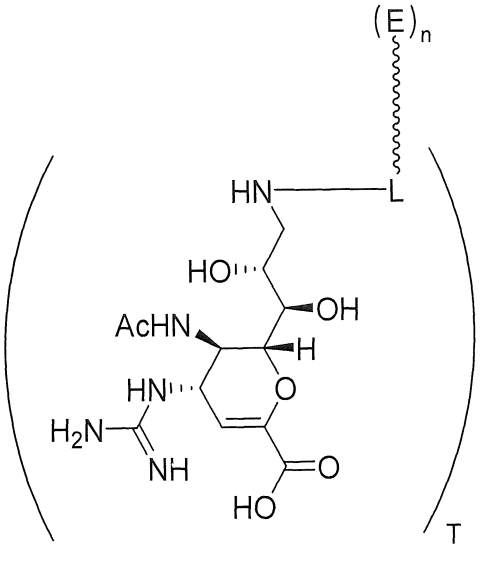
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-1):



(M-III-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

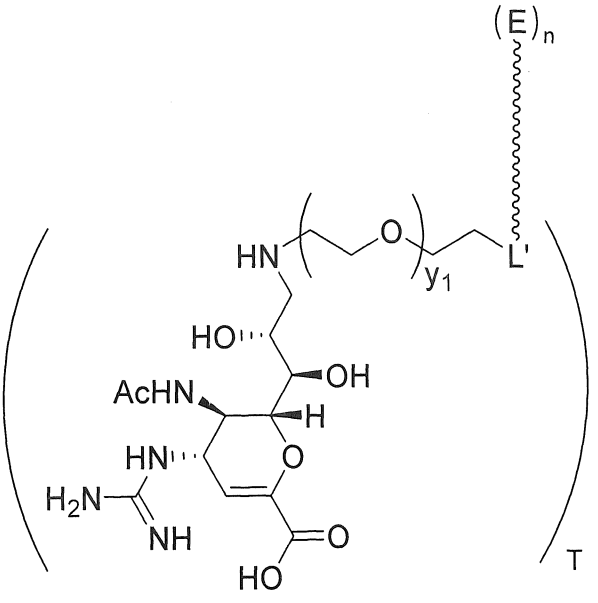
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-2):



(M-III-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

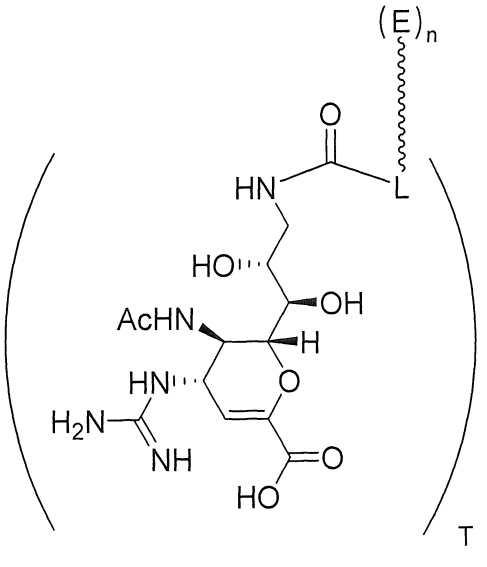
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-3):



(M-III-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

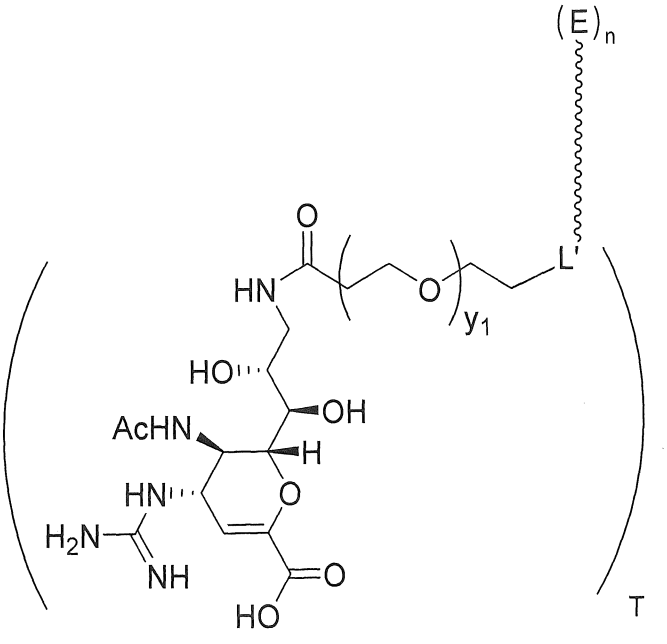
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-4):



(M-III-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

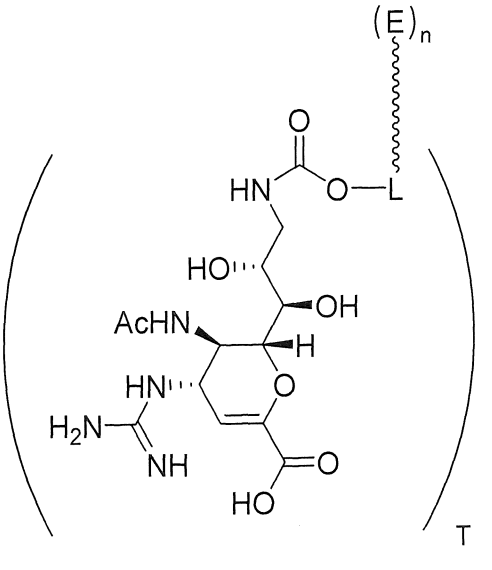
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-5):



(M-III-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

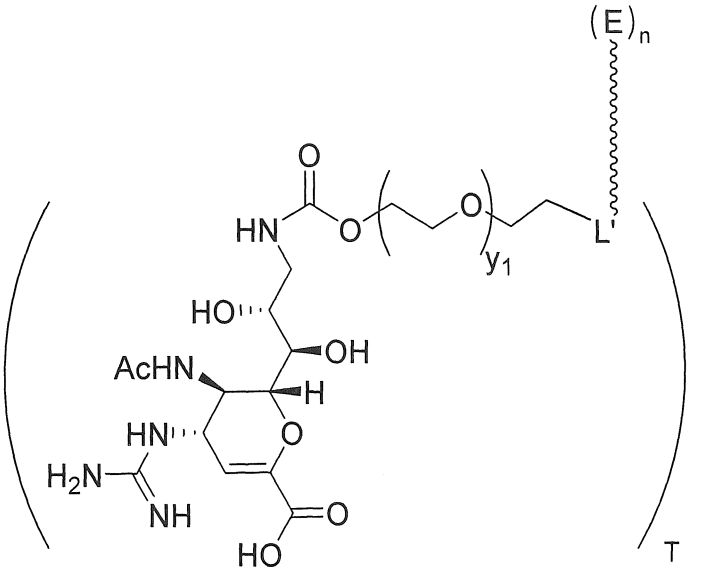
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-6):



(M-III-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

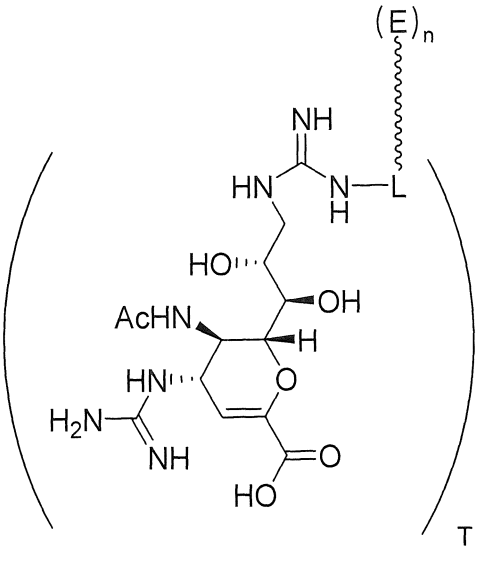
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-7):



(M-III-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

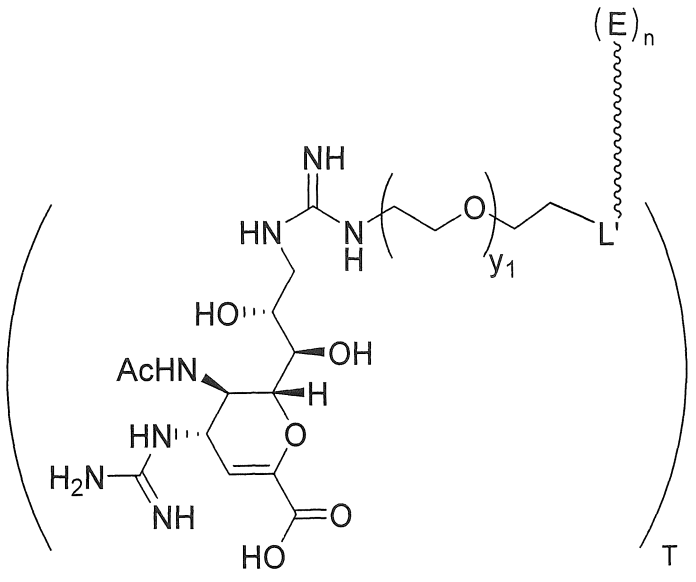
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-8):



(M-III-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

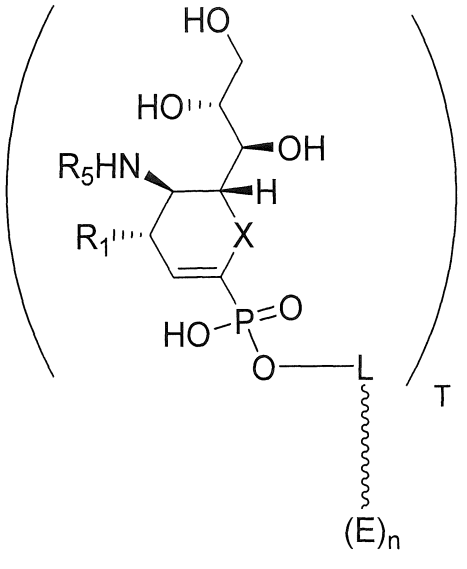
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-III-9):



(M-III-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

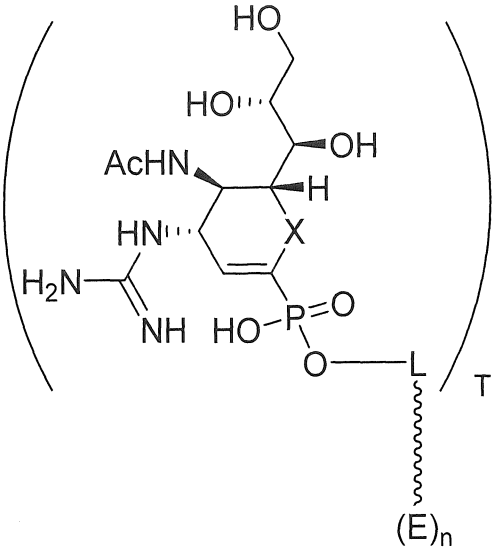
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IV):



(M-IV)

hoặc muối dược dụng của nó.

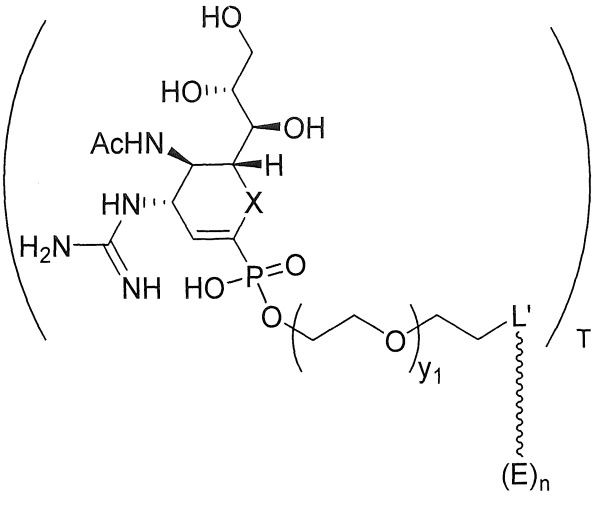
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IV-1):



(M-IV-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

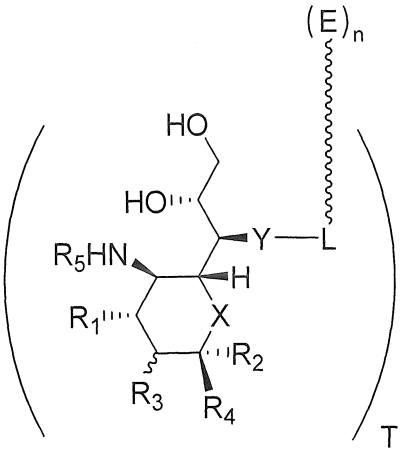
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IV-2):



(M-IV-2)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

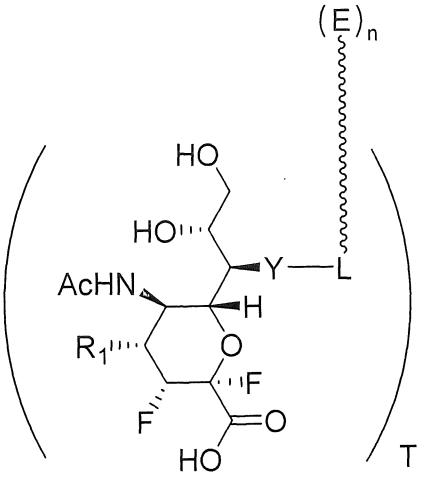
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V):



(M-V)

hoặc muối dược dụng của nó.

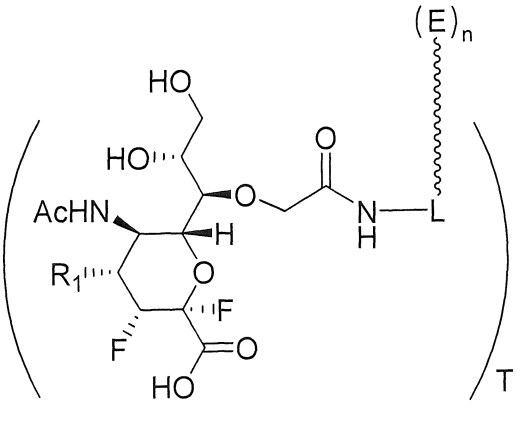
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-1):



(M-V-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

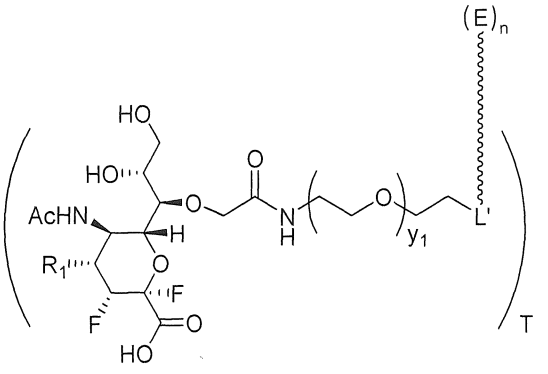
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-2):



(M-V-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

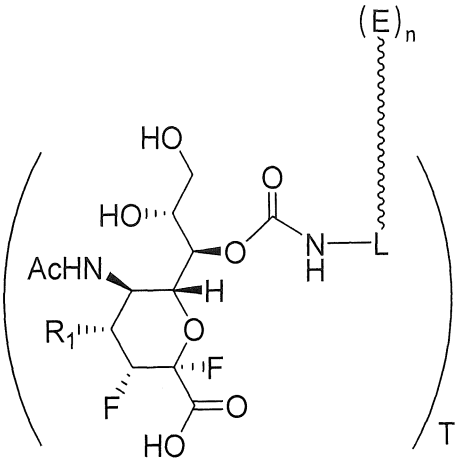
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-3):



(M-V-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

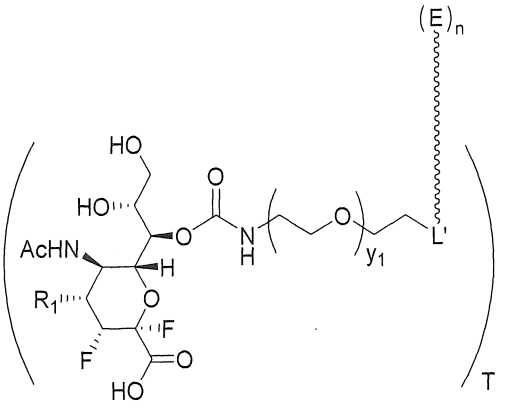
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-4):



(M-V-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

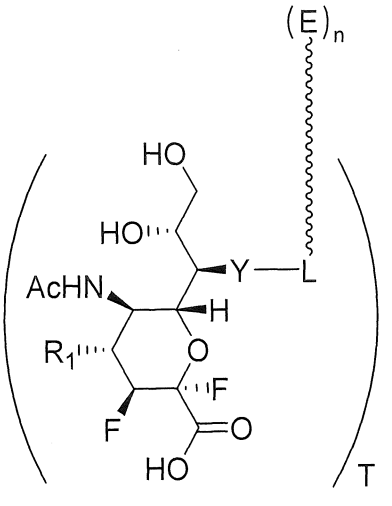
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-5):



(M-V-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

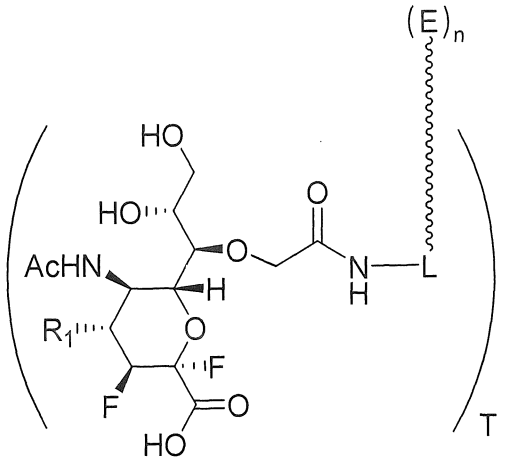
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-6):



(M-V-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

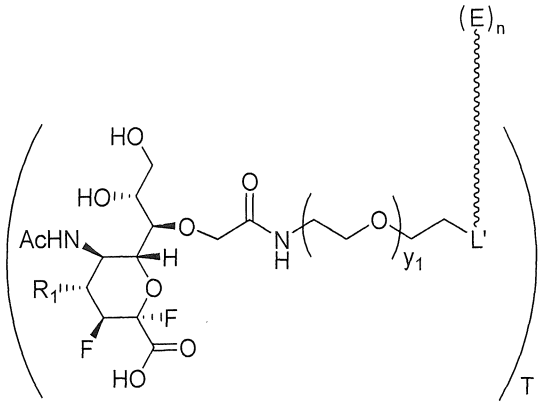
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-7):



(M-V-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

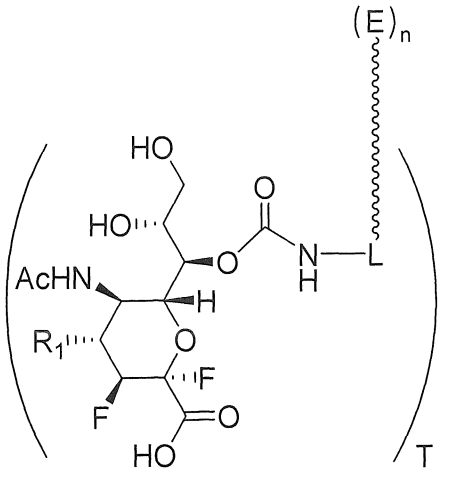
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-8):



(M-V-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

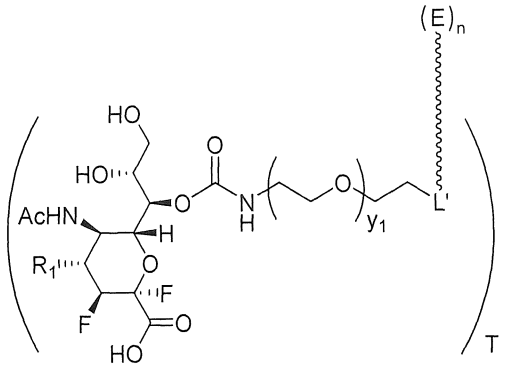
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-9):



(M-V-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

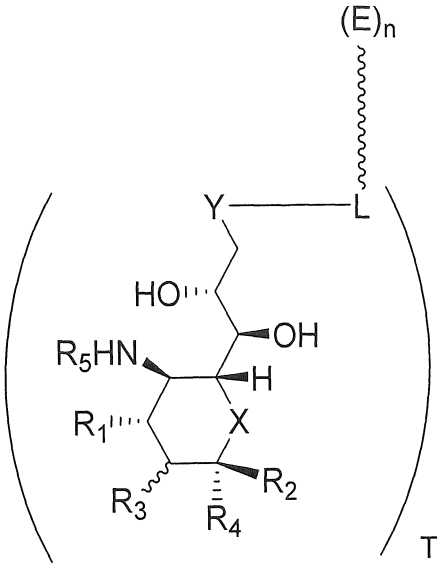
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-V-10):



(M-V-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

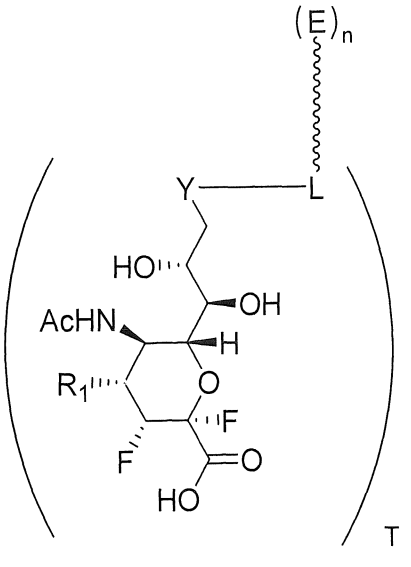
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI):



(M-VI)

hoặc muối dược dụng của nó.

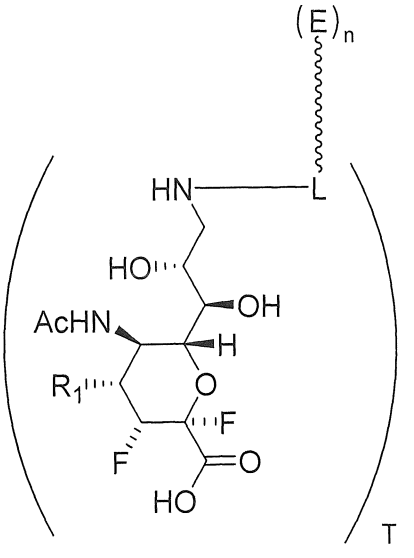
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-1):



(M-VI-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

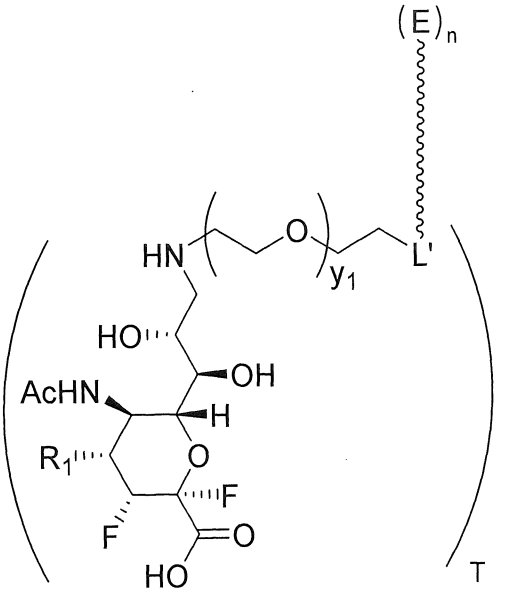
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-2):



(M-VI-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

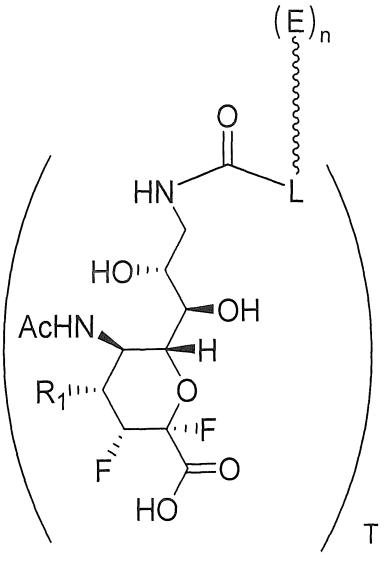
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-3):



(M-VI-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

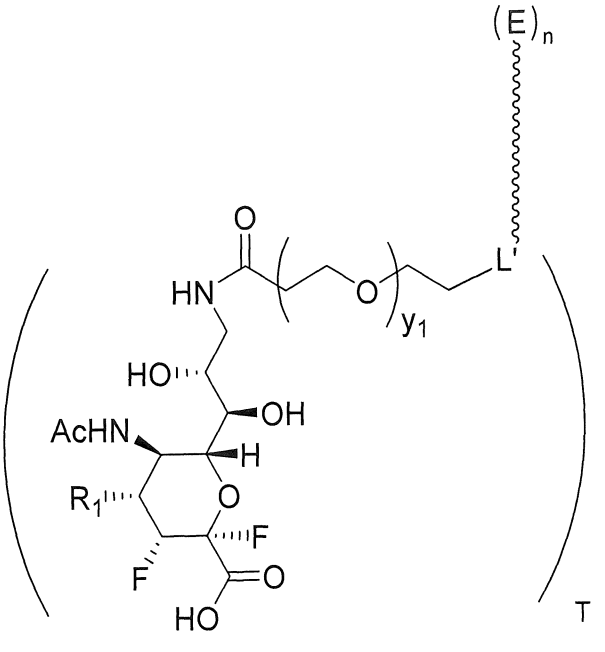
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-4):



(M-VI-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

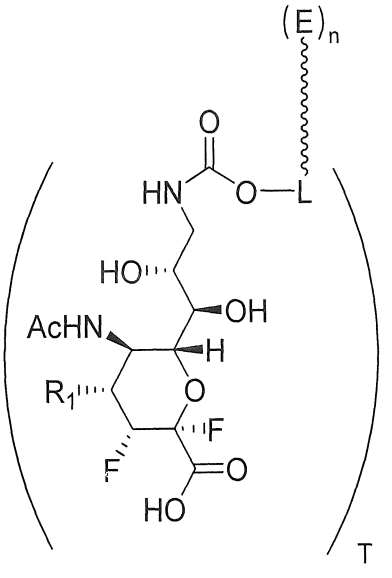
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-5):



(M-VI-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

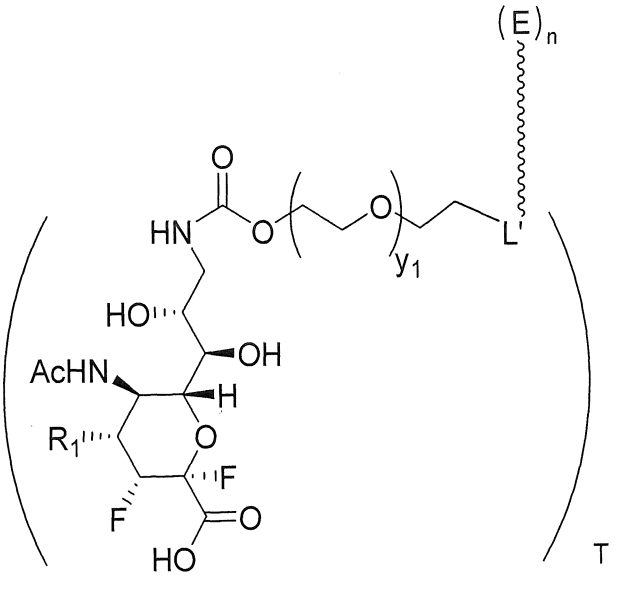
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-6):



(M-VI-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

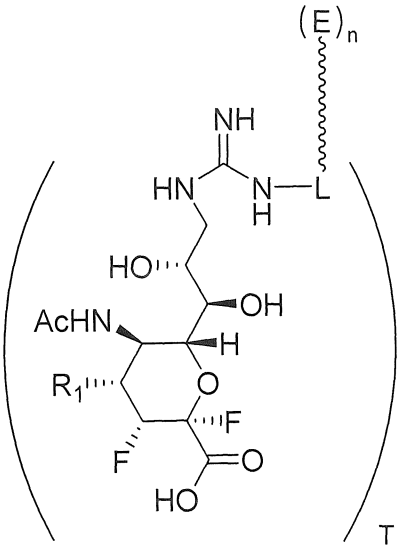
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-7):



(M-VI-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

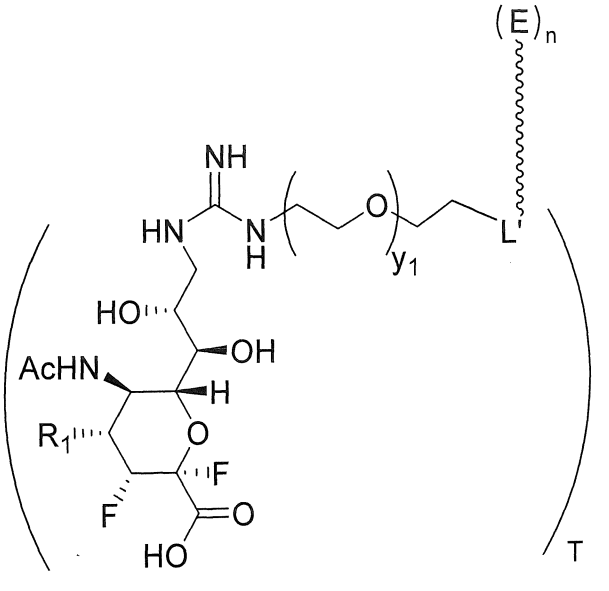
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-8):



(M-VI-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

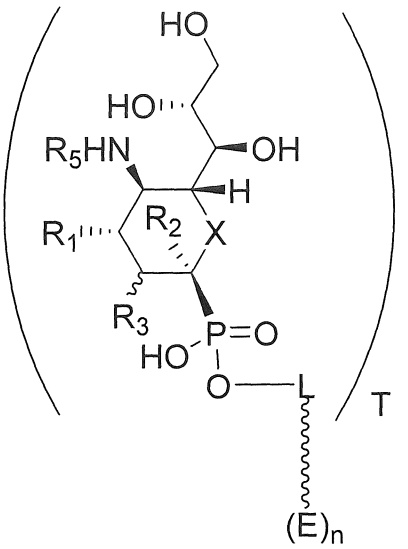
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VI-9):



(M-VI-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VII):

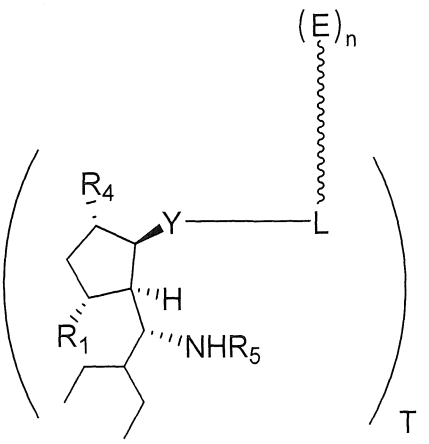


(M-VII)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là OH. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là NH_2. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là -NHC(=NH)NH_2.

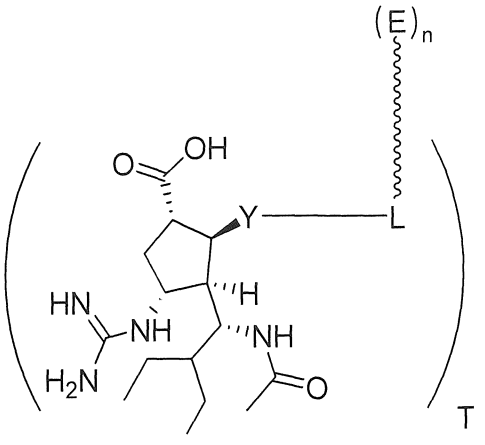
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII):



(M-VIII)

hoặc muối dược dụng của nó.

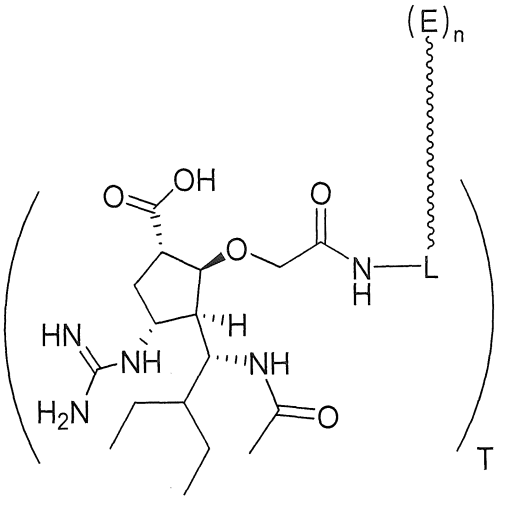
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-1):



(M-VIII-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

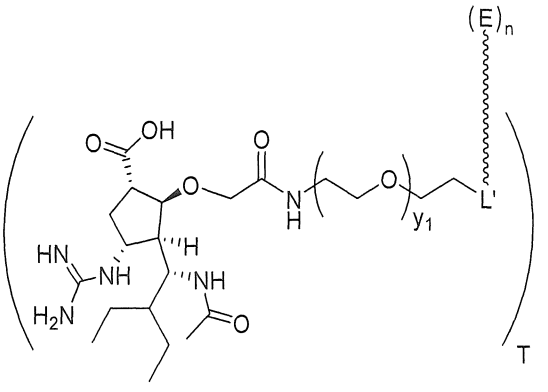
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng (M-VIII-2):



(M-VIII-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

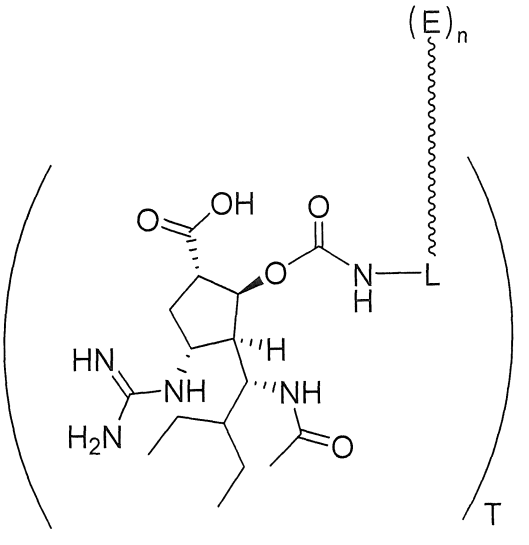
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-3):



(M-VIII-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

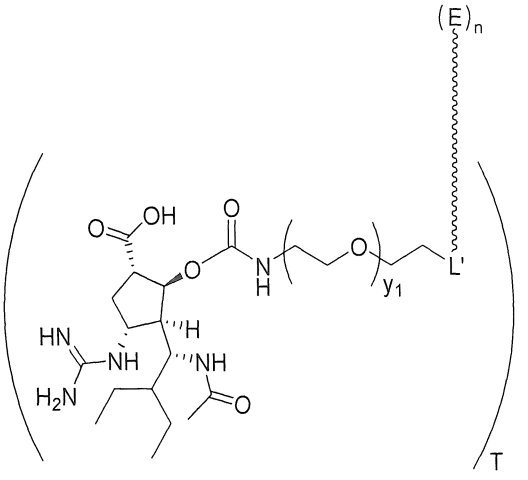
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-4):



(M-VIII-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

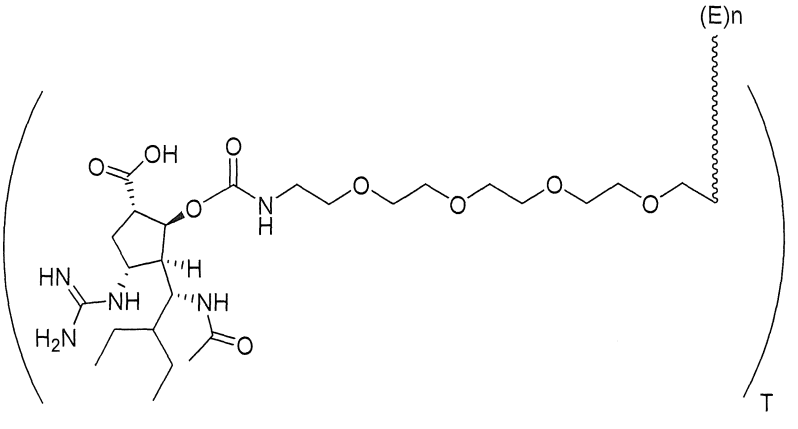
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-5):



(M-VIII-5)

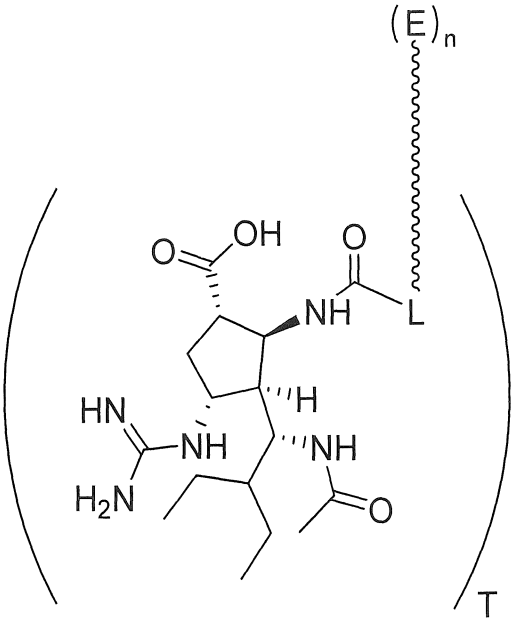
trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

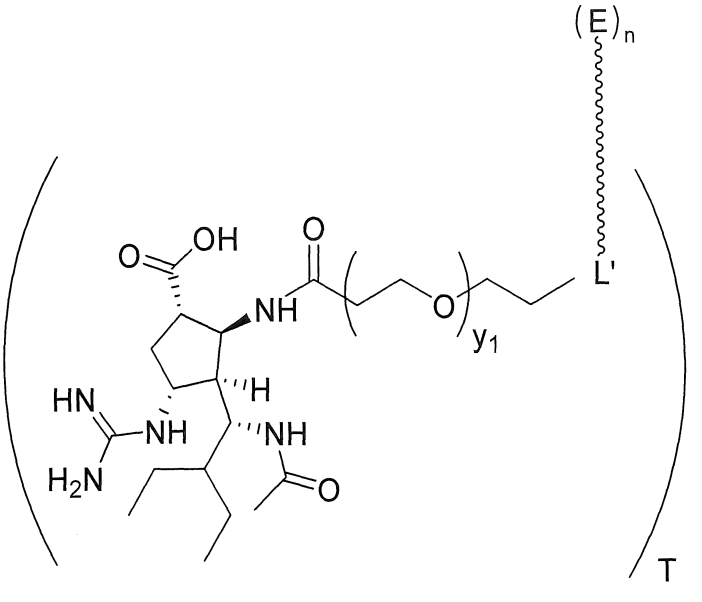
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-6):



(M-VIII-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

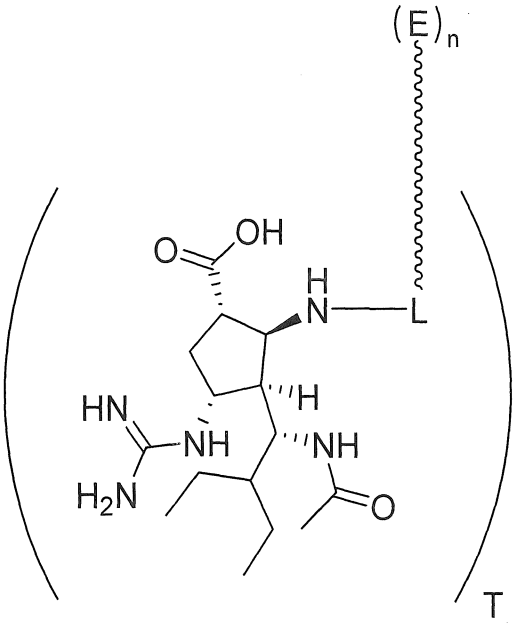
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-7):



(M-VIII-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

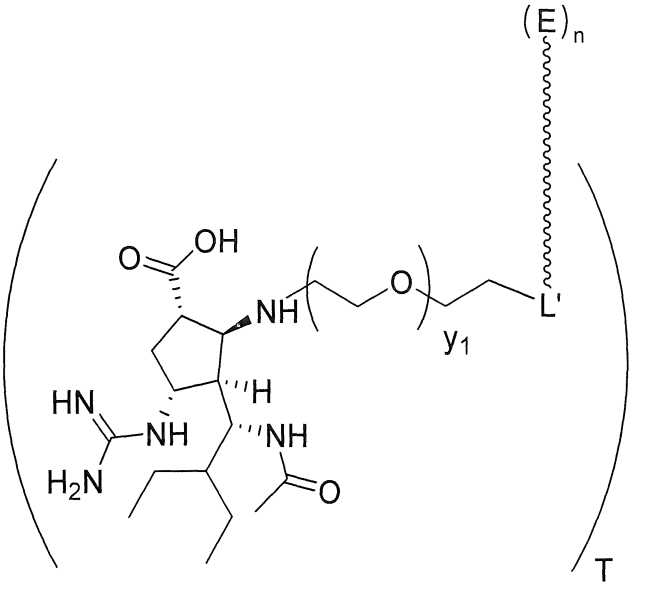
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-8):



(M-VIII-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

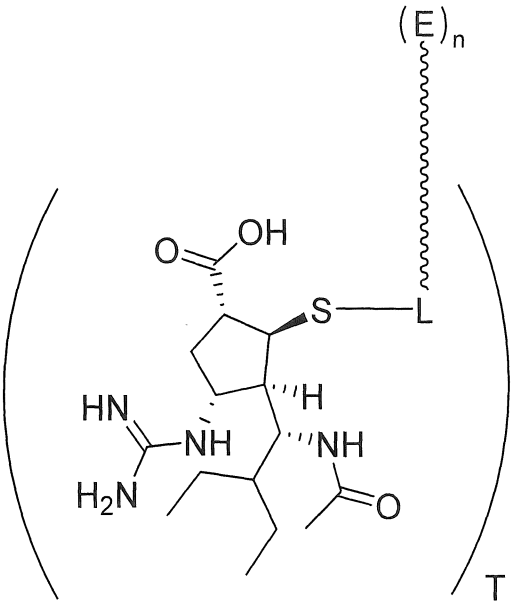
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-9):



(M-VIII-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

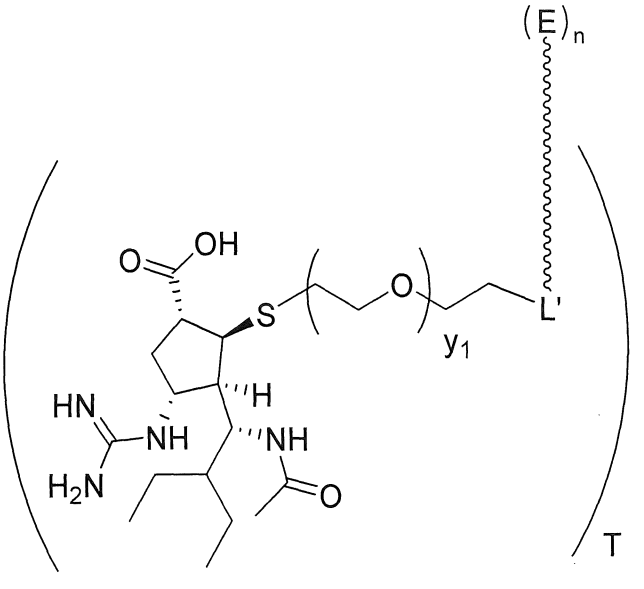
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-10):



(M-VIII-10)

hoặc muối dược dụng của nó.

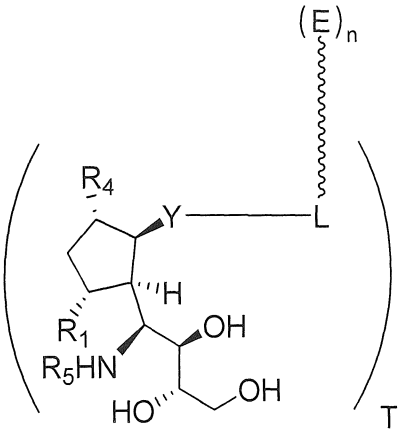
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-VIII-11):



(M-VIII-11)

trong đó L' là phần còn lại của L, và y_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, y_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

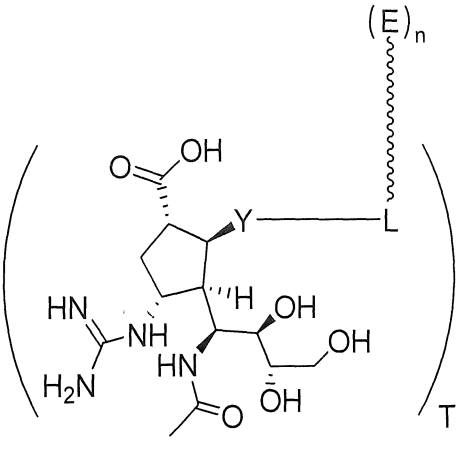
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX):



(M-IX)

hoặc muối dược dụng của nó.

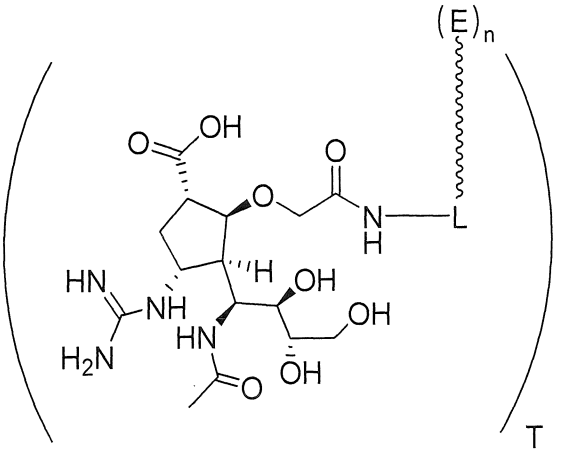
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-1):



(M-IX-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

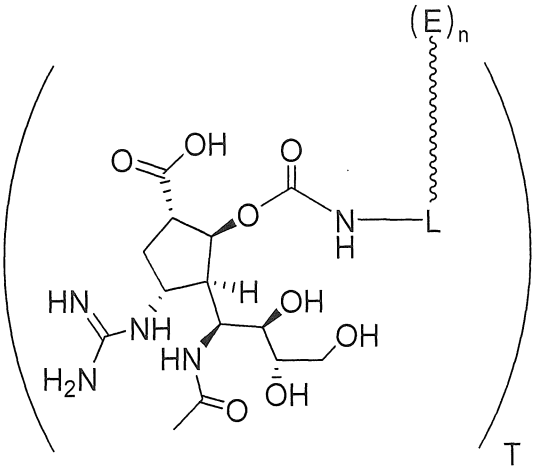
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-2):



(M-IX-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

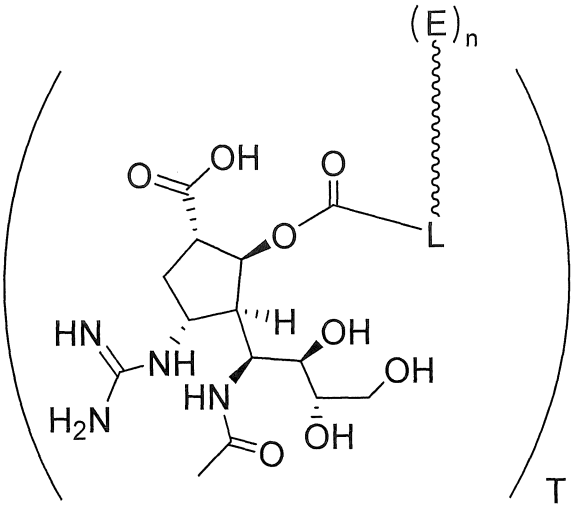
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-3):



(M-IX-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

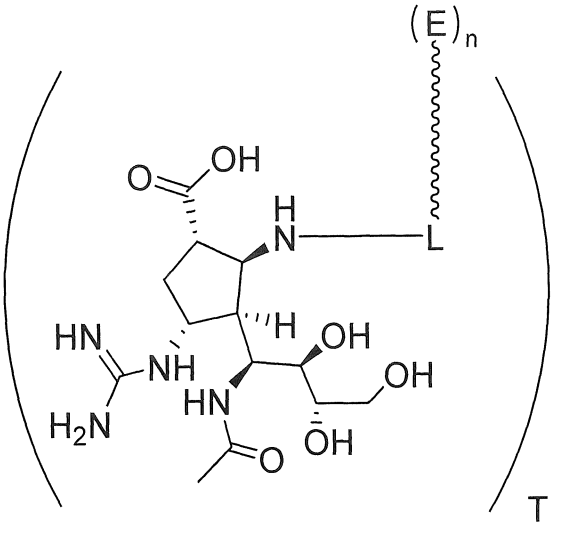
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-4):



(M-IX-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

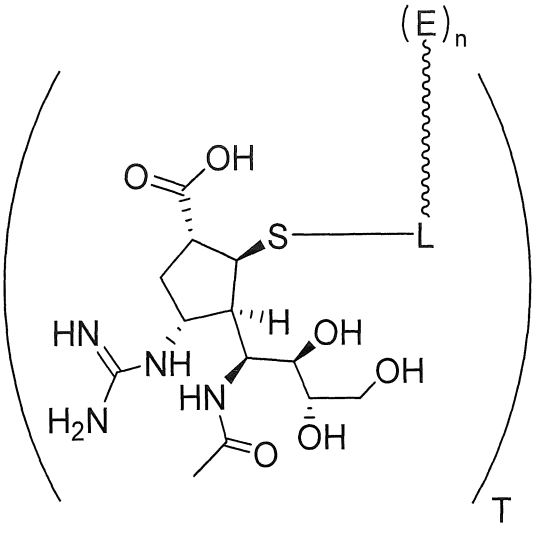
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-5):



(M-IX-5)

hoặc muối dược dụng của nó.

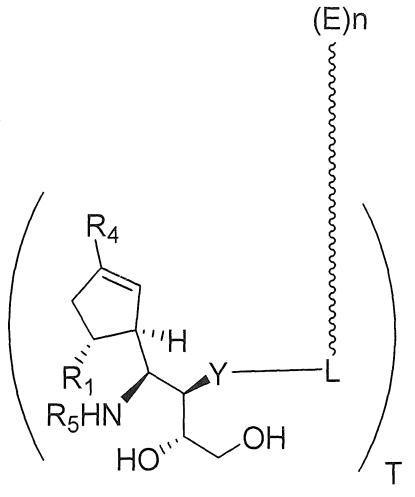
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-IX-6):



(M-IX-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

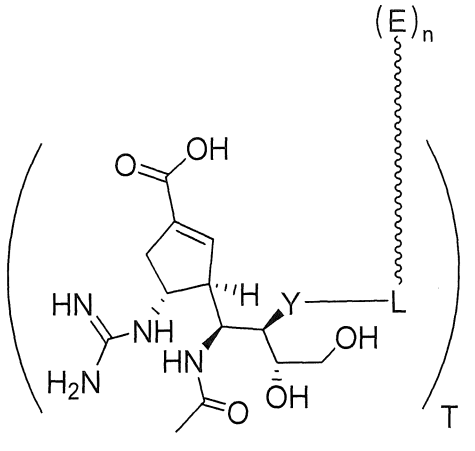
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-X):



(M-X)

hoặc muối dược dụng của nó.

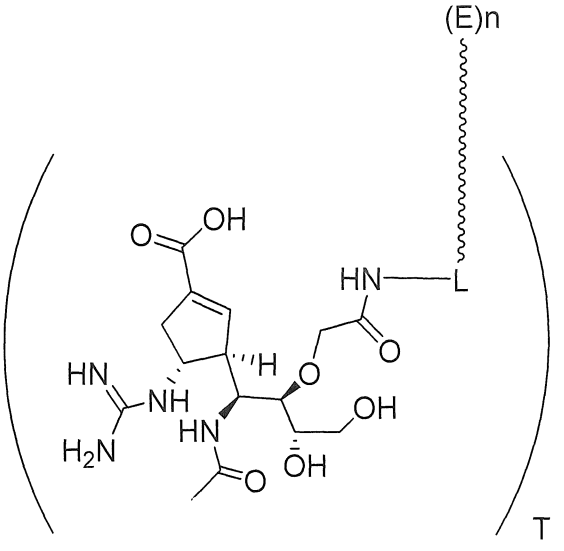
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-X-1):



(M-X-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

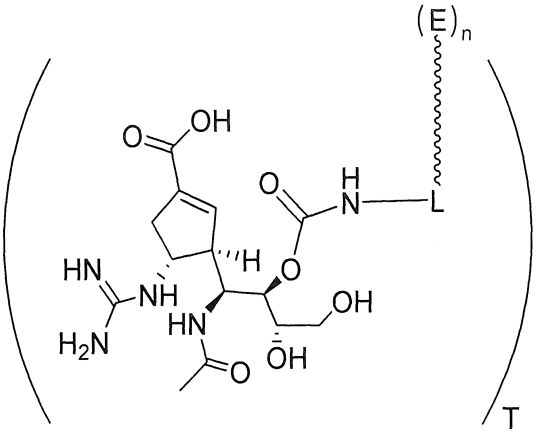
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-X-2):



(M-X-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-X-3):



(M-X-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế một

cách tùy ý, O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino, trong đó R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, khung của L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý, O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino, trong đó R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L hoặc L' được thế oxo. Theo một số phương án, khung của L hoặc L' chứa không nhiều hơn 250 nguyên tử. Theo một số phương án, L hoặc L' có khả năng tạo thành liên kết amit, carbamat, sulfonyl, hoặc ure. Theo một số phương án, L hoặc L' là liên kết. Theo một số phương án, L hoặc L' là nguyên tử. Theo một số phương án, L' là nguyên tử nitơ.

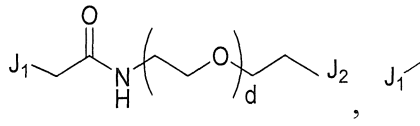
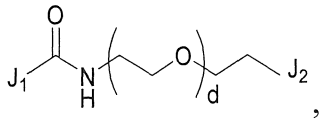
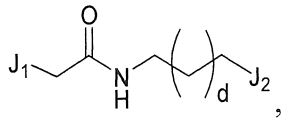
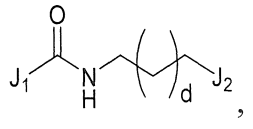
Theo một số phương án, mỗi L được mô tả bằng công thức (M-L-1):

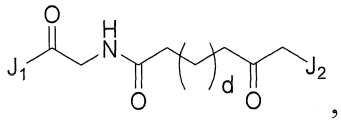
$$J^1\text{-}(Q^1)_g\text{-}(T^1)_h\text{-}(Q^2)_i\text{-}(T^2)_j\text{-}(Q^3)_k\text{-}(T^3)_l\text{-}(Q^4)_m\text{-}(T^4)_n\text{-}(Q^5)_o\text{-}J^2$$

trong đó: J^1 là liên kết được gắn với A1; J^2 là liên kết được gắn với E hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với E (ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic được hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic được hoạt hóa và amin, isoxyanat và amin, azit và alkyn, và alken và tetrazin); mỗi Q^1, Q^2, Q^3, Q^4, và Q^5 độc lập là C1-C20 alkylen được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế một cách tùy ý, C5-C15 arylen được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế một cách tùy ý; mỗi T^1, T^2, T^3, T^4 độc lập là O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino; R^i là H, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế một cách tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế một cách tùy ý, C5-C15 aryl được thế một cách tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế một cách tùy ý; và mỗi g, h, i, j, k, l, m, n, và o độc lập là 0 hoặc 1; hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, J^2 có thể có hai điểm gắn với miền Fc, peptit liên kết Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin (ví dụ, hai J^2).

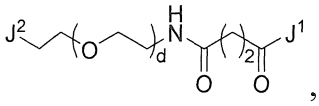
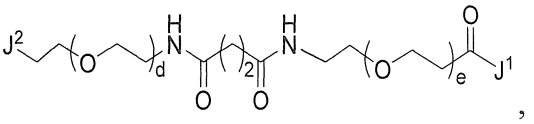
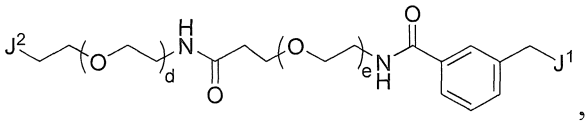
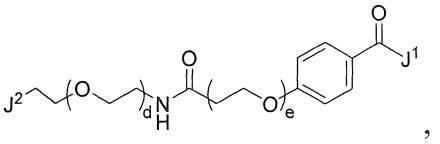
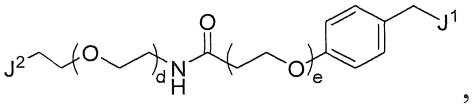
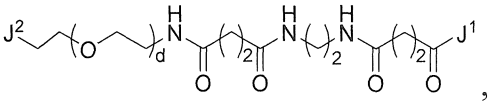
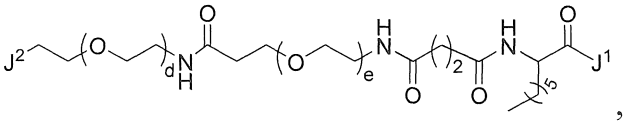
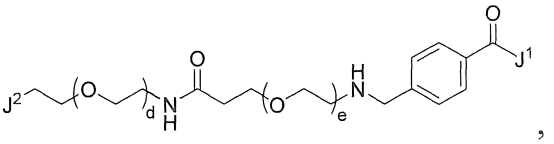
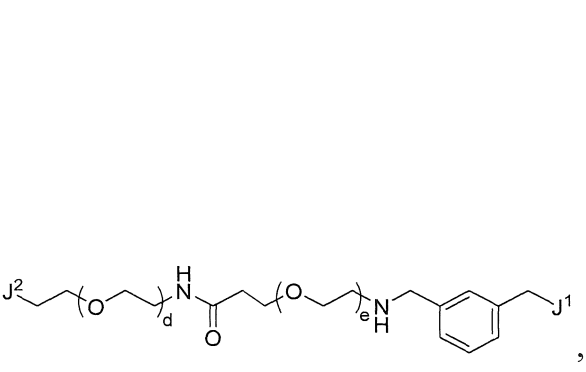
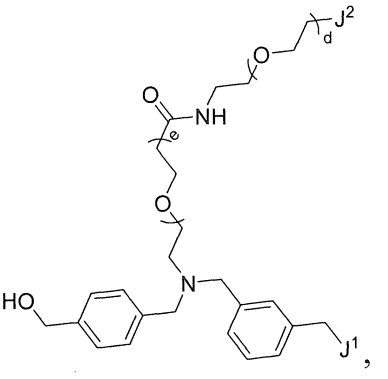
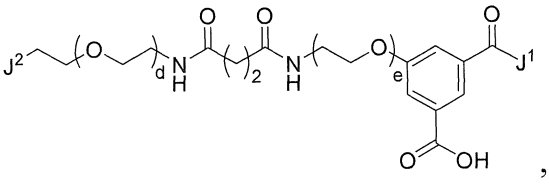
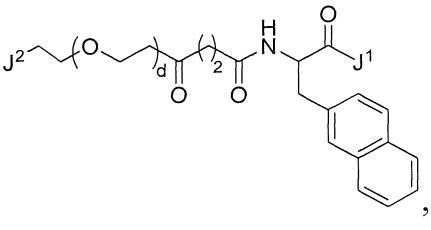
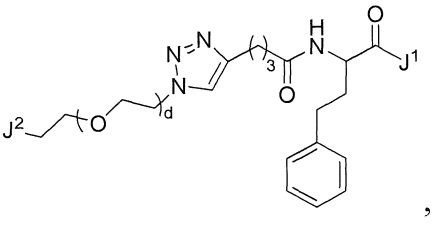
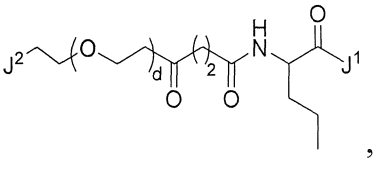
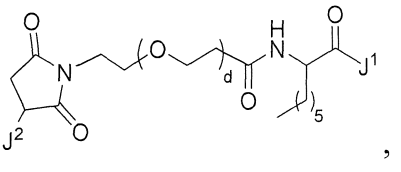
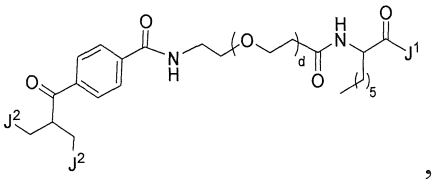
Theo một số phương án, L là


,

,

,

,

hoặc

,

trong đó d là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, d là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20).

Theo một số phương án, L là

 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,

hoặc ,

trong đó mỗi d và e độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 26; hoặc muối dược dụng của nó.

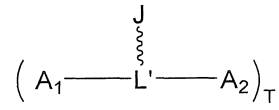
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L bao gồm yếu tố liên kết polyetylen glycol (PEG). Yếu tố liên kết PEG bao gồm yếu tố liên kết có cấu trúc đơn vị lặp lại $(-CH_2CH_2O-)_n$, trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 100. Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (M-I)-(M-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể liên kết cộng hóa trị dime chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Yếu tố liên kết polyetylen glycol có thể được chọn bất kỳ trong số các yếu tố liên kết từ PEG_2 đến PEG_{100} (ví dụ, PEG_2, PEG_3, PEG_4, PEG_5, PEG_5-PEG_{10}, PEG_{10}-PEG_{20}, PEG_{20}-PEG_{30}, PEG_{30}-PEG_{40}, PEG_{50}-PEG_{60}, PEG_{60}-PEG_{70}, PEG_{70}-PEG_{80}, PEG_{80}-PEG_{90}, PEG_{90}-PEG_{100}). Theo một số phương án, L^c bao gồm yếu tố liên kết PEG, trong đó L^C được gắn cộng hóa trị với mỗi Q và E.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_1 là $-NHC(=NH)NH_2$. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_2 là -F. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_3 là -F. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_4 là $–CO_2H$. Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, R_5 là $–COCH_3$.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc bề mặt của E hoặc L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc bề mặt của E.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E là monome miền Fc. Theo một số phương án, n là 2 và mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc.

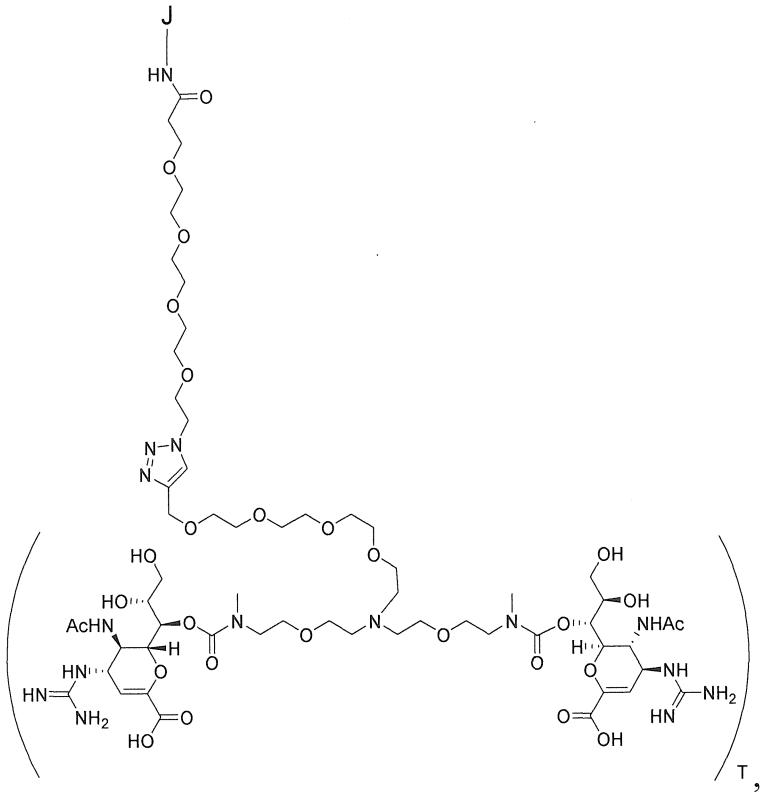
Theo một số phương án, n là 2, mỗi E là monome miền Fc, mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc, và thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I-1):



(D-I-1)

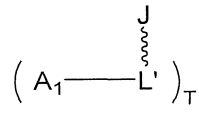
trong đó J là miền Fc; và T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, n là 2, mỗi E là monome miền Fc, mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc, và thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I-1):



(M-I-1)

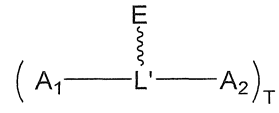
trong đó J là miền Fc; và T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc. Theo một số phương án,

trong đó E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc, n là 1.

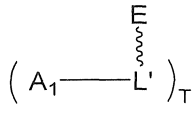
Theo một số phương án, n là 1, E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc và thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-I-2):



(D-I-2)

trong đó E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; và T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, n là 1, E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc, và thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-I-2):



(M-I-2)

trong đó E là protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; và T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E là protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, T là 1, 2, 3, 4, hoặc 5.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp có cấu trúc của các thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, tập hợp các thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), trong đó giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 20 (ví dụ, giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5). Theo một số phương án, giá trị trung bình của T là khoảng 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,

7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, hoặc 20.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L-A_2 bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, E có thể được liên hợp với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều hơn các gốc A_1-L-A_2 khác nhau. Theo một số phương án, E được liên hợp với gốc A_1-L-A_2 thứ nhất, và gốc A_1-L-A_2 thứ hai. Theo một số phương án, A_1 và A_2 của gốc A_1-L-A_2 thứ nhất được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V), và A_1 và A_2 của gốc A_1-L-A_2 thứ hai được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), và (A-IX).

Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L-A_2 thứ nhất được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_1-L-A_2 thứ hai được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E). Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L-A_2 thứ nhất được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_1-L-A_2 thứ hai được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E).

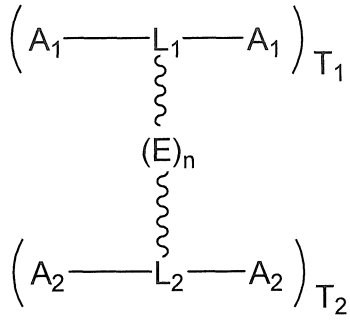
Theo một số phương án, số lượng gốc A_1-L-A_2 thứ nhất được liên hợp với E là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10). Theo một số phương án, số lượng gốc A_1-L-A_2 thứ hai được liên hợp với E là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L có thể được chọn độc lập (ví dụ, được chọn độc lập từ cấu trúc A_1-L bất kỳ được mô tả ở đây). Theo một số phương án, E có thể được liên hợp với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều gốc A_1-L khác nhau. Theo một số phương án, E được liên hợp với gốc A_1-L thứ nhất, và gốc A_1 L thứ hai. Theo một số phương án, A_1 của gốc A_1-L thứ nhất được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V), và A_1 của gốc A_1-L thứ hai được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), hoặc (A-IX).

Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L thứ nhất được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_1-L thứ hai được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E). Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L thứ nhất được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_1-L thứ hai được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E).

Theo một số phương án, số lượng gốc A_1-L thứ nhất được liên hợp với E là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10). Theo một số phương án, số lượng gốc A_1-L thứ hai được liên hợp với E là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D'-I):



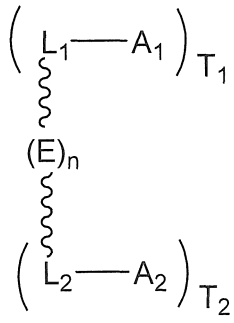
(D'-I)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V); trong đó mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), và (A-IX); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_1 là yếu tố liên kết được liên hợp cộng hóa trị với E và với mỗi A_1; T_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_2 là yếu tố liên kết được liên hợp cộng hóa trị với E và mỗi A_2; T_2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_2 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, mỗi A_1-L-A_1 được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi A_2-L-A_2 được

liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E). Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L-A_1 được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_2-L-A_2 được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M'-I):



(M'-I)

trong đó mỗi A_1 được chọn độc lập từ công thức (M-IX) bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V); trong đó mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), và (A-IX); mỗi E bao gồm monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138), protein albumin (ví dụ, protein albumin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139-141), peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc; n là 1 hoặc 2; T_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_1 là yếu tố liên kết được liên hợp cộng hóa trị với E và A_1; T_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_1 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_2 là yếu tố liên kết được liên hợp cộng hóa trị với E và A_2; T_2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10 (ví dụ, T_2 là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, mỗi A_1-L được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi A_2-L được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E). Theo một số phương án, mỗi gốc A_1-L được liên hợp đặc hiệu với gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein được tiếp xúc bề mặt của E), và mỗi gốc A_2-L được liên hợp đặc hiệu với gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin được tiếp xúc bề mặt của E).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm các thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), hoặc muối dược dụng của nó, và tá dược dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng bị lây nhiễm virut hoặc được cho là bị lây nhiễm virut, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của thể liên hợp hoặc chế phẩm bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị phòng ngừa nhiễm virut ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của thể liên hợp hoặc chế phẩm bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)).

Theo một số phương án, lây nhiễm virut gây ra bởi virut cúm hoặc virut á cúm. Theo một số phương án, lây nhiễm virut là virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

Theo một số phương án, đối tượng bị suy giảm miễn dịch.

Theo một số phương án, đối tượng được chẩn đoán là thiếu hụt miễn dịch dịch thể, thiếu hụt tế bào T, giảm bạch cầu trung tính, không lách, hoặc thiếu hụt bổ thể.

Theo một số phương án, đối tượng đang được điều trị hoặc sắp được điều trị bằng liệu pháp ức chế miễn dịch.

Theo một số phương án, đối tượng được chẩn đoán mắc bệnh gây ra ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, bệnh là bệnh ung thư hoặc hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu, u lympho, hoặc bệnh đa u tủy.

Theo một số phương án, đối tượng đã trải qua hoặc sắp trải qua cấy ghép tế bào gốc tạo máu tự thân.

Theo một số phương án, đối tượng đã trải qua hoặc sắp trải qua cấy ghép cơ quan.

Theo một số phương án, đối tượng có hoặc có nguy cơ phát triển lây nhiễm thứ phát. Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát là lây nhiễm khuẩn (ví dụ, lây nhiễm tụ cầu vàng kháng methixilin (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, và/hoặc *Haemophilus influenzae*),

lây nhiễm virut, hoặc lây nhiễm nấm. Theo các phương án cụ thể, lây nhiễm thứ phát là MRSA. Theo các phương án nhất định, lây nhiễm thứ phát là *S. pneumoniae*. Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát là lây nhiễm đường hô hấp (ví dụ, lây nhiễm bệnh đường hô hấp). Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát được liên kết với (ví dụ, gây ra) bệnh viêm phổi (ví dụ, bệnh viêm phổi do vi khuẩn hoặc virut). Theo một số phương án, đối tượng có hoặc có nguy cơ phát triển bệnh viêm phổi.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa lây nhiễm thứ phát ở đối tượng được chẩn đoán là lây nhiễm cúm, trong đó phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng thể liên hợp hoặc chế phẩm được mô tả ở đây. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng thể liên hợp 45 hoặc dược phẩm chứa thể liên hợp 45.

Theo một số phương án, việc dùng thể liên hợp hoặc chế phẩm theo sáng chế cho đối tượng được chẩn đoán là lây nhiễm cúm làm giảm khả năng phát triển lây nhiễm thứ phát, ví dụ, khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% hoặc nhiều hơn (ví dụ, so với đối tượng mắc bệnh cúm không được điều trị bằng thể liên hợp hoặc chế phẩm này). Ví dụ, việc dùng thể liên hợp hoặc chế phẩm theo sáng chế cho đối tượng được chẩn đoán là lây nhiễm cúm làm giảm khả năng phát triển lây nhiễm vi khuẩn thứ phát (ví dụ, MRSA, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, và/hoặc *Haemophilus influenzae)*, ví dụ, khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, thể liên hợp hoặc chế phẩm được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong màng bụng, trong tổn thương, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong dịch kính, trong âm đạo, trong trực tràng, khu trú, trong khối u, màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong phế nang, trong niêm mạc, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, miệng, cục bộ, bằng cách xông, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách truyền.

Theo một số phương án, đối tượng được điều trị bằng chất điều trị thứ hai. Theo một số phương án, chất điều trị thứ hai là chất kháng virut. Theo một số phương án, chất kháng virut được chọn từ pimovidir, oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir, amantadin, hoặc rimantadin. Theo các phương án cụ thể, chất điều trị thứ hai là pimovidir. Theo một số phương án, chất điều trị thứ hai là vắc-xin virut. Theo một số

phương án, vắc-xin virut gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng đối với virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

Theo một số phương án, thể liên hợp được dùng kết hợp với chất kháng virut, trong đó chất kháng virut là baloxavir. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-6). Theo các phương án khác, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-7). Theo các phương án nhất định, mỗi E bao gồm miền Fc có trình tự axit amin ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63-138. Theo các phương án cụ thể, mỗi E bao gồm miền Fc có trình tự axit amin ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, hoặc SEQ ID NO: 86. Theo các phương án cụ thể, mỗi E bao gồm miền Fc có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, hoặc SEQ ID NO: 86. Theo các phương án được ưu tiên, thể liên hợp là thể liên hợp 45 (ví dụ, thể liên hợp 45a hoặc 45b) hoặc thể liên hợp 46.

Theo các phương án nhất định, thể liên hợp và baloxavir được dùng lần lượt. Theo các phương án khác, thể liên hợp và baloxavir được dùng đồng thời.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virut ở đối tượng bằng việc dùng cho đối tượng: a) lượng hữu hiệu của thể liên hợp hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 215; và b) chất điều trị thứ hai. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp được dùng cho đối tượng sau khi đối tượng bị lây nhiễm virut, được cho là bị lây nhiễm virut, hoặc đã được tiếp xúc với virut. Theo một số phương án, thể liên hợp được dùng cho đối tượng để phòng ngừa. Theo các phương án nhất định, chất điều trị thứ hai được dùng cho đối tượng sau khi đối tượng bị lây nhiễm virut, được cho là bị lây nhiễm virut, hoặc đã được tiếp xúc với virut. Theo một số phương án, chất điều trị thứ hai được dùng cho đối tượng để phòng ngừa. Theo một số phương án, chất điều trị thứ hai được dùng trong 30 ngày, trong 14 ngày, trong 7 ngày, trong 2 ngày, hoặc trong 24 giờ bằng thể liên hợp. Theo các phương án cụ thể, chất điều trị thứ hai được dùng trong 2 ngày bằng thể liên hợp. Theo các phương án nhất định, chất điều trị thứ hai là chất kháng virut (ví dụ, pimovidir, oseltamivir, zanamivir,

peramivir, laninamivir, amantadin, baloxavir marboxil, axit baloxavir, rimantadin, hoặc muối dược dụng của nó). Theo các phương án cụ thể, chất kháng virut là baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của nó. Theo các phương án nhất định, baloxavir marboxil được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 20 mg đến 90 mg (ví dụ, nằm trong khoảng từ 25 mg đến 50 mg, nằm trong khoảng từ 45 mg đến 70 mg, hoặc nằm trong khoảng từ 65 mg đến 90 mg). Theo một số phương án, baloxavir marboxil được dùng qua đường miệng. Theo các phương án nhất định, baloxavir marboxil được dùng dưới dạng một liều đơn. Theo các phương án khác, baloxavir marboxil được dùng dưới dạng nhiều hơn một liều. Theo các phương án cụ thể, baloxavir marboxil được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 20 mg đến 40 mg. Theo các phương án khác, baloxavir marboxil được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 30 mg đến 80 mg. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-6). Theo các phương án khác, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-7). Theo các phương án nhất định, mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63-138. Theo các phương án cụ thể, mỗi E bao gồm miền Fc có trình tự axit amin ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, hoặc SEQ ID NO: 86. Theo các phương án cụ thể, mỗi E bao gồm miền Fc có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, hoặc SEQ ID NO: 86. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp là thể liên hợp 45 (ví dụ, thể liên hợp 45a hoặc thể liên hợp 45b) hoặc thể liên hợp 46. Theo các phương án cụ thể, thể liên hợp được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong màng bụng, trong tổn thương, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong dịch kính, trong âm đạo, trong trực tràng, khu trú, trong khối u, màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong phế nang, trong niêm mạc, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, miệng, cục bộ, bằng cách xông, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách truyền. Theo một số phương án, thể liên hợp được dùng trong tĩnh mạch. Theo một số phương án, thể liên hợp được dùng trong cơ. Theo một số phương án, lây nhiễm virut gây ra bởi virut cúm hoặc

virut á cúm. Theo các phương án nhất định, virut là virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc có thể được thay thế cho miền Fc và chế phẩm chứa monome miền Fc có thể được thay thế cho monome miền Fc ở công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I) (ví dụ, công thức bất kỳ trong số các công thức (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6), (M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1), (M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3), (M-XI), (M-XI-1), hoặc (M'-I)). Trong các công thức bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), khi n là 1, E là chế phẩm chứa monome miền Fc. Trong các công thức bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), khi n là 2, E là chế phẩm chứa miền Fc.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa miền Fc là kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Kháng thể có thể bao gồm dạng globulin miễn dịch, kháng thể chuỗi nặng, kháng thể chuỗi nhẹ, kháng thể gốc LRR, hoặc khung protein khác với các đặc tính giống kháng thể bất kỳ, cũng như gốc liên kết miễn dịch khác bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này, bao gồm các mảnh kháng thể (ví dụ, Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv, hoặc SMIP). Các cấu trúc tiểu đơn vị và hình dạng ba chiều của các lớp kháng thể khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mảnh kháng thể có thể chứa gốc liên kết bao gồm phần có nguồn gốc từ hoặc có sự tương đồng đáng kể với kháng thể, chẳng hạn như vùng xác định kháng nguyên của kháng thể. Các mảnh kháng thể làm ví dụ bao gồm Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv, và SMIP.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể là kháng thể hoặc mảnh kháng thể ở người, chuột, lạc đà (ví dụ, lạc đà không bướu, alpaca, hoặc lạc đà có bướu), dê, cừu, thỏ, gà, chuột lang, chuột hang, ngựa, hoặc chuột cống. Theo các phương án cụ thể, kháng thể là IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc kháng thể nội bào. Theo các phương án nhất định, mảnh kháng thể bao gồm scFv, sdAb, dAb, Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, hoặc SMIP.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể) tạo ra tính đặc hiệu liên kết với một hoặc nhiều đích (ví dụ, kháng nguyên).

Theo một số phương án, một hoặc nhiều đích (ví dụ, kháng nguyên) được liên kết bởi chế phẩm chứa miền Fc (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể) là protein virut (ví dụ, cúm), chẳng hạn như neuraminidaza hoặc hemagglutinin. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể nhận biết kháng nguyên bề mặt virut. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể hướng đích hemagglutinin. Các kháng thể hướng đích hemagglutinin bao gồm các kháng thể đơn dòng, chẳng hạn như CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A, và VIS410. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể là kháng thể trung hòa rộng rãi hoặc hemagglutinin cúm hướng đích mảnh kháng thể (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mô tả trong Wu et al., J. Mol. Biol. 429:2694–2709 (2017)). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể hướng đích protein nền virut (ví dụ, protein nền 2). TCN032 là kháng thể đơn dòng hướng đích protein nền 2.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể) bao gồm một hoặc nhiều kháng thể miền chức năng đơn (sdAB). Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc là kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm sdAb với hoạt tính cúm A, chẳng hạn như sdAb liên kết với hemagglutinin của cúm A (ví dụ, SD36 hoặc SD38, được mô tả trong Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018)). Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc là kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm sdAb với

hoạt tính cúm B, chẳng hạn như sdAb liên kết với hemagglutinin của cúm B (ví dụ, SD83 hoặc SD84, được mô tả trong Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018)).

Theo một số phương án, chế phẩm chứa miền Fc là kháng thể đa miền (MDAb) hoặc mảnh kháng thể đa miền bao gồm 2 hoặc nhiều hơn (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 hoặc nhiều hơn) sdAB. Theo một số phương án, MDAb hoặc mảnh của nó bao gồm một hoặc nhiều sdAB liên kết với hemagglutinin của cúm A, và một hoặc nhiều sdAB liên kết với hemagglutinin của cúm B. Theo một số phương án, MDAb là JNJ-7445 (còn được gọi là MD3606) được mô tả trong Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018). Nói ngắn gọn, JNJ-7445 là MDAb bao gồm hai sdAB liên kết với hemagglutinin của cúm A (SD36 và SD38) và hai sdAB liên kết với hemagglutinin của cúm B (SD83 và SD84), mà được liên kết với miền Fc (IgG1). sdAB được sản xuất bằng cách gây miễn dịch lạc đà không bướu với vắc-xin cúm và hemagglutinin tái tổ hợp H7 và H2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bao gồm thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I) (ví dụ, công thức bất kỳ trong số các công thức (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6), (M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1), (M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3), hoặc (M'-I)), trong đó E là kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Theo các

phương án được ưu tiên, trong đó E là kháng thể hoặc mảnh kháng thể, n là 1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể bất kỳ được mô tả ở đây, chẳng hạn như kháng thể đơn dòng liên kết với hemagglutinin virut (ví dụ, CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A, hoặc VIS410); kháng thể hoặc mảnh kháng thể trung hòa rộng rãi hướng đích hemagglutinin virut (ví dụ, các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể được mô tả trong Wu et al., J. Mol. Biol. 429:2694–2709 (2017)); sdAb hướng đích hemagglutinin virut (ví dụ, SD36, SD38, SD83, hoặc SD84); hoặc MDAb hoặc mảnh của nó hướng đích hemagglutinin virut (ví dụ, JNJ-7445).

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 37.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 66. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 66.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 70. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 70.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 74. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 74.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 75.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 78. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 78.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 82. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 82.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 87. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 87.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 89. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 89.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 93.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 107. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 107.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 108. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 108.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 109. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 109.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 111. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 111.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 112. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 112.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 113. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 113.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 114. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 114.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 115. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 115.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 116. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 116.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 117. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 117.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 118. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 118.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 119. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 119.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 120. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 120.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 121. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 121.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 122. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 122.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 123. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 123.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 124. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 124.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 125.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 126. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 126.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 127. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 127.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 128.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 129. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 129.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 130.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 131.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 132.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 133. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 133.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 134.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 135. Theo một số phương án, E bao

gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 135.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 136. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 136.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 137. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 137.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 138. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 138.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 139. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 139.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 140. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 140.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, E (ví dụ, mỗi E) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo một số phương án, E bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 141.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó E bao gồm monome miền Fc, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138) bao gồm đột biến bộ ba tương ứng với M252Y/S254T/T256E (YTE). Như được sử dụng ở đây, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần được hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu để sắp xếp đối

với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể). Ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-138 có thể bị đột biến để bao gồm đột biến YTE.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó E bao gồm monome miền Fc, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138) bao gồm đột biến kép tương ứng với M428L/N434S (LS). Như được sử dụng ở đây, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần được hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu để sắp xếp đối với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể). Ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-138 có thể bị đột biến để bao gồm đột biến LS.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó E bao gồm monome miền Fc, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138) bao gồm đột biến tương ứng với N434H. Như được sử dụng ở đây, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần được hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu để sắp xếp đối với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể). Ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-138 có thể bị đột biến để bao gồm đột biến N434H.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó E bao gồm monome miền Fc, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138) bao gồm đột biến tương ứng với C220S. Như được sử dụng ở đây, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần được hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu để sắp xếp đối với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể). Ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-138 có thể bị đột biến để bao gồm đột biến C220S.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-95) bao gồm đột biến bộ ba tương ứng với V309D/Q311H/N434S (DHS). Như được sử dụng ở đây, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần được hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu để sắp xếp đối với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể).

Ví dụ, SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-95 có thể bị đột biến để bao gồm đột biến DHS.

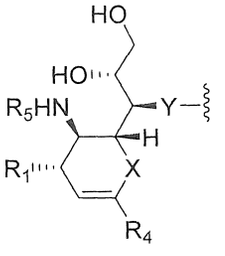
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó E bao gồm monome miền Fc, monome miền Fc (ví dụ, monome miền Fc có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138) là mảnh của monome miền Fc (ví dụ, đoạn có ít nhất 25 (ví dụ, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 hoặc nhiều hơn), ít nhất 50 (ví dụ, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 hoặc nhiều hơn), ít nhất 75 (ví dụ, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 hoặc nhiều hơn) axit ammin liên tục theo độ dài từ các SEQ ID NO: 1-138.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), một hoặc nhiều nguyên tử nitơ của một hoặc nhiều gốc lysin tiếp xúc bề mặt của E hoặc một hoặc nhiều nguyên tử lưu huỳnh của một hoặc nhiều xystein tiếp xúc bề mặt trong E được liên hợp cộng hóa trị với yếu tố liên kết (ví dụ, yếu tố liên kết PEG_2-PEG_{20}). Yếu tố liên kết được liên hợp với E có thể được tạo chức sao cho nó có thể phản ứng để tạo thành liên kết cộng hóa trị với L của A_1-L bất kỳ hoặc A_2-L-A_1 bất kỳ được mô tả ở đây. Theo các phương án được ưu tiên, E được liên hợp với yếu tố liên kết được tạo chức với nhóm azido và L của A_1-L hoặc A_2-L-A_1 bất kỳ được tạo chức với nhóm alkyn. Sự liên hợp (ví dụ, bằng hóa học click) của yếu tố liên kết azido của E và yếu tố liên kết alkyn của A_1-L hoặc A_2-L-A_1 tạo thành thể liên hợp của sáng chế, ví dụ thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I). Theo các phương án khác, E được liên hợp với yếu tố liên kết được tạo chức với nhóm alkyn và L của A_1-L bất kỳ hoặc của A_2-L-A_1 bất kỳ được tạo chức với nhóm azido. Sự liên hợp (ví dụ, bằng hóa học click, xem, ví dụ, Fig. 103) của yếu tố liên kết alkyn của E và yếu tố liên kết azido của A_1-L hoặc A_2-L-A_1 tạo thành thể liên hợp của sáng chế, ví dụ, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I).

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, đường lượn sóng của công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I) có thể thể hiện liên kết cộng hóa trị giữa E và L của A_1-L hoặc A_2-L-A_1.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, đường lượn sóng của công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I) có thể thể hiện rằng một hoặc nhiều chuỗi bên axit amin của E (ví dụ, một hoặc nhiều nguyên tử nitơ của một hoặc nhiều gốc lysin tiếp xúc bề mặt của E hoặc một hoặc nhiều nguyên tử lưu huỳnh của một hoặc nhiều xystein tiếp xúc bề mặt trong E) đã được liên hợp với yếu tố liên kết (ví dụ, yếu tố liên kết PEG_2-PEG_{20}) trong đó yếu tố liên kết đã được tạo chức với gốc phản ứng, sao cho gốc phản ứng tạo thành liên kết cộng hóa trị với L của A_1-L bất kỳ hoặc A_2-L-A_1 bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, bằng hóa học click giữa yếu tố liên kết được tạo chức azido và yếu tố liên kết được tạo chức alkyn, như được mô tả ở trên; xem, ví dụ, Fig. 103).

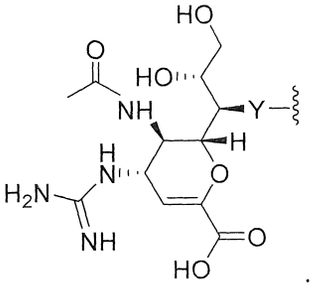
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-I):



(A-I).

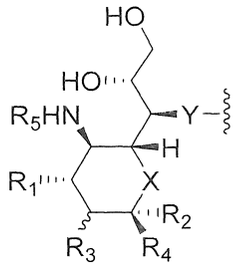
Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-I): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_4 là -CO_2H, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc zanamivir được mô tả bằng:



.

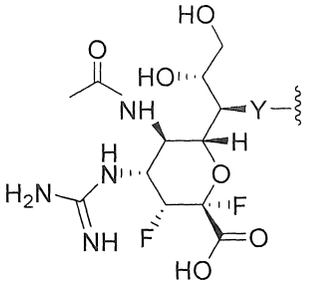
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-II):



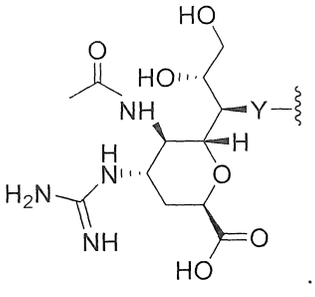
(A-II).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-II): R_1 là $-NHC(=NH)NH_2$, R_2 là H hoặc F, R_3 là H hoặc F, R_4 là $-CO_2H$, R_5 là $-COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:

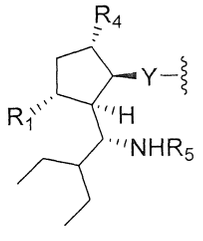


hoặc



.

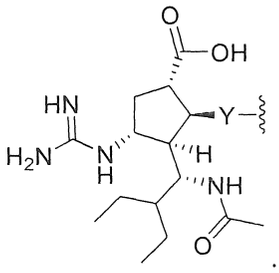
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-III):



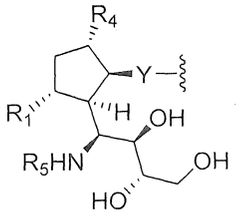
(A-III).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-III): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_4 là -CO_2H, và/hoặc R_5 là -$COCH_3$.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc peramivir được mô tả bằng:



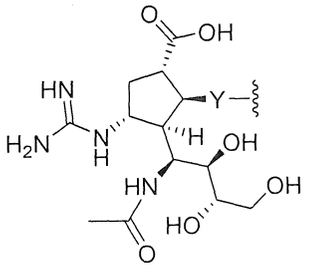
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-IV):



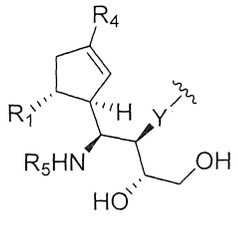
(A-IV).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-IV): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_4 là -CO_2H, và/hoặc R_5 là -$COCH_3$.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:



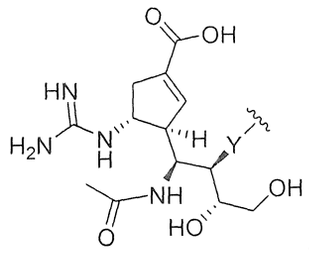
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-V):



(A-V).

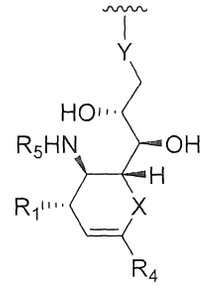
Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-V): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_4 là -CO_2H, và/hoặc R_5 là -$COCH_3$.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:



.

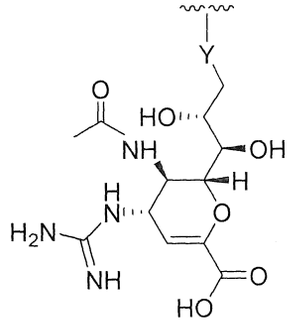
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VI):



(A-VI).

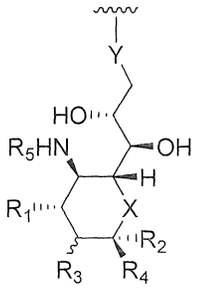
Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VI): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_4 là -CO_2H, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc zanamivir được mô tả bằng:



.

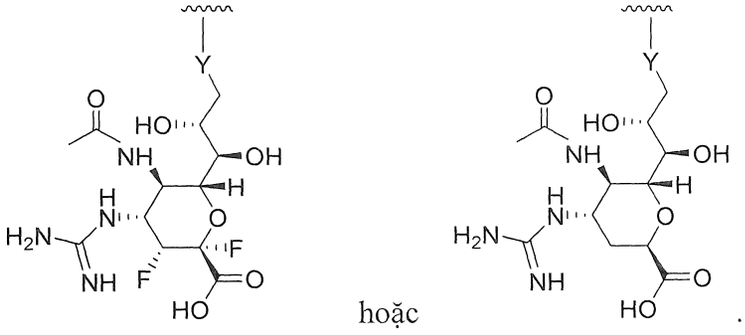
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VII):



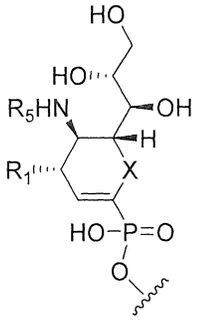
(A-VII).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VII): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_2 là H hoặc F, R_3 là H hoặc F, R_4 là -CO_2H, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:



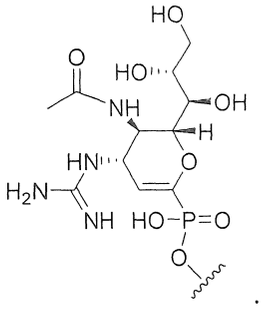
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VIII):



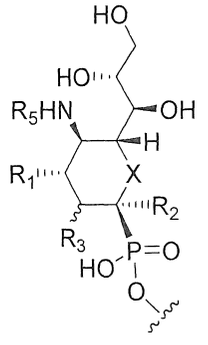
(A-VIII).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-VIII): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:



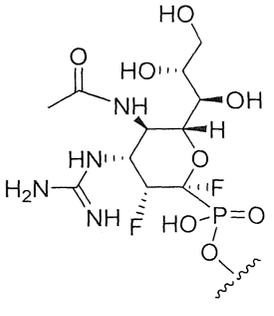
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-IX):



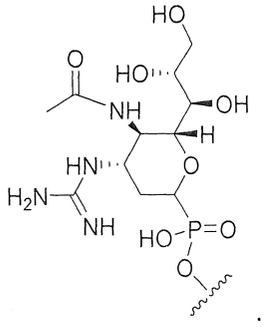
(A-IX).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-IX): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_2 là H hoặc F, R_3 là H hoặc F, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng:

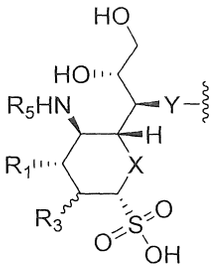


hoặc



.

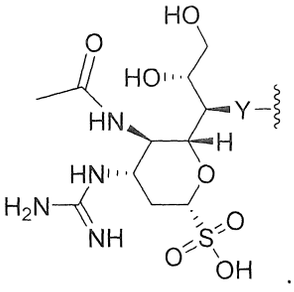
Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-X):



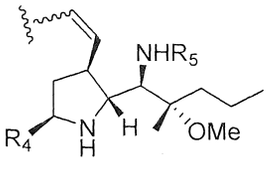
(A-X).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-X): R_1 là -NHC(=NH)NH_2, R_3 là H, R_5 là -$COCH_3$, và/hoặc X là -O-.

Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc sulfozanamivir được mô tả bằng:

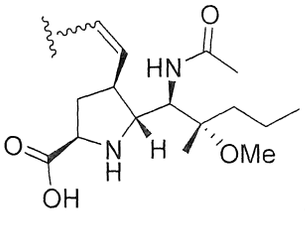


Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-XI):

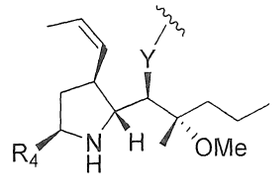


(A-XI).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-XI): R_4 là -CO_2H, và/hoặc R_5 là -$COCH_3$. Theo các phương án được ưu tiên, alken là (E), (Z), hoặc hỗn hợp raxemic của (E)/(Z). Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc A-315675 (Abbott) được mô tả bằng:

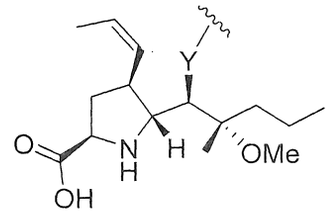


Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-XII):



(A-XII).

Theo các phương án được ưu tiên, trong đó A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc được mô tả bằng (A-XII): R_4 là $-CO_2H$. Theo các phương án được ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 có cấu trúc A-315675 (Abbott) được mô tả bằng:



Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 1, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và tỷ lệ dược chất trên kháng thể (DAR - drug-to-antibody ratio) (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 1, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 2, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 2, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 3, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 3, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm

trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 4, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 4, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 5, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 5, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến

15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 6, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của chúng, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 6, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 7, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của chúng, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp của các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 7, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp

các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 8, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp của các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 8, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 9, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp của các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 9, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 10, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 10, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 11, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR

nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 11, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 12, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 12, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 13, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7,

6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 13, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 14, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 14, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 15, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6,

2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 15, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 16, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 16, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 17, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 17, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 18, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 18, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm

trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 19, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 19, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 20, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp của các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 20, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ

10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 21, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp của các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 21, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 22, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 22, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp

nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 23, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 23, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 24, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 24, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 25, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 25, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 26, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR

nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 26, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 27, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 27, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 28, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7,

6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 28, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 29, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 29, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 30, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6,

2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 30, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 31, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 31, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 32, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 32, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 33, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 33 trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm

trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 34, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 34, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 35, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 35, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến

15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 36, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 36, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 37, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 37, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp

nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 38, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 38, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 39, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 39, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 40, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 40, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 41, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR

nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 41, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 42, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 42, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 43, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7,

6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 43, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 44, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 44, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 45 (ví dụ, thể liên hợp 45a hoặc thể liên hợp 45b), hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,

1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 45 (ví dụ, thể liên hợp 45a hoặc thể liên hợp 45b), trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

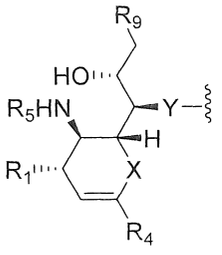
Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 46, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 46, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 47, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 47, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án, thể liên hợp là thể liên hợp 48, hoặc chất đồng phân vị trí bất kỳ của nó, và DAR (ví dụ, T) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, khoảng 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, hoặc 10,0. Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0, nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0, nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 8,0 đến 10,0. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tập hợp các thể liên hợp, mỗi thể liên hợp có cấu trúc thể liên hợp 48, trong đó DAR trung bình (ví dụ, T) của tập hợp các thể liên hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 2, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 5 đến 10, nằm trong khoảng từ 10 đến 15, nằm trong khoảng từ 15 đến 20, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,5, nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,5, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5, nằm

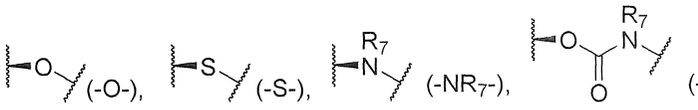
trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 10,5.

Theo một số phương án của các khía cạnh bất kỳ được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2): trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-XIII):



(A-XIII)

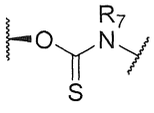
trong đó R_1 được chọn từ -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, và $-NHC(=NH)NHR_6$; R_4 được chọn từ $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 được chọn từ $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X được chọn từ -O- và -S-; Y được chọn từ:

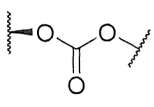

(-O-),

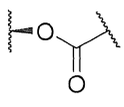
(-S-),

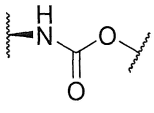
($-NR_7$-),

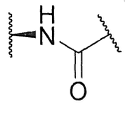
($-O(C=O)NR_7$-),

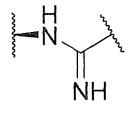

($-O(C=S)NR_7$-),

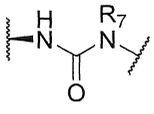

(-O(C=O)O-),

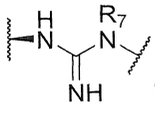

(-O(C=O)-),

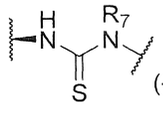

(-NH(C=O)O-),

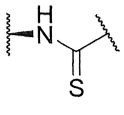

(-NH(C=O)-),

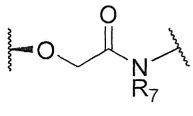

(-NH(C=NH)-),

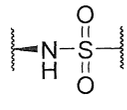

($-NH(C=O)NR_7$-),

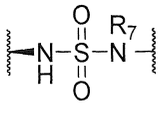

($-NH(C=NH)NR_7$-),

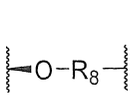

($-NH(C=S)NR_7$-),

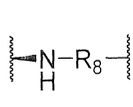

(-NH(C=S)-),

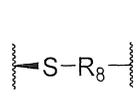

($-OCH_2(C=O)NR_7$-),

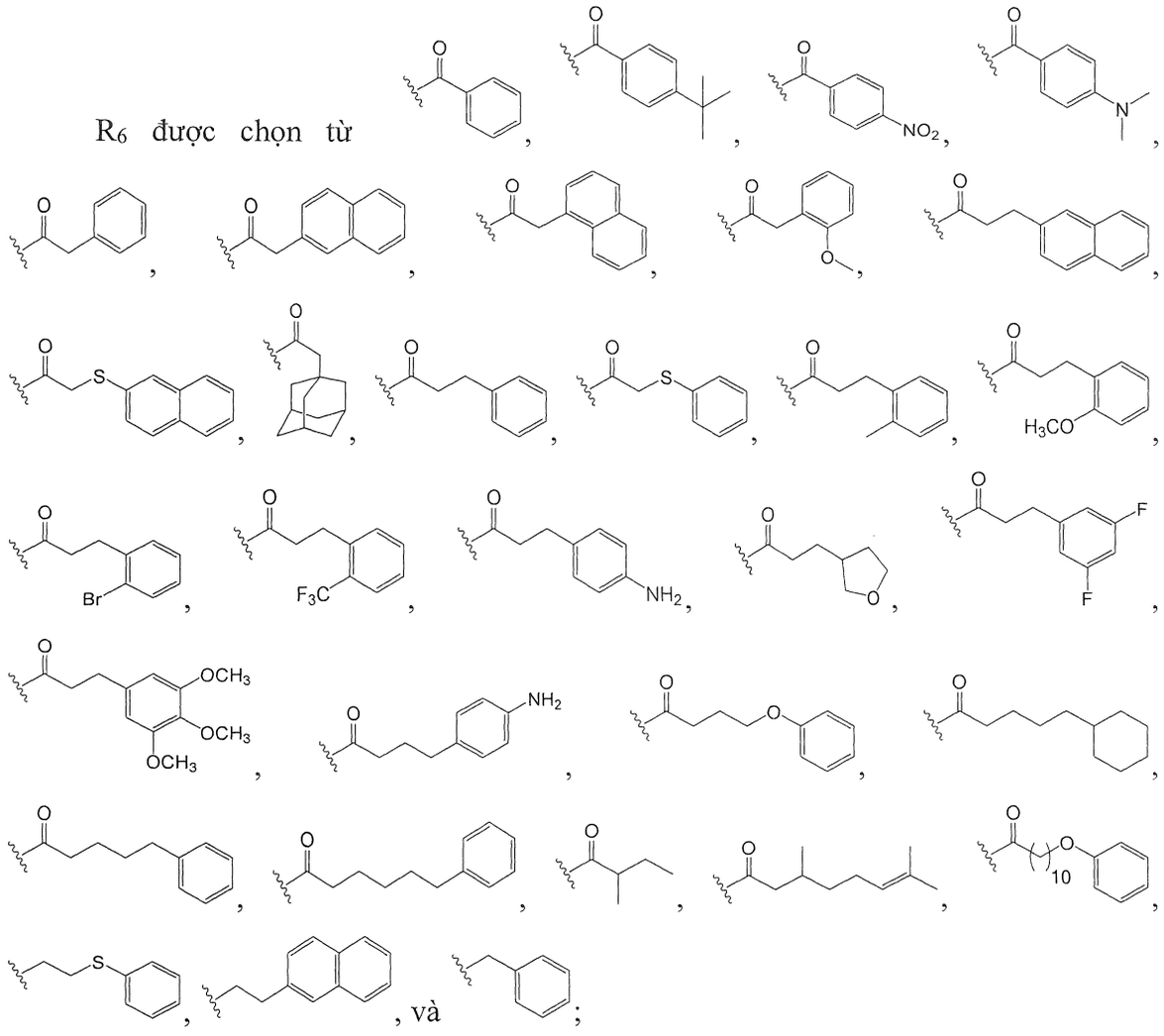

($-NH(SO_2)$-),


($-NH(SO_2)NR_7$-),


($-OR_8$-),


($-NR_8$-), and


($-SR_8$-);

R_6 được chọn từ 

R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

R_8 được chọn từ C3-C20 heteroxycloalkyl, C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

R_9 được chọn từ -H, halogen (ví dụ, Cl hoặc F), $-OR_{10}$, $-NHC(=O)R_7$, C1-C20 alkyl được thế một cách tùy ý, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

R_{10} được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

n là 1 hoặc 2;

mỗi E chứa monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

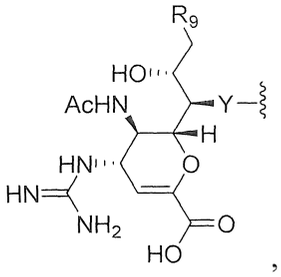
L là yếu tố liên kết được gắn cộng hóa trị với E và với mỗi Y của mỗi A_1 hoặc mỗi A_1 và A_2;

T là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, và

mỗi đường lượn sóng trong các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2) chỉ ra rằng L được gắn cộng hóa trị với mỗi E;

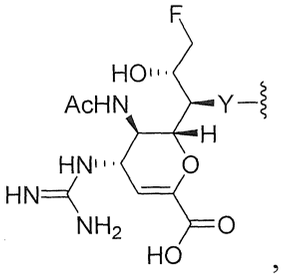
hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, mỗi A_1 và mỗi A_2 được mô tả bằng công thức (A-XIII-1):

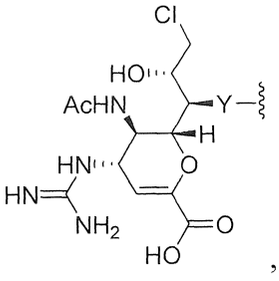


(A-XIII-1)

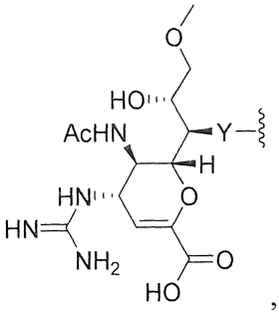
Theo một số phương án, mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn độc lập từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-XIII-1a)-(A-XIII-1d):



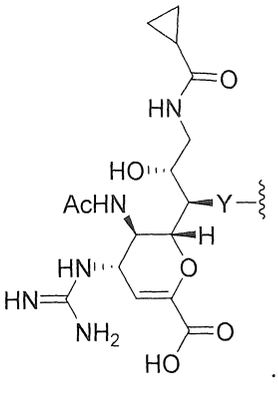
(A-XIII-1a)



(A-XIII-1b)

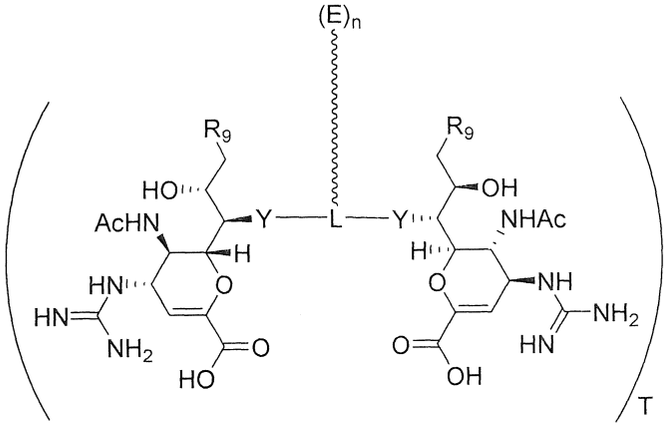


(A-XIII-1c)



(A-XIII-1d)

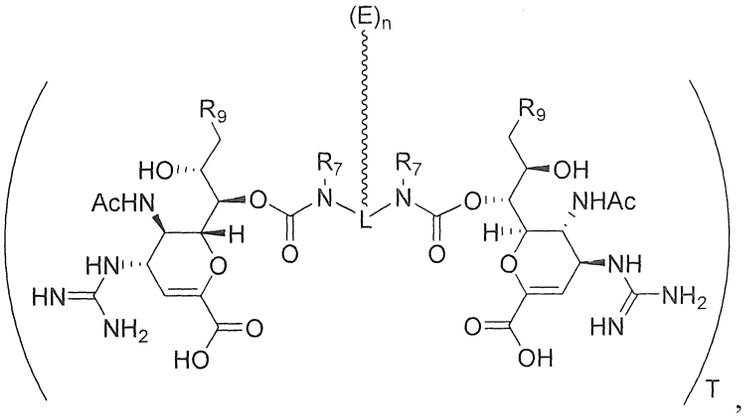
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-XI):



(D-XI)

hoặc muối dược dụng của nó.

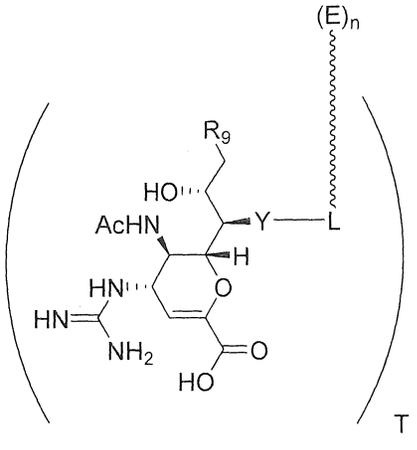
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-XI-1):



(D-XI-1)

trong đó R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; hoặc muối dược dụng của nó.

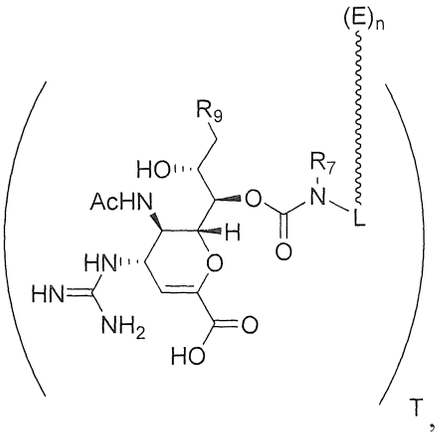
Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-XI):



(M-XI)

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả bằng công thức (M-XI-1):



(M-XI-1)

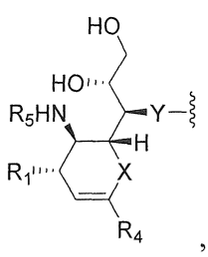
trong đó R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; hoặc muối dược dụng của nó.

Định nghĩa

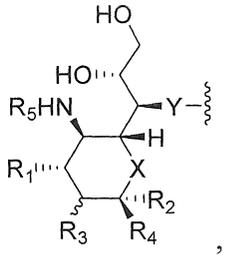
Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hiểu sáng chế, một số thuật ngữ được xác định dưới đây. Các thuật ngữ được xác định trong bản mô tả này có nghĩa như được hiểu chung bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thuật ngữ như "a", "an" và "the" không nhằm mục đích chỉ một thực thể đơn lẻ, mà bao gồm lớp chung có ví dụ cụ thể có thể được sử dụng để minh họa. Thuật ngữ trong bản mô tả này được sử dụng để mô tả các phương án cụ thể theo sáng chế, nhưng việc sử dụng chúng không giới hạn sáng chế, ngoại trừ như được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ “chất ức chế neuraminidaza” hoặc “chất ức chế neuraminidaza virut”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ hợp chất làm giảm hoạt tính của enzym neuraminidaza của virut cúm (ví dụ, từ virut cúm A, B, hoặc C). Chất ức chế neuraminidaza có thể được nhận dạng bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách làm giảm sự sao chép của virut trong thử nghiệm làm giảm vết tan virut cúm, ví dụ, ở nồng độ nhỏ hơn 20 μM (ví dụ, nhỏ hơn 10 μM, 5 μM, 2 μM, 1 μM, 500 nM hoặc 100 nM). Chất ức chế neuraminidaza virut đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm zanamivir, sulfozanamivir, peramivir, và A-315675 (Abbott) (xem, ví dụ, Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti- virus activity. ChemMedChem

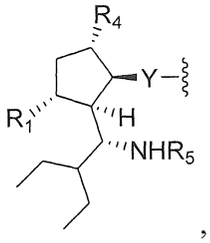
Comm. 13:785-789 (2018) and In vitro characterization of A-315675, and In vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain of influenza virus neuraminidases and influenza virus replication. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(4):1014-1021 (2002)). Chất ức chế neuraminidaza virut theo sáng chế bao gồm zanamivir, sulfozanamivir, peramivir, A-315675 và các chất tương tự của chúng, như chất ức chế neuraminidaza virut có công thức (A-I)-(A-XIII):



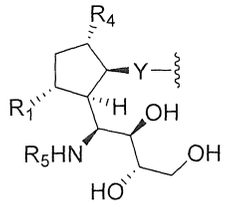
(A-I)



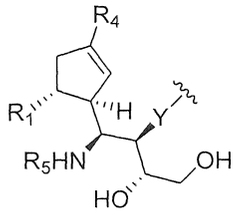
(A-II)



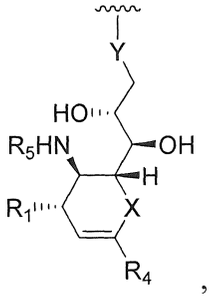
(A-III)



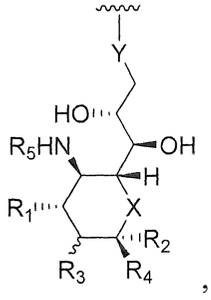
(A-IV)



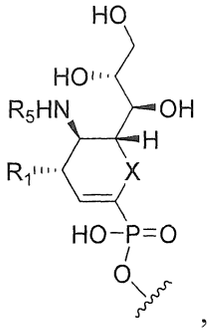
(A-V)



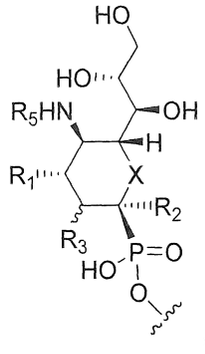
(A-VI)



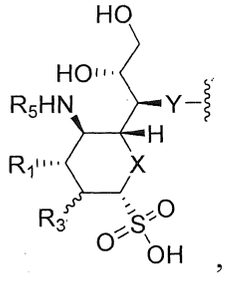
(A-VII)



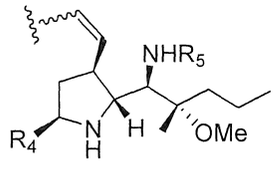
(A-VIII)



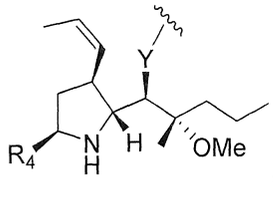
(A-IX)



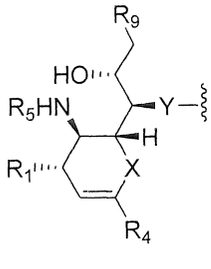
(A-X)



(A-XI)

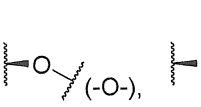


(A-XII)

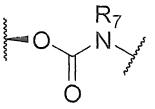
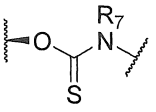
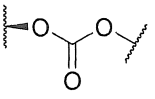
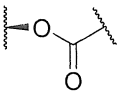
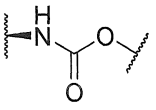
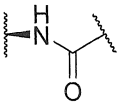
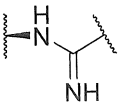
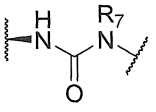
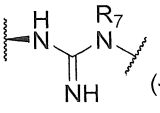
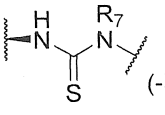
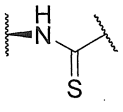
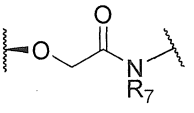
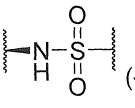
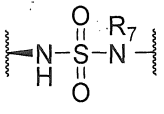
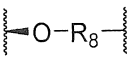
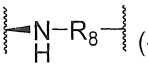
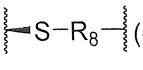


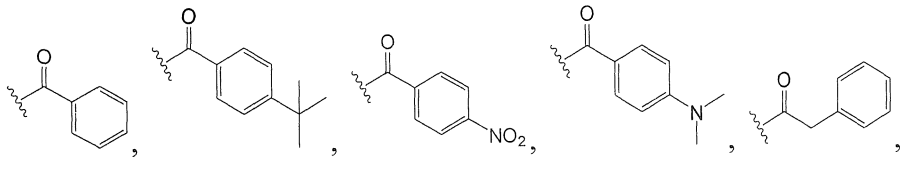
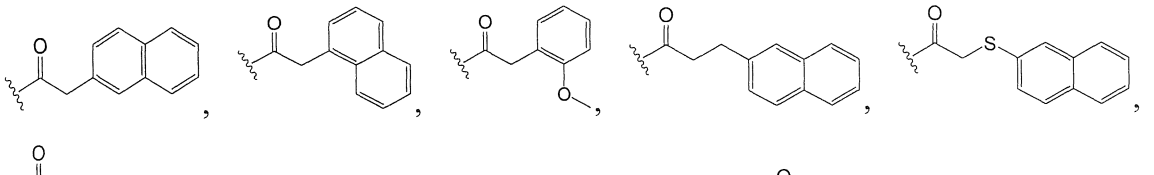
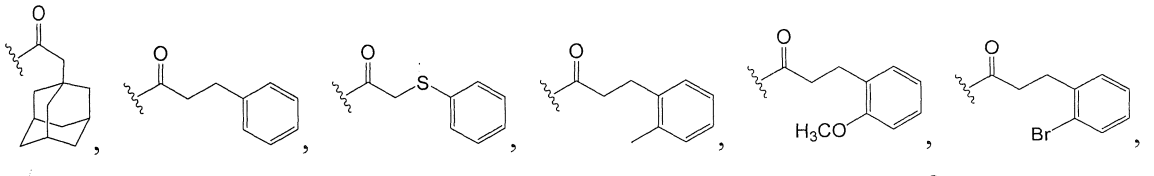
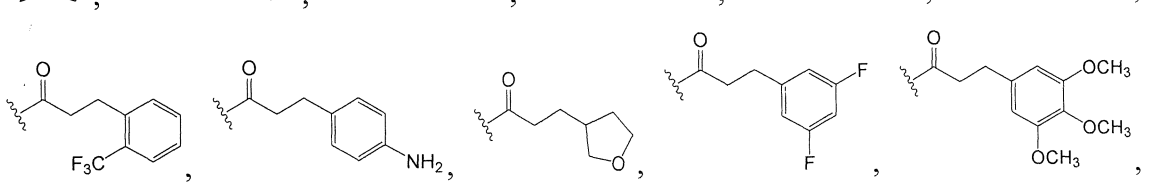
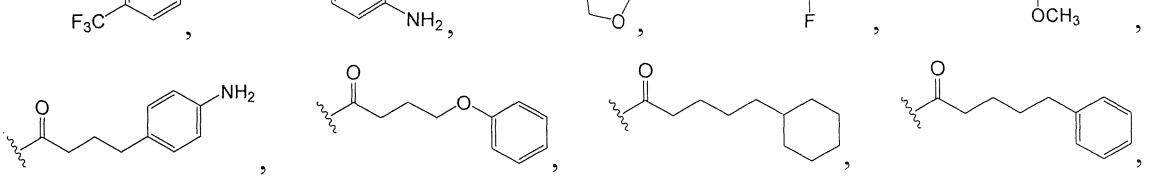
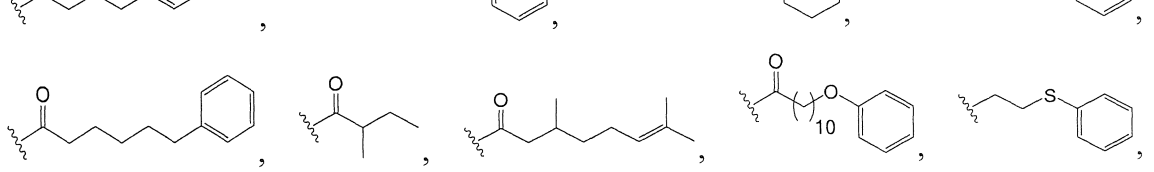
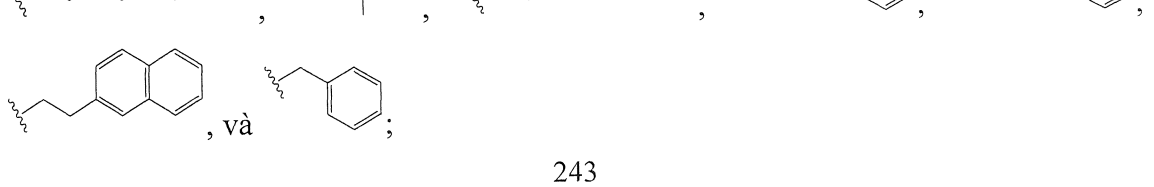
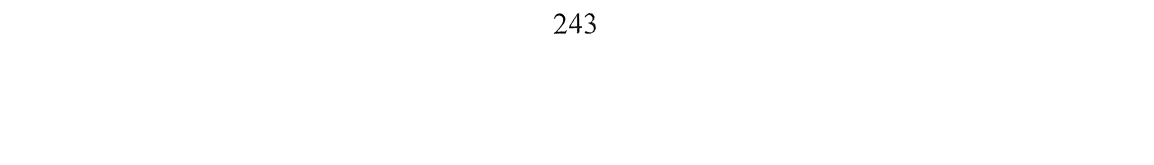
(A-XIII)

trong đó R_1 được chọn từ -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, và $-NHC(=NH)NHR_6$; R_2 và R_3 mỗi nhóm độc lập được chọn từ -H, -OH, -F, -Cl, và -Br; R_4 được chọn từ $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 được chọn từ $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X được chọn từ -O- và -S-; Y được chọn từ


(-O-),

(-S-),

($-NR_7-$),

($-O(C=O)NR_7-$),

($-O(C=S)NR_7-$),

(-O(C=O)O-),

(-O(C=O)-),

(-NH(C=O)O-),

(-NH(C=O)-),

(-NH(C=NH)-),

($-NH(C=O)NR_7-$),

($-NH(C=NH)NR_7-$),

($-NH(C=S)NR_7-$),

(-NH(C=S)-),

($-OCH_2(C=O)NR_7-$),

($-NH(SO_2)-$),

($-NH(SO_2)NR_7-$),

($-OR_8-$),

($-NR_8-$), and

($-SR_8-$);

R_6 được chọn từ









, và
;

R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; và R_8 được chọn từ C3-C20 heteroxycloalkyl, C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; R_9 được chọn từ -H, halogen (ví dụ, Cl, F, hoặc Br), $-OR_{10}$, $-NHC(=O)R_7$, C1-C20 alkyl tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; và R_{10} được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

Thuật ngữ "ức chế hoạt tính neuraminidaza," như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 1.000 nM, ví dụ, khi đo theo thử nghiệm ức chế neuraminidaza trong ví dụ 2 trong bản mô tả này. Cụ thể, IC_{50} thể hiện nồng độ chất ức chế neuraminidaza virut cúm cần để ức chế 50% in vitro. Theo một số khía cạnh, IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM theo thử nghiệm ức chế neuraminidaza là dấu hiệu của hợp chất ức chế hoạt tính neuraminidaza.

"Lây nhiễm virut" nghĩa là sự sinh trưởng gây bệnh của virut (ví dụ, virut cúm) ở sinh vật chủ (ví dụ, đối tượng là người). Lây nhiễm virut có thể là trường hợp bất kỳ trong đó sự có mặt của quần thể virut gây hại cho cơ thể chủ. Do đó, đối tượng "trải qua" lây nhiễm virut khi lượng dư quần thể virut có mặt trong hoặc trên cơ thể đối tượng, hoặc khi sự có mặt của quần thể virut gây hại cho tế bào hoặc mô khác của đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "monome miền Fc" dùng để chỉ chuỗi polypeptit bao gồm ít nhất vùng bản lề và miền hằng định kháng thể thứ hai và thứ ba (C_H2 và C_H3) hoặc mảnh chức năng của chúng (ví dụ, mảnh có khả năng (i) dime hóa với monome miền Fc khác tạo ra miền Fc, và (ii) liên kết với thụ thể Fc. Monome miền Fc có thể là isotyp kháng thể globulin miễn dịch bất kỳ, bao gồm IgG, IgE, IgM, IgA, hoặc IgD (ví dụ, IgG). Ngoài ra, monome miền Fc có thể là kiểu phụ IgG (ví dụ, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, hoặc IgG4) (ví dụ, IgG1). Monome miền Fc không bao gồm phần bất kỳ của globulin miễn dịch mà có khả năng đóng vai trò vùng nhận diện kháng nguyên, ví dụ, miền biến đổi hoặc vùng quyết định tính bổ trợ (CDR). Monome miền Fc trong các thể liên hợp như được mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều thay đổi so với trình tự monome miền Fc kiểu dại (ví dụ, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 axit amin thay thế, thêm đoạn hoặc khuyết đoạn) mà biến đổi tương tác giữa miền Fc và

thụ thể Fc. Các ví dụ về các thay đổi thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án nhất định, monome miền Fc của người (ví dụ, chuỗi nặng của IgG, như IgG1) bao gồm vùng kéo dài từ bất kỳ trong số Asn208, Glu216, Asp221, Lys222, hoặc Cys226 đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng ở Lys447. Lys447 đầu tận cùng C của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt, mà không ảnh hưởng đến cấu trúc hoặc tính ổn định của vùng Fc. Lys 447 đầu tận cùng C có thể được phân cắt bằng protein khi biểu hiện polypeptit. Theo một số phương án của bất kỳ trong số các monome miền Fc được mô tả ở đây, Lys 447 đầu tận cùng C tùy ý có mặt hoặc không có mặt. Sáng chế này dự tính cụ thể trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-4, 11, 16, 19, 20, 32-37, 48-53, và 60-68 không bao gồm Lys đầu tận cùng C tương tương với Lys447. N đầu tận cùng N (Asn) của cùng Fc (ví dụ, của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 60-77) có thể có mặt hoặc có thể không có mặt, mà không ảnh hưởng đến cấu trúc ổn định của cùng Fc. Asn đầu tận cùng N có thể được khử amit khi biểu hiện polypeptit. Theo một số phương án của bất kỳ trong số các monome miền Fc được mô tả ở đây, Asn đầu tận cùng N tùy ý có mặt hoặc không có mặt. Sáng chế này đặc biệt dự tính trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 60-77 không bao gồm Asn đầu tận cùng N. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, việc đánh số gốc axit amin trong IgG hoặc monome miền Fc theo hệ thống đánh số EU đối với kháng thể, còn gọi là chỉ số Kabat EU, như được mô tả, ví dụ, trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền Fc" dùng để chỉ dime của hai monome miền Fc có khả năng liên kết với thụ thể Fc. Trong miền Fc kiểu dại, hai monome miền Fc dime hóa bằng tương tác giữa hai C_H3 miền hằng định kháng thể, theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết disulfua tạo ra giữa các vùng bản lề của hai dime hóa monome miền Fc.

Thuật ngữ "được gắn cộng hóa trị" dùng để chỉ hai phần của thể liên hợp được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị tạo ra giữa hai nguyên tử trong hai phần của thể liên hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "peptit liên kết với Fc" dùng để chỉ polypeptit có trình tự axit amin từ 5 đến 50 (ví dụ, 5 đến 40, 5 đến 30, 5 đến 20, 5 đến 15, 5 đến 10, 10 đến 50, 10 đến 30, hoặc 10 đến 20) gốc axit amin có ái lực và

hoạt tính liên kết với miền Fc, như bất kỳ trong số các miền Fc được mô tả ở đây. Peptit liên kết với Fc có thể có nguồn gốc khác nhau, ví dụ, từ tổng hợp, người, chuột nhắt hoặc chuột cống. Peptit liên kết với Fc theo sáng chế bao gồm peptit liên kết với Fc đã được thao tác di truyền để bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, hoặc năm) gốc xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi, mà có thể tạo vị trí để liên hợp với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết). Tốt nhất là, peptit liên kết với Fc chứa xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí của hợp chất theo sáng chế. Peptit liên kết với Fc có thể bao gồm duy nhất gốc axit amin có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin không có trong tự nhiên. Khi được bao gồm, gốc axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, mạch bên của gốc axit amin không có trong tự nhiên) có thể được sử dụng làm điểm gắn cho hợp chất theo sáng chế (ví dụ, monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết). Peptit liên kết với Fc theo sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng. Peptit liên kết với Fc theo sáng chế bao gồm bất kỳ peptit liên kết với Fc đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein albumin" dùng để chỉ polypeptit bao gồm trình tự axit amin tương ứng với protein albumin có trong tự nhiên (ví dụ, albumin huyết thanh người) hoặc biến thể của nó, như biến thể được thao tác di truyền của protein albumin có trong tự nhiên. Biến thể của protein albumin bao gồm đoạn đa hình, mảnh như miền và phân miền, và protein liên hợp (ví dụ, protein albumin có liên hợp đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N, như polypeptit liên kết). Tốt hơn là, protein albumin có trình tự axit amin của albumin huyết thanh người (HSA) hoặc biến thể hoặc mảnh của nó, tốt nhất là biến thể hoặc mảnh chức năng của nó. Protein albumin theo sáng chế bao gồm các protein có mức đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 139-141. Protein albumin theo sáng chế bao gồm protein albumin đã được thao tác di truyền để bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, hoặc năm) gốc xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi, mà có thể tạo vị trí để liên hợp với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết). Tốt nhất là, protein albumin chứa xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí

của hợp chất theo sáng chế. Protein albumin có thể bao gồm duy nhất gốc axit amin có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin không có trong tự nhiên. Khi được bao gồm, gốc axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, mạch bên của gốc axit amin không có trong tự nhiên) có thể được sử dụng làm điểm gắn cho hợp chất theo sáng chế (ví dụ, monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "peptit liên kết protein albumin" dùng để chỉ polypeptit có trình tự axit amin từ 5 đến 50 (ví dụ, 5 đến 40, 5 đến 30, 5 đến 20, 5 đến 15, 5 đến 10, 10 đến 50, 10 đến 30, hoặc 10 đến 20) gốc axit amin mà có ái lực và hoạt tính liên kết với protein albumin, như bất kỳ trong số các protein albumin được mô tả ở đây. Tốt hơn là, peptit liên kết protein albumin liên kết với albumin huyết thanh có trong tự nhiên, tốt nhất là albumin huyết thanh người. Peptit liên kết protein albumin có thể có nguồn gốc khác nhau, ví dụ, từ tổng hợp, người, chuột nhắt hoặc chuột cống. Peptit liên kết protein albumin theo sáng chế bao gồm peptit liên kết protein albumin đã được thao tác di truyền để bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, hoặc năm) gốc xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi, mà có thể tạo vị trí để liên hợp với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết). Tốt nhất là, peptit liên kết protein albumin chứa xystein hoặc lysin tiếp cận dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí của hợp chất theo sáng chế. Peptit liên kết protein albumin có thể bao gồm duy nhất gốc axit amin có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin không có trong tự nhiên. Khi được bao gồm, gốc axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, mạch bên của gốc axit amin không có trong tự nhiên) có thể được sử dụng làm điểm gắn cho hợp chất theo sáng chế (ví dụ, monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm nhờ yếu tố liên kết). Peptit liên kết protein albumin theo sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng. Peptit liên kết protein albumin theo sáng chế bao gồm bất kỳ peptit liên kết protein albumin đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các ví dụ về chúng được đề xuất trong bản mô tả này. Peptit liên kết protein albumin được lấy làm ví dụ khác được nêu trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0287153, toàn bộ nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "axit amin tiếp cận bề mặt" hoặc "axit amin tiếp xúc dung môi," như xystein tiếp cận bề mặt hoặc lysin tiếp cận bề mặt dùng để chỉ axit amin có thể tiếp cận dung môi xung quanh protein. Axit amin tiếp cận bề mặt có thể là biến thể có trong tự nhiên hoặc được thao tác di truyền (ví dụ, thay thế hoặc cài biến) của protein. Theo một số phương án, axit amin tiếp cận bề mặt là axit amin mà khi được thay thế về cơ bản không làm thay đổi cấu trúc ba chiều của protein.

Các thuật ngữ "yếu tố liên kết," "L," và "L'," như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến liên kết cộng hóa trị hoặc kết nối giữa hai thành phần hoặc nhiều hơn trong thể liên hợp (ví dụ, giữa hai chất ức chế neuraminidaza trong thể liên hợp được mô tả ở đây, giữa chất ức chế neuraminidaza và miền Fc hoặc protein albumin trong thể liên hợp được mô tả ở đây, và giữa dime của hai chất ức chế neuraminidaza và miền Fc hoặc protein albumin trong thể liên hợp được mô tả ở đây). Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây có thể chứa yếu tố liên kết có cấu trúc hóa trị ba (ví dụ, yếu tố liên kết hóa trị ba). Yếu tố liên kết hóa trị ba có ba cánh, trong đó mỗi cánh được liên kết cộng hóa trị với thành phần của thể liên hợp (ví dụ, cánh thứ nhất được liên hợp với chất ức chế neuraminidaza thứ nhất, cánh thứ hai được liên hợp với chất ức chế neuraminidaza thứ hai, và cánh thứ ba được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin).

Phân tử có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết bao gồm ít nhất hai nhóm chức, mà có thể giống hoặc khác nhau, ví dụ, hai nhóm axit carboxylic, hai nhóm amin, hai nhóm axit sulfonic, nhóm axit carboxylic và nhóm maleimit, nhóm axit carboxylic và nhóm alkyn, nhóm axit carboxylic và nhóm amin, nhóm axit carboxylic và nhóm axit sulfonic, nhóm amin và nhóm maleimit, nhóm amin và nhóm alkyn, hoặc nhóm amin và nhóm axit sulfonic. Nhóm chức thứ nhất có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với thành phần thứ nhất trong thể liên hợp và nhóm chức thứ hai có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với thành phần thứ hai trong thể liên hợp. Theo một số phương án về yếu tố liên kết hóa trị ba, hai cánh của yếu tố liên kết có thể chứa hai axit dicarboxylic, trong đó axit carboxylic thứ nhất có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza thứ nhất trong thể liên hợp và axit carboxylic thứ hai có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza thứ hai trong thể liên hợp, và cánh thứ ba của yếu tố liên kết có thể liên kết cộng hóa trị với miền Fc hoặc protein albumin trong thể liên hợp. Các ví dụ về axit dicarboxylic được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo một số

phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm maleimit có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm maleimit có thể tạo ra liên kết cacbon-lưu huỳnh với xystein trong thành phần (ví dụ, miền Fc hoặc protein albumin) trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm alkyn có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm alkyn có thể tạo ra liên kết 1,2,3-triazol với azit trong thành phần (ví dụ, miền Fc hoặc protein albumin) trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm azit có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm azit có thể tạo ra liên kết 1,2,3-triazol với alkyn trong thành phần (ví dụ, miền Fc hoặc protein albumin) trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm bis-sulfon có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm bis-sulfon có thể tạo ra liên kết với nhóm amin thành phần (ví dụ, miền Fc hoặc protein albumin) trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm axit sulfonic có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm axit sulfonic có thể tạo ra liên kết sulfonamit với thành phần trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm isoxyanat có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm isoxyanat có thể tạo ra liên kết ure với thành phần trong thể liên hợp. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm haloalkyl có thể được sử dụng làm yếu tố liên kết, trong đó nhóm haloalkyl có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị, ví dụ, các liên kết C-N và C-O, với thành phần trong thể liên hợp.

Theo một số phương án, yếu tố liên kết tạo khoảng trống, tính bền vững, và/hoặc tính linh động giữa hai hoặc nhiều hơn hai thành phần. Theo một số phương án, yếu tố liên kết có thể là liên kết, ví dụ, liên kết cộng hóa trị. Thuật ngữ "liên kết" dùng để chỉ liên kết hóa học, ví dụ, liên kết amit, liên kết disulfua, liên kết C-O, liên kết C-N, liên kết N-N, liên kết C-S, hoặc bất kỳ kiểu liên kết tạo ra từ phản ứng hóa học, ví dụ, liên hợp hóa học. Theo một số phương án, yếu tố liên kết bao gồm không nhiều hơn 250 nguyên tử. Theo một số phương án, yếu tố liên kết bao gồm không nhiều hơn 250 nguyên tử không phải là hydro. Theo một số phương án, khung chính của yếu tố liên kết bao gồm không nhiều hơn 250 nguyên tử. "Khung chính" của yếu tố liên kết dùng để chỉ các nguyên tử trong yếu tố liên kết mà cùng nhau tạo ra đường dẫn ngắn nhất từ một phần của thể liên hợp với phần khác của thể liên hợp (ví dụ, đường dẫn ngắn nhất liên kết chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế

neuraminidaza thứ hai). Các nguyên tử trong khung chính của yếu tố liên kết trực tiếp tham gia vào liên kết một phần của thể liên hợp với phần khác của thể liên hợp (ví dụ, liên kết chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế neuraminidaza thứ hai). Ví dụ, nguyên tử hydro gắn vào cacbon trong khung chính của yếu tố liên kết không được coi là trực tiếp tham gia vào liên kết một phần của thể liên hợp với phần khác của thể liên hợp.

Theo một số phương án, yếu tố liên kết có thể bao gồm nhóm tổng hợp tạo ra từ, ví dụ, polyme tổng hợp (ví dụ, polyme polyetylen glycol (PEG)). Theo một số phương án, yếu tố liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin, như gốc axit amin D hoặc L. Theo một số phương án, yếu tố liên kết có thể là gốc của trình tự axit amin (ví dụ, 1-25 axit amin, 1-10 axit amin, 1-9 axit amin, 1-8 axit amin, 1-7 axit amin, 1-6 axit amin, 1-5 axit amin, 1-4 axit amin, 1-3 axit amin, 1-2 axit amin, hoặc 1 trình tự axit amin). Theo một số phương án, yếu tố liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều, ví dụ, 1-100, 1-50, 1-25, 1-10, 1-5, hoặc 1-3, alkylen tùy ý được thế, heteroalkylen tùy ý được thế (ví dụ, đơn vị PEG), alkenylen tùy ý được thế, heteroalkenylen tùy ý được thế, alkynylen tùy ý được thế, heteroalkynylen tùy ý được thế, xycloalkylen tùy ý được thế, heteroxycloalkylen tùy ý được thế, xycloalkenylen tùy ý được thế, heteroxycloalkenylen tùy ý được thế, xycloalkynylen tùy ý được thế, heteroxycloalkynylen tùy ý được thế, arylen tùy ý được thế, heteroarylen tùy ý được thế (ví dụ, pyridin), O, S, NR^i (R^i là H, alkyl tùy ý được thế, heteroalkyl tùy ý được thế, alkenyl tùy ý được thế, heteroalkenyl tùy ý được thế, alkynyl tùy ý được thế, heteroalkynyl tùy ý được thế, xycloalkyl tùy ý được thế, heteroxycloalkyl tùy ý được thế, xycloalkenyl tùy ý được thế, heteroxycloalkenyl tùy ý được thế, xycloalkynyl tùy ý được thế, heteroxycloalkynyl tùy ý được thế, aryl tùy ý được thế, hoặc heteroaryl tùy ý được thế), P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino. Ví dụ, yếu tố liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen tùy ý được thế, C1-C20 heteroalkylen tùy ý được thế (ví dụ, đơn vị PEG), C2-C20 alkenylen tùy ý được thế (ví dụ, C2 alkenylen), C2-C20 heteroalkenylen tùy ý được thế, C2-C20 alkynylen tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkynylen tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkylen tùy ý được thế (ví dụ, xyclopropylen, xyclobutylen), C3-C20 heteroxycloalkylen tùy ý được thế, C4-C20 xycloalkenylen tùy ý được thế, C4-C20 heteroxycloalkenylen tùy ý được thế, C8-C20 xycloalkynylen tùy ý được thế, C8-C20

heteroxycloalkynylen tùy ý được thế, C5-C15 arylen tùy ý được thế (ví dụ, C6 arylen), C2-C15 heteroarylen tùy ý được thế (ví dụ, imidazol, pyridin), O, S, NR^i (R^i là H, C1-C20 alkyl tùy ý được thế, C1-C20 heteroalkyl tùy ý được thế, C2-C20 alkenyl tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkenyl tùy ý được thế, C2-C20 alkynyl tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkynyl tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkyl tùy ý được thế, C3-C20 heteroxycloalkyl tùy ý được thế, C4-C20 xycloalkenyl tùy ý được thế, C4-C20 heteroxycloalkenyl tùy ý được thế, C8-C20 xycloalkynyl tùy ý được thế, C8-C20 heteroxycloalkynyl tùy ý được thế, C5-C15 aryl tùy ý được thế, hoặc C2-C15 heteroaryl tùy ý được thế), P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino.

Các thuật ngữ "alkyl," "alkenyl," và "alkynyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm các phần tử thế đơn trị mạch thẳng và mạch nhánh, cũng như dạng kết hợp của chúng, chứa duy nhất C và H khi không được thế. Khi nhóm alkyl bao gồm ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc liên kết ba cacbon-cacbon, nhóm alkyl có thể được đề cập lần lượt là nhóm "alkenyl" hoặc "alkynyl". Tính đơn trị của nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl không bao gồm các phần tử thế tùy ý trên nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl. Ví dụ, nếu nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl được gắn vào hợp chất, thì tính đơn trị của nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl dùng để chỉ sự gắn của nó vào hợp chất và không bao gồm bất kỳ phần tử thế bổ sung có thể có mặt trên nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl. Theo một số phương án, nhóm alkyl hoặc heteroalkyl có thể chứa, ví dụ, 1-20, 1-18, 1-16, 1-14, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, hoặc 1-2 nguyên tử cacbon (ví dụ, C1-C20, C1-C18, C1-C16, C1-C14, C1-C12, C1-C10, C1-C8, C1-C6, C1-C4, hoặc C1-C2). Theo một số phương án, nhóm alkenyl, heteroalkenyl, alkynyl, hoặc heteroalkynyl có thể chứa, ví dụ, 2-20, 2-18, 2-16, 2-14, 2-12, 2-10, 2-8, 2-6, hoặc 2-4 nguyên tử cacbon (ví dụ, C2-C20, C2-C18, C2-C16, C2-C14, C2-C12, C2-C10, C2-C8, C2-C6, hoặc C2-C4). Ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, metyl, etyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, 2-propenyl, và 3-butynyl.

Thuật ngữ "xycloalkyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm alkyl vòng không thơm đơn trị, no hoặc không no. Xycloalkyl có thể có, ví dụ, ba đến hai mươi nguyên tử cacbon (ví dụ, C3-C7, C3-C8, C3-C9, C3-C10, C3-C11, C3-C12, C3-C14, C3-C16, C3-C18, hoặc C3-C20 xycloalkyl). Các ví dụ về xycloalkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, và

xycloheptyl. Khi nhóm xycloalkyl bao gồm ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon, nhóm xycloalkyl có thể được đề cập là nhóm "xycloalkenyl". Xycloalkenyl có thể có, ví dụ, bốn đến hai mươi nguyên tử cacbon (ví dụ, C4-C7, C4-C8, C4-C9, C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18, hoặc C4-C20 xycloalkenyl). Nhóm xycloalkenyl được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xyclopentenyl, xyclohexenyl, và xycloheptenyl. Khi nhóm xycloalkyl bao gồm ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon, nhóm xycloalkyl có thể được đề cập là nhóm "xycloalkynyl". Xycloalkynyl có thể có, ví dụ, tám đến hai mươi nguyên tử cacbon (ví dụ, C8-C9, C8-C10, C8-C11, C8-C12, C8-C14, C8-C16, C8-C18, hoặc C8-C20 xycloalkynyl). Thuật ngữ "xycloalkyl" cũng bao gồm hợp chất vòng có cấu trúc đa vòng liên kết cầu trong đó một hoặc nhiều cacbon liên kết cầu hai cạnh không liền kề của vòng đơn, ví dụ, bixyclo[2.2.1.]heptyl và adamantan. Thuật ngữ "xycloalkyl" cũng bao gồm các cấu trúc hai vòng, ba vòng và bốn vòng liên hợp, ví dụ, các hợp chất vòng decalin và spiro.

Thuật ngữ "aryl," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ bất kỳ hệ đơn vòng hoặc hệ hai vòng hoặc ba vòng liên hợp có tính chất thơm về sự phân bố điện tử trên khắp hệ vòng, ví dụ, phenyl, naphtyl, hoặc phenantren. Theo một số phương án, hệ vòng chứa 5-15 nguyên tử trong vòng hoặc 5-10 nguyên tử trong vòng. Nhóm aryl có thể có, ví dụ, năm đến mười lăm nguyên tử cacbon (ví dụ, C5-C6, C5-C7, C5-C8, C5-C9, C5-C10, C5-C11, C5-C12, C5-C13, C5-C14, hoặc C5-C15 aryl). Thuật ngữ "heteroaryl" cũng dùng để chỉ các hệ đơn vòng hoặc hai vòng liên hợp như vậy chứa một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại được chọn từ O, S và N. Nhóm heteroaryl có thể có, ví dụ, hai đến mười lăm nguyên tử cacbon (ví dụ, C2-C3, C2-C4, C2-C5, C2-C6, C2-C7, C2-C8, C2-C9, C2-C10, C2-C11, C2-C12, C2-C13, C2-C14, hoặc C2-C15 heteroaryl). Việc đưa vào nguyên tử khác loại cho phép đưa vào các vòng có 5 cạnh được coi là thơm cũng như các vòng có 6 cạnh. Do đó, các hệ heteroaryl điển hình bao gồm, ví dụ, pyridyl, pyrimidyl, indolyl, benzimidazolyl, benzotriazolyl, isoquinolyl, quinolyl, benzothiazolyl, benzofuranyl, thienyl, furyl, pyrolyl, thiazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, benzoxazolyl, benzoisoxazolyl, và imidazolyl. Do có thể có chất hỗ biến nên nhóm như phtalimido cũng được coi là heteroaryl. Theo một số phương án, nhóm aryl hoặc heteroaryl là hệ vòng thơm có 5 hoặc 6 cạnh tùy ý chứa 1-2 nguyên tử nitơ. Theo một số phương án, nhóm aryl hoặc heteroaryl là phenyl, pyridyl, indolyl, pyrimidyl, pyridazinyl,

benzothiazolyl, benzimidazolyl, pyrazolyl, imidazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, hoặc imidazopyridinyl tùy ý được thế. Theo một số phương án, nhóm aryl là phenyl. Theo một số phương án, nhóm aryl có thể tùy ý được thế bằng phần tử thế như phần tử thế aryl, ví dụ, biphenyl.

Thuật ngữ "alkaryl" dùng để chỉ nhóm aryl được nối với nhóm alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen. Nói chung, nếu hợp chất được gắn vào nhóm alkaryl, thì phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của alkaryl được gắn vào hợp chất. Theo một số phương án, alkaryl là C6-C35 alkaryl (ví dụ, C6-C16, C6-C14, C6-C12, C6-C10, C6-C9, C6-C8, C7, hoặc C6 alkaryl), trong đó số nguyên tử cacbon chỉ ra tổng số nguyên tử cacbon trong cả phần aryl và phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của alkaryl. Các ví dụ về alkaryl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, (C1-C8)alkylen(C6-C12)aryl, (C2-C8)alkenylen(C6-C12)aryl, hoặc (C2-C8)alkynylen(C6-C12)aryl. Theo một số phương án, alkaryl là benzyl hoặc phenetyl. Trong heteroalkaryl, một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, và S có thể có mặt trong phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của nhóm alkaryl và/hoặc có thể có mặt trong phần aryl của nhóm alkaryl. Trong alkaryl tùy ý được thế, phần tử thế có thể có mặt trên phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của nhóm alkaryl và/hoặc có thể có mặt trên phần aryl của nhóm alkaryl.

Thuật ngữ "amino," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện $–N(R^x)_2$ hoặc $–N^+(R^x)_3$, trong đó mỗi R^x độc lập là H, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, alkaryl, xycloalkyl, hoặc hai R^x kết hợp tạo ra heteroxycloalkyl. Theo một số phương án, nhóm amino là $-NH_2$.

Thuật ngữ "alkamino," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm amino, được mô tả ở đây, được gắn vào nhóm alkylen (ví dụ, C1-C5 alkylen), alkenylen (ví dụ, C2-C5 alkenylen), hoặc alkynylen (ví dụ, C2-C5 alkenylen). Nói chung, nếu hợp chất được gắn vào nhóm alkamino, thì phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của alkamino được gắn vào hợp chất. Phần amino của alkamino dùng để chỉ $–N(R^x)_2$ hoặc $–N^+(R^x)_3$, trong đó mỗi R^x độc lập là H, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, alkaryl, xycloalkyl, hoặc hai R^x kết hợp tạo ra heteroxycloalkyl. Theo một số phương án, phần amino của alkamino là $-NH_2$. Ví dụ về nhóm alkamino là C1-C5 alkamino, ví dụ, C2 alkamino (ví dụ, $CH_2CH_2NH_2$ hoặc $CH_2CH_2N(CH_3)_2$). Trong nhóm heteroalkamino, một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại

được chọn từ N, O, và S có thể có mặt trong phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của heteroalkamino nhóm. Theo một số phương án, nhóm alkamino có thể tùy ý được thế. Trong nhóm alkamino được thế, phần tử thế có thể có mặt trên phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của nhóm alkamino và/hoặc có thể có mặt trên phần amino của nhóm alkamino.

Thuật ngữ "alkamit," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm amit được gắn vào nhóm alkylen (ví dụ, C1-C5 alkylen), alkenylen (ví dụ, C2-C5 alkenylen), hoặc alkynylen (ví dụ, C2-C5 alkenylen). Nói chung, nếu hợp chất được gắn vào nhóm alkamit, thì phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của alkamit được gắn vào hợp chất. Phần amit của alkamit dùng để chỉ $–C(O)-N(R^x)_2$, trong đó mỗi R^x độc lập là H, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, alkaryl, xycloalkyl, hoặc hai R^x kết hợp tạo ra heteroxycloalkyl. Theo một số phương án, phần amit của alkamit là $-C(O)NH_2$. Nhóm alkamit có thể là $-(CH_2)_2-C(O)NH_2$ hoặc $-CH_2-C(O)NH_2$. Trong nhóm heteroalkamit, một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, và S có thể có mặt trong phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của nhóm heteroalkamit. Theo một số phương án, nhóm alkamit có thể tùy ý được thế. Trong nhóm alkamit được thế, phần tử thế có thể có mặt trên phần alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen của alkamit nhóm và/hoặc có thể có mặt trên phần amit của nhóm alkamit.

Các thuật ngữ "alkylen", "alkenylen" và "alkynylen" như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến nhóm hóa trị hai có kích thước cụ thể. Theo một số phương án, alkylen có thể chứa, ví dụ, 1-20, 1-18, 1-16, 1-14, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, hoặc 1-2 nguyên tử cacbon (ví dụ, C1-C20, C1-C18, C1-C16, C1-C14, C1-C12, C1-C10, C1-C8, C1-C6, C1-C4, hoặc C1-C2). Theo một số phương án, alkenylen hoặc alkynylen có thể chứa, ví dụ, 2-20, 2-18, 2-16, 2-14, 2-12, 2-10, 2-8, 2-6, hoặc 2-4 nguyên tử cacbon (ví dụ, C2-C20, C2-C18, C2-C16, C2-C14, C2-C12, C2-C10, C2-C8, C2-C6, hoặc C2-C4). Alkylen, alkenylen, và/hoặc alkynylen bao gồm các dạng mạch thẳng và mạch nhánh, cũng như dạng kết hợp của chúng. Bản chất hóa trị hai của nhóm alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen không bao gồm các phần tử thế tùy ý trên nhóm alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen. Ví dụ, hai chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn với nhau nhờ yếu tố liên kết bao gồm alkylen, alkenylen, và/hoặc alkynylen, hoặc dạng kết hợp của chúng. Mỗi nhóm alkylen, alkenylen, và/hoặc

alkynylen trong yếu tố liên kết được coi là hóa trị hai đối với hai điểm gắn ở một trong hai đầu của nhóm alkylen, alkenylen, và/hoặc alkynylen. Ví dụ, nếu yếu tố liên kết bao gồm -(alkylen tùy ý được thế)-(alkenylen tùy ý được thế)-(alkylen tùy ý được thế)-, alkenylen được coi là hóa trị hai đối với các điểm gắn của nó vào hai alkylen ở các đầu của yếu tố liên kết. Các phần tử thế tùy ý trên alkenylen là không bao gồm trong bản chất hóa trị hai của alkenylen. Bản chất hóa trị hai của nhóm alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen (ví dụ, alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen trong yếu tố liên kết) dùng để chỉ cả hai đầu của nhóm và không bao gồm phần tử thế tùy ý có thể có mặt trong nhóm alkylen, alkenylen, hoặc alkynylen. Do là hóa trị hai, chúng có thể liên kết cùng với nhiều (ví dụ, hai) phần của thể liên hợp, ví dụ, chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế neuraminidaza thứ hai. Các nhóm alkylen, alkenylen, và/hoặc alkynylen có thể được thế bằng các nhóm thường thích hợp làm phần tử thế cho các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl như nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, C=O là C1 alkylen được thế bằng oxo (=O). Ví dụ, -HCR-C≡C- có thể được coi là alkynylen tùy ý được thế và được coi là nhóm hóa trị hai cho dù nó có phần tử thế tùy ý, R. Các nhóm heteroalkylen, heteroalkenylen, và/hoặc heteroalkynylen đề cập đến nhóm alkylen, alkenylen, và/hoặc alkynylen bao gồm một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại, ví dụ, N, O, và S. Ví dụ, polyme polyetylen glycol (PEG) hoặc đơn vị PEG -$(CH_2)_2$-O- trong polyme PEG được coi là heteroalkylen chứa một hoặc nhiều nguyên tử oxy.

Như được sử dụng ở đây, " trị liệu kết hợp" hoặc "được dùng kết hợp" có nghĩa là thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) và một (hoặc nhiều) tác nhân hoặc phương pháp điều trị khác nhau được dùng cho đối tượng như một phần của phác đồ điều trị đã xác định cho nhiễm virut. Phác đồ điều trị xác định liều lượng và chu kỳ dùng thuốc của từng loại thuốc sao cho tác dụng của từng loại thuốc riêng biệt đối với đối tượng được chồng chéo lên nhau. Theo một số phương án, sự phân phối thể liên hợp và một hoặc nhiều chất là đồng thời hoặc cùng một lúc và thể liên hợp và một hoặc nhiều chất có thể được điều chế đồng thời. Theo một số phương án, thể liên hợp và một hoặc nhiều chất không được điều chế đồng thời và được dùng lần lượt như một phần của phác đồ theo quy định. Theo một số phương án, việc dùng thể liên hợp và một hoặc nhiều chất hoặc phương pháp điều trị kết hợp sao

cho mức giảm triệu chứng, hoặc thông số khác liên quan đến nhiễm virut, lớn hơn mức giảm quan sát được khi dùng một chất hoặc phương pháp điều trị một mình hoặc khi không dùng cả hai. Hiệu quả của thể liên hợp và một hoặc nhiều chất có thể là cộng hợp một phần, cộng hợp toàn bộ hoặc lớn hơn cộng hợp (ví dụ, hiệp đồng). Việc sử dụng lần lượt hoặc đồng thời về cơ bản mỗi chất điều trị có thể theo đường dùng thích hợp bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dùng qua đường miệng, đường tiêm tĩnh mạch, đường tiêm bắp và hấp thụ trực tiếp qua mô niêm mạc. Các chất điều trị có thể được dùng theo cùng một đường dùng hoặc theo các đường dùng khác nhau. Ví dụ, thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch trong khi chất điều trị thứ hai của dạng kết hợp có thể được dùng qua đường miệng.

Thuật ngữ "xycloalkylen," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm vòng hóa trị hai liên kết cùng với hai phần của hợp chất. Ví dụ, một nguyên tử cacbon trong nhóm xycloalkylen có thể liên kết với một phần của hợp chất, trong khi nguyên tử cacbon khác trong nhóm xycloalkylen có thể liên kết với phần khác của hợp chất. Nhóm xycloalkylen có thể bao gồm nhóm vòng không thơm no hoặc không no. Xycloalkylen có thể có, ví dụ, ba đến hai mươi nguyên tử cacbon trong phần vòng của xycloalkylen (ví dụ, C3-C7, C3-C8, C3-C9, C3-C10, C3-C11, C3-C12, C3-C14, C3-C16, C3-C18, hoặc C3-C20 xycloalkylen). Khi nhóm xycloalkylen bao gồm ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon, nhóm xycloalkylen có thể được đề cập là nhóm "xycloalkenylen". Xycloalkenylen có thể có, ví dụ, bốn đến hai mươi nguyên tử cacbon trong phần vòng của xycloalkenylen (ví dụ, C4-C7, C4-C8, C4-C9, C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18, hoặc C4-C20 xycloalkenylen). Khi nhóm xycloalkylen bao gồm ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon, nhóm xycloalkylen có thể được đề cập là nhóm "xycloalkynylen". Xycloalkynylen có thể có, ví dụ, bốn đến hai mươi nguyên tử cacbon trong phần vòng của xycloalkynylen (ví dụ, C4-C7, C4-C8, C4-C9. C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18, hoặc C8-C20 xycloalkynylen). Nhóm xycloalkylen có thể được thế bằng các nhóm thường thích hợp làm phần tử thế cho các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl như nêu trong bản mô tả này. Heteroxycloalkylen dùng để chỉ nhóm xycloalkylen bao gồm một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại, ví dụ, N, O, và S. Các ví dụ về xycloalkylen bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xyclopropylen và xyclobutylen. Tetrahydrofuran có thể được coi là heteroxycloalkylen.

Thuật ngữ "arylen," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm aryl đa trị (ví dụ, hóa trị hai hoặc hóa trị ba) liên kết cùng nhau nhiều (ví dụ, hai hoặc ba) phần của hợp chất. Ví dụ, một nguyên tử cacbon trong nhóm arylen có thể liên kết với một phần của hợp chất, trong khi nguyên tử cacbon khác trong nhóm arylen có thể liên kết với phần khác của hợp chất. Arylen có thể có, ví dụ, năm đến mười lăm nguyên tử cacbon trong phần aryl của arylen (ví dụ, C5-C6, C5-C7, C5-C8, C5-C9, C5-C10, C5-C11, C5-C12, C5-C13, C5-C14, hoặc C5-C15 arylen). Nhóm arylen có thể được thế bằng các nhóm thường thích hợp làm phần tử thế cho các nhóm alkyl, alkenyl và alkynyl như nêu trong bản mô tả này. Heteroarylen dùng để chỉ nhóm thơm bao gồm một hoặc nhiều, ví dụ, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, hoặc 4, nguyên tử khác loại, ví dụ, N, O, và S. Nhóm heteroarylen có thể có, ví dụ, hai đến mười lăm nguyên tử cacbon (ví dụ, C2-C3, C2-C4, C2-C5, C2-C6, C2-C7, C2-C8, C2-C9, C2-C10, C2-C11, C2-C12, C2-C13, C2-C14, hoặc C2-C15 heteroarylen).

Thuật ngữ "tùy ý được thế," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ có 0, 1 phần tử thế, hoặc nhiều hơn, như 0-25, 0-20, 0-10 hoặc 0-5 phần tử thế. Phần tử thế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, alkaryl, axyl, heteroaryl, heteroalkyl, heteroalkenyl, heteroalkynyl, heteroalkaryl, halogen, oxo, xyano, nitro, amino, alkamino, hydroxy, alkoxy, alkanoyl, cacbonyl, carbamoyl, guanidinyl, ureido, amidinyl, bất kỳ trong số các nhóm hoặc gốc được mô tả trên đây, và các dạng khác loại (hetero) của bất kỳ trong số các nhóm hoặc gốc được mô tả trên đây. Phần tử thế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, F, Cl, metyl, phenyl, benzyl, OR, NR_2, SR, SOR, SO_2R, OCOR, NRCOR, $NRCONR_2$, NRCOOR, $OCONR_2$, RCO, COOR, alkyl-OOCR, SO_3R, $CONR_2$, SO_2NR_2, $NRSO_2NR_2$, CN, CF_3, OCF_3, SiR_3, và NO_2, trong đó mỗi R độc lập là H, alkyl, alkenyl, aryl, heteroalkyl, heteroalkenyl, hoặc heteroaryl, và trong đó hai trong số các phần tử thế tùy ý trên cùng nguyên tử hoặc nguyên tử liền kề có thể được nối tạo ra vòng liên hợp, tùy ý được thế thơm hoặc không thơm, no hoặc không no chứa 3-8 cạnh, hoặc hai trong số các phần tử thế tùy ý trên cùng nguyên tử có thể được nối tạo ra vòng thơm hoặc không thơm, no hoặc không no, tùy ý được thế chứa 3-8 cạnh.

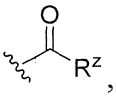
Nhóm hoặc gốc tùy ý được thế dùng để chỉ nhóm hoặc gốc (ví dụ, bất kỳ một trong số các nhóm hoặc gốc được mô tả trên đây) trong đó một trong số các nguyên tử (ví dụ, nguyên tử hydro) tùy ý được thế bằng phần tử thế khác. Ví dụ, alkyl tùy ý được

thế có thể là metyl tùy ý được thế, trong đó nguyên tử hydro của nhóm metyl được thay bằng, ví dụ, OH. Theo ví dụ khác, phần tử thế trên heteroalkyl hoặc phần bổ sung hóa trị hai của nó, heteroalkylen, có thể thay thế hydro trên cacbon hoặc hydro trên nguyên tử khác loại như N. Ví dụ, nguyên tử hydro trong nhóm -R-NH-R- có thể được thế bằng phần tử thế alkamit, ví dụ, -R-N[($CH_2C(O)N(CH_3)_2$]-R.

Nói chung, phần tử thế tùy ý là phần tử thế không nhiễu. "Phần tử thế không nhiễu" dùng để chỉ phần tử thế duy trì khả năng của các thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) liên kết với neuraminidaza virut hoặc ức chế sự tăng sinh của virut cúm. Do đó, theo một số phương án, phần tử thế có thể làm biến đổi hoạt độ này. Tuy nhiên, miễn là thể liên hợp vẫn giữ khả năng liên kết với neuraminidaza virut hoặc ức chế sự tăng sinh virut, phần tử thế sẽ được xếp vào loại "không nhiễu". Ví dụ, phần tử thế không nhiễu có thể duy trì khả năng của hợp chất trong việc tạo ra hiệu quả kháng virut dựa trên giá trị IC_{50} bằng 10 μM hoặc nhỏ hơn trong thử nghiệm làm giảm vết tan virut, như trong ví dụ 2 dựa trên giá trị IC_{50} chống lại neuraminidaza của virut cúm nhỏ hơn 500 nM. Do đó, phần tử thế có thể làm biến đổi mức độ ức chế dựa trên việc làm giảm vết tan hoặc ức chế neuraminidaza của virut cúm. Tuy nhiên, miễn là các hợp chất trong bản mô tả này như hợp chất có công thức (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII) và (A-XIII) vẫn giữ khả năng ức chế hoạt tính neuraminidaza của virut cúm, phần tử thế sẽ được xếp vào loại "không nhiễu." Một số thử nghiệm để xác định việc làm giảm vết tan virut hoặc khả năng của bất kỳ hợp chất ức chế neuraminidaza của virut cúm là khả dụng trong lĩnh vực này, và một số được lấy làm ví dụ trong ví dụ dưới đây.

Thuật ngữ "hetero," khi sử dụng để mô tả nhóm hoặc gốc hóa học, dùng để chỉ có ít nhất một nguyên tử khác loại mà không là cacbon hoặc hydro, ví dụ, N, O, và S. Bất kỳ một trong số các nhóm hoặc gốc được mô tả trên đây có thể được đề cập là hetero (khác loại) nếu nó chứa ít nhất một nguyên tử khác loại. Ví dụ, nhóm heteroxycloalkyl, heteroxycloalkenyl, hoặc heteroxycloalkynyl dùng để chỉ nhóm xycloalkyl, xycloalkenyl, hoặc xycloalkynyl có một hoặc nhiều nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ, ví dụ, N, O, và S. Ví dụ về nhóm heteroxycloalkenyl là maleimido. Ví dụ, nhóm heteroaryl dùng để chỉ nhóm thơm có một hoặc nhiều nguyên

tử khác loại độc lập được chọn từ, ví dụ, N, O, và S. Một hoặc nhiều nguyên tử khác loại cũng có thể được bao gồm trong phần tử thế mà thay thế nguyên tử hydro trong nhóm hoặc gốc như được mô tả ở đây. Ví dụ, trong nhóm heteroaryl tùy ý được thế, nếu một trong số các nguyên tử hydro trong nhóm heteroaryl được thay bằng phần tử thế (ví dụ, metyl), phần tử thế cũng có thể chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (ví dụ, metanol).

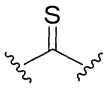
Thuật ngữ "axyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm có cấu trúc:  , trong đó R^z là alkyl, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, xycloalkynyl, aryl, alkaryl, alkamino, heteroalkyl, heteroalkenyl, heteroalkynyl, heteroxycloalkyl, heteroxycloalkenyl, heteroxycloalkynyl, heteroaryl, heteroalkaryl, hoặc heteroalkamino tùy ý được thế.

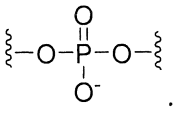
Thuật ngữ "halo" hoặc "halogen," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ bất kỳ nguyên tử halogen, ví dụ, F, Cl, Br, hoặc I. Bất kỳ một trong số các nhóm hoặc gốc được mô tả ở đây có thể được đề cập là "gốc halo" nếu nó chứa ít nhất một nguyên tử halogen, như haloalkyl.

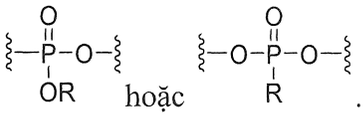
Thuật ngữ "hydroxyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm -OH.

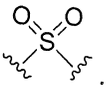
Thuật ngữ "oxo," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ phần tử thế có cấu trúc =O, trong đó có liên kết đôi giữa nguyên tử và nguyên tử oxy.

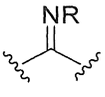
Thuật ngữ "cacbonyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm có cấu trúc:  .

Thuật ngữ "thiocacbonyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ nhóm có cấu trúc: 

Thuật ngữ "phosphat," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm có cấu trúc:  .

Thuật ngữ "phosphoryl," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm có cấu trúc:  hoặc .

Thuật ngữ "sulfonyl," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm có cấu trúc:  .

Thuật ngữ "imino," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm có cấu trúc:  , trong đó R là phần tử thế tùy ý.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ N," như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện nhóm được dự định để bảo vệ nhóm amino khỏi các phản ứng không mong muốn trong quy trình tổng hợp. Các nhóm bảo vệ N được sử dụng phổ biến được bộc lộ trong Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 5th Edition (John Wiley & Sons, New York, 2014), mà được kết hợp vào trong bản mô tả này bằng cách tham khảo. Nhóm bảo vệ N bao gồm, ví dụ, các nhóm axyl, aryloyl, và carbamyl như formyl, axetyl, propionyl, pivaloyl, t-butylaxetyl, 2-cloaxetyl, 2-bromoaxetyl, trifloaxetyl, tricloaxetyl, phtalyl, o-nitrophenoxyaxetyl, α-clobutyryl, benzoyl, carboxybenzyl (CBz), 4-clobenzoyl, 4-bromobenzoyl, 4-nitrobenzoyl, và chất trợ bất đối như các gốc axit amin dạng D, L được bảo vệ hoặc không được bảo vệ hoặc các gốc axit amin dạng D, L như alanin, leuxin, phenylalanin; nhóm chứa sulfonyl như benzensulfonyl và p-toluensulfonyl; nhóm tạo carbamat như benzyloxycacbonyl, p-clobenzyloxycacbonyl, p-metoxybenzyloxycacbonyl, p-nitrobenzyloxycacbonyl, 2-nitrobenzyloxycacbonyl, p-bromobenzyloxycacbonyl, 3,4-dimetoxybenzyloxycacbonyl, 3,5-dimetoxybenzyl oxycacbonyl, 2,4-dimetoxybenzyloxycacbonyl, 4-metoxybenzyloxycacbonyl, 2-nitro-4,5-dimetoxybenzyloxycacbonyl, 3,4,5-trimetoxybenzyloxycacbonyl, 1-(p-biphenylyl)-1-metyletoxycacbonyl, α,α-dimetyl-3,5-dimetoxybenzyloxycacbonyl, benzhydryloxy cacbonyl, t-butyloxycacbonyl (BOC), diisopropylmetoxycacbonyl, isopropyloxycacbonyl, etoxycacbonyl, metoxycacbonyl, alyloxycacbonyl, 2,2,2,-tricloetoxycacbonyl, phenoxycacbonyl, 4-nitrophenoxy cacbonyl, fluorenyl-9-metoxycacbonyl (Fmoc), xyclopentyloxycacbonyl, adamantyloxycacbonyl,

xyclohexyloxycacbonyl, và phenylthiocacbonyl; nhóm alkaryl như benzyl, triphenylmetyl, và benzyloxymetyl; và nhóm silyl như trimetylsilyl.

Thuật ngữ "axit amin", như được sử dụng trong bản mô tả này, là axit amin có trong tự nhiên và axit amin không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "axit amin có trong tự nhiên", như được sử dụng trong bản mô tả này, là axit amin bao gồm Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, và Val.

Thuật ngữ "axit amin không có trong tự nhiên", như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là axit amin alpha không được tạo ra hoặc tìm thấy trong tự nhiên ở động vật có vú. Các ví dụ về axit amin không có trong tự nhiên bao gồm axit amin dạng D; axit amin có nhóm axetylaminometyl gắn vào nguyên tử lưu huỳnh của xystein; axit amin được peg hóa; axit amin omega có công thức $NH_2(CH_2)_nCOOH$ trong đó n là 2-6, axit amin trung tính không phân cực, như sarcosin, t-butyl alanin, t-butyl glyxin, N-metyl isoleuxin, và norleuxin; oxymethionin; phenylglyxin; xitrulin; methionin sulfoxit; axit xysteic; ornithin; axit diaminobutyric; 3-aminoalanin; 3-hydroxy-D-prolin; axit 2,4-diaminobutyric; axit 2-aminopentanoic; axit 2-aminooctanoic, 2-carboxy piperazin; axit piperazin-2-carboxylic, axit 2-amino-4-phenylbutanoic; 3-(2-naphtyl)alanin, và hydroxyprolin. Các axit amin khác là axit α-aminobutyric, α-amino-α-metylbutyrat, aminoxyclopropan-carboxylat, axit aminoisobutyric, aminonorbornyl-carboxylat, L-xyclohexylalanin, xyclopentylalanin, L-N-metylleuxin, L-N-metylmethionin, L-N-metylnorvalin, L-N-metylphenylalanin, L-N-metylprolin, L-N-metylserin, L-N-metyltryptophan, D-ornithin, L-N-metyletylglyxin, L-norleuxin, α-metyl-aminoisobutyrat, α-metylxyclohexylalanin, D-α-metylalanin, D-α-metylarginin, D-α-metylasparagin, D-α-metylaspartat, D-α-metylxystein, D-α-metylglutamin, D-α-metylhistidin, D-α-metylisoleuxin, D-α-metylleuxin, D-α-metyllysin, D-α-metylmethionin, D-α-metylornithin, D-α-metylphenylalanin, D-α-metylprolin, D-α-metylserin, D-N-metylserin, D-α-metylthreonin, D-α-metyltryptophan, D-α-metyltyrosin, D-α-metylvalin, D-N-metylalanin, D-N-metylarginin, D-N-metylasparagin, D-N-metylaspartat, D-N-metylxystein, D-N-metylglutamin, D-N-metylglutamat, D-N-metylhistidin, D-N-metylisoleuxin, D-N-metylleuxin, D-N-metyllysin, N-metylxyclohexylalanin, D-N-metylornithin, N-metylglyxin, N-metylaminoisobutyrat, N-(1-metylpropyl)glyxin, N-

(2-metylpropyl)glyxin, D-N-metyltryptophan, D-N-metyltyrosin, D-N-metylvalin, axit γ-aminobutyric, L-t-butylglyxin, L-etylglyxin, L-homophenylalanin, L-α-metylarginin, L-α-metylaspartat, L-α-metylxystein, L-α-metylglutamin, L-α-metylhistidin, L-α-metylisoleuxin, L-α-metylleuxin, L-α-metylmethionin, L-α-metylnorvalin, L-α-metylphenylalanin, L-α-metylserin, L-α-metyltryptophan, L-α-metylvalin, N-(N-(2,2-diphenyletyl) carbamylmetylglyxin, 1-carboxy-1-(2,2-diphenyl-etylamino) xyclopropan, 4-hydroxyprolin, ornithin, 2-aminobenzoyl (anthraniloyl), D-xyclohexylalanin, 4-phenyl-phenylalanin, L-xitrulin, α-xyclohexylglyxin, axit L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxylic, axit L-thiazolidin-4-carboxylic, L-homotyrosin, L-2-furylalanin, L-histidin (3-metyl), N-(3-guanidinopropyl)glyxin, O-metyl-L-tyrosin, O-glycan-serin, meta-tyrosin, nor-tyrosin, L-N,N′,N″-trimetyllysin, homolysin, norlysin, N-glycan asparagin, 7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-4-flophenylalanin, 4-metylphenylalanin, bis-(2-picolyl)amin, pentaflophenylalanin, axit indolin-2-carboxylic, axit 2-aminobenzoic, axit 3-amino-2-naphtoic, dimetylarginin không đối xứng, axit L-tetrahydroisoquinolin-1-carboxylic, axit D-tetrahydroisoquinolin-1-carboxylic, axit 1-amino-xyclohexan axetic, D/L-alylglyxin, axit 4-aminobenzoic, axit 1-amino-xyclobutan carboxylic, axit 2 hoặc 3 hoặc 4-aminoxyclohexan carboxylic, axit 1-amino-1-xyclopentan carboxylic, axit 1-aminoindan-1-carboxylic, axit 4-amino-pyrolidin-2-carboxylic, axit 2-aminotetralin-2-carboxylic, axit azetidin-3-carboxylic, axit 4-benzyl-pyrolidin-2-carboxylic, tert-butylglyxin, b-(benzothiazolyl-2-yl)-alanin, b-xyclopropyl alanin, axit 5,5-dimetyl-1,3-thiazolidin-4-carboxylic, axit (2R,4S)4-hydroxypiperidin-2-carboxylic, axit (2S,4S) và (2S,4R)-4-(2-naphtylmetoxy)-pyrolidin-2-carboxylic, axit (2S,4S) và (2S,4R)4-phenoxy-pyrolidin-2-carboxylic, axit (2R,5S) và (2S,5R)-5-phenyl-pyrolidin-2-carboxylic, axit (2S,4S)-4-amino-1-benzoyl-pyrolidin-2-carboxylic, t-butylalanin, axit (2S,5R)-5-phenyl-pyrolidin-2-carboxylic, axit 1-aminometyl-xyclohexan-axetic, axit 3,5-bis-(2-amino)etoxy-benzoic, axit 3,5-diamino-benzoic, axit 2-metylamino-benzoic, axit N-metylanthranylic, L-N-metylalanin, L-N-metylarginin, L-N-metylasparagin, axit L-N-metylaspartic, L-N-metylxystein, L-N-metylglutamin, axit L-N-metylglutamic, L-N-metylhistidin, L-N-metylisoleuxin, L-N-metyllysin, L-N-metylnorleuxin, L-N-metylornithin, L-N-metylthreonin, L-N-metyltyrosin, L-N-metylvalin, L-N-metyl-t-butylglyxin, L-norvalin, α-metyl-γ-aminobutyrat, 4,4′-

biphenylalanin, α-metylxylcopentylalanin, α-metyl-α-naptylalanin, α-metylpenixilamin, N-(4-aminobutyl)glyxin, N-(2-aminoetyl)glyxin, N-(3-aminopropyl)glyxin, N-amino-α-metylbutyrat, α-naptylalanin, N-benzylglyxin, N-(2-carbamyletyl)glyxin, N-(carbamylmetyl)glyxin, N-(2-carboxyetyl)glyxin, N-(carboxymetyl)glyxin, N-xyclobutylglyxin, N-xyclodexylglyxin, N-xycloheptylglyxin, N-xyclohexylglyxin, N-xyclodexylglyxin, N-xyclododexylglyxin, N-xyclooctylglyxin, N-xyclopropylglyxin, N-xycloundexylglyxin, N-(2,2-diphenyletyl)glyxin, N-(3,3-diphenylpropyl)glyxin, N-(3-guanidinopropyl)glyxin, N-(1-hydroxyetyl)glyxin, N-(hydroxyetyl))glyxin, N-(imidazolyletyl))glyxin, N-(3-indolylyetyl)glyxin, N-metyl-γ-aminobutyrat, D-N-metylmethionin, N-metylxyclopentylalanin, D-N-metylphenylalanin, D-N-metylprolin, D-N-metylthreonin, N-(1-metyletyl)glyxin, N-metyl-naptylalanin, N-metylpenixilamin, N-(p-hydroxyphenyl)glyxin, N-(thiometyl)glyxin, penixilamin, L-α-metylalanin, L-α-metylasparagin, L-α-metyl-t-butylglyxin, L-metyletylglyxin, L-α-metylglutamat, L-α-metylhomophenylalanin, N-(2-metylthioetyl)glyxin, L-α-metyllysin, L-α-metylnorleuxin, L-α-metylornithin, L-α-metylprolin, L-α-metylthreonin, L-α-metyltyrosin, L-N-metyl-homophenylalanin, N-(N-(3,3-diphenylpropyl) carbamylmetylglyxin, axit L-pyroglutamic, axit D-pyroglutamic, O-metyl-L-serin, O-metyl-L-homoserin, 5-hydroxylysin, α-carboxyglutamat, phenylglyxin, axit L-pipecolic (homoprolin), L-homoleuxin, L-lysin (dimetyl), L-2-naphtylalanin, L-dimetyldopa hoặc L-dimetoxy-phenylalanin, L-3-pyridylalanin, L-histidin (benzoyloxymetyl), N-xycloheptylglyxin, L-diphenylalanin, O-metyl-L-homotyrosin, L-β-homolysin, O-glycan-threoin, Ortho-tyrosin, L-N,N'-dimetyllysin, L-homoarginin, neotryptophan, 3-benzothienylalanin, axit isoquinolin-3-carboxylic, axit diaminopropionic, homoxystein, 3,4-dimetoxyphenylalanin, 4-clophenylalanin, axit L-1,2,3,4-tetrahydronorharman-3-carboxylic, adamantylalanin, dimetylarginin đối xứng, 3-carboxythiomorpholin, axit D- 1,2,3,4-tetrahydronorharman-3-carboxylic, axit 3-aminobenzoic, 3-amino-1-carboxymetyl-pyridin-2-on, axit 1-amino-1-xyclohexan carboxylic, axit 2-aminoxyclopentan carboxylic, axit 1-amino-1-xyclopropan carboxylic, 2-aminoindan-2-carboxylic, axit 4-amino-tetrahydrothiopyran-4-carboxylic, axit azetidin-2-carboxylic, b-(benzothiazol-2-yl)-alanin, neopentylglyxin, 2-carboxymetyl piperidin, b-xyclobutyl alanin, alylglyxin, axit diaminopropionic, homo-xyclohexyl alanin, axit (2S,4R)-4-

hydroxypiperidin-2-carboxylic, axit octahydroindol-2-carboxylic, (2S,4R) và (2S,4R)-4-(2-naphtyl), axit pyrolidin-2-carboxylic, axit nipecotic, axit (2S,4R) và (2S,4S)-4-(4-phenylbenzyl) pyrolidin-2-carboxylic, axit (3S)-1-pyrolidin-3-carboxylic, axit (2S,4S)-4-tritylmercapto-pyrolidin-2-carboxylic, (2S,4S)-4-mercaptoprolin, t-butylglyxin, N,N-bis(3-aminopropyl)glyxin, axit 1-amino-xyclohexan-1-carboxylic, N-mercaptoetylglyxin, và selenoxystein. Theo một số phương án, gốc axit amin có thể mang điện hoặc phân cực. Axit amin mang điện bao gồm alanin, lysin, axit aspartic, hoặc axit glutamic, hoặc các chất tương tự không có trong tự nhiên của chúng. Axit amin phân cực bao gồm glutamin, asparagin, histidin, serin, threonin, tyrosin, methionin, hoặc tryptophan, hoặc các chất tương tự không có trong tự nhiên của chúng. Theo một số phương án, đã dự tính cụ thể rằng nhóm amino đầu tận cùng trong axit amin có thể là nhóm amido hoặc nhóm carbamat.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần trăm (%) đồng nhất" dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm gốc axit amin của trình tự ứng viên, ví dụ, Fc-IgG, hoặc mảnh của nó, giống hệt với gốc axit amin của trình tự tham chiếu sau khi sắp hàng trình tự và đưa vào khoảng trống, nếu cần, để đạt tối đa phần trăm đồng nhất (tức là, khoảng trống có thể được đưa vào ở một hoặc cả hai ứng viên và trình tự tham chiếu để sắp hàng tối ưu và trình tự không tương đồng có thể được bỏ qua nhằm mục đích so sánh). Việc sắp hàng nhằm xác định phần trăm đồng nhất có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau nằm trong phạm vi hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính khả dụng công khai như BLAST, ALIGN, hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định thông số thích hợp để sắp hàng, bao gồm bất kỳ thuật toán cần thiết để đạt được việc sắp hàng tối ưu trên toàn bộ chiều dài của trình tự được so sánh. Theo một số phương án, phần trăm đồng nhất của trình tự axit amin của trình tự ứng viên nhất định đối với, với, hoặc so với trình tự tham chiếu nhất định (mà có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự ứng viên nhất định có hoặc bao gồm phần trăm đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc so với trình tự tham chiếu nhất định) được tính như sau:

100 x (phân số A/B)

trong đó A là số gốc axit amin được tính điểm là giống hệt trong sắp hàng trình tự ứng viên và trình tự tham chiếu, và trong đó B là tổng số gốc axit amin trong trình

tự tham chiếu. Theo một số phương án trong đó chiều dài của trình tự ứng viên không bằng chiều dài của trình tự tham chiếu, phần trăm đồng nhất của trình tự axit amin của trình tự ứng viên với trình tự tham chiếu sẽ không bằng phần trăm đồng nhất của trình tự axit amin của trình tự tham chiếu với trình tự ứng viên.

Hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit được coi là "giống hệt" nếu trình tự nucleotit hoặc axit amin trong hai trình tự là như nhau khi sắp hàng cho tương ứng tối đa như được mô tả trên đây. So sánh giữa hai trình tự thường được thực hiện bằng cách so sánh trình tự qua cửa sổ so sánh để nhận dạng và so sánh các vùng cục bộ về mức tương đồng trình tự. "Cửa sổ so sánh", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ đoạn gồm ít nhất khoảng 15 vị trí liền kề, khoảng 20 vị trí liền kề, khoảng 25 vị trí liền kề, hoặc nhiều hơn (ví dụ, khoảng 30 đến khoảng 75 vị trí liền kề, hoặc khoảng 40 đến khoảng 50 vị trí liền kề), trong đó trình tự có thể so với trình tự tham chiếu có cùng số vị trí liền kề sau khi hai trình tự được sắp hàng tối ưu.

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "để điều trị," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ việc điều trị lây nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut như lây nhiễm virut cúm) ở đối tượng. Theo một số phương án, việc điều trị có thể làm chậm sự tiến triển của lây nhiễm virut, cải thiện kết quả ở đối tượng, và/hoặc loại bỏ lây nhiễm. Theo một số phương án, việc điều trị lây nhiễm virut ở đối tượng có thể làm dịu hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng hoặc tình trạng liên quan đến lây nhiễm virut, làm giảm thiểu phạm vi virut, bình ổn (tức là, không trầm trọng thêm) tình trạng lây nhiễm virut, ngăn ngừa lây lan lây nhiễm virut, và/hoặc trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của lây nhiễm virut, so với tình trạng và/hoặc tình trạng lây nhiễm virut khi không được điều trị.

Thuật ngữ "giá trị trung bình của T," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ số lượng trung bình của monome của chất ức chế neuraminidaza hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin trong tập hợp của các thể liên hợp. Theo một số phương án, trong tập hợp của các thể liên hợp, số lượng trung bình của monome của chất ức chế neuraminidaza hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với monome miền Fc có thể là từ 1 đến 20 (ví dụ, giá trị trung bình của T là từ 1 đến 2, 1 đến 3, 1 đến 4, 1 đến 5, 5 đến 10, 10 đến 15, 15 đến 20, 1,5 đến 3,5, 2,5 đến 4.,5, 3,5 đến 5,5, 4,5 đến 6,5, 5,5 đến 7,5, 6,5

đến 8,5, 7,5 đến 9,5, hoặc 8,5 đến 10,5). Theo một số phương án, giá trị trung bình của T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20.

Thuật ngữ "đối tượng", như được sử dụng trong bản mô tả này, có thể là người, động vật linh trưởng không phải là người, hoặc động vật có vú khác như, nhưng không giới hạn ở, chó, mèo, ngựa, bò, lợn, gà tây, dê, cá, khỉ, gà, chuột cống, chuột nhắt, và cừu.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ lượng, ví dụ, liều dược phẩm, có hiệu quả trong việc tạo ra tác dụng mong muốn ở đối tượng hoặc trong điều trị đối tượng có tình trạng hoặc rối loạn được mô tả ở đây (ví dụ, lây nhiễm virut, như lây nhiễm cúm). Trong bản mô tả này người ta cũng hiểu rằng "lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị" có thể được hiểu là lượng tạo ra tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa mong muốn, dùng trong một hoặc nhiều liều hoặc trong bất kỳ liều dùng hoặc đường dùng, và/hoặc dùng riêng lẻ hoặc kết hợp với chất điều trị bệnh khác (ví dụ, chất kháng virut được mô tả ở đây). Ví dụ, trong trường hợp dùng thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) được sử dụng để điều trị lây nhiễm virut, lượng hữu hiệu của thể liên hợp là, ví dụ, lượng đủ để ngăn ngừa, làm chậm, hoặc đảo ngược sự tiến triển lây nhiễm virut so với đáp ứng thu được mà không dùng thể liên hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ thuốc hoặc dược phẩm chứa ít nhất một thành phần hoạt tính (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) cũng như một hoặc nhiều tá dược và chất pha loãng cho phép thành phần hoạt tính thích hợp với phương pháp dùng. Dược phẩm theo sáng chế bao gồm thành gốcợc dụng tương thích với thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang dược dụng" dùng để chỉ tá dược hoặc chất pha loãng trong dược phẩm. Ví dụ, chất mang dược dụng có thể là chất dẫn có khả năng tạo huyền phù hoặc hòa tan thể liên hợp hoạt tính (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), hoặc (M-I)-(M-VI)). Chất mang dược dụng phải là tương thích với thành phần khác của chế

phẩm và không gây hại cho đối tượng nhận. Theo sáng chế, chất mang dược dụng phải tạo tính ổn định dược thích hợp với thể liên hợp được mô tả ở đây. Bản chất của chất mang khác nhau tùy theo đường dùng. Ví dụ, để dùng qua đường miệng, chất mang rắn được ưu tiên; để dùng trong tĩnh mạch, chất mang dạng dung dịch nước (ví dụ, WFI và/hoặc dung dịch đệm) thường được sử dụng.

Thuật ngữ "muối dược dụng", như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện muối của các thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) mà, trong phạm vi đánh giá y khoa hợp lý, thích hợp để sử dụng trong phương pháp được mô tả ở đây mà không gây độc, kích ứng, và/hoặc dị ứng. Muối dược dụng là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, muối dược dụng được mô tả trong: Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Eds. P.H. Stahl và C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Muối có thể được điều chế tại chỗ trong quá trình tách và tinh chế cuối các thể liên hợp được mô tả ở đây hoặc riêng rẽ bằng cách cho nhóm bazơ tự do phản ứng với axit hữu cơ thích hợp.

Thuật ngữ "tỷ lệ thuốc/kháng thể" hoặc "DAR" dùng để chỉ số lượng trung bình của gốc thuốc phân tử nhỏ (ví dụ, số lượng trung bình của monome hoặc dime của thuốc phân tử nhỏ) được liên hợp với kháng thể, miền Fc, hoặc protein albumin được mô tả ở đây. Theo một số phương án được mô tả ở đây, DAR được thể hiện bằng "T" (ví dụ, trong công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)). Như được sử dụng trong bản mô tả này, mỗi gốc monome (ví dụ, monome mỗi zanamivir hoặc peramivir) hoặc mỗi gốc dime (ví dụ, mỗi dime zanamivir hoặc dime peramivir) được liên hợp với miền Fc, kháng thể, hoặc protein albumin tương ứng với giá trị DAR bằng 1,0 (ví dụ, giá trị "T" bằng 1,0). Ví dụ, miền Fc được liên hợp với 4 monome zanamivir có thể có DAR bằng 4,0 (ví dụ, "T" bằng 4,0). Miền Fc được liên hợp với 4 dime zanamivir (ví dụ, tổng 8 phân tử zanamivir) cũng có thể có DAR bằng 4,0 (ví dụ, "T" bằng 4,0). DAR cũng có thể được tính là DAR trung bình cho tập hợp các phân tử, như tập hợp các miền Fc, kháng thể, hoặc protein albumin. Giá trị DAR có thể ảnh hưởng đến hiệu lực, mức hiệu nghiệm, dược động học, hoặc độc tính của thuốc.

Thuật ngữ "lây nhiễm thứ phát", như được sử dụng ở đây, đề cập đến tình trạng lây nhiễm xảy ra ở một đối tượng trong hoặc sau một lần lây nhiễm khác (được gọi là

nguyên phát) ở đối tượng đó (ví dụ, trong hoặc sau một lần lây nhiễm cúm nguyên phát). Lây nhiễm thứ phát có thể do lây nhiễm nguyên phát hoặc có thể do điều trị lây nhiễm nguyên phát. Trong một số trường hợp, lây nhiễm nguyên phát làm thay đổi hệ thống miễn dịch khiến đối tượng dễ bị lây nhiễm thứ phát hơn. Trong một số trường hợp, việc điều trị lây nhiễm nguyên phát làm cho đối tượng dễ bị lây nhiễm thứ phát hơn. Ví dụ, virut cúm có liên quan đến các bệnh lây nhiễm thứ phát (ví dụ, tăng nguy cơ phát triển bệnh lây nhiễm thứ phát), chẳng hạn như các bệnh lây nhiễm thứ phát do vi khuẩn, ví dụ, ở đường hô hấp. Lây nhiễm thứ phát liên quan đến lây nhiễm cúm làm tăng tỷ lệ mắc và tử vong do cúm. Lây nhiễm thứ phát bao gồm các bệnh đồng nhiễm. Thuật ngữ "lây nhiễm thứ phát" và "đồng nhiễm" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây.

Thuật ngữ "khoảng," như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ ra độ lệch lên đến ±5%. Ví dụ, khoảng 10% dùng để chỉ từ 9,5% đến 10,5%.

Giá trị bất kỳ nêu trong khoảng giá trị bao gồm cả giới hạn trên và dưới, và giá trị bất kỳ chứa trong giới hạn trên và dưới.

Thuật ngữ "(1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)", như được sử dụng trong bản mô tả này, thể hiện công thức của bất kỳ một trong số (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6), (M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1),

(M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3), (M-XI), (M-XI-1), hoặc (M'-I)).

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của các thể liên hợp được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng từ phần Mô tả chi tiết sáng chế và Yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là ảnh mô tả phương pháp được lấy làm ví dụ để liên hợp monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, ví dụ, nhờ yếu tố liên kết, với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin.

FIG. 2 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 1.

FIG. 3 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 3.

FIG. 4 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 5.

FIG. 5 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 7.

FIG. 6 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 9.

FIG. 7 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 12.

FIG. 8 thể hiện SDS-PAGE khử và không khử và sơ đồ minh họa của miền Fc tạo ra từ monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 14.

FIG. 9 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 1.

FIG. 10 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 2.

FIG. 11 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 3.

FIG. 12 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 4.

FIG. 13 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 5.

FIG. 14 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 6.

FIG. 15 là đồ thị thể hiện giá trị IC_{50} từ thử nghiệm ức chế neuraminidaza H1N1 đối với Int-2 và thể liên hợp 1.

FIG. 16 là đồ thị thể hiện giá trị IC_{50} từ thử nghiệm ức chế neuraminidaza H1N1 đối với thể liên hợp 1-6.

FIG. 17 là đồ thị thể hiện giá trị IC_{50} từ thử nghiệm ức chế neuraminidaza H3N2 đối với thể liên hợp 1-6.

FIG. 18A-18C là loạt đồ thị thể hiện khả năng sống sót của tế bào của tế bào A549 được điều trị bằng thể liên hợp 3 (FIG. 18A), thể liên hợp 4 (FIG. 18B), hoặc thể liên hợp 6 (FIG. 18C).

FIG. 19A-19E là loạt đồ thị thể hiện khả năng của thể liên hợp 3 trong việc ức chế sự sinh trưởng của các chủng virut cúm gây bệnh A/WSN/33 H1N1 (FIG. 19A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (FIG. 19B), A/California/04/09 H1N1 pdm (FIG. 19C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (FIG. 19D), hoặc B/Lee/40 Victoria (FIG. 19E) ở tế bào biểu mô người.

FIG. 20A-20E là loạt đồ thị thể hiện khả năng của thể liên hợp 4 trong việc ức chế sự sinh trưởng của các chủng virut cúm gây bệnh A/WSN/33 H1N1 (FIG. 20A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (FIG. 20B), A/California/04/09 H1N1 pdm (FIG. 20C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (FIG. 20D), hoặc B/Lee/40 Victoria (FIG. 20E) ở tế bào biểu mô người.

FIG. 21A-21E là loạt đồ thị thể hiện khả năng của thể liên hợp 6 trong việc ức chế sự sinh trưởng của các chủng virut cúm gây bệnh A/WSN/33 H1N1 (FIG. 21A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (FIG. 21B), A/California/04/09 H1N1 pdm (FIG. 21C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (FIG. 21D), hoặc B/Lee/40 Victoria (FIG. 21E) ở tế bào biểu mô người.

FIG. 22A-22E là loạt đồ thị thể hiện khả năng của thể liên hợp 6 trong việc ức chế sự sinh trưởng của các chủng virut cúm gây bệnh A/WSN/33 H1N1 (FIG. 22A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (FIG. 22B), A/California/04/09 H1N1 pdm (FIG. 22C), B/Lee/40 Victoria (FIG. 22D), hoặc A/Vietnam/1203/04 (FIG. 22E) ở tế bào biểu mô người, so với Oseltamivir.

FIG. 23 là đồ thị thể hiện nồng độ huyết thanh chuột nhắt tương đối của thể liên hợp 6 so với Fc (hIgG1) một mình.

FIG. 24 là đồ thị thể hiện tác dụng của thể liên hợp 6 đối với cân nặng chuột nhắt trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 29.

FIG. 25 là đồ thị thể hiện tác dụng của thể liên hợp 6 đối với khả năng sống sót trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 29.

FIG. 26 là đồ thị thể hiện tác dụng của thể liên hợp 6 đối với cân nặng chuột nhắt trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 30.

FIG. 27 là đồ thị thể hiện tác dụng của thể liên hợp 6 đối với khả năng sống sót trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 30.

FIG. 28 là ảnh mô tả phương pháp liên hợp monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, ví dụ, nhờ yếu tố liên kết, với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin bởi liên hợp oxim với gốc axit amin, ví dụ, nguyên tử nitơ của lysin tiếp cận bề mặt.

FIG. 29 là ảnh mô tả phương pháp liên hợp monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, ví dụ, nhờ yếu tố liên kết, với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin bởi liên hợp thioete với gốc axit amin, ví dụ, nguyên tử nitơ của lysin tiếp cận bề mặt.

FIG. 30 là ảnh mô tả phương pháp liên hợp monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, ví dụ, nhờ yếu tố liên kết, với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin bởi liên hợp xystein được liên kết cầu lại, ví dụ, liên hợp xystein được liên kết cầu với cặp nguyên tử lưu huỳnh của hai xystein bản lề ở monome miền Fc hoặc miền Fc.

FIG. 31A-31F là loạt đồ thị thể hiện khả năng sống sót của chuột nhắt được điều trị bằng thể liên hợp 6 trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Chuột nhắt được điều trị bằng Oseltamivir (Tamiflu™) đối chứng, 20 mg/kg, 2x hàng ngày, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 31A); thể liên hợp 6, 50 mg/kg, 1 liều 28 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 31B); thể liên hợp 6, 10 mg/kg, 1 liều 28 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 31C); thể liên hợp 6, 5 mg/kg, 1 liều 28 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 31D); thể liên hợp 6, 2,5 mg/kg, 1 liều 28 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 31E); hoặc thể liên hợp 6, 1,25 mg/kg, 1 liều 28 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 31F). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 33.

FIG. 32A-32F là loạt đồ thị thể hiện rằng thể liên hợp 6 mở rộng cửa sổ điều trị so với Oseltamivir (Tamiflu™) khi được xác định bằng khả năng sống sót trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Chuột nhắt được điều trị bằng tá dược (PBS), Fc duy nhất 10 mpk, hoặc thể liên hợp 6, 4 giờ trước khi lây nhiễm (FIG. 32A); thể liên hợp 6 hoặc Oseltamivir (Tamiflu™), 8 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 32B); thể liên hợp 6 hoặc Oseltamivir (Tamiflu™), 24 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 32C); thể liên hợp 6 hoặc Oseltamivir (Tamiflu™), 48 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 32D); thể liên hợp 6 hoặc Oseltamivir (Tamiflu™), 72 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 32E); hoặc thể liên hợp 6 hoặc Oseltamivir (Tamiflu™), 96 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 32F). Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 34.

FIG. 33 là đồ thị thể hiện không có tác dụng đáng kể của việc tăng cân được quan sát thấy sau khi dùng thể liên hợp 6 trong nghiên cứu tìm giới hạn liều độc trong 14 ngày ở chuột cống. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 35.

FIG. 34A-34D là loạt đồ thị thể hiện rằng thể liên hợp 6 mở rộng cửa sổ điều trị so với Oseltamivir (Tamiflu™) khi được xác định bằng khả năng sống sót trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Chuột nhắt được điều trị bằng Oseltamivir (Tamiflu™) đối chứng, 20 mg/kg, 2x hàng ngày, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm (FIG. 34A); thể liên hợp 6, 10 mg/kg, 1 liều 4 giờ trước khi lây nhiễm (FIG. 34B); thể liên hợp 6, 2 mg/kg, 1 liều 4 giờ trước khi lây nhiễm (FIG. 34C); hoặc thể liên hợp 6, 0,4 mg/kg, 1 liều 4 ngày trước khi lây nhiễm (FIG. 34D). Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 37.

FIG. 35 là đồ thị thể hiện tác dụng của thể liên hợp 6 đối với cân nặng chuột nhắt trong mô hình bệnh cúm gây chết ở chuột nhắt. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 37.

FIG. 36 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học trong 7 ngày ở chuột cống sau khi dùng qua đường IV (tiêm trong tĩnh mạch) thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 38.

FIG. 37 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học trong 14 ngày ở chuột cống sau khi dùng qua đường IV thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 39.

FIG. 38 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học trong 28 ngày ở chuột cống so sánh Việc dùng IV và SC thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 40.

FIG. 39 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học trong 28 ngày ở động vật linh trưởng không phải là người sau khi dùng qua đường IV thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 41.

FIG. 40 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học phân bố ở phổi chuột nhắt sau khi dùng qua đường IV thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 42.

FIG. 41 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học 5 ngày ở chuột nhắt so sánh dùng IV, SC và IM thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 43.

FIG. 42 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 8.

FIG. 43 thể hiện cấu trúc của thể liên hợp 6.

FIG. 44 là đồ thị thể hiện nghiên cứu độ ổn định huyết tương chuột nhắt in vitro trong 24 giờ so sánh giữa thể liên hợp 6 ủ ở 37°C trong 24 giờ so với hợp chất đối chứng và hợp chất nguyên chất.

FIG. 45 là đồ thị thể hiện nghiên cứu độ ổn định huyết tương người in vitro trong 24 giờ so sánh giữa thể liên hợp 6 ủ ở 37°C trong 24 giờ so với hợp chất đối chứng và hợp chất nguyên chất .

FIG. 46 là đồ thị thể hiện nghiên cứu độ ổn định vi thể gan chuột nhắt trong 24 giờ so sánh thể liên hợp 6 ủ ở 37°C trong 24 giờ ở tế bào vi thể gan chuột nhắt và tế bào vi thể gan chuột nhắt được tiêu diệt bằng nhiệt làm đối chứng.

FIG. 47 là đồ thị thể hiện nghiên cứu độ ổn định vi thể gan người trong 24 giờ so sánh thể liên hợp 6 ủ ở 37°C trong 24 giờ ở tế bào vi thể gan người và tế bào vi thể gan chuột nhắt được tiêu diệt bằng nhiệt làm đối chứng.

FIG. 48 là đồ thị thể hiện % mức thay đổi cân nặng ở chuột nhắt trong 15 ngày sau thử thách virut. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 66.

FIG. 49 là đồ thị thể hiện % mức sống sót ở chuột nhắt trong 15 ngày sau thử thách virut. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 66.

FIG. 50 là đồ thị thể hiện liên kết của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12 so với hIgG1 Fc (WT) và hIgG1 Fc (N297A) với thụ thể Fcγ IIIA. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 67.

FIG. 51 là đồ thị thể hiện liên kết của thể liên hợp 6 và thể liên hợp với thụ thể Fcγ IIIA. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 67.

FIG. 52 là đồ thị thể hiện nghiên cứu độc lực ở động vật linh trưởng không phải là người trong 7 ngày sau khi dùng qua đường IV thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 68.

FIG. 53 là đồ thị thể hiện nghiên cứu dược động học ở động vật linh trưởng không phải là người trong 28 ngày so sánh việc dùng IV (tiêm tĩnh mạch) và SC (tiêm dưới da) thể liên hợp 6. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 68.

FIG. 54 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 12.

FIG. 55 thể hiện SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 13 có các giá trị tỷ lệ thuốc/kháng thể (DAR) (thể liên hợp 13a, thể liên hợp 13b, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, thể liên hợp 13e, thể liên hợp 13f, và thể liên hợp 13g) khác nhau.

FIG. 56 là đồ thị thể hiện % mức sống sót ở chuột nhắt tổn thương miễn dịch sau 35 ngày thử thách virut. Nhóm điều trị 0,3 mg/kg thể liên hợp 6 duy trì mức sống sót 100% nhưng hơi lệch trên đồ thị nhằm rõ ràng. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 95.

FIG. 57 là đồ thị thể hiện % mức thay đổi cân nặng ở chuột nhắt tổn thương miễn dịch sau 35 ngày thử thách virut. Nghiên cứu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 95.

FIG. 58 là đồ thị thể hiện việc dùng thể liên hợp 6 dẫn đến sự thanh thải virut phụ thuộc vào liều lượng ở phổi của chuột nhiễm bệnh cúm A (H1N1) và sự thanh thải virut này lớn hơn mẫu đối chứng dùng PBS, mẫu đối chứng chỉ dùng Fc, hoặc mẫu đối chứng dùng Oseltamivir. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 96.

FIG. 59 là đồ thị cho thấy rằng việc dùng thể liên hợp 6 dẫn đến sự giảm phụ thuộc vào liều lượng của xytokin viêm ở phổi ở chuột nhiễm bệnh cúm A (H1N1). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 97.

FIG. 60 là đồ thị thể hiện dược động học của thể liên hợp 6 ở chuột nhắt BALB/c SCID (tổn thương miễn dịch) và chuột nhắt CD-1 (có thẩm quyền miễn dịch). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 98.

FIG. 61 là ảnh mô tả thể liên hợp 33.

FIG. 62A-62B là đồ thị thể hiện mức thay đổi cân nặng (%) ở chuột nhắt BALB/c được thử thách trong mũi với LD_{95} gấp 3 lần so với cúm A.PR/8/1934 (H1N1) đã thích nghi ở chuột. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 63A là đồ thị thể hiện tải lượng virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 63B là đồ thị thể hiện mức giảm log về tải lượng virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 64A là đồ thị thể hiện việc dùng thể liên hợp 33 dẫn đến giảm phụ thuộc vào liều lượng của tải lượng virut ở chuột nhiễm bệnh cúm A (H1N1) được so sánh với mẫu đối chứng dùng PBS hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 64B là đồ thị thể hiện mức giảm log về tải lượng virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 65A-65E là loạt đồ thị dạng thanh thể hiện việc dùng thể liên hợp 33 dẫn đến giảm nồng độ xytokin phụ thuộc vào liều lượng đối với TNF-α (FIG. 65A), IL-6 (FIG. 65B), INF-γ (FIG. 65C), MCP-1 (FIG. 65D) và MIP-1α (FIG. 65E). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 133.

FIG. 66 là sắc ký đồ cho thấy độ ổn định của Int-80 so với Int-4 ở ngày thứ 7 khi ủ ở 37°C và 60°C. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 142.

FIG. 67 là đồ thị thể hiện cấy chuyển A/CA/09 pdm với sự có mặt của thể liên hợp 6, oseltamivir, baloxavir hoặc đối chứng dùng PBS ở tế bào A549 để đánh giá khả năng phát triển của chủng virut đột biến kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc với chất ức chế virut. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 147.

FIG. 68 là đồ thị thể hiện cấy chuyển A/WSN/1933 với sự có mặt của thể liên hợp 6, thể liên hợp 33, oseltamivir, baloxavir hoặc đối chứng dùng PBS ở tế bào MDCK để đánh giá khả năng phát triển của chủng virut đột biến kháng thuốc dưới áp

lực chọn lọc với chất ức chế virut. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 147.

FIG. 69 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 6 chống lại cúm A H1N1. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 70 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng bởi thể liên hợp 6 chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI là 1. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 71A-71C là đồ thị thể hiện sự gia tăng phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 33 chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1, FIG. 71A), cúm A/CA/07/2009 (H1N1) pdm (FIG. 71B) và cúm A/HK/1/1968 (H3N2, FIG. 71C). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 72 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 33 chống lại cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 73A-73B là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng bởi thể liên hợp 33 chống lại cúm A/PR/8/1934 ở MOI là 1 (FIG. 73A) và MOI là 10 (FIG. 73B). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 74 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ đối chứng, Gedivumab (Genentech), chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 75A-75B là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng bởi kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ đối chứng, Gedivumab (Genentech), chống lại cúm A/PR/8/1934 ở MOI là 1 (FIG. 75A) và MOI là 10 (FIG. 75B). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 152.

FIG. 76 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 6 chống lại cúm A H1N1. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 77A-77B là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng bởi thể liên hợp 6 chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI là 1 (FIG. 77A) và MOI là 10 (FIG. 77B). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 78A-78C là đồ thị thể hiện sự gia tăng phụ thuộc vào MOI trong liên hợp 33 chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1, FIG. 78A), cúm A/CA/07/2009 (H1N1) pdm (FIG. 78B) và cúm A/HK/1/1968 (H3N2, FIG. 78C). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 79 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 33 chống lại cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 80A-80B là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng bởi thể liên hợp 33 chống lại cúm A/PR/8/1934 ở MOI là 1 (FIG. 80A) và MOI là 10 (FIG. 80B). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 81 là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào MOI bởi kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ đối chứng, Gedivumab (Genentech), chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 82A-82B là đồ thị thể hiện sự gia tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng bởi kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ đối chứng, Gedivumab (Genentech), chống lại cúm A/PR/8/1934 ở MOI là 1 (FIG. 82A) và MOI là 10 (FIG. 82B). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 153.

FIG. 83 là đồ thị thể hiện sự cấy chuyển nối tiếp A/Ca/07/2009 (H1N1) pdm với sự có mặt của thể liên hợp 45b, oseltamivir, baloxavir, hoặc đối chứng dùng PBS trong các tế bào MDCK để đánh giá tiềm năng phát triển của các chủng virus đột biến kháng thuốc trong điều kiện chọn lọc áp lực với các chất ức chế virus. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 165.

FIG. 84 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp 45b trong huyết tương trong nghiên cứu PK trên chuột so sánh việc sử dụng IV, SC và IM. Mức nồng độ trong huyết tương được xác định bằng cách bắt giữ NA. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 173.

FIG. 85 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp 45b trong huyết tương trong nghiên cứu PK trên chuột so sánh việc sử dụng IV, SV và IM. Mức nồng độ trong huyết tương được xác định bằng cách bắt giữ hIgG Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 173.

FIG. 86 là đồ thị thể hiện tính tuyến tính của liều lượng trong nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương bằng cách bắt giữ NA. Nghiên cứu này được thực hiện như

được mô tả trong ví dụ 174.

FIG. 87 là đồ thị thể hiện tính tuyến tính của liều lượng trong nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương bằng cách bắt giữ hIgG. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 174.

FIG. 88 là đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của thể liên hợp 45b ở liều lượng dùng SC 50 mg/kg và 5 mg/kg trong nghiên cứu PK trên chuột. Nồng độ trong huyết tương được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng tấm tráng neuraminidaza. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 175.

FIG. 89 là đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết tương của thể liên hợp 45b so sánh việc dùng IV và SV của thể liên hợp 45b ở 5 mg/kg. Nồng độ trong huyết tương được xác định bằng ELISA sử dụng tấm tráng neuraminidaza. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 175.

FIG. 90 là đồ thị thể hiện nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương ở loài linh trưởng không phải là người, khỉ cynomolgus. Nồng độ trong huyết tương được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng tấm tráng neuraminidaza. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 176.

FIG. 91 là đồ thị thể hiện nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương ở loài linh trưởng không phải là người, khỉ cynomolgus. Nồng độ trong huyết tương được xác định bằng cách bắt giữ hIgG Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 176.

FIG. 92 là đồ thị thể hiện nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương từ ngày 1 đến ngày 14 ở loài linh trưởng không phải là người, khỉ cynomolgus. Nồng độ trong huyết tương được xác định bằng cách bắt giữ neuraminidaza (NA) và bắt giữ Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 176.

FIG. 93 là đồ thị thể hiện nồng độ thể liên hợp 45b (3 mpk IV) trong huyết tương trong các nghiên cứu PK ở chồn sương được xác định bằng cách bắt giữ neuraminidaza (NA) và bắt giữ Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 183.

FIG. 94 là đồ thị thể hiện mức dịch rửa mũi chứa thể liên hợp 45b trong các nghiên cứu ở chồn sương được xác định bằng cách bắt giữ neuraminidaza (NA) H1N1. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 186.

FIG. 95 là đồ thị thể hiện mức dịch rửa mũi chứa thể liên hợp 45b trong các nghiên cứu PK ở chồn sương được xác định bằng cách bắt giữ hIgG Fc. Nghiên cứu

này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 186.

FIG. 96 là đồ thị thể hiện sự so sánh các quan sát lâm sàng sau khi dùng thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg, một mình) so với oseltamivir (10 mg/kg, x 5 lần) hoặc tá dược. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 182.

FIG. 97 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp 45b (2 mpk IV) trong huyết tương so với thể liên hợp 46 (2 mpk IV) trong các nghiên cứu PK ở linh trưởng không phải là người được xác định bằng cách bắt giữ Fc. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 189.

FIG. 98 là đồ thị thể hiện nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương so với nồng độ thể liên hợp 45b trong chất lỏng biểu mô (ELF) ở chuột. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 191.

FIG. 99 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp 45b trong huyết tương trong các nghiên cứu PK ở chuột SCID được xác định bằng cách bắt giữ Fc H1N1. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 192.

FIG. 100 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp 45b trong huyết tương trong các nghiên cứu PK ở chuột SCID được xác định bằng cách bắt giữ neuraminidaza (NA). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 192.

FIG. 101 là đồ thị thể hiện mức thể liên hợp trong huyết tương của 45b so với thể liên hợp 46 trong nghiên cứu PK ở chuột được xác định bằng cách bắt giữ neuraminidaza (NA). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 193.

FIG. 102 là hình ảnh mô tả thể liên hợp 45 và thể liên hợp 46.

FIG. 103 là hình ảnh mô tả sự liên hợp hóa học click làm ví dụ của monome miền Fc được chức hóa azido hoặc miền Fc với chất trung gian tiền liên hợp (Int).

FIG. 104 là hình ảnh mô tả quy trình thí nghiệm đối với mô hình nhiễm vi khuẩn thứ phát với Staphylococcus aureus kháng methixilin (MRSA) như được mô tả trong ví dụ 200.

FIG. 105A-105B là đồ thị thể hiện tỷ lệ phần trăm mức sống sót (FIG. 105A) và CFU/g phổi (FIG. 105B) của mô hình chuột lây nhiễm thứ phát sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45b. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 200.

FIG. 106 là hình ảnh mô tả quy trình thí nghiệm đối với mô hình nhiễm vi khuẩn thứ phát với Streptococcus pneumoniae như được mô tả trong ví dụ 200.

FIG. 107 là đồ thị mô tả tỷ lệ phần trăm mức sống sót của chuột trong mô hình nhiễm S. pneumoniae thứ phát sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45b. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 200.

FIG. 108A-108B là đồ thị thể hiện khả năng sống sót của chuột (FIG. 108A) và cân nặng trung bình (FIG. 108B) sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45a một lần duy nhất, 7 ngày trước khi thử thách virut, với cúm A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Sau khi lây nhiễm thử thách và điều trị với thể liên hợp 45a, mức bảo vệ 100% được quan sát thấy đối với liều 10 mg/kg, mức bảo vệ 80% đối với liều 0,3 và 3,0 mg/kg, và mức bảo vệ 70% đối với liều 1 mg/kg (FIG. 108A). Tỷ lệ sống sót 30% ở nhóm dùng giả dược là bất thường, vì vậy liều 1 mg/kg không mang lại hiệu quả bảo vệ đáng kể. Ngoài ra, tất cả các liều đều mang lại mức bảo vệ đáng kể khỏi sự giảm cân (FIG. 108B). (* P <0,05, ** P <0,01, **** P <0,0001). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 201.

FIG. 109A-109B là đồ thị thể hiện mức sống sót của chuột (FIG. 109A) và cân nặng trung bình (FIG. 109B) sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45a một lần duy nhất, 4 giờ sau thử thách virut với cúm A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Sau khi lây nhiễm và điều trị thử thách với thể liên hợp 45a, mức bảo vệ 100% được quan sát thấy đối với liều 1, 3 và 10 mg/kg, và mức bảo vệ 70% đối với liều 0,3 mg/kg (FIG. 109A). Tỷ lệ sống sót 30% ở nhóm dùng giả dược là bất thường, vì vậy liều 0,3 mg/kg không mang lại hiệu quả bảo vệ đáng kể. Ngoài ra, tất cả các liều đều mang lại mức bảo vệ đáng kể khỏi sự giảm cân (FIG. 109B). (* P <0,05, ** P <0,01, **** P <0,0001). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 201.

FIG. 110A là hình ảnh mô tả cấu trúc tinh thể của zanamivir tetrame (thể hiện trong mô hình quả bóng và que) được tạo phức với A/California/04/2009 H1N1 neuraminidaza (NA) (PDB mã 3TI5). Khoảng cách tuyến tính giữa các vị trí hoạt động NA liền kề trong tetrame được thể hiện. Vị trí C7 trên zanamivir đã được chọn để gắn vào chất mang Fc (thông qua este NHS) được tô sáng. C7 trên zanamivir được tiếp xúc với dung môi và không bị cản trở theo hướng, cho phép liên hợp với C7 với tác động tối thiểu đến ái lực liên kết. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 203.

FIG. 110B là hình ảnh biểu diễn bề mặt phân tử bán trong suốt của cấu trúc của hIgG1 có độ dài đầy đủ (mã PDB 1HZH) được tô màu để chỉ thể hiện ranh giới cấu trúc Fc được sử dụng trong thể liên hợp 45b. Vị trí của các lysin được ưu tiên liên hợp trong thể liên hợp 45b được thể hiện bằng màu xanh lục. thể liên hợp 45b là thể liên

hợp đa trị của các dime zanamivir (Int-83, cấu trúc thể hiện bên phải) được liên hợp ổn định với lysin trên hIgG1 Fc mở rộng ở đầu N với tỷ lệ thuốc-kháng thể trung bình (DAR) là 4,5: 1. Sự bố trí trong không gian của lysin được liên hợp của bề mặt miền Fc và chiều dài và tính linh hoạt của các trình tự liên kết PEG dẫn đến các nhóm tương tự dime Int.83 trên thể liên hợp 45b mà tại đó tồn tại mức phân tách đủ (>90 A) giữa các dime zanamivir để cho phép tham gia đồng thời của nhiều vị trí hoạt động trong một tetrame NA, giữa các tetrame NA lân cận trên cùng một hạt virut, hoặc giữa các tetrame NA trên các hạt virut khác nhau bởi một phân tử thể liên hợp 45b duy nhất. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 203.

FIG. 111A-111J là đồ thị thể hiện thể liên hợp 45b liên kết với thụ thể Fcγ và kích hoạt ADCC. FIG. 111A-111D thể hiện thể liên hợp 45b liên kết với Fcγ RI của người (FIG. 111A), RIIa (FIG. 111B), RIIb (FIG. 111C) và RIIIa (FIG. 111D), được xác định bằng ELISA. FIG. 111E-111H thể hiện thể liên hợp 45b liên kết với Fcγ RI của chuột cống (FIG. 111E), RIII (FIG. 111F), RIIb (FIG. 111G) và RIV (FIG. 111H), được xác định bằng ELISA. FIG. 111I-111J thể hiện thể liên hợp 45b gây ra độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể trong phụ thuộc vào liều lượng (FIG. 111I) và phụ thuộc vào MOI (FIG. 111J), bằng cách sử dụng các tế bào báo cáo. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 203.

FIG. 112A-112M là đồ thị thể hiện hiệu lực của thể liên hợp 45b chống lại thử thách gây chết người với bệnh cúm ở chuột Balb/C. FIG. 112A là đồ thị thể hiện đáp ứng liều lượng của thể liên hợp 45b nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1 mg/kg SC định lượng ở 2 giờ sau khi lây nhiễm chống lại thử thách gây chết người với cúm A/PR/8/1934 (H1N1) về khả năng sống sót. FIG. 112B-112H là đồ thị thể hiện hiệu lực của liều bảo vệ tối thiểu của thể liên hợp 45b được dùng SC chống lại cúm A/CA/07/2009 (H1N1) pdm (FIG. 112B), A/WSN/1933 (H1N1) (FIG. 112C), A/CA/12/2012 (H1N1) pdm09 (FIG. 112D), A/Texas/23/2012 (H1N1) pdm09 H275Y (FIG. 112E), A/HongKong/1/1968 (H3N2) (FIG. 112F), B/Florida/4/2006 (Yamagata) (FIG. 112G), và B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (FIG. 112H). FIG. 112I là đồ thị thể hiện hiệu lực của thể liên hợp 45 chống lại chủng BSL-3 A/Vietnam/1203/2005 (H5N1). FIG. 112J là biểu đồ cột thể hiện mức virut trong phổi vào ngày thứ 4 sau khi lây nhiễm bệnh. FIG. 112K-112L là đồ thị thể hiện mức xytokin trong phổi của IL-6 (FIG. 112K) và MCP-1 (FIG. 112L). FIG. 112M là đồ thị thể hiện liều bảo vệ tối thiểu của thể liên hợp 45b được dùng SC chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ

203.

FIG. 113A-113J là đồ thị thể hiện hiệu lực của thể liên hợp 45b chống lại thử thách gây chết người với cúm ở chuột Balb/C theo phần trăm mức thay đổi cân nặng. FIG. 113A là đồ thị thể hiện mức đáp ứng liều lượng của thể liên hợp 45b nằm trong khoảng từ 0,01-1 mg/kg được dùng SC ở 2 giờ sau khi lây nhiễm bệnh trước thử thách gây chết người với cúm A/PR/8/1934 (H1N1). FIG. 113B-113H thể hiện mức phần trăm thay đổi cân nặng sau liều bảo vệ tối thiểu của thể liên hợp 45b được dùng SC chống lại cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (FIG. 113B), A/WSN/1933 (H1N1) (FIG. 113C), A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09 (FIG. 113D), A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y (FIG. 113E), A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) (FIG. 113F), B/Florida/4/2006 (Yamagata) (FIG. 113G), và B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (FIG. 113H). FIG. 113I là đồ thị thể hiện hiệu lực của thể liên hợp 45b chống lại chủng BSL-3 A/Vietnam/1203/2005 (H5N1). FIG. 113J là đồ thị thể hiện mức thay đổi cân nặng khi sử dụng liều bảo vệ tối thiểu của thể liên hợp 45b để chống lại cúm A/PR/8/1934 (H1N1). Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 203.

FIG. 114A-114B là cặp đồ thị thể hiện hiệu lực của oseltamivir ở liều tương đương trên người là 5 mg/kg (BID x 5 ngày) hoặc gấp 10 lần liều tương đương trên người ở 50 mg/kg (BID x 5 ngày) trong mô hình chuột gây chết của A/PR/8/1934 (H1N1) về mức sống sót (FIG. 114A) và thay đổi cân nặng (FIG. 114B).

FIG. 115A-115C là biểu đồ cột thể hiện mức xytokin trong phổi đối với NF-α (FIG. 115A), KC (FIG. 115B), MIP-1α (FIG. 115C) vào ngày thứ 4 sau khi bị lây nhiễm với thử thách gây chết A/PR/8/1934 (H1N1).

FIG. 116A-116B là đồ thị mô tả hiệu lực của thể liên hợp 45b sau khi dùng SC, IM hoặc IV một liều duy nhất chống lại cúm A/CA/07/2009 (H1N1) pdm về phần trăm mức sống sót (FIG. 111A) và phần trăm thay đổi cân nặng (FIG 116B).

FIG. 116C-116D là đồ thị mô tả mức thể liên hợp 45b trong huyết tương sau khi dùng SC, IM hoặc IV một liều duy nhất ở chuột trong 168 giờ được xác định bằng cách bắt giữ NA (FIG. 116C) hoặc bắt giữ Fc (FIG. 116D).

FIG. 117A-117C là đồ thị thể hiện kiểu liên kết FcRn tương đương như hIgG1 Fc hoặc đối chứng isotyp IgG1 có chiều dài đầy đủ với người (FIG. 117A), khỉ cynomolgus (FIG. 117B) và chuột (FIG. 117C) với sự liên kết mạnh hơn ở độ pH 5,8 và giảm liên kết ở độ pH 7,4.

FIG. 118A-118F là đồ thị mô tả thời gian tác dụng dài của thể liên hợp 45b. FIG. 118A là đồ thị thể hiện mức độ đáp ứng với liều thể liên hợp 45b trong huyết

tương từ 1 -100 mg/kg sau khi dùng SC ở chuột. FIG. 118B là đồ thị mô tả mức thể liên hợp 45b sau khi dùng SC trong huyết tương, ELF và phổi của chuột. FIG. 118C-F thể hiện mức bảo vệ do dùng thể liên hợp 45b 28 ngày trước thử thách gây chết người chống lại cúm A/CA/07/2009 (H1N1) pdm (FIG. 118C), A/HK/1/1968 (H3N2) (FIG. 118D), B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (FIG. 118E), và B/Florida/4/2006 (Yamagata) (FIG. 118F) về tỷ lệ sống sót.

FIG. 119 là đồ thị mô tả đường cong mức sống sót của các nhóm dùng liều thể liên hợp 45a thấp hơn. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 209.

FIG. 120 là đồ thị mô tả đường cong mức sống sót Kaplan-Meier của các mẫu đối chứng và thể liên hợp 45a ở 0,3 và 0,03 mg/kg. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 210.

FIG. 121 là đồ thị mô tả đường cong mức sống sót Kaplan-Meier của các mẫu đối chứng và thể liên hợp 45a (cột protein A được tinh chế) và *thể liên hợp 45a (cột protein A chảy qua) ở 0,1 mg/kg. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 215.

FIG. 122 là đồ thị mô tả đường cong mức sống sót Kaplan-Meier của các mẫu đối chứng và thể liên hợp 45a và 46 ở 0,1 mg/kg. Nghiên cứu này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 216.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất thể liên hợp, chế phẩm, và phương pháp điều trị lây nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm). Các thể liên hợp bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza virut (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của chúng) được liên hợp với monome Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, zanamivir, peramivir, hoặc các chất tương tự của chúng) trong các thể liên hợp hướng đích neuraminidaza trên bề mặt của hạt virut. Monome Fc hoặc miền Fc trong các thể liên hợp liên kết với FcγR (ví dụ, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, và FcγRIIIb) trên tế bào miễn dịch, ví dụ, bạch cầu trung tính, để hoạt hóa thực bào và chức năng tác động, như tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), do đó dẫn đến nhấn chìm và phá hủy hạt virut bởi tế bào miễn dịch và tăng cường hơn nữa hoạt tính kháng virut của các thể liên

hợp. Albumin hoặc peptit liên kết albumin có thể kéo dài thời gian bán rã của thể liên hợp, ví dụ, bằng cách liên kết albumin với thụ thể Fc sơ sinh tuần hoàn. Các chế phẩm như vậy là hữu ích trong phương pháp ức chế sự sinh trưởng của virut và trong phương pháp điều trị lây nhiễm virut, như lây nhiễm do virut cúm gây ra A, virut cúm B và virut cúm C.

I. Lây nhiễm virut

Các hợp chất và dược phẩm được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) có thể được sử dụng để điều trị lây nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm, như cúm A, B, C, hoặc á cúm).

Lây nhiễm virut dùng để chỉ sự sinh trưởng gây bệnh của virut (ví dụ, virut cúm) ở sinh vật chủ (ví dụ, đối tượng là người). Lây nhiễm virut có thể là trường hợp bất kỳ trong đó sự có mặt của (các) quần thể virut gây hại cho cơ thể chủ. Do đó, đối tượng bị lây nhiễm virut khi lượng quần thể virut dư thừa có mặt trong hoặc trên cơ thể đối tượng, hoặc khi sự có mặt của quần thể virut gây hại cho tế bào hoặc mô khác của đối tượng.

Bệnh cúm, thường được gọi là "bệnh cảm cúm", là bệnh lây nhiễm do virut cúm gây ra. Triệu chứng có thể là nhẹ đến nặng. Triệu chứng phổ biến nhất bao gồm: sốt cao, chảy mũi, đau họng, đau cơ, đau đầu, ho, và mệt mỏi. Các triệu chứng này thường bắt đầu hai ngày sau khi tiếp xúc với virut và hầu hết kéo dài chưa đến một tuần. Tuy nhiên, ho có thể kéo dài hơn hai tuần. Ở trẻ em, có thể là buồn nôn và nôn, nhưng ít phổ biến ở người trưởng thành. Biến chứng của bệnh cúm có thể bao gồm viêm màng phổi do virut, viêm màng phổi nhiễm khuẩn thứ phát, nhiễm trùng xoang, và làm trầm trọng thêm vấn đề sức khỏe trước đó như bệnh hen hoặc suy tim. Biến chứng nặng có thể xảy ra ở đối tượng có hệ miễn dịch yếu như trẻ nhỏ, người già, những người mắc các bệnh gây suy yếu hệ miễn dịch và những người đang điều trị bằng liệu pháp dẫn đến suy yếu hệ miễn dịch.

Các đối tượng bị lây nhiễm cúm cũng có nguy cơ cao mắc các bệnh lây nhiễm thứ phát (ví dụ, lây nhiễm thứ phát do vi khuẩn, virut hoặc nấm), đặc biệt là các bệnh lây nhiễm do vi khuẩn như Staphylococcus aureus kháng methixilin (MRSA), Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa và/hoặc Haemophilus

influenzae. Lây nhiễm thứ phát do vi khuẩn làm tăng thêm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong do nhiễm cúm.

Ba loại virut cúm ảnh hưởng đến đối tượng người, cụ thể là Typ A, Typ B, và Typ C. Thông thường, virut lây lan qua không khí do ho hoặc hắt hơi. Người ta tin rằng điều này xảy ra chủ yếu ở khoảng cách tương đối ngắn. Nó cũng có thể lây lan do chạm vào bề mặt bị lây nhiễm virut và sau đó chạm vào miệng hoặc mắt. Một người có thể lây nhiễm cho người khác trước và trong thời gian họ biểu hiện các triệu chứng. Việc nhiễm này có thể được xác nhận bằng cách xét nghiệm virut ở cổ họng, đờm hoặc mũi. Có một số xét nghiệm nhanh; tuy nhiên, mọi người vẫn có thể bị lây nhiễm nếu kết quả là âm tính. Một loại phản ứng chuỗi polymeraza phát hiện ARN của virut có thể được sử dụng để chẩn đoán nhiễm cúm.

II. Thể liên hợp theo sáng chế

Sáng chế đề xuất thể liên hợp tổng hợp hữu ích trong điều trị lây nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm). Các thể liên hợp bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm miền Fc hoặc protein albumin được liên hợp với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza hoặc một hoặc nhiều dime của hai chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza được chọn từ zanamivir, sulfozanamivir, peramivir, A-315675, hoặc các chất tương tự của chúng). Dime của hai chất ức chế neuraminidaza bao gồm chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza thứ nhất có công thức (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII), hoặc (A-XIII)) và chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza thứ hai có công thức (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII), hoặc (A-XIII)). Chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai được liên kết với nhau nhờ yếu tố liên kết. Nói chung, theo một số khía cạnh, thể liên hợp được mô tả ở đây liên kết với bề mặt của hạt virut (ví dụ, liên kết với enzym neuraminidaza virut trên bề mặt hạt virut cúm) nhờ tương tác giữa các gốc chất ức chế neuraminidaza trong các thể liên hợp và protein trên bề mặt của hạt virut. Chất ức chế neuraminidaza làm xáo trộn neuraminidaza, một glycoprotein vỏ ngoài phân cắt axit sialic, tức là các gốc axit neuraminic đầu tận cùng, từ cấu trúc glycan trên bề mặt của tế bào chủ bị nhiễm, giải phóng virut con cháu và cho phép lây lan virut từ tế bào chủ đến tế bào xung quanh không bị nhiễm.

Thể liên hợp theo sáng chế bao gồm monome và dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc, monome Fc, hoặc peptit liên kết với Fc. Miền Fc trong các thể liên hợp được mô tả ở đây gắn kết với FcγR (ví dụ, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, và FcγRIIIb) trên tế bào miễn dịch. Sự gắn kết của miền Fc trong các thể liên hợp được mô tả ở đây với FcγR trên tế bào miễn dịch hoạt hóa quá trình thực bào và chức năng tác động, như tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), do đó dẫn đến nhấn chìm và phá hủy hạt virut bởi tế bào miễn dịch và tăng cường hơn nữa hoạt tính kháng virut của các thể liên hợp.

Thể liên hợp theo sáng chế bao gồm monome và dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với protein albumin hoặc peptit liên kết protein albumin. Protein albumin hoặc peptit liên kết protein albumin có thể kéo dài thời gian bán rã của thể liên hợp, ví dụ, bằng cách liên kết albumin với thụ thể Fc sơ sinh tuần hoàn.

Thể liên hợp được đề xuất trong bản mô tả này được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I). Theo một số phương án, các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin. Theo một số phương án, các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin. Theo một số phương án, khi n là 2, E (monome miền Fc) dime hóa tạo thành miền Fc.

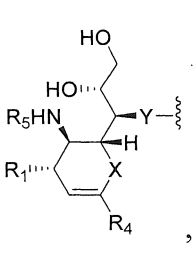
Thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp hóa học khả dụng trong lĩnh vực này. Trong các trường hợp nhóm chức không khả dụng cho việc liên hợp, phân tử có thể được tạo dẫn xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp hóa học thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, các thể liên hợp được mô tả ở đây chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng. Các thể liên hợp bao gồm mỗi dạng đồng phân lập thể được phân lập cũng như hỗn hợp chất đồng phân lập thể với độ tinh khiết bất đối khác nhau, bao gồm hỗn hợp raxemic. Nó cũng bao hàm các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, và chất hỗ biến có thể được tạo ra.

Chất ức chế neuraminidaza

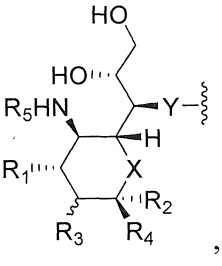
Thành phần của các thể liên hợp được mô tả ở đây là nhóm chất ức chế neuraminidaza virut cúm. Chất ức chế neuraminidaza virut cúm làm xáo trộn neuraminidaza, một glycoprotein vỏ ngoài phân cắt axit sialic, tức là các gốc axit neuraminic đầu tận cùng, từ cấu trúc glycan trên bề mặt của tế bào chủ bị nhiễm, giải phóng virut con cháu và cho phép lây lan virut từ tế bào chủ đến tế bào xung quanh không bị nhiễm. Các ví dụ về chất ức chế neuraminidaza virut cúm bao gồm zanamivir (Relenza), sulfozanamivir, A-315675 và peramivir. Ngoài ra, các dẫn xuất của zanamivir, sulfozanamivir, A-315675 và peramivir, như các dẫn xuất được tìm thấy trong tài liệu chuyên ngành, có hoạt tính ức chế neuraminidaza và hữu ích làm nhóm chất ức chế neuraminidaza của các hợp chất trong bản mô tả này (xem, ví dụ, Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti-influenza virus activity. ChemMedChem Comm. 13:785-789 (2018) và in vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain of influenza virus neuraminidases and influenza virus replication. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(4):1014-1021 (2002)).

Thể liên hợp được mô tả ở đây được chia thành hai loại: (1) một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin và (2) một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin. Dime của chất ức chế neuraminidaza được liên kết với nhau nhờ yếu tố liên kết, như các yếu tố liên kết được mô tả ở đây.

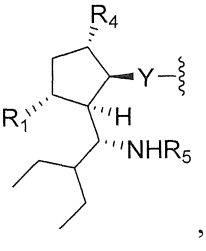
Chất ức chế neuraminidaza virut theo sáng chế bao gồm zanamivir, sulfozanamivir, A-315675, peramivir, và các chất tương tự của chúng, như chất ức chế neuraminidaza virut có công thức (A-I)-(A-XIII):



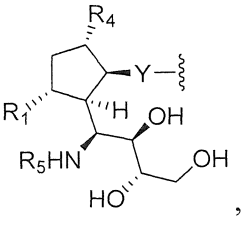
(A-I)



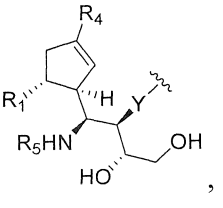
(A-II)



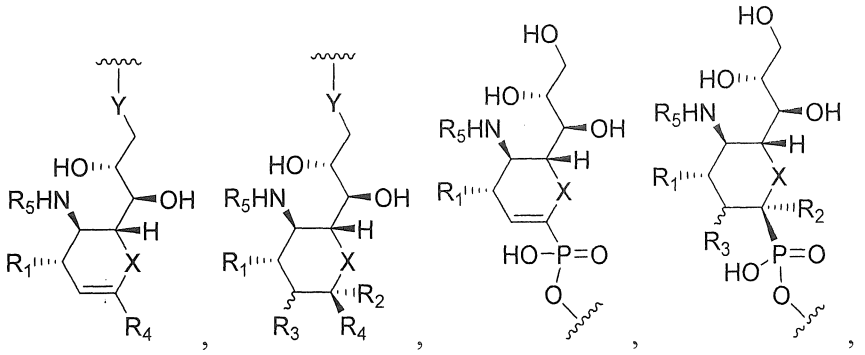
(A-III)



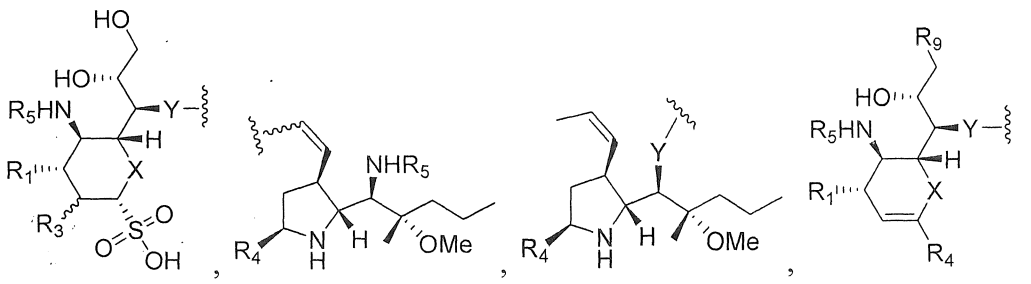
(A-IV)



(A-V)

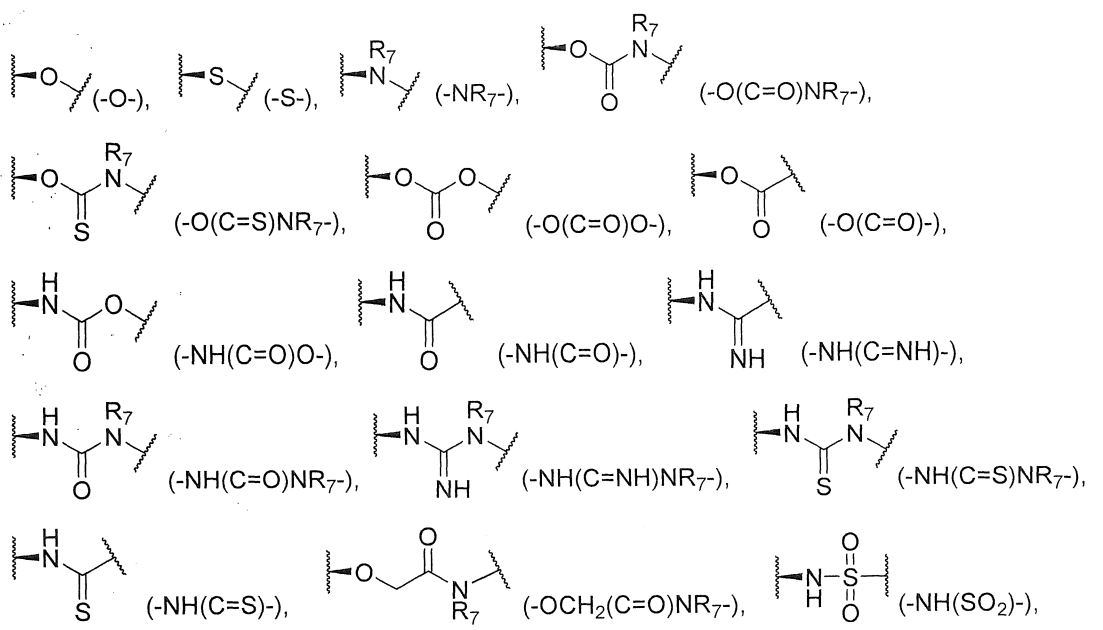


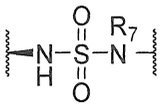
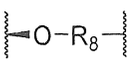
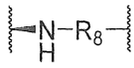
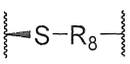
(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)

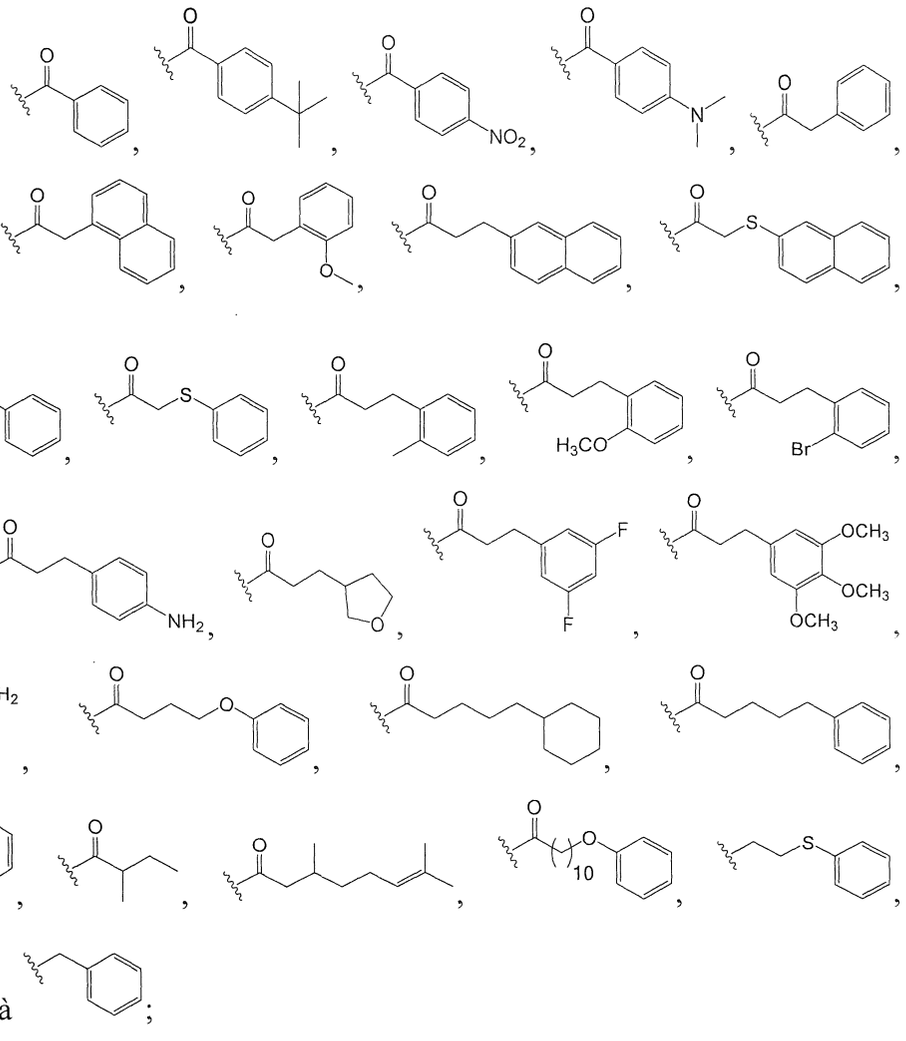


(A-X) (A-XI) (A-XII) (A-XIII)

trong đó R_1 được chọn từ -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, và $-NHC(=NH)NHR_6$; mỗi nhóm R_2 và R_3 độc lập được chọn từ -H, -OH, -F, -Cl, và -Br; R_4 được chọn từ $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 được chọn từ $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X được chọn từ -O- và -S-; Y được chọn từ

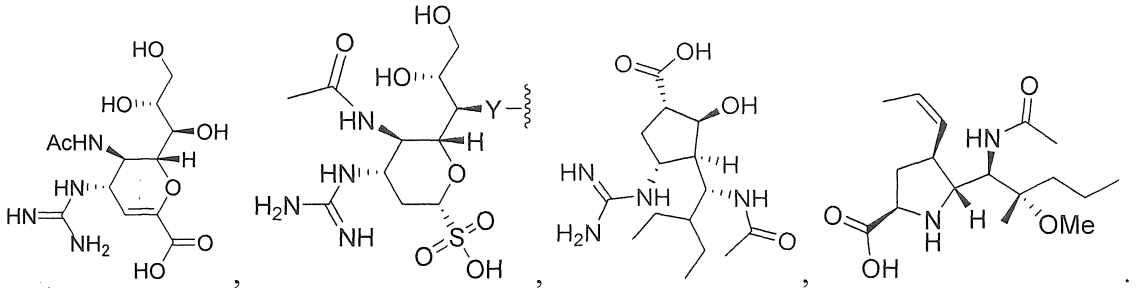



(-NH(SO$_2$)NR$_7$-), 
(-OR$_8$-), 
(-NR$_8$-), và 
(-SR$_8$-);

R$_6$ được chọn từ 
, và
;

R$_7$ được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; và R$_8$ được chọn từ C3-C20 heteroxycloalkyl, C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; R$_9$ được chọn từ -H, halogen (ví dụ, Cl, F, hoặc Br), -OR$_{10}$, -NHC(=O)R$_7$, C1-C20 alkyl tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl; và R$_{10}$ được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl. Tốt nhất là, chất ức chế neuraminidaza virut có công thức (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII) hoặc (A-XIII) được gắn cộng hóa trị vào thể liên hợp qua Y.

Tốt hơn là, chất ức chế neuraminidaza virut được chọn từ zanamivir, sulfozanamivir, peramivir, hoặc A-315675:



Zanamivir Sulfozanamivir Peramivir A-315675

Thể liên hợp của dime của chất ức chế neuraminidaza liên kết với miền Fc hoặc protein albumin

Các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm miền Fc, và monome Fc, peptit liên kết với Fc, và protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza. Dime của hai chất ức chế neuraminidaza bao gồm chất ức chế neuraminidaza thứ nhất (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza virut thứ nhất có công thức (A-I)-(A-XIII)) và chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza virut thứ hai có công thức (A-I)-(A-XIII)). Chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai được liên kết với nhau nhờ yếu tố liên kết, như yếu tố liên kết được mô tả ở đây. Theo một số phương án về dime của chất ức chế neuraminidaza, chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai là giống nhau. Theo một số phương án, chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai là khác nhau.

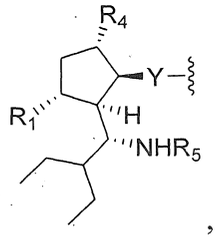
Dime của chất ức chế neuraminidaza bao gồm homo-dime của zanamivir hoặc các chất tương tự của chúng (ví dụ, (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) hoặc (A-XIII)). Ví dụ, dime của chất ức chế neuraminidaza theo sáng chế bao gồm dime có cấu trúc A_1-L-A_2, trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn từ (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) và (A-XIII).

Dime của chất ức chế neuraminidaza bao gồm homo-dime của peramivir hoặc các chất tương tự của chúng (ví dụ, (A-III), (A-IV), hoặc (A-V)). Ví dụ, dime của chất ức chế neuraminidazadime theo sáng chế bao gồm dime có cấu trúc A_1-L-A_2, trong đó mỗi A_1 và mỗi A_2 được chọn từ (A-III), (A-IV), và (A-V).

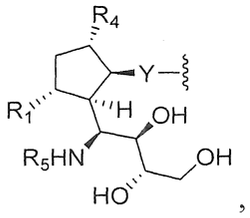
Dime của chất ức chế neuraminidaza bao gồm dị dime bao gồm zanamivir hoặc các chất tương tự của chúng và peramivir của các chất tương tự của chúng (ví dụ, (A-I)-(A-XIII)). Ví dụ, dime của chất ức chế neuraminidazadime theo sáng chế bao gồm

dime có cấu trúc A_1-L-A_2, trong đó mỗi A_1 được chọn từ (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) và (A-XIII), và mỗi A_2 được chọn từ (A-III), (A-IV), và (A-V).

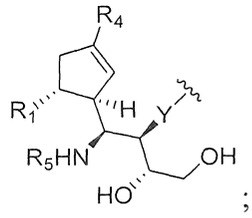
Theo một số phương án, khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L-A_2 có thể độc lập được chọn (ví dụ, độc lập được chọn từ bất kỳ trong số cấu trúc A_1-L-A_2 được mô tả ở đây). Theo một số phương án, E có thể được liên hợp với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc hơn nhóm A_1-L-A_2 khác nhau. Theo một số phương án, E được liên hợp với nhóm A_1-L-A_2 thứ nhất, và nhóm A_1-L-A_2, thứ hai. Theo một số phương án, A_1 và A_2 của nhóm A_1-L-A_2 thứ nhất độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V):



(A-III)

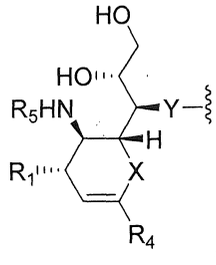


(A-IV)

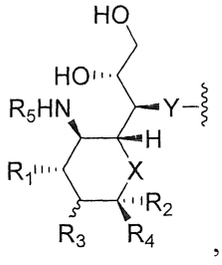


(A-V)

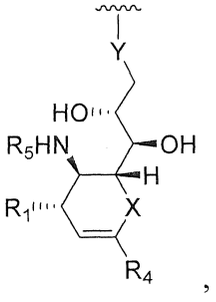
và A_1 và A_2 của nhóm A_1-L-A_2 thứ hai độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), hoặc (A-XIII):



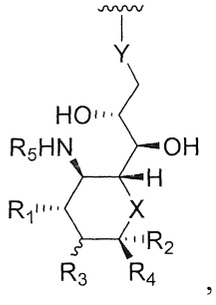
(A-I)



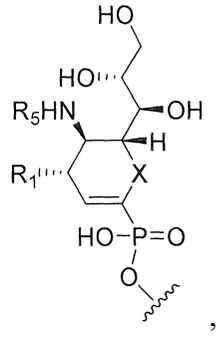
(A-II)



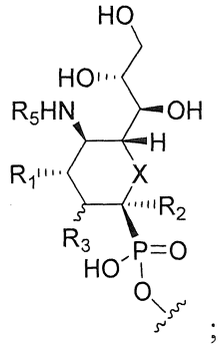
(A-VI)



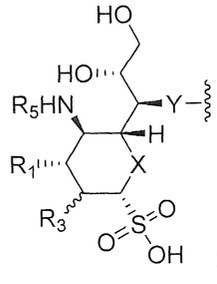
(A-VII)



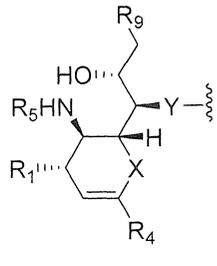
(A-VIII)



(A-IX)



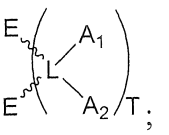
(A-X)



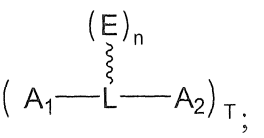
(A-XIII)

Theo một số phương án, nhóm A_1-L-A_2 thứ nhất được liên hợp cụ thể với các gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin tiếp cận bề mặt của E), và nhóm A_1-L-A_2 thứ hai được liên hợp cụ thể với các gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của các gốc xystein tiếp cận bề mặt của E). Theo một số phương án, nhóm A_1-L-A_2 thứ nhất được liên hợp cụ thể với các gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của các gốc xystein tiếp cận bề mặt của E), và nhóm A_1-L-A_2 thứ hai được liên hợp cụ thể với các gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của các gốc lysin tiếp cận bề mặt của E).

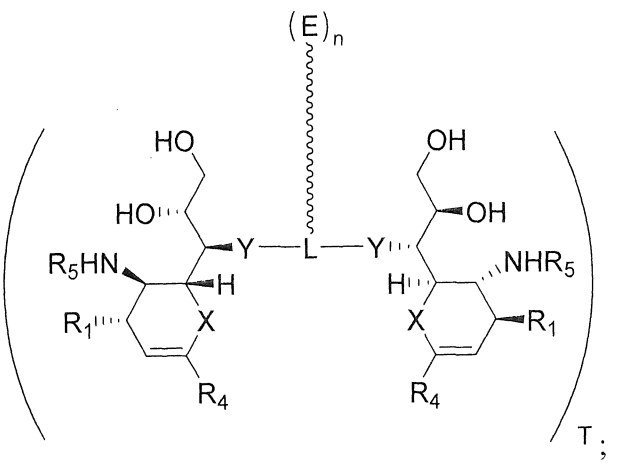
Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp, hoặc muối dược dụng của nó, được mô tả bằng công thức sau:



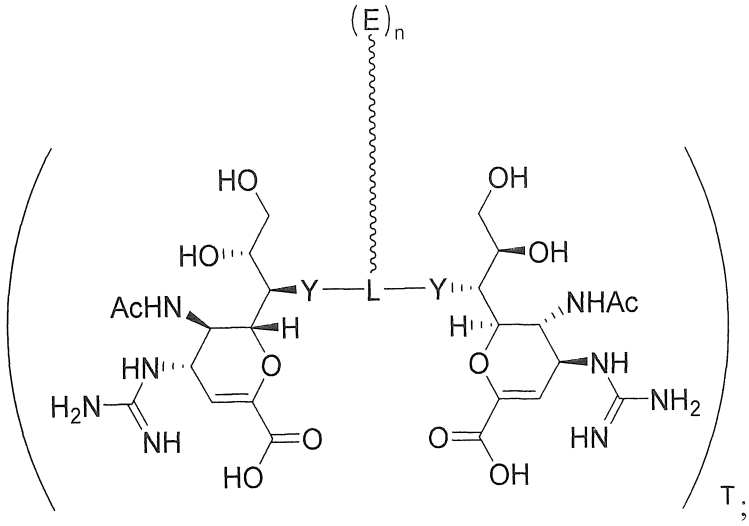
(1)



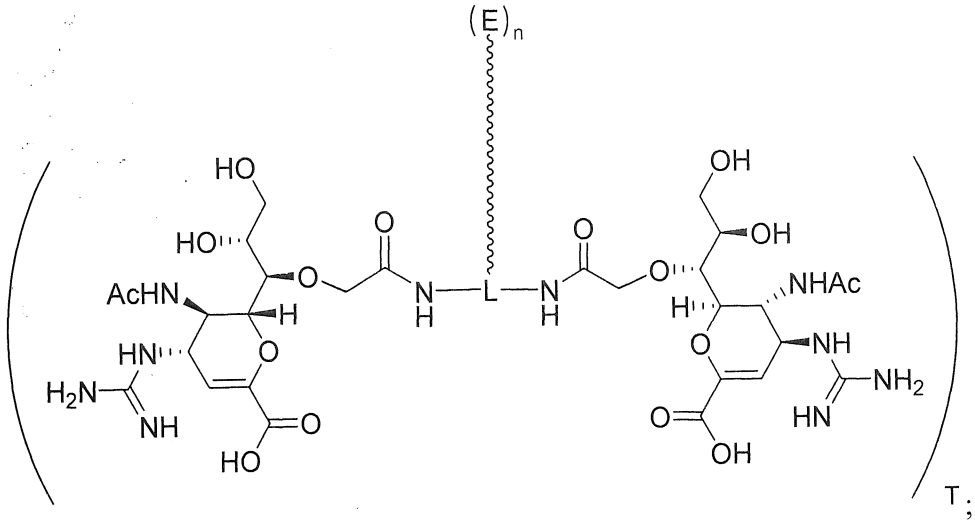
(D-I)



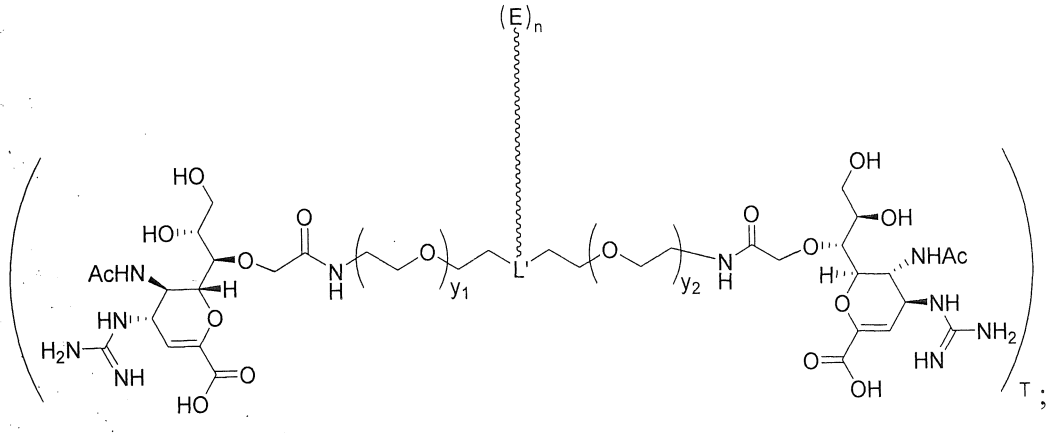
(D-II)



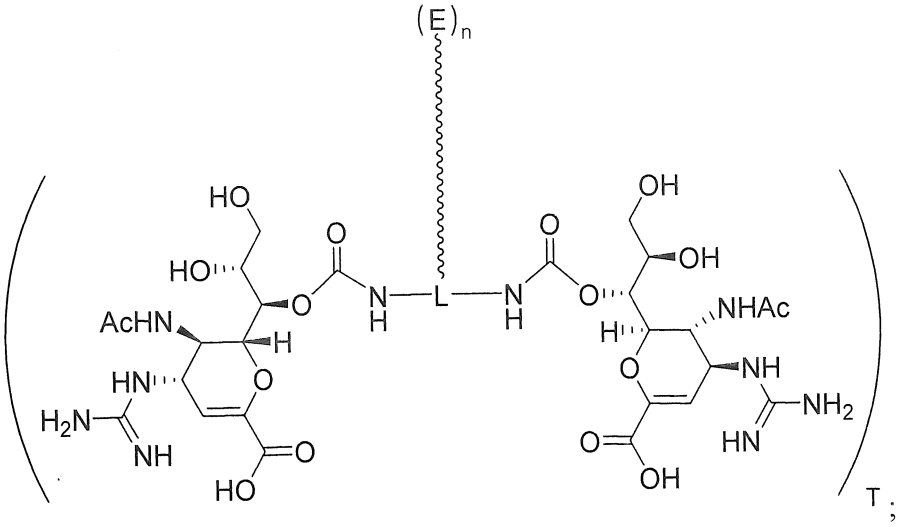
(D-II-1)



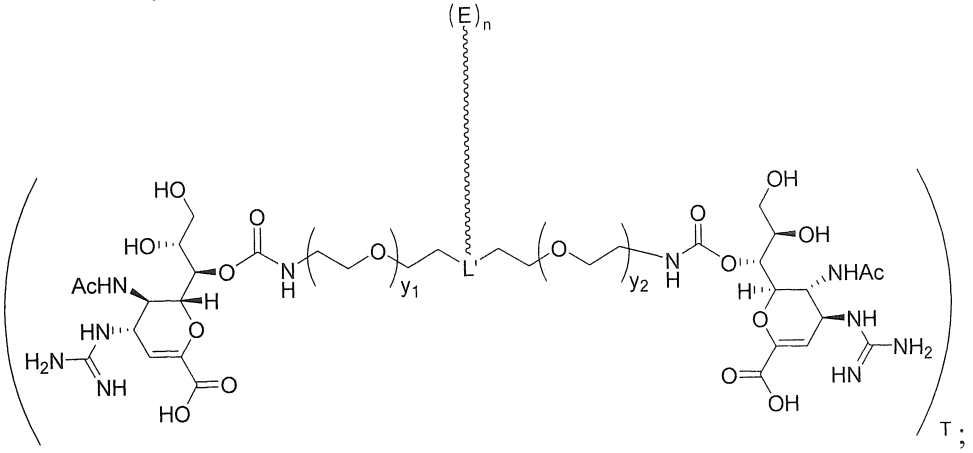
(D-II-2)



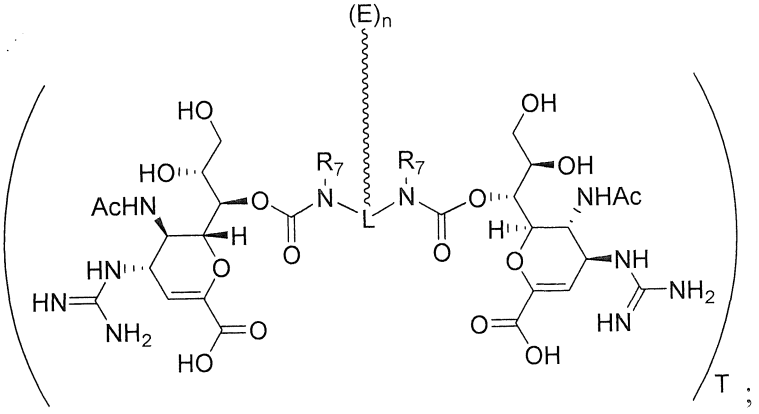
(D-II-3)



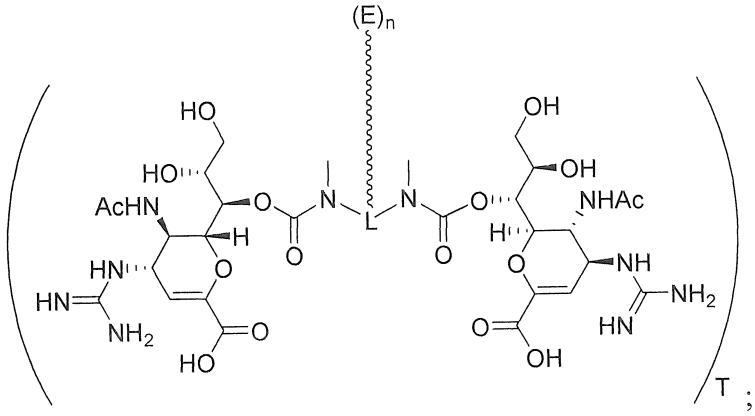
(D-II-4)



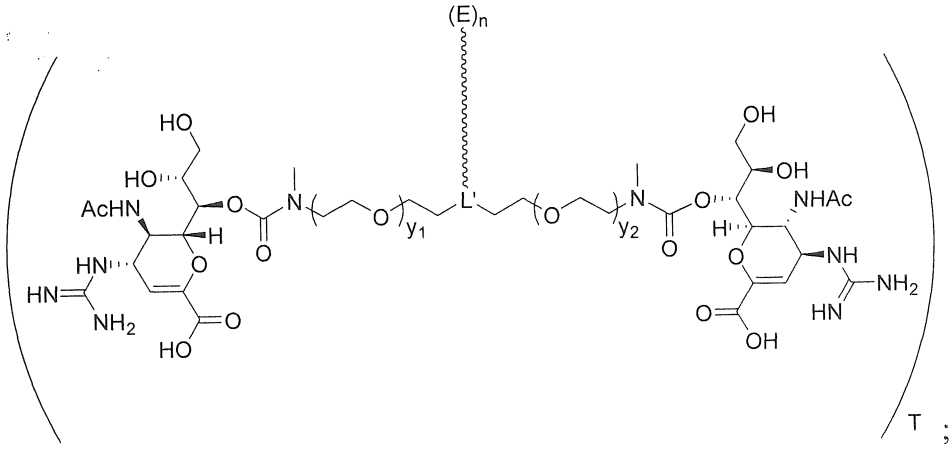
(D-II-5)



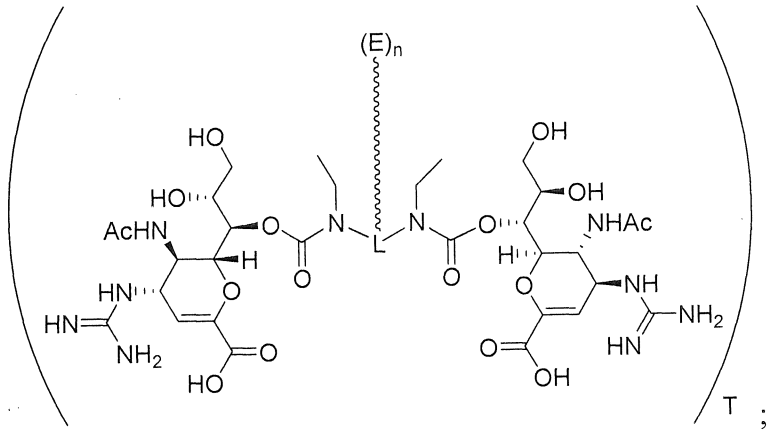
(D-II-6)



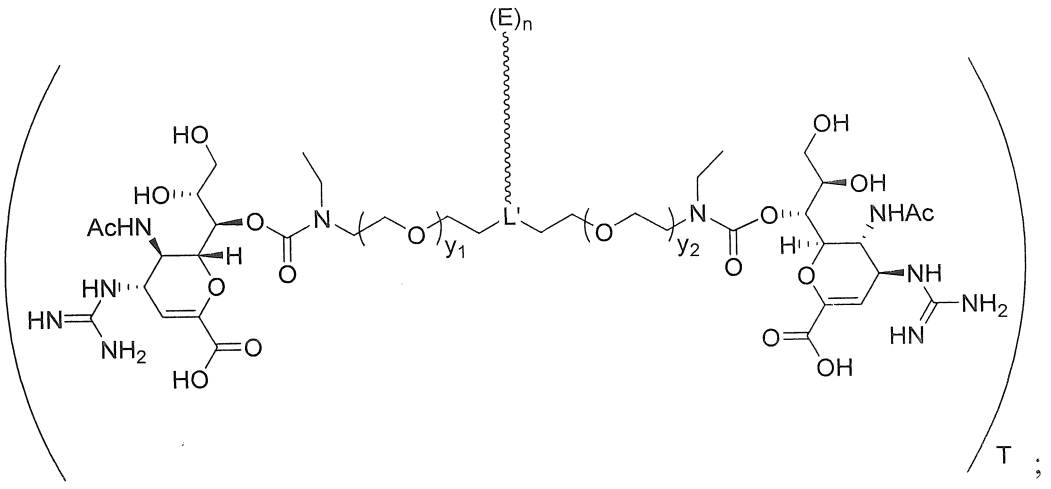
(D-II-7)



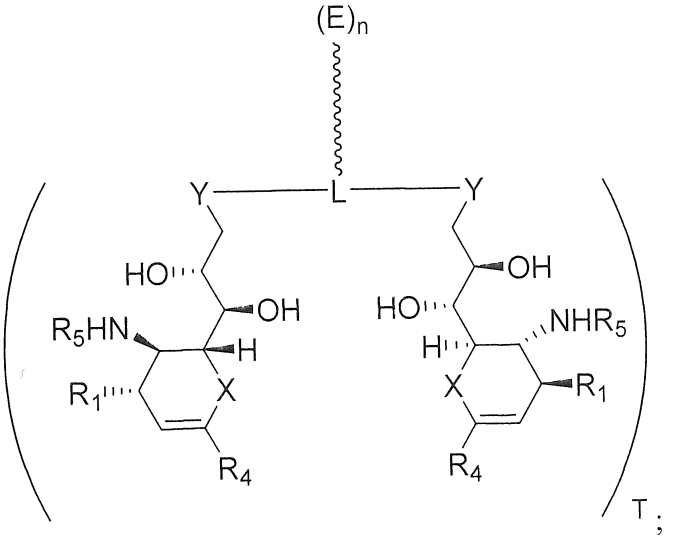
(D-II-8)



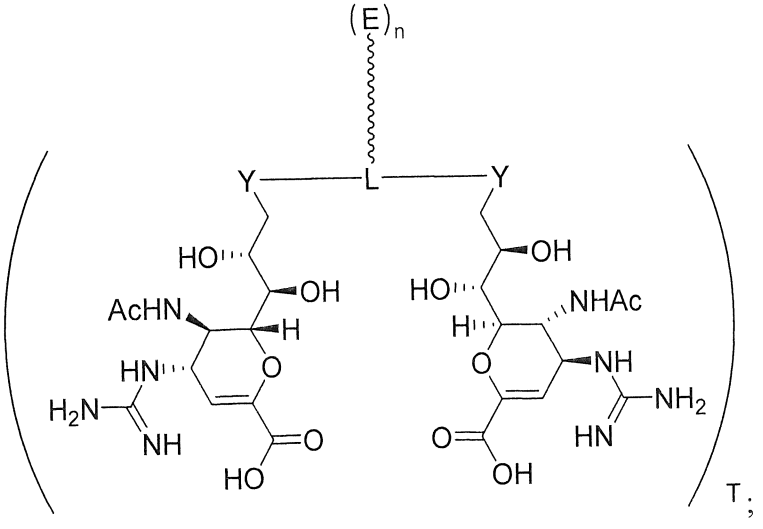
(D-II-9)



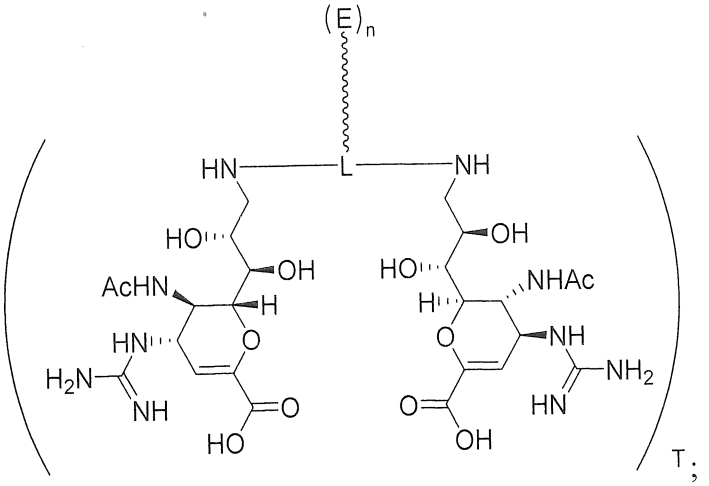
(D-II-10)



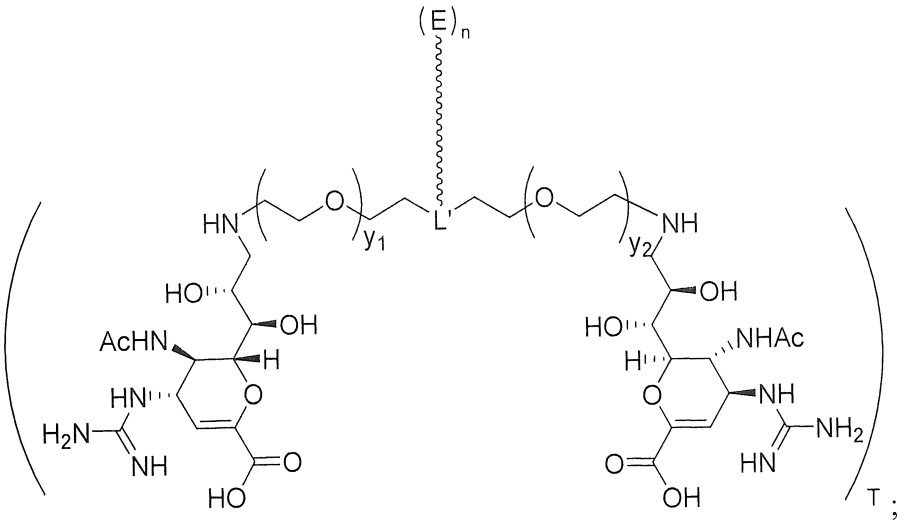
(D-III)



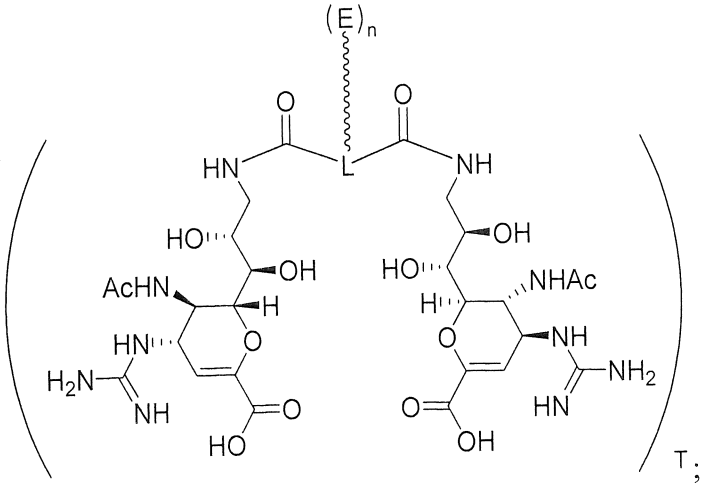
(D-III-1)



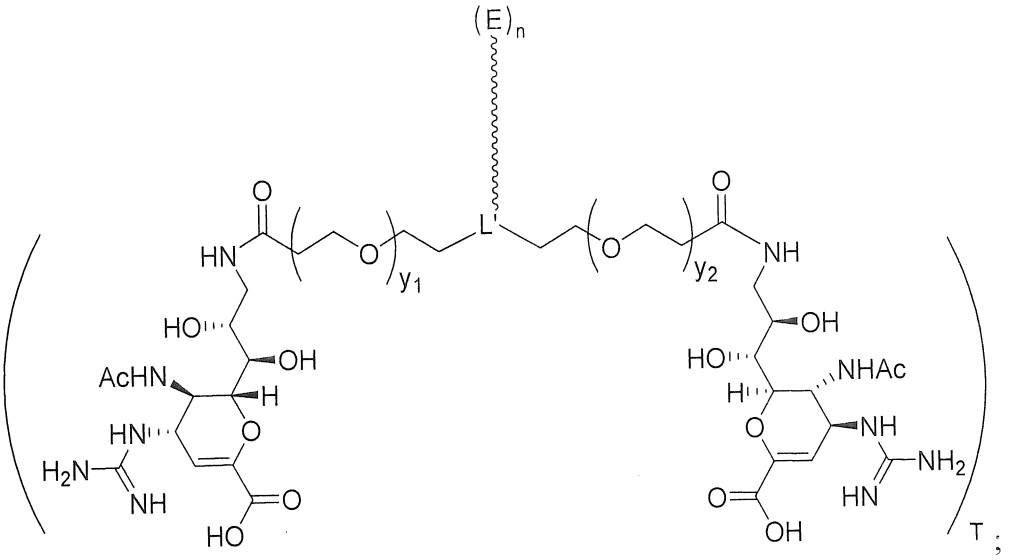
(D-III-2)



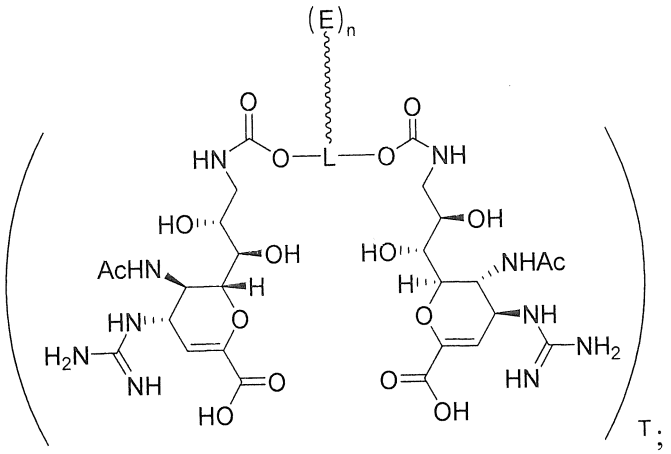
(D-III-3)



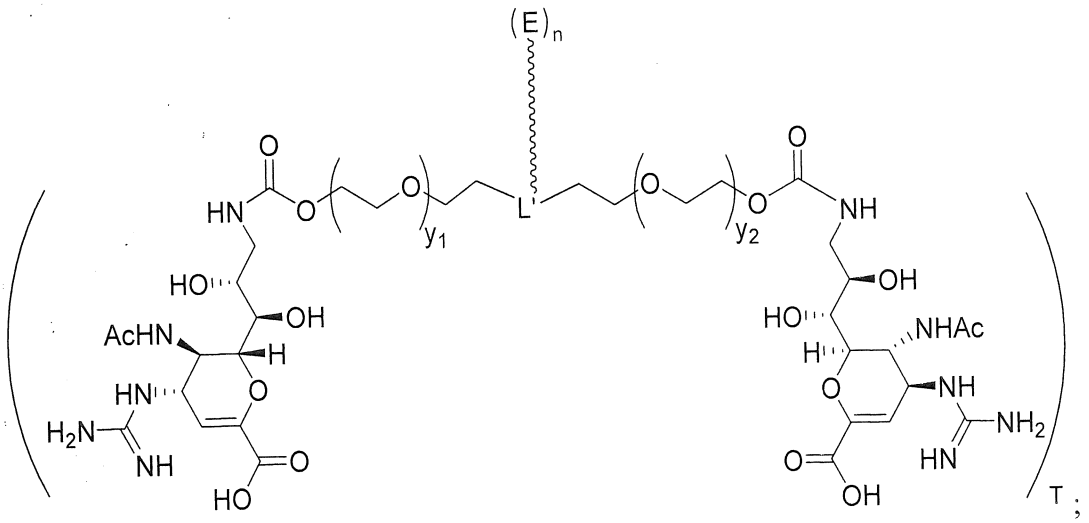
(D-III-4)



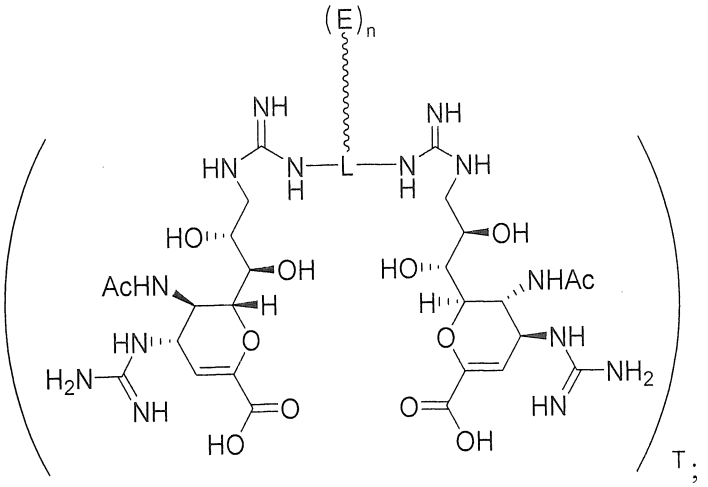
(D-III-5)



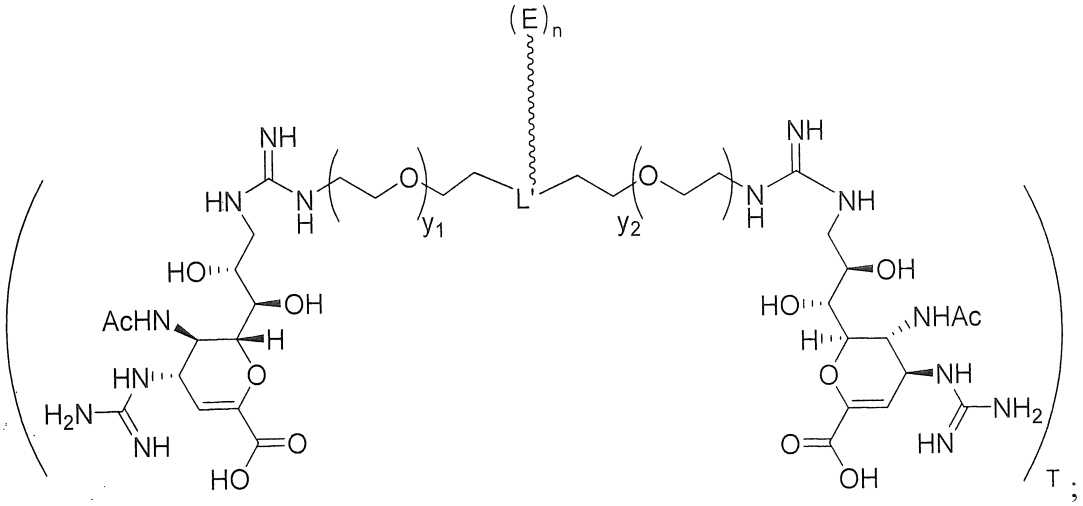
(D-III-6)



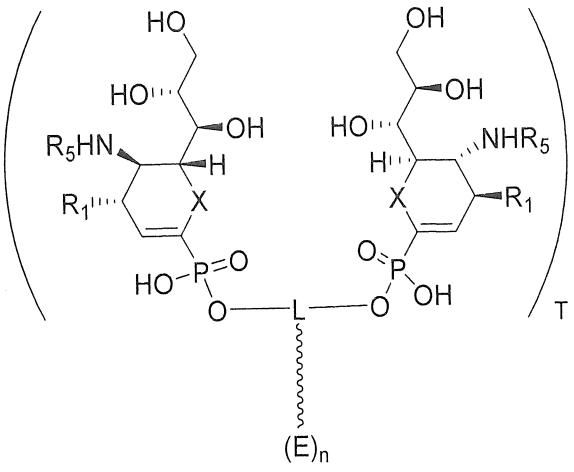
(D-III-7)



(D-III-8)

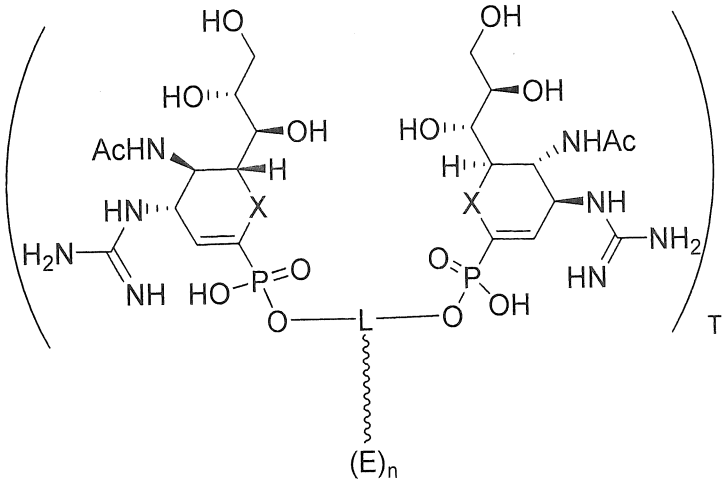


(D-III-9)



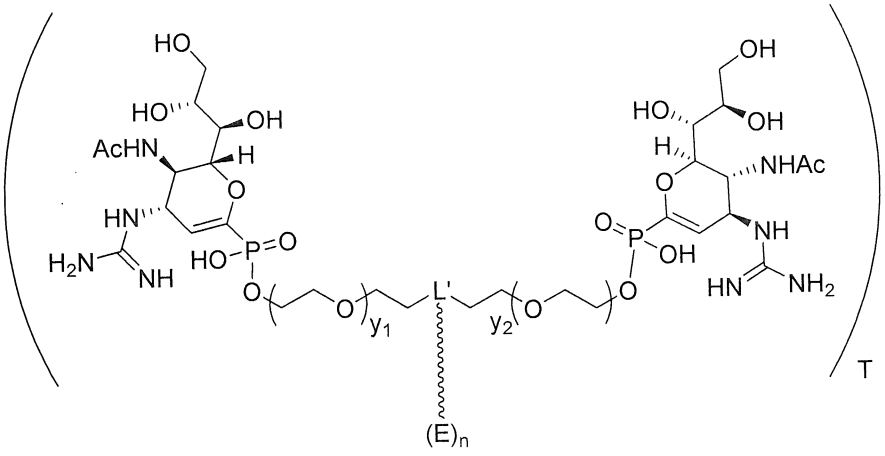
;

(D-IV)



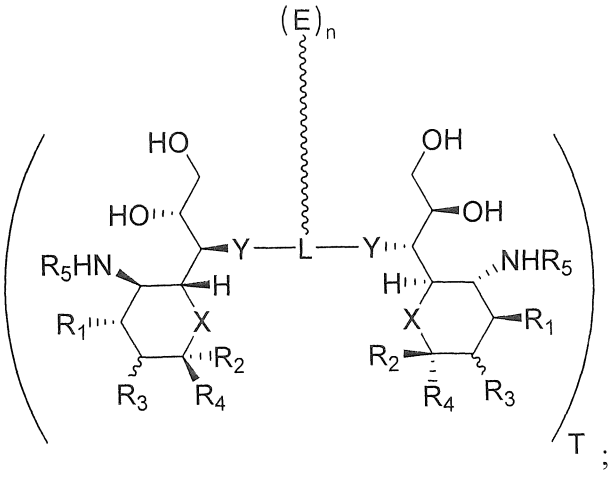
;

(D-IV-1)

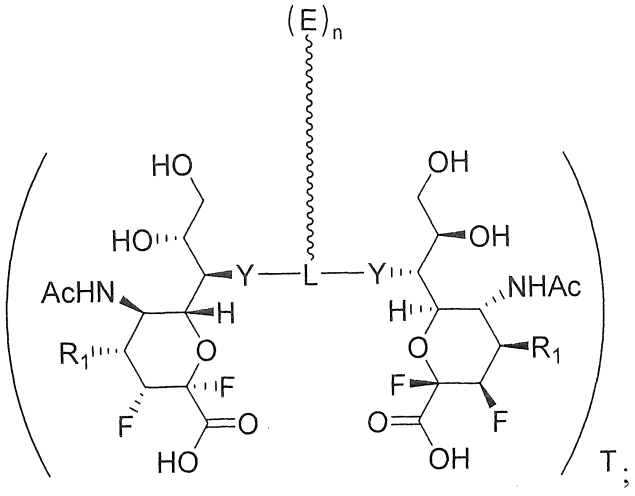


;

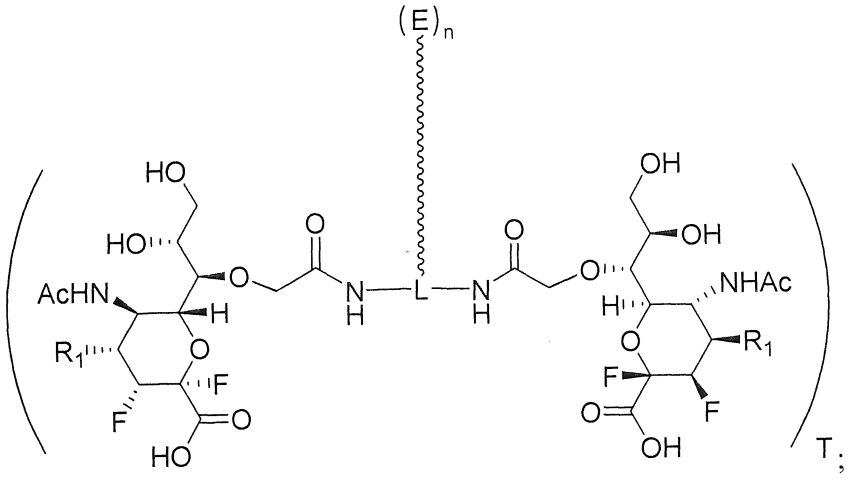
(D-IV-2)



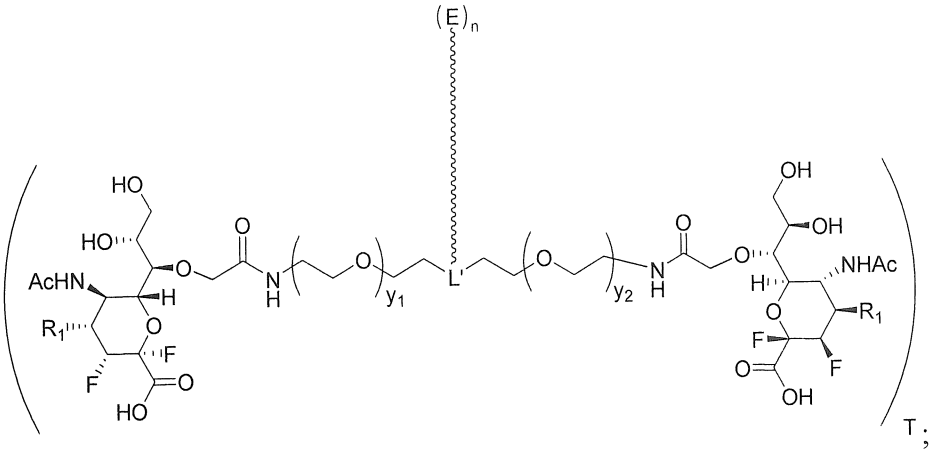
(D-V)



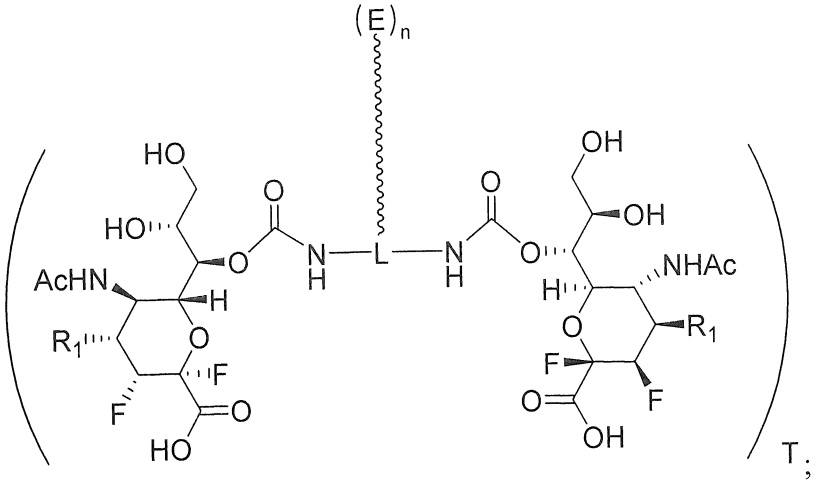
(D-V-1)



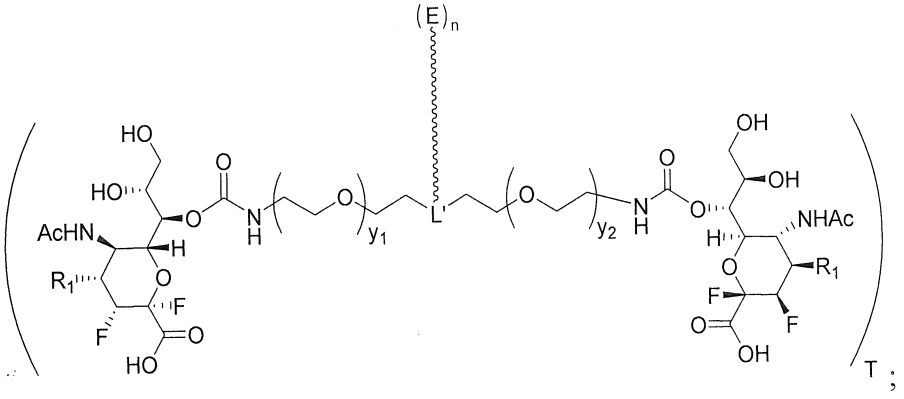
(D-V-2)



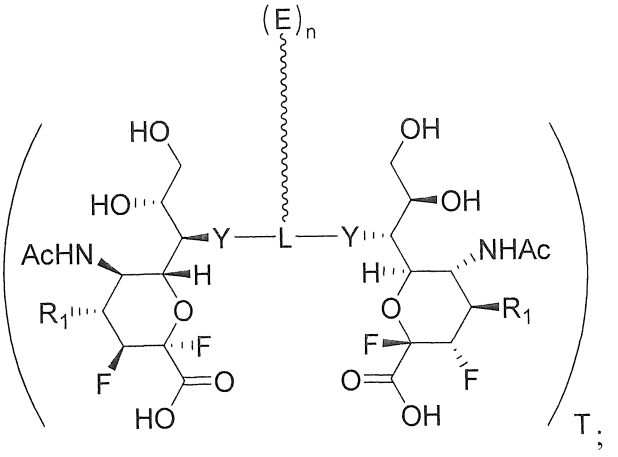
(D-V-3)



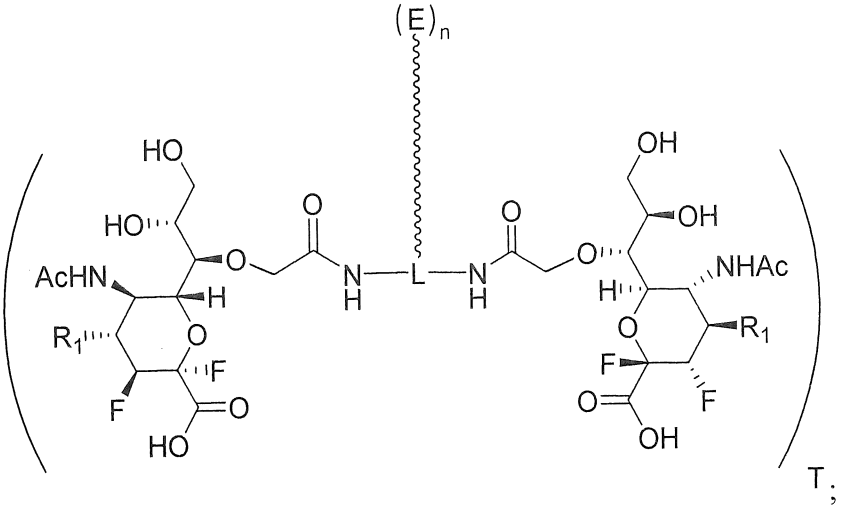
(D-V-4)



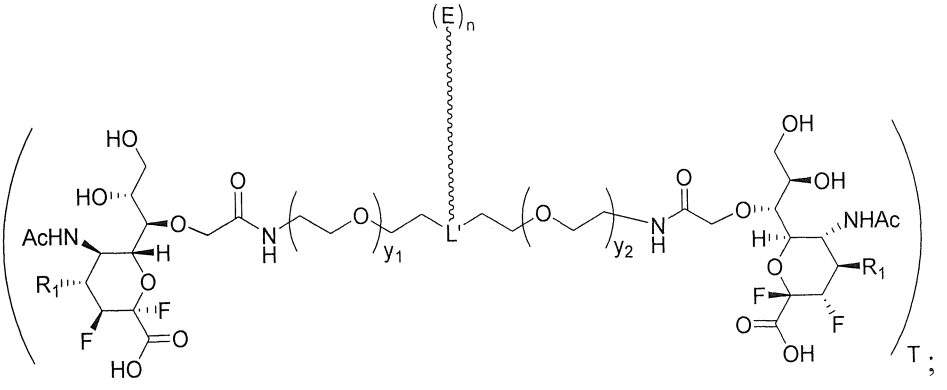
(D-V-5)



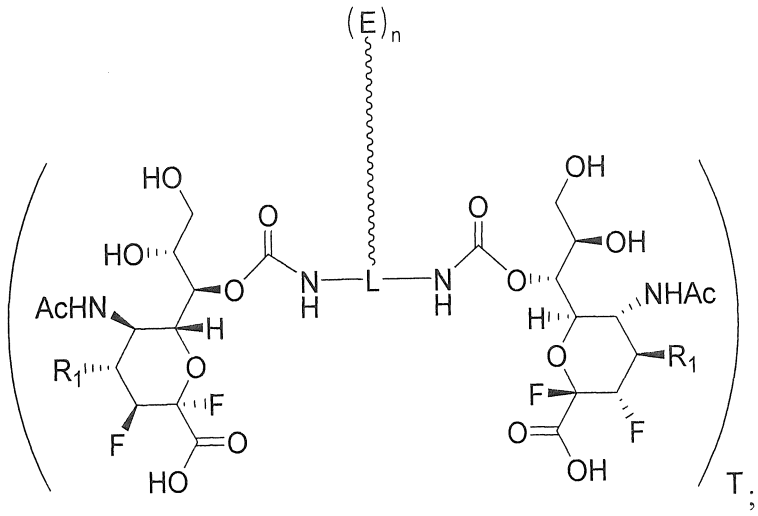
(D-V-6)



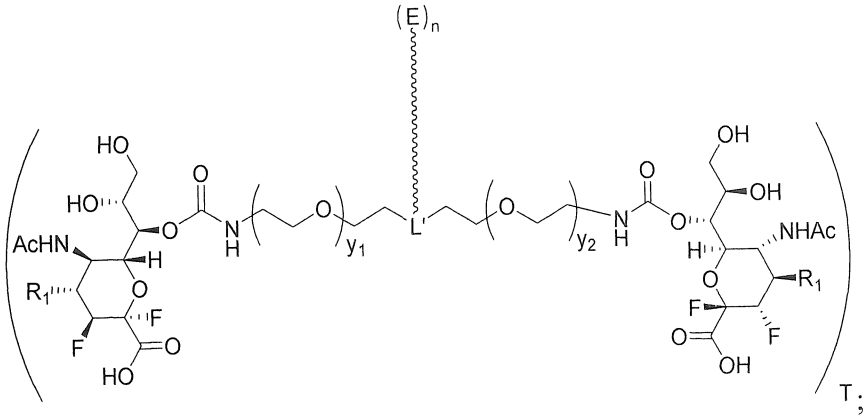
(D-V-7)



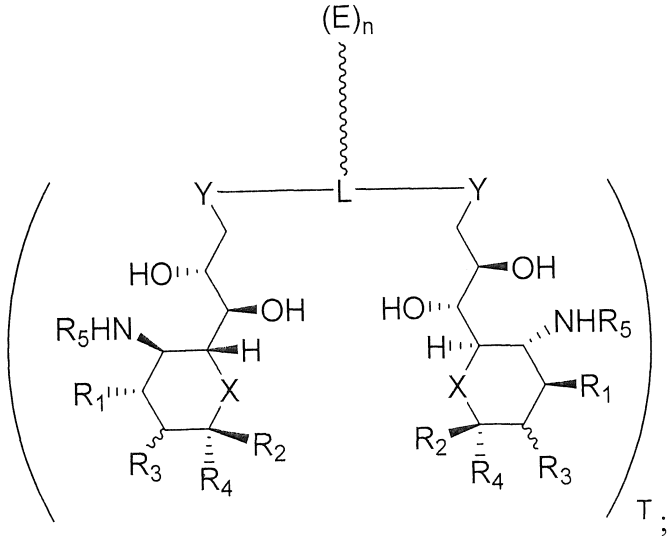
(D-V-8)



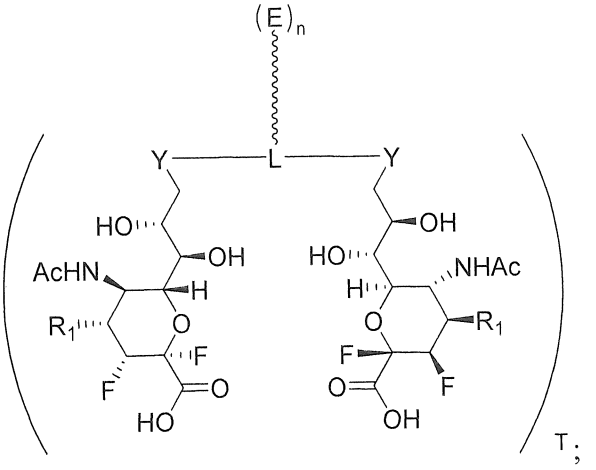
(D-V-9)



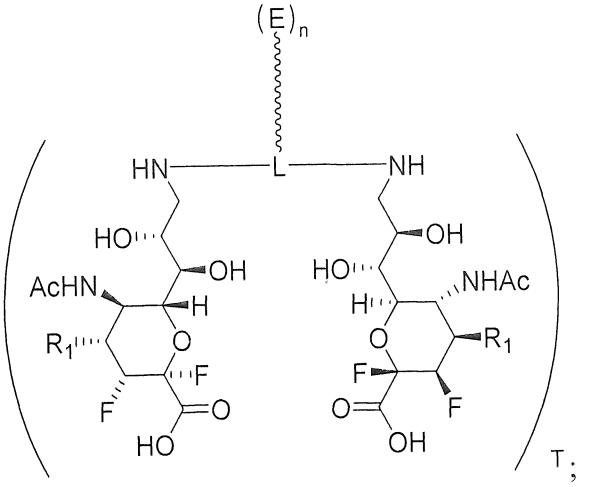
(D-V-10)



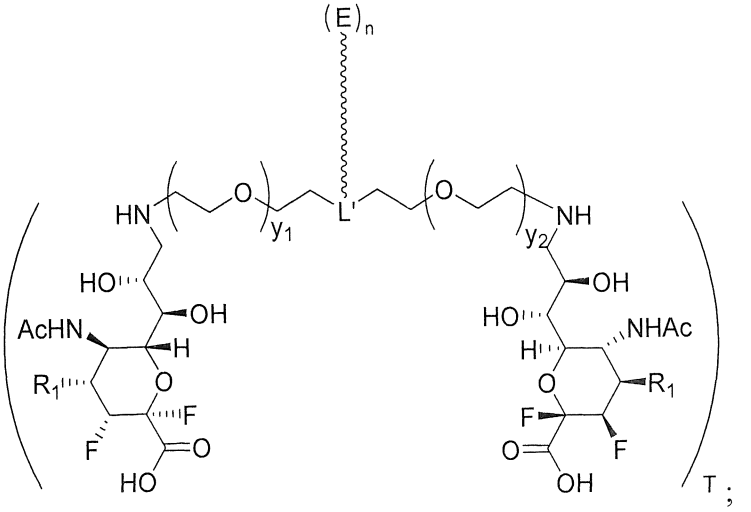
(D-VI)



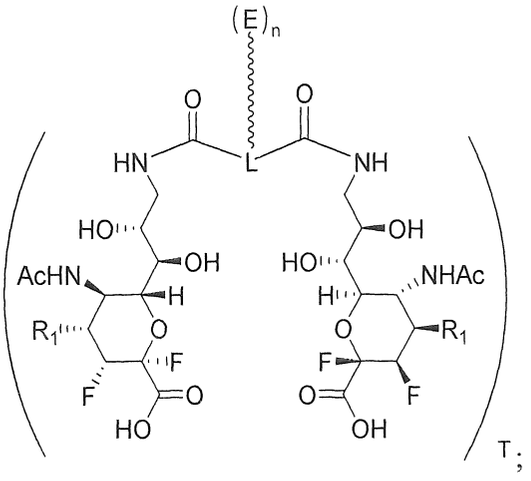
(D-VI-1)



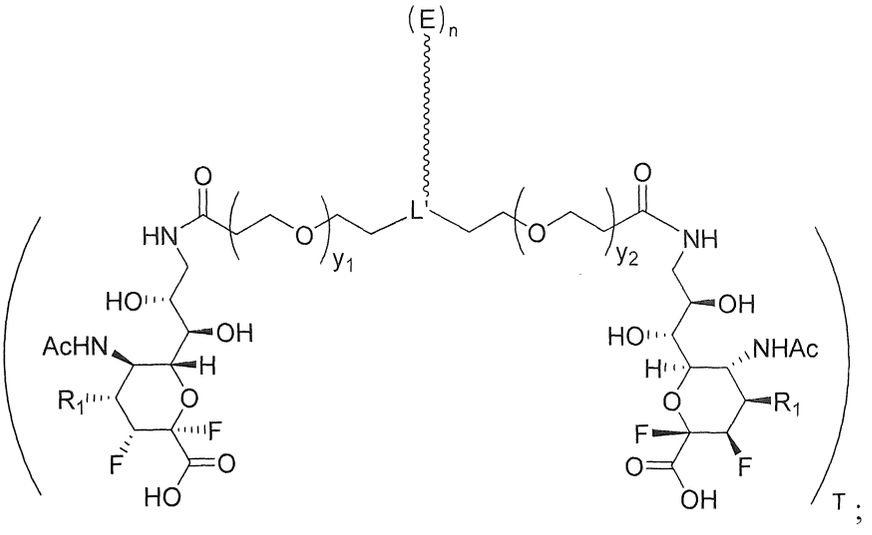
(D-VI-2)



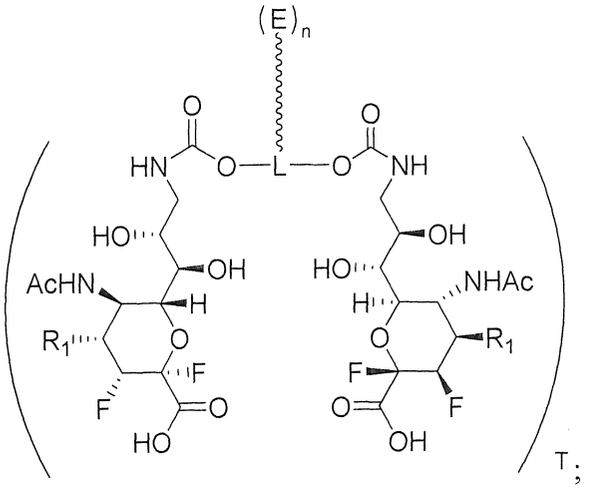
(D-VI-3)



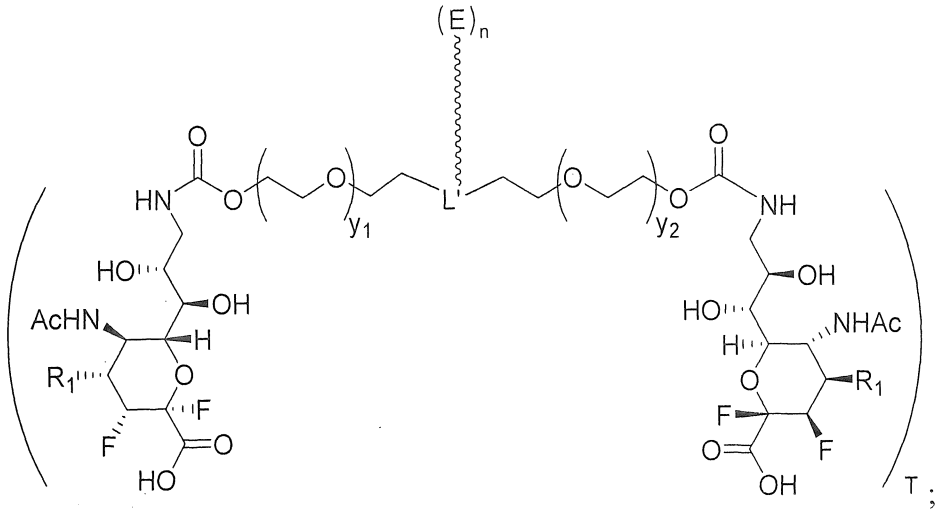
(D-VI-4)



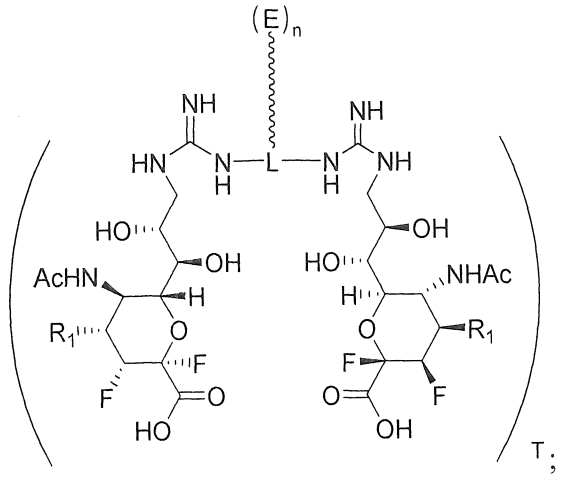
(D-VI-5)



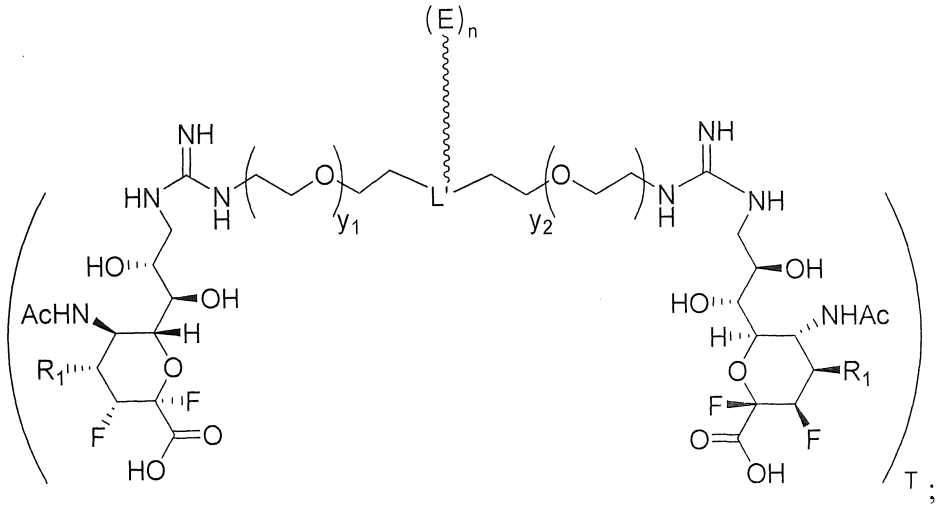
(D-VI-6)



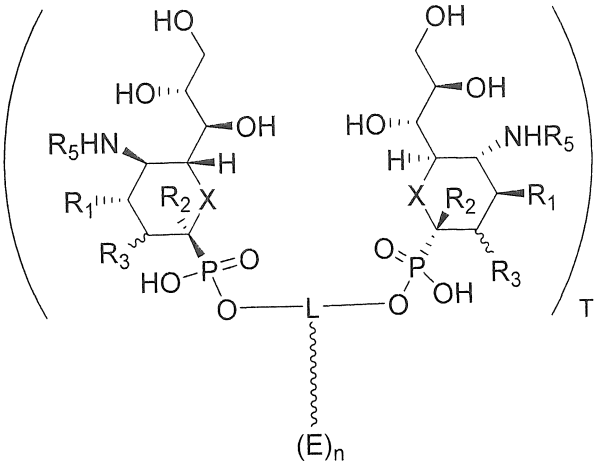
(D-VI-7)



(D-VI-8)

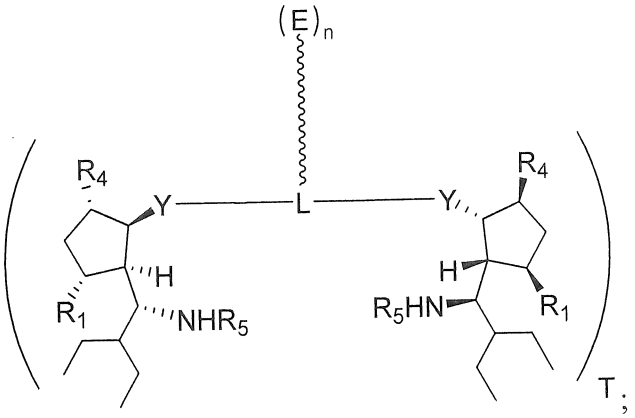


(D-VI-9)



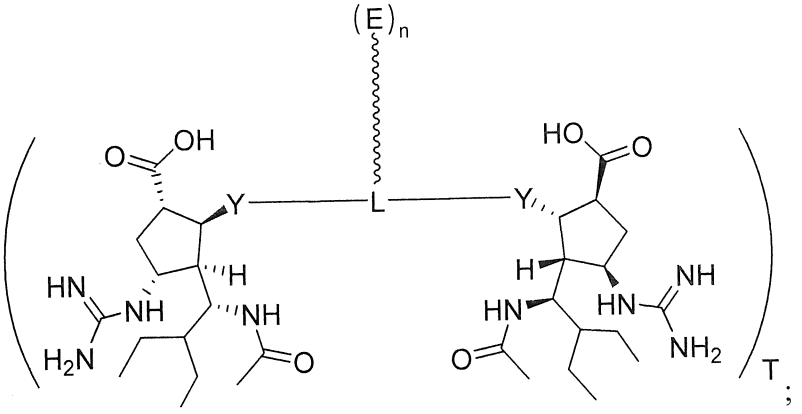
;

(D-VII)



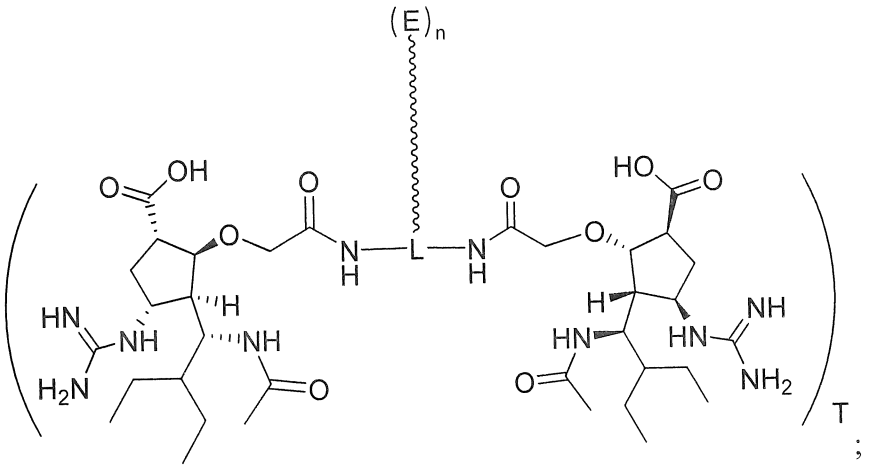
;

(D-VIII)

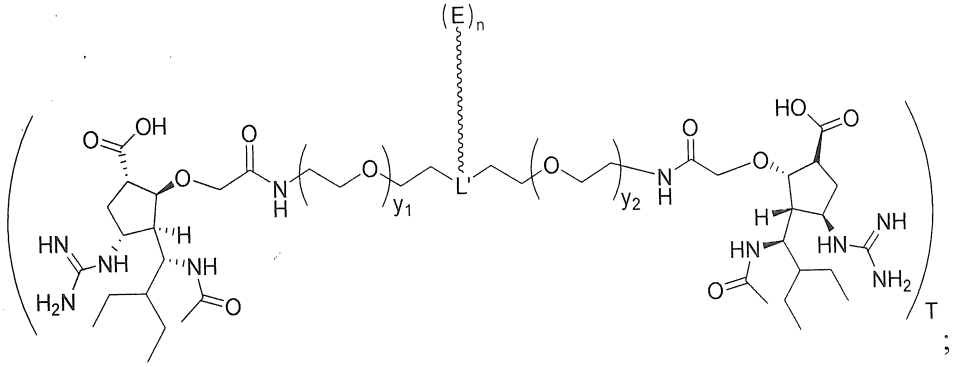


;

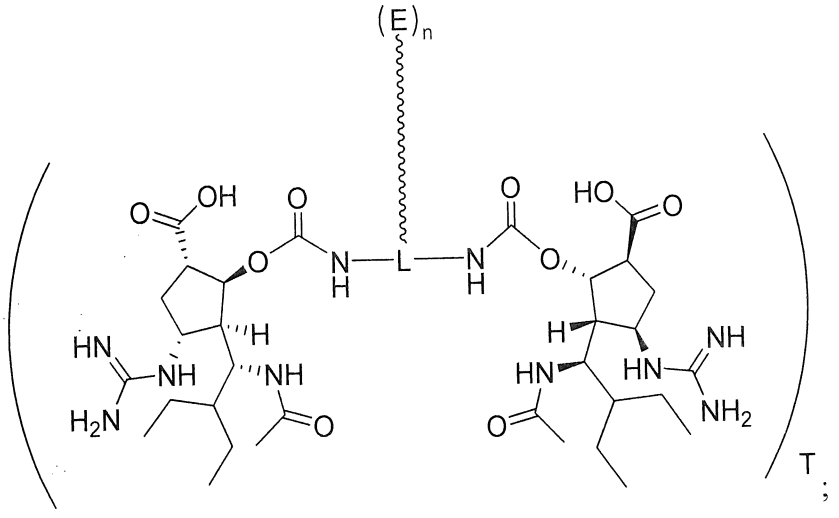
(D-VIII-1)



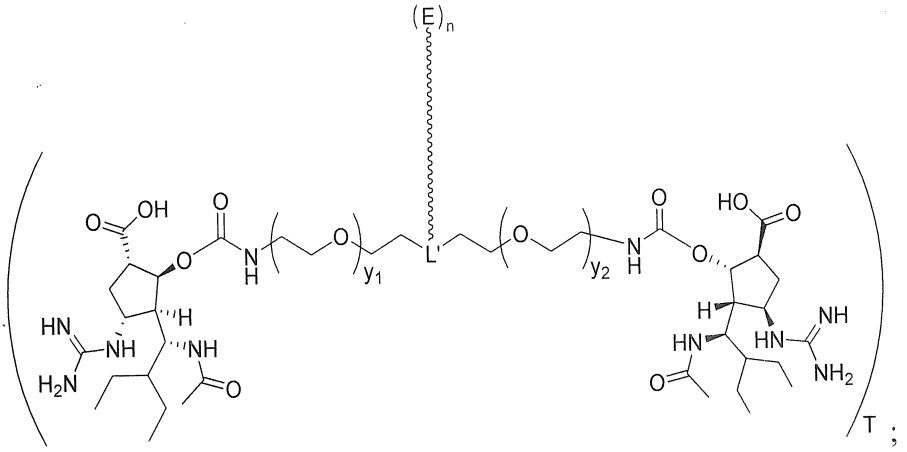
(D-VIII-2)



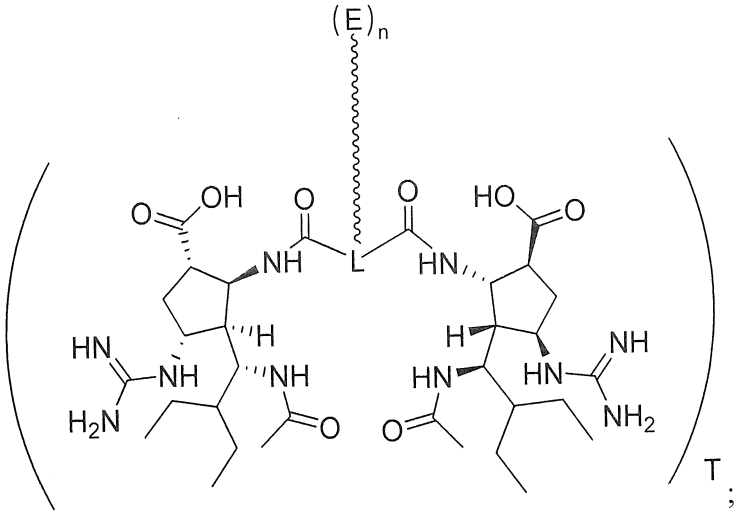
(D-VIII-3)



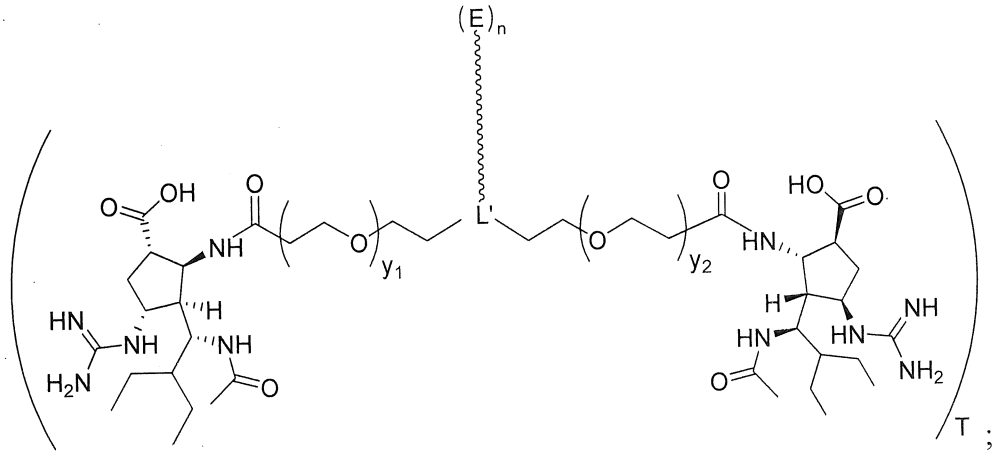
(D-VIII-4)



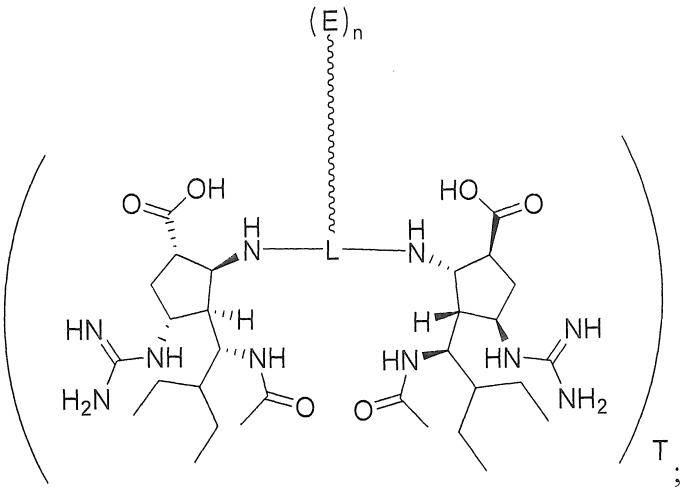
(D-VIII-5)



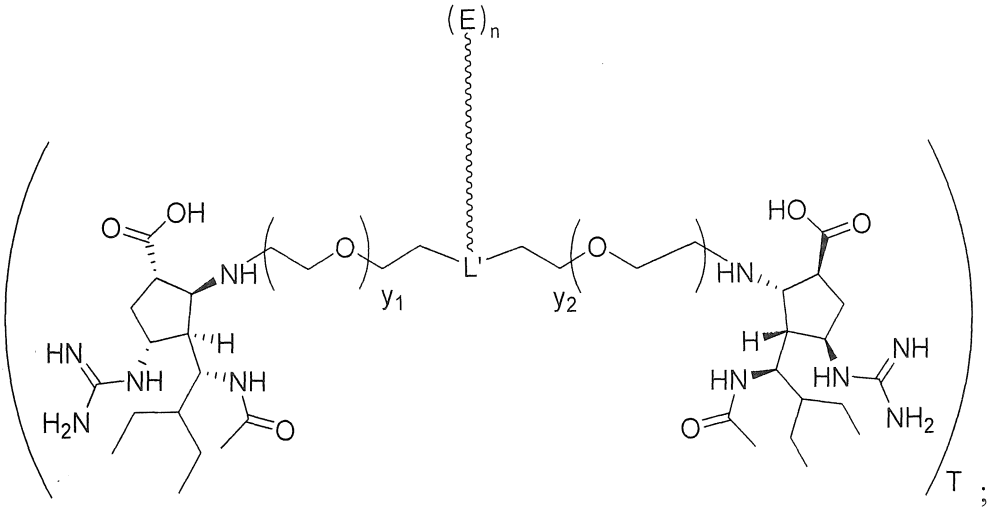
(D-VIII-6)



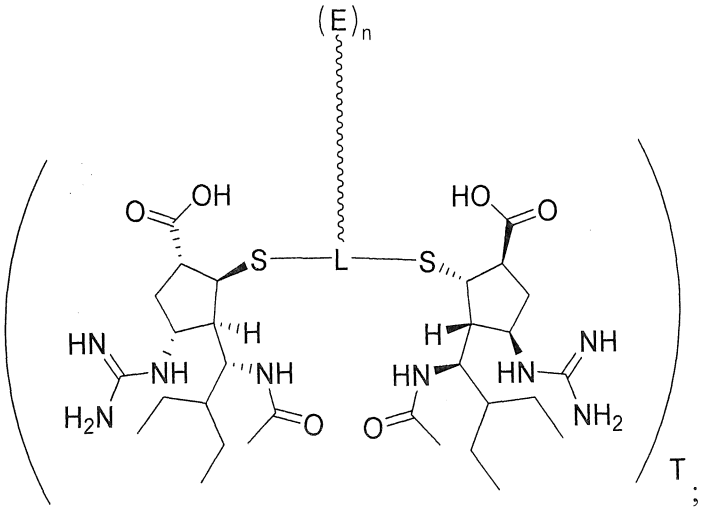
(D-VIII-7)



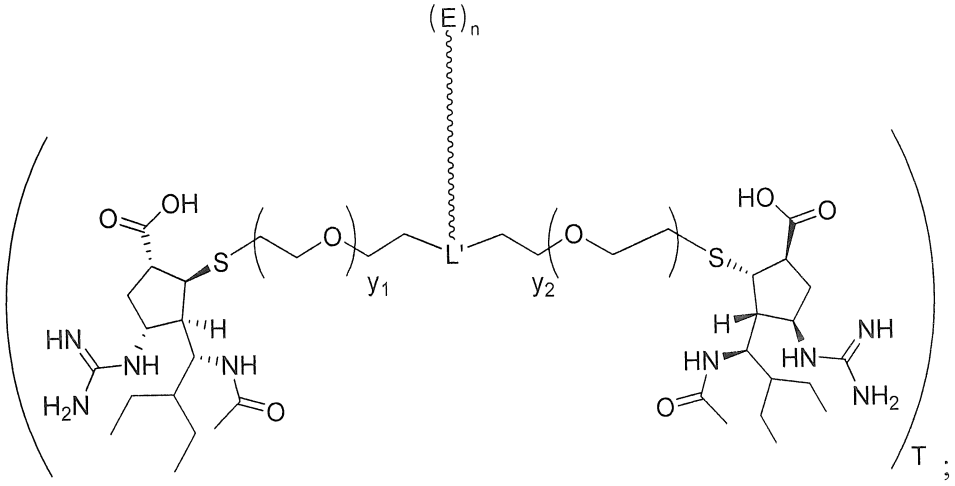
(D-VIII-8)



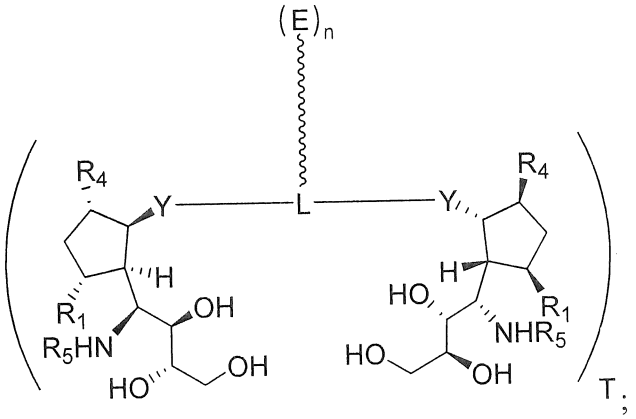
(D-VIII-9)



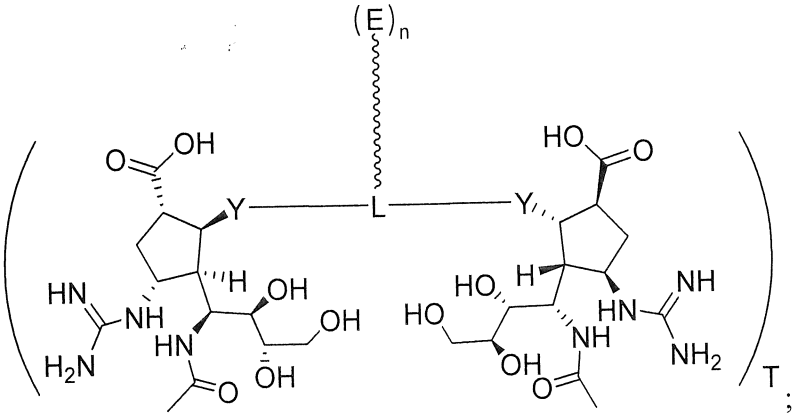
(D-VIII-10)



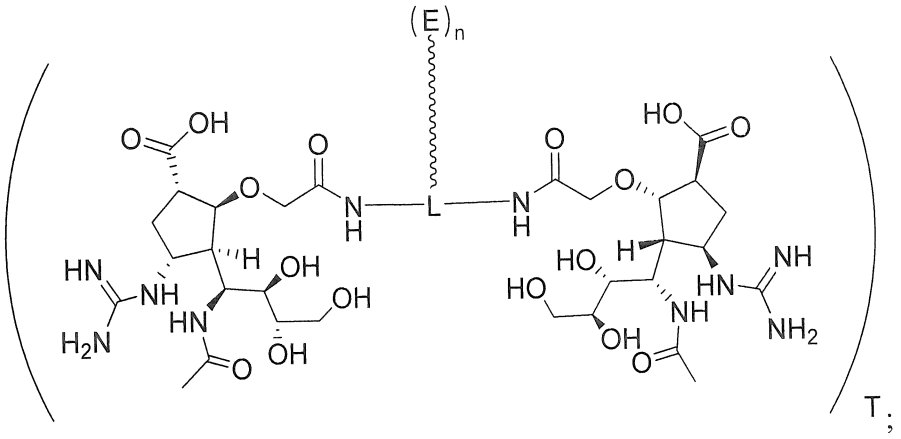
(D-VIII-11)



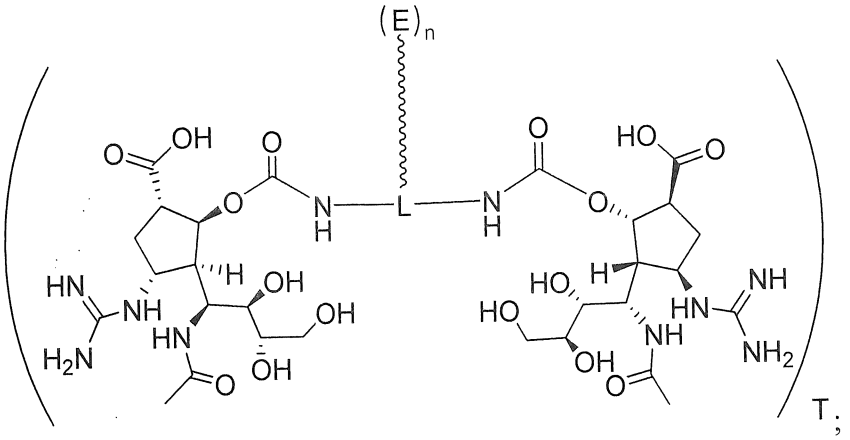
(D-IX)



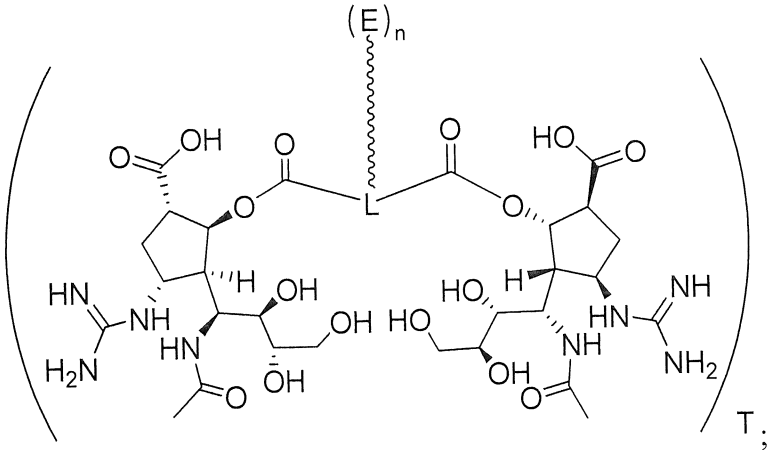
(D-IX-1)



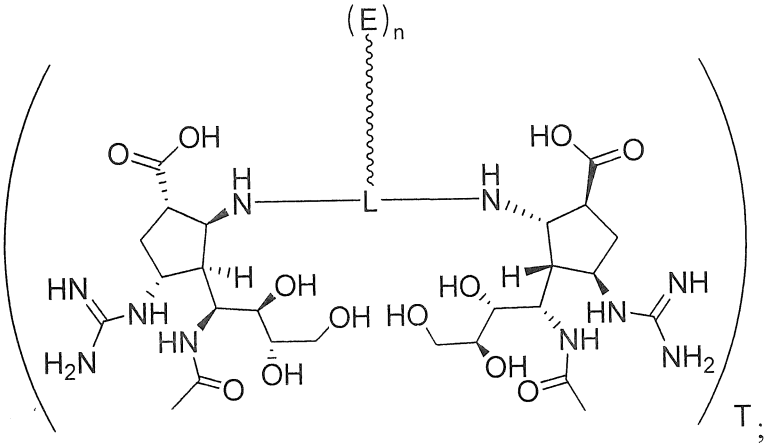
(D-IX-2)



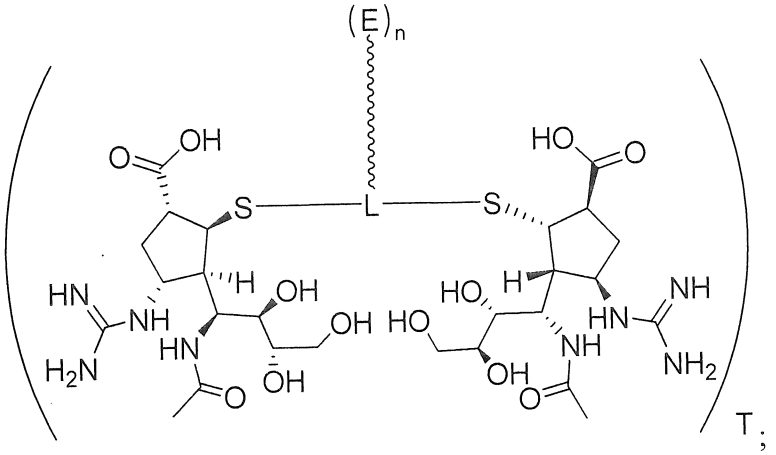
(D-IX-3)



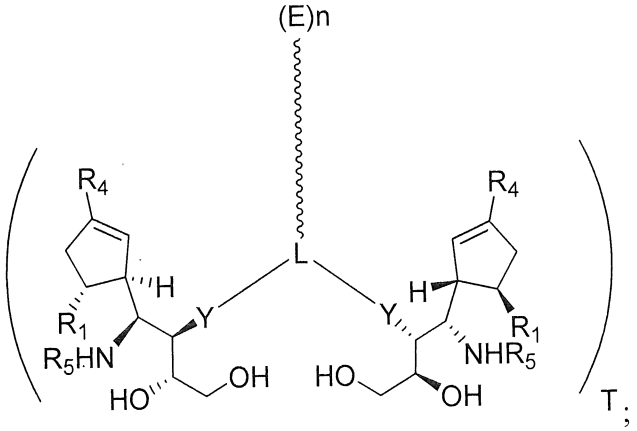
(D-IX-4)



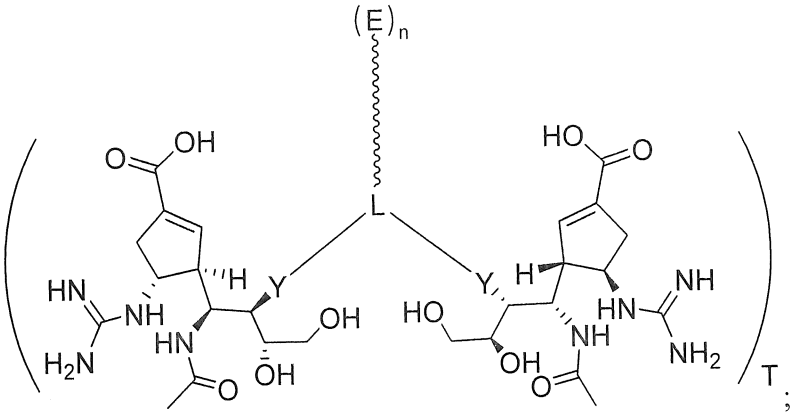
(D-IX-5)



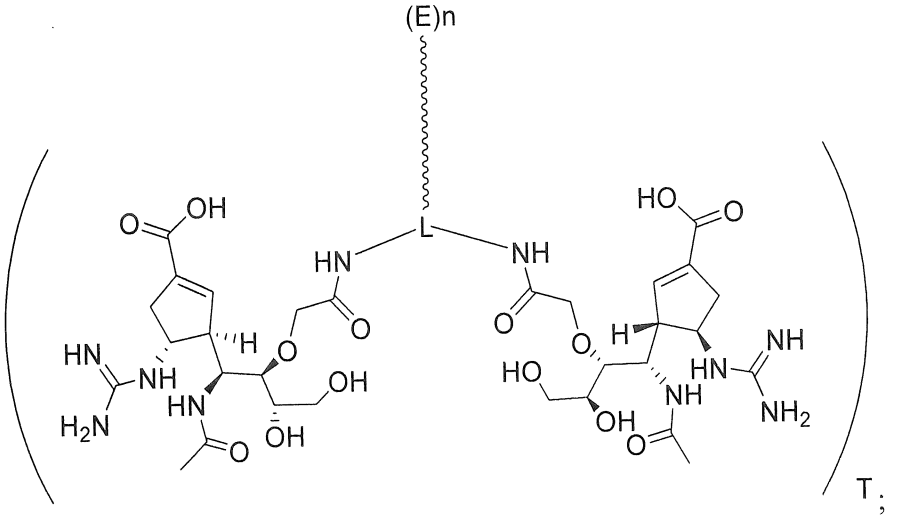
(D-IX-6)



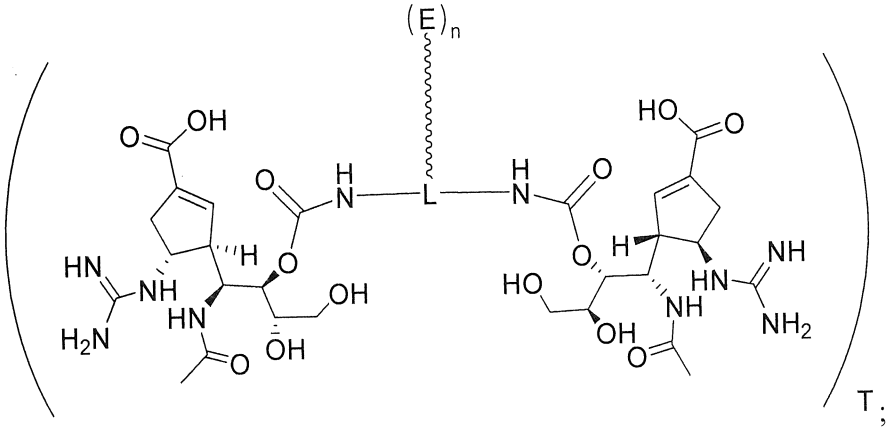
(D-X)



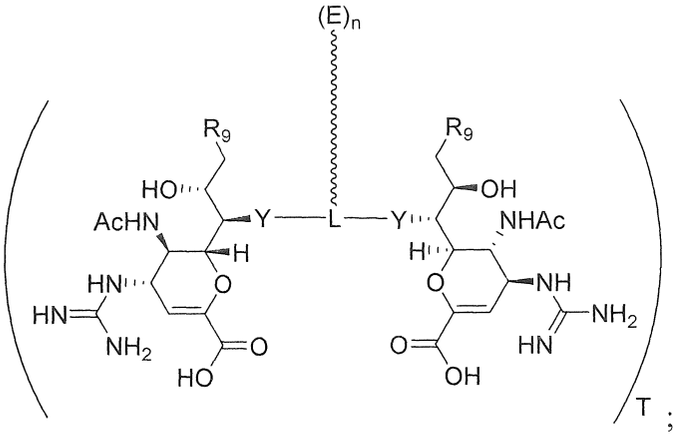
(D-X-1)



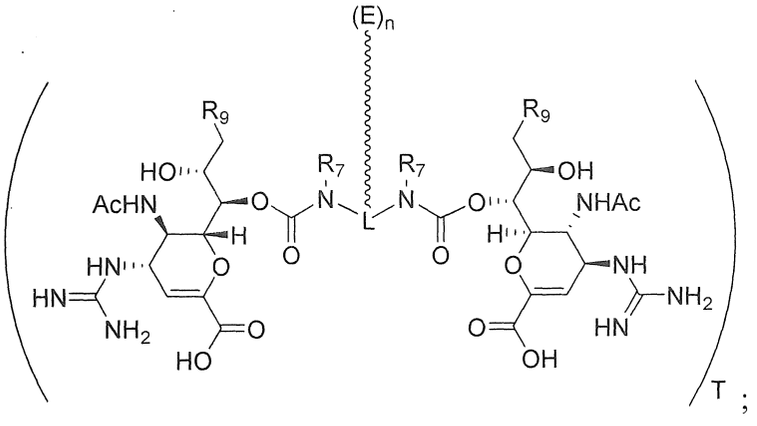
(D-X-2)



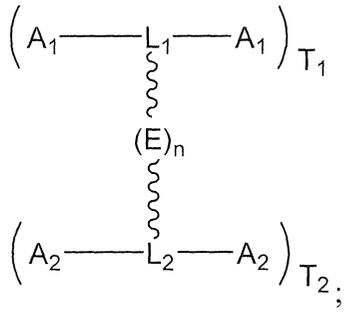
(D-X-3)



(D-XI)



(D-XI-1)



(D'-I)

hoặc muối dược dụng của nó.

Trong các thể liên hợp được mô tả ở đây, đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20) dime của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi n là 1, một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10) dime của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào monome miền

Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi n là 2, một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20) dime của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào miền Fc. Đường lượn sóng trong các thể liên hợp được mô tả ở đây không được coi là liên kết đơn giữa một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza và nguyên tử ở miền Fc hoặc protein albumin. Theo một số phương án, khi T là 1, một dime của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào nguyên tử trong monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi T là 2, hai dime của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào nguyên tử trong monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin.

Như được mô tả thêm trong bản mô tả này, yếu tố liên kết trong thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, L hoặc L') có thể là cấu trúc mạch nhánh. Như được mô tả thêm trong bản mô tả này, yếu tố liên kết trong thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, L hoặc L') có thể là cấu trúc đa trị, ví dụ, cấu trúc hóa trị hai hoặc hóa trị ba lần lượt có hai hoặc ba cánh. Theo một số phương án, khi yếu tố liên kết có ba cánh, hai trong số các cánh này có thể được gắn vào chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai và cánh thứ ba có thể được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin.

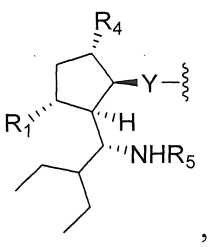
Trong thể liên hợp có miền Fc được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza, như được thể hiện bằng công thức trên đây, khi n là 2, hai monome miền Fc (mỗi monome miền Fc được thể hiện bằng E) dime hóa tạo thành miền Fc.

Thể liên hợp gồm monome của chất ức chế neuraminidaza liên kết với miền Fc hoặc protein albumin

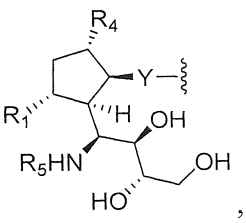
Theo một số phương án, các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza. Thể liên hợp gồm monome miền Fc hoặc protein albumin và một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được tạo ra bằng cách liên kết miền Fc hoặc protein albumin vào mỗi monome của chất ức chế neuraminidaza thông qua yếu tố liên kết, như bất kỳ trong số các yếu tố liên kết được mô tả ở đây.

Trong thể liên hợp có miền Fc hoặc protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza được mô tả ở đây, đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20) monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi n là 1, một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10) monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào monome miền Fc hoặc protein albumin. Theo một số phương án, khi n là 2, một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20) monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào miền Fc. Đường lượn sóng trong các thể liên hợp được mô tả ở đây không được coi là liên kết đơn giữa một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza và nguyên tử trong monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi T là 1, một monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào nguyên tử trong monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin. Theo một số phương án, khi T là 2, hai monome của chất ức chế neuraminidaza có thể được gắn vào nguyên tử trong monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin.

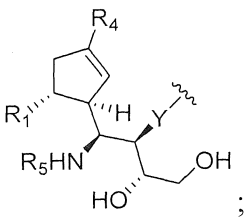
Theo một số phương án, khi T lớn hơn 1 (ví dụ, T là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20), mỗi A_1-L có thể độc lập được chọn (ví dụ, độc lập được chọn từ bất kỳ trong số các cấu trúc A_1 L được mô tả ở đây). Theo một số phương án, E có thể được liên hợp với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều hơn nhóm A_1-L khác nhau. Theo một số phương án, E được liên hợp với nhóm A_1-L thứ nhất, và nhóm A_1-L thứ hai. Theo một số phương án, A_1 của nhóm A_1-L thứ nhất được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-III)-(A-V):



(A-III)

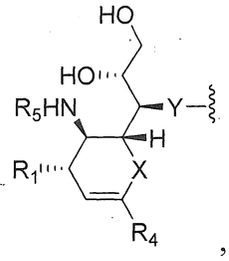


(A-IV)

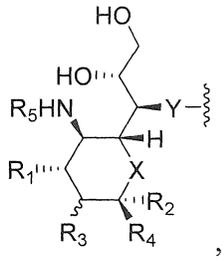


(A-V)

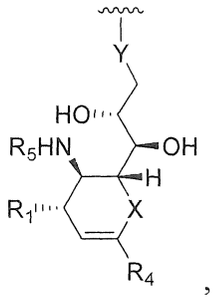
và A_1 của nhóm A_1-L thứ hai được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), hoặc (A-XIII):



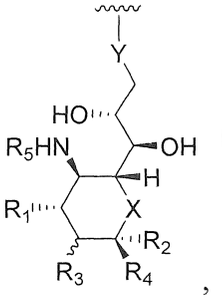
(A-I),



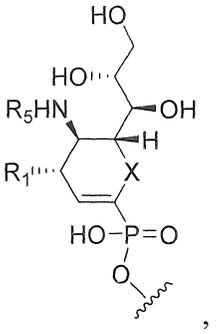
(A-II),



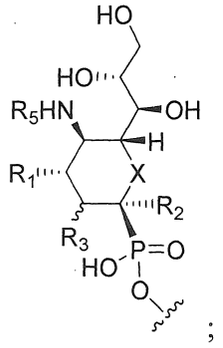
(A-VI),



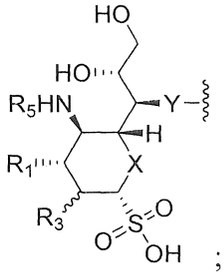
(A-VII),



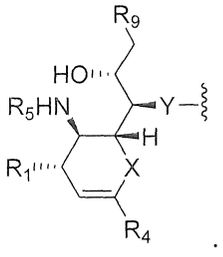
(A-VIII),



(A-IX);



(A-X);

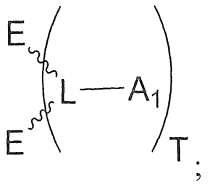


(A-XIII).

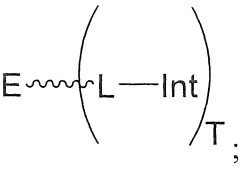
Theo một số phương án, nhóm A_1-L thứ nhất được liên hợp cụ thể với các gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin tiếp cận bề mặt của E), và nhóm A_1-L thứ hai được liên hợp cụ thể với các gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của các gốc xystein tiếp cận bề mặt của E). Theo một số phương án, nhóm A_1-L thứ nhất được liên hợp cụ thể với các gốc xystein của E (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của các gốc xystein tiếp cận bề mặt của E), và nhóm A_1-L thứ hai được liên hợp cụ thể với các gốc lysin của E (ví dụ, nguyên tử nitơ của gốc lysin tiếp cận bề mặt của E).

Như được mô tả thêm trong bản mô tả này, yếu tố liên kết trong thể liên hợp có monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza được mô tả ở đây (ví dụ, L hoặc L') có thể là cấu trúc hóa trị hai có hai cánh. Một cánh trong yếu tố liên kết hóa trị hai có thể được gắn vào monome của chất ức chế neuraminidaza và cánh còn lại có thể được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin.

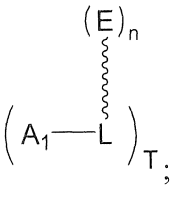
Theo một số phương án, thể liên hợp chứa monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza được đề xuất trong bản mô tả này được mô tả bằng bất kỳ một trong số các công thức sau:



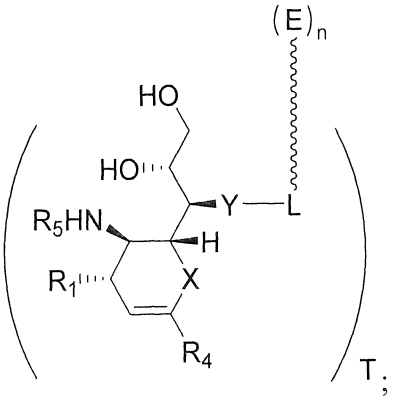
(2)



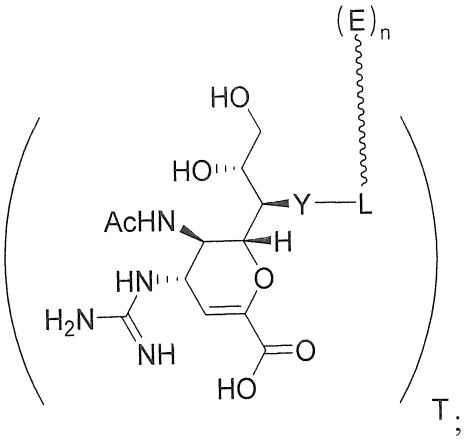
(5)



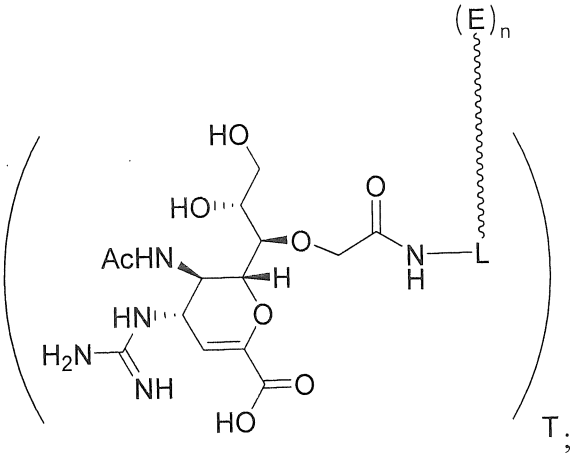
(M-I)



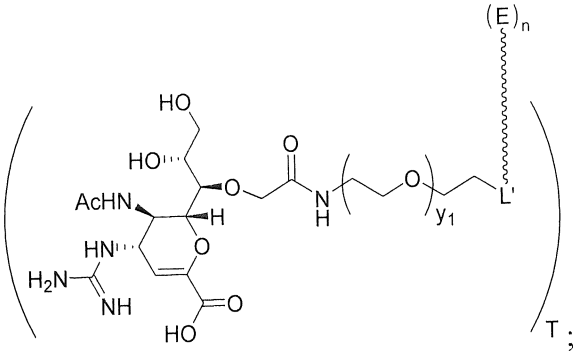
(M-II)



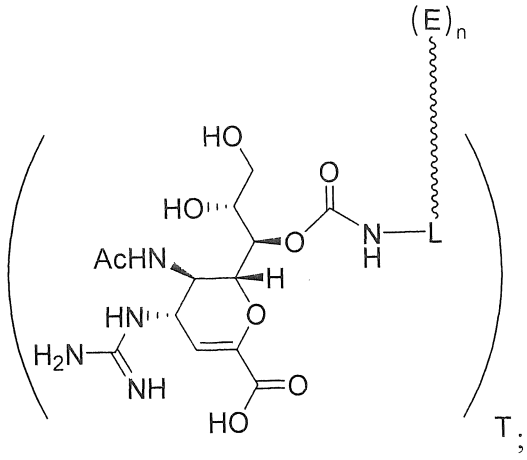
(M-II-1)



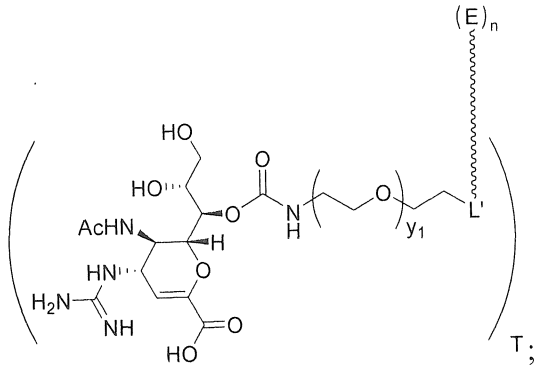
(M-II-2)



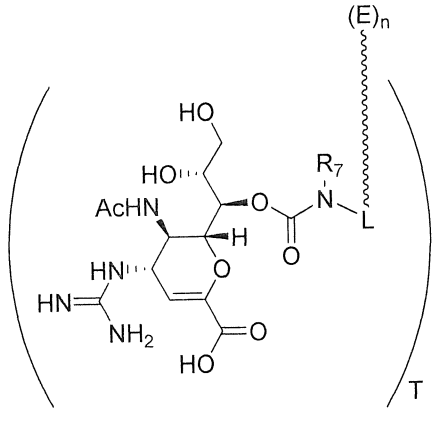
(M-II-3)



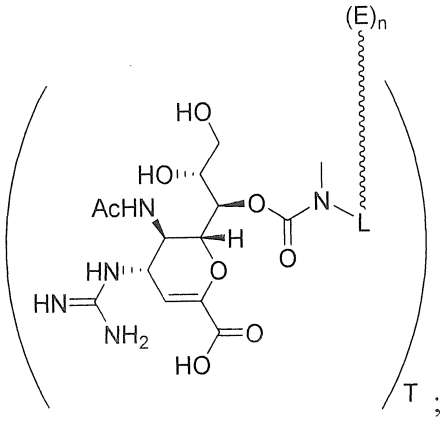
(M-II-4)



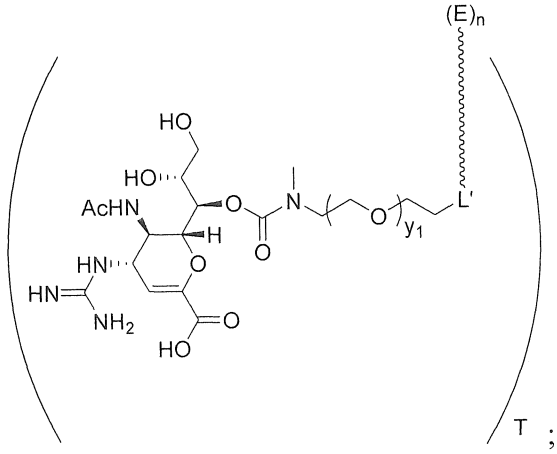
(M-II-5)



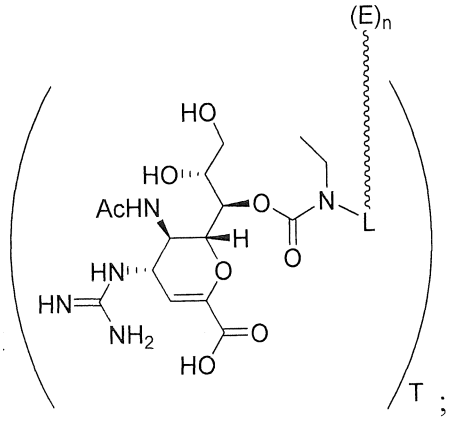
(M-II-6)



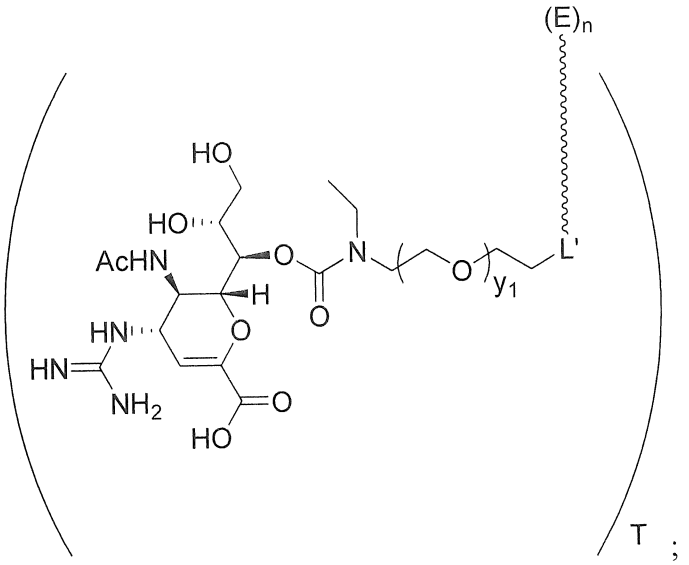
(M-II-7)



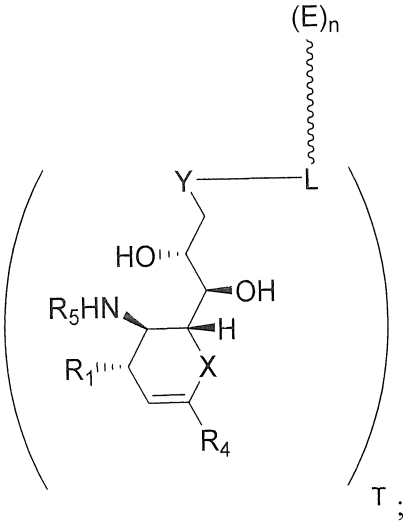
(M-II-8)



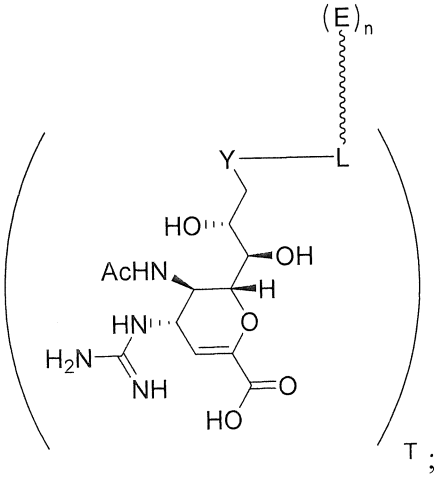
(M-II-9)



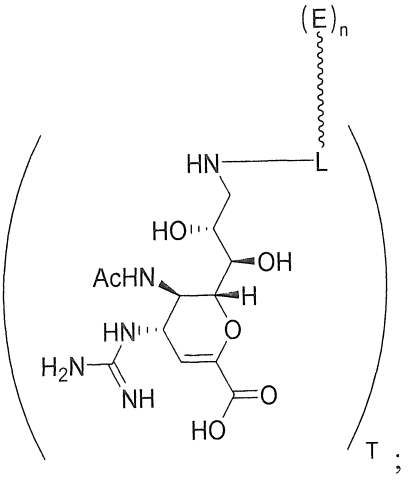
(M-II-10)



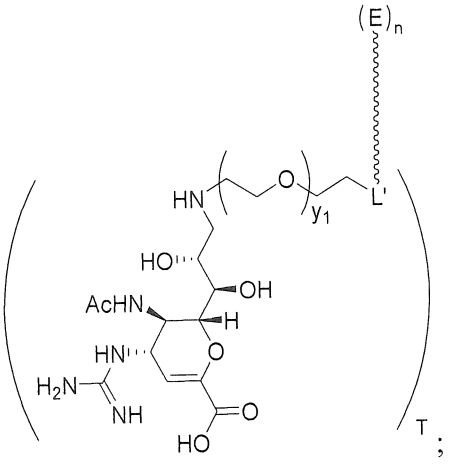
(M-III)



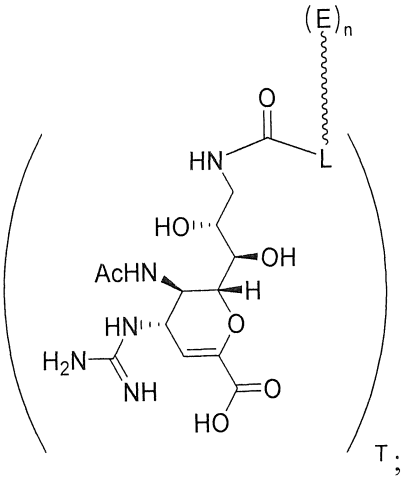
(M-III-1)



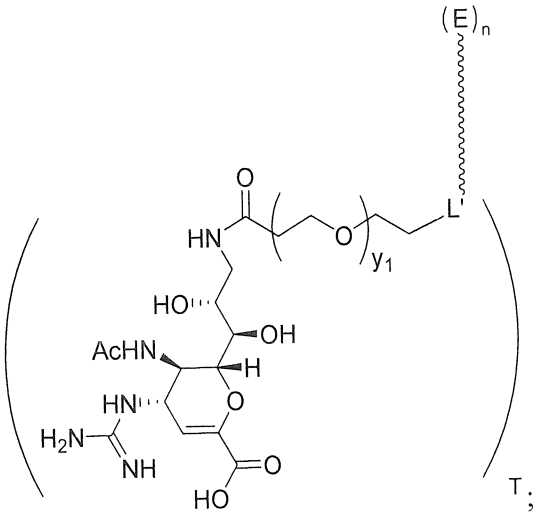
(M-III-2)



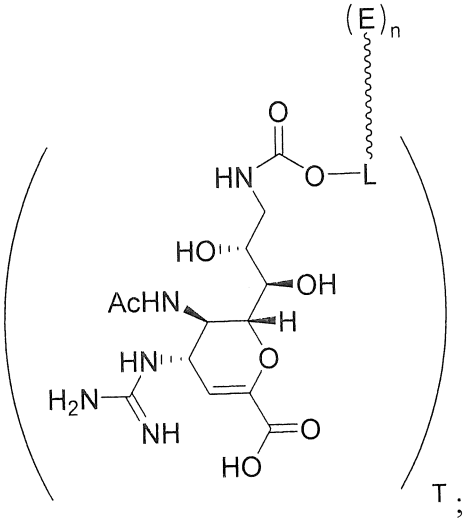
(M-III-3)



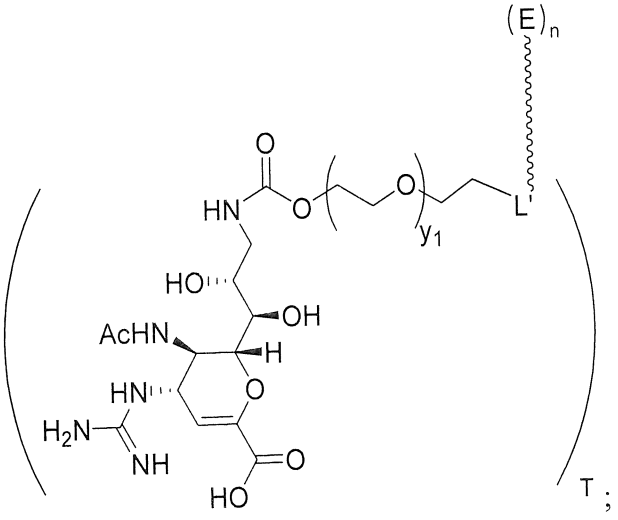
(M-III-4)



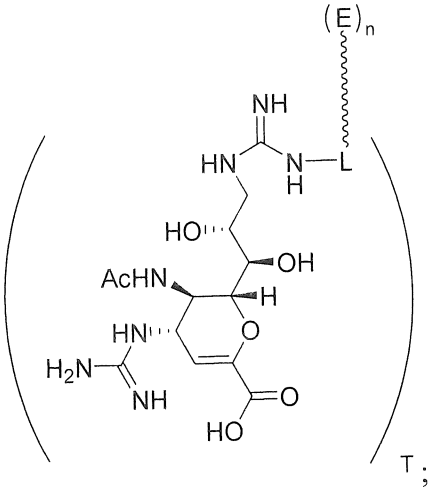
(M-III-5)



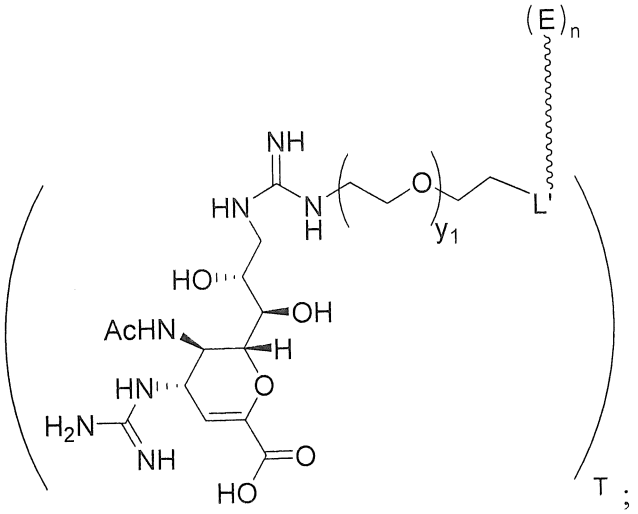
(M-III-6)



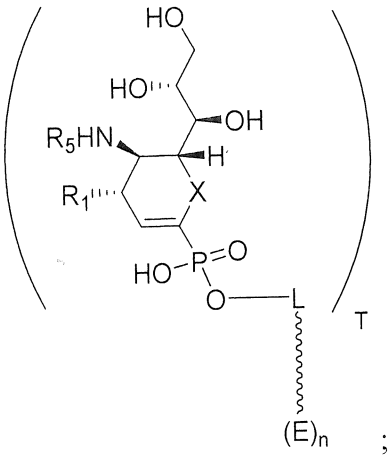
(M-III-7)



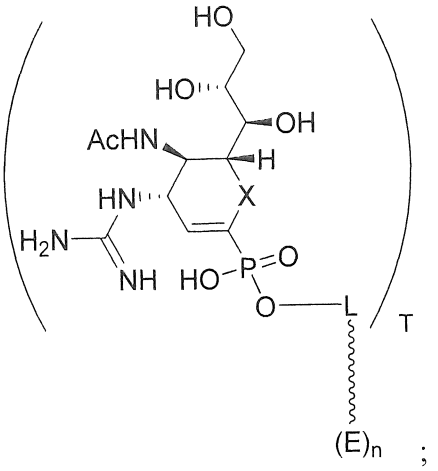
(M-III-8)



(M-III-9)

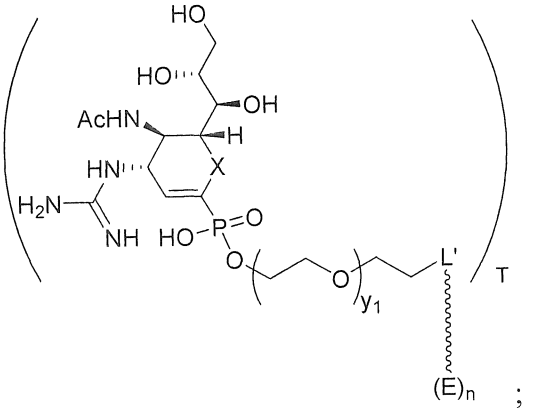


(M-IV)



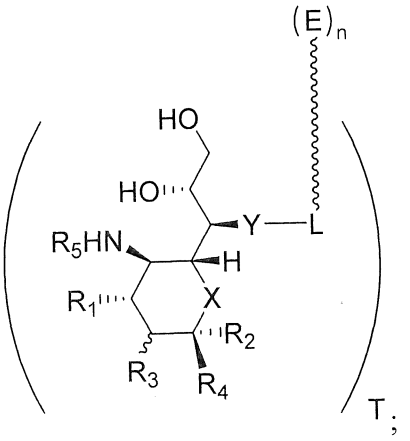
;

(M-IV-1)



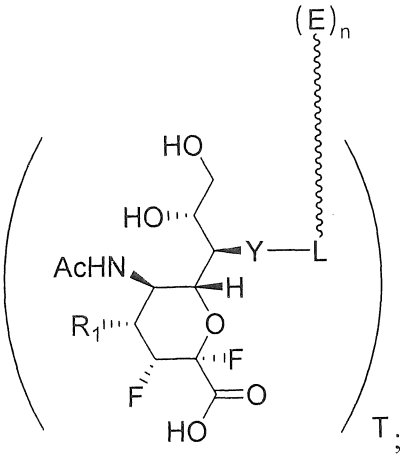
;

(M-IV-2)

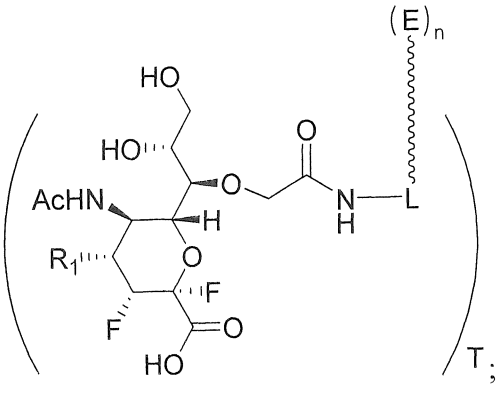


;

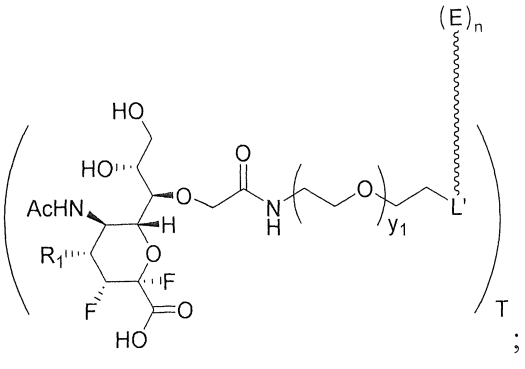
(M-V)



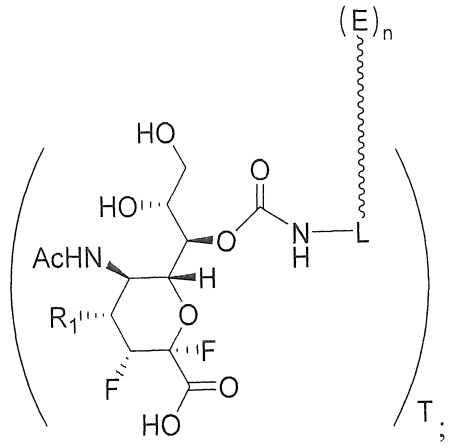
(M-V-1)



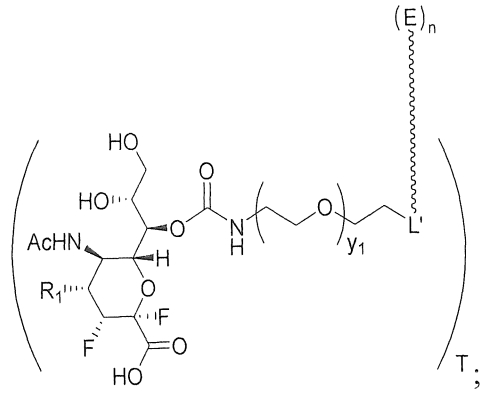
(M-V-2)



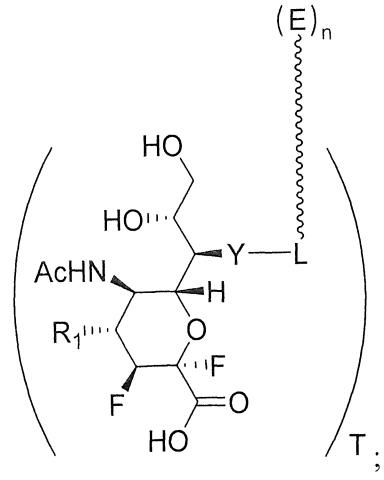
(M-V-3)



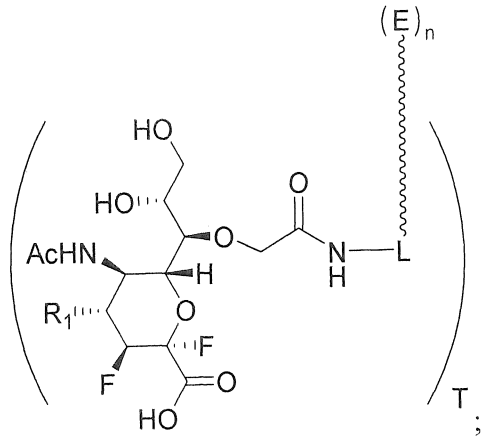
(M-V-4)



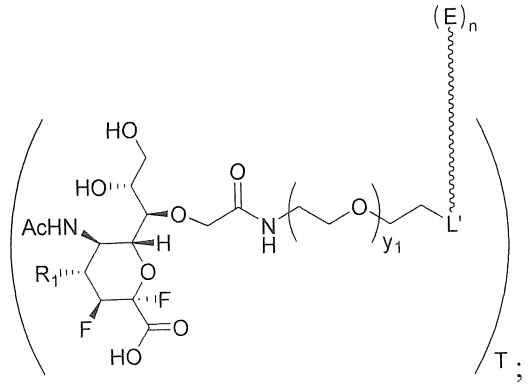
(M-V-5)



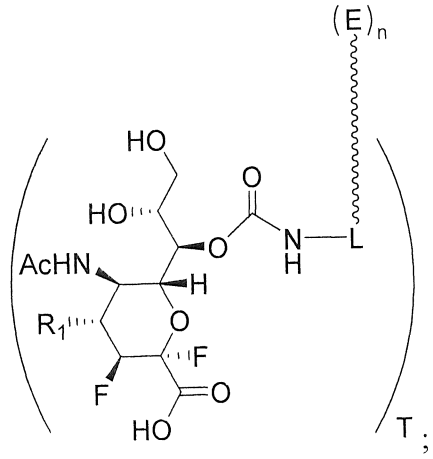
(M-V-6)



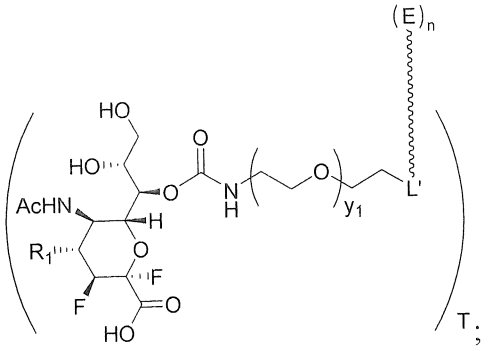
(M-V-7)



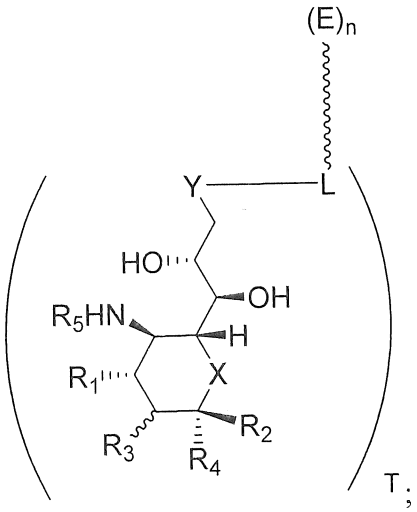
(M-V-8)



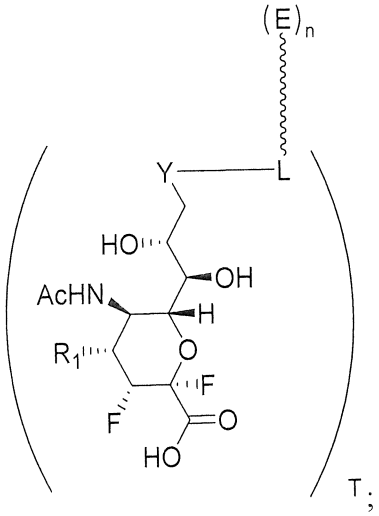
(M-V-9)



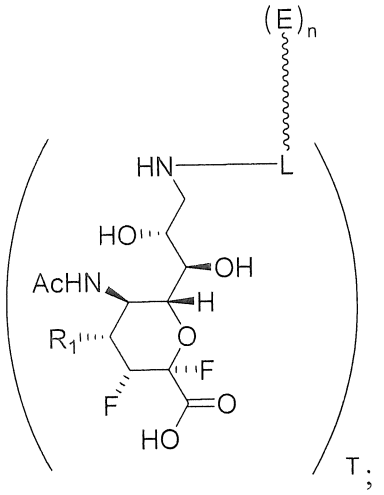
(M-V-10)



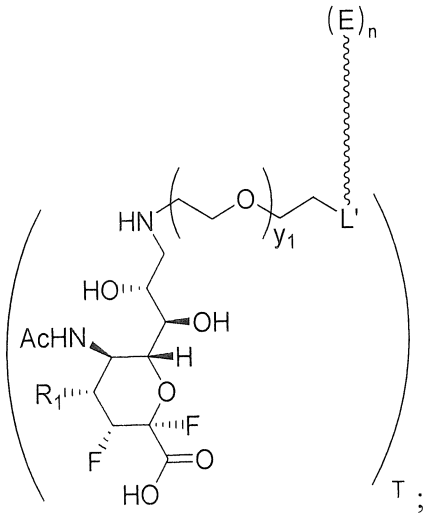
(M-VI)



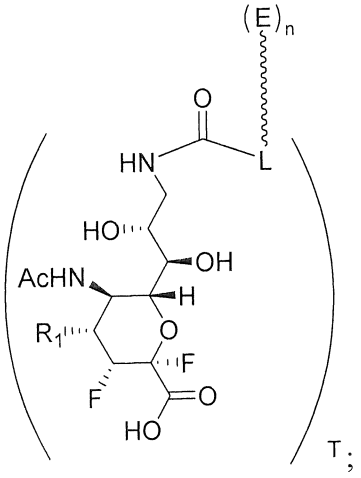
(M-VI-1)



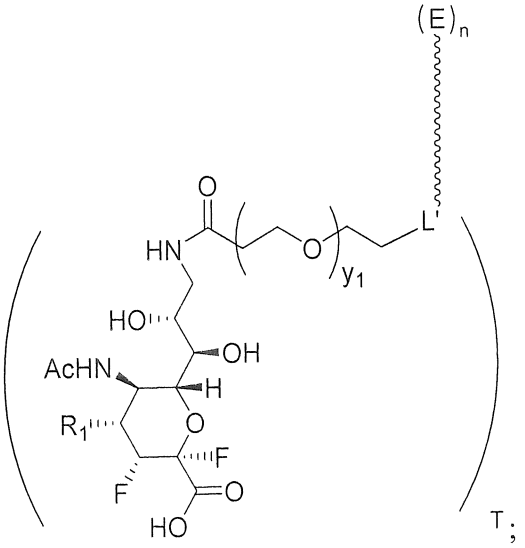
(M-VI-2)



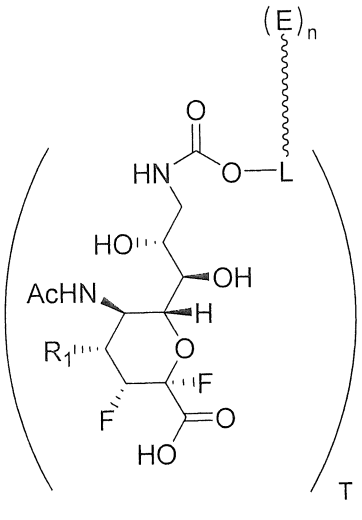
(M-VI-3)



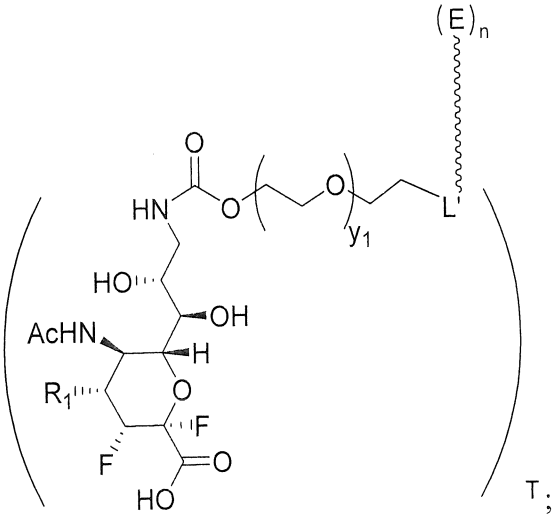
(M-VI-4)



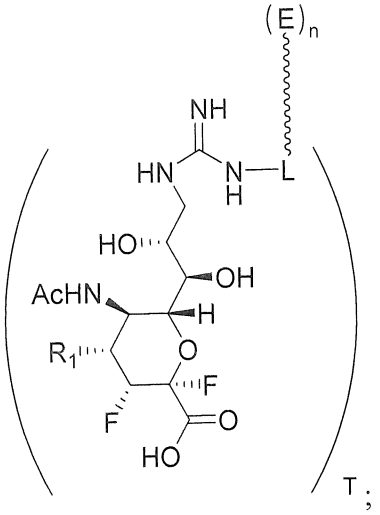
(M-VI-5)



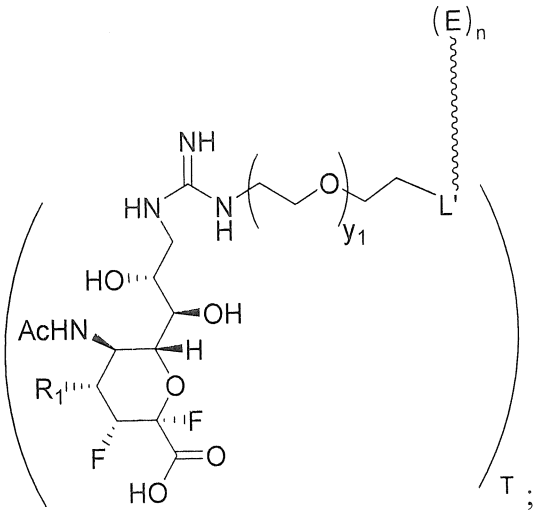
(M-VI-6)



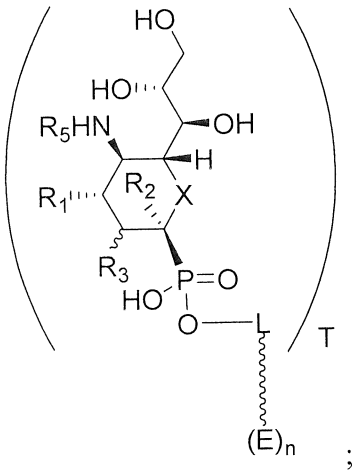
(M-VI-7)



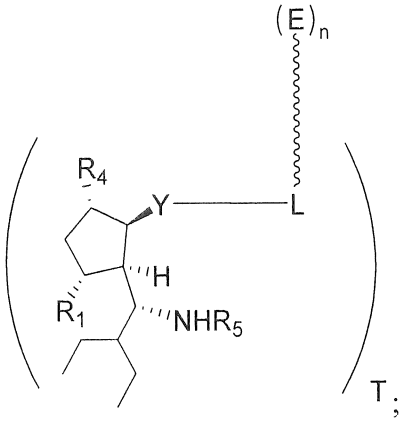
(M-VI-8)



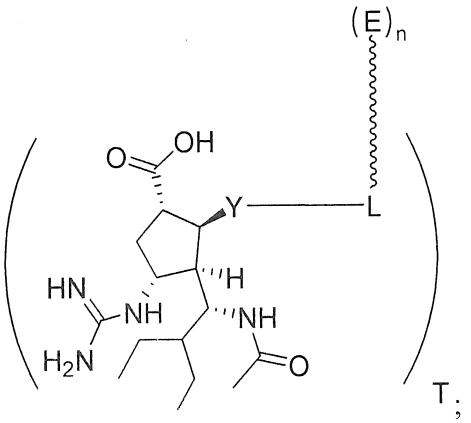
(M-VI-9)



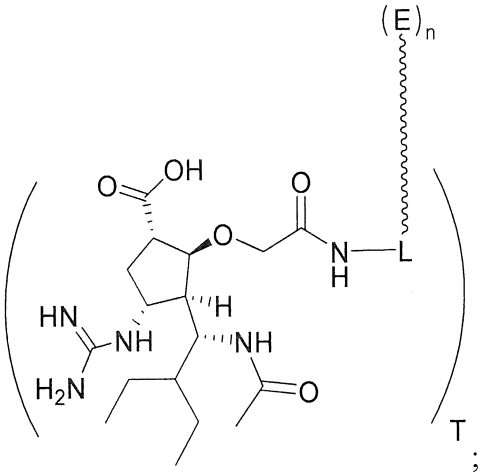
(M-VII)



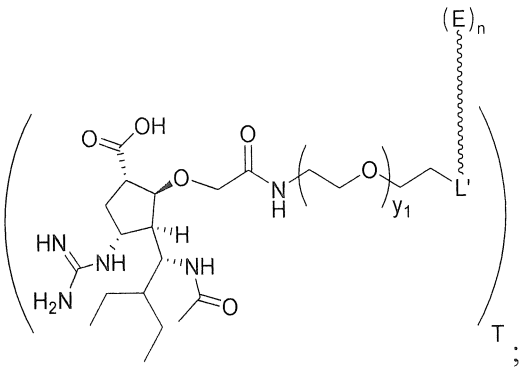
(M-VIII)



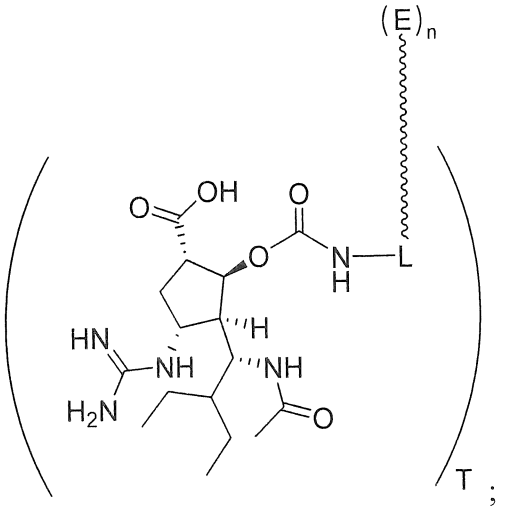
(M-VIII-1)



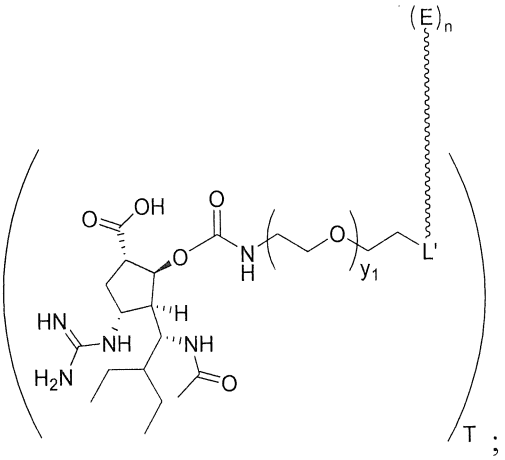
(M-VIII-2)



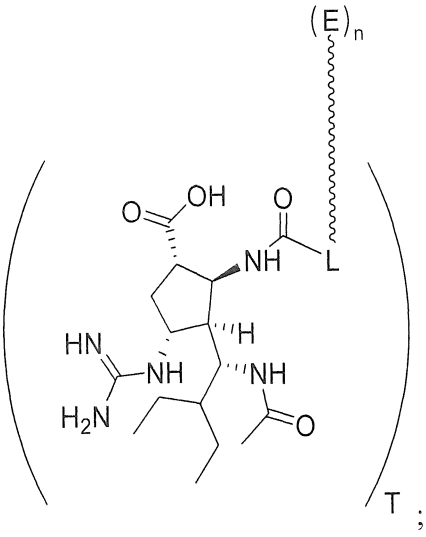
(M-VIII-3)



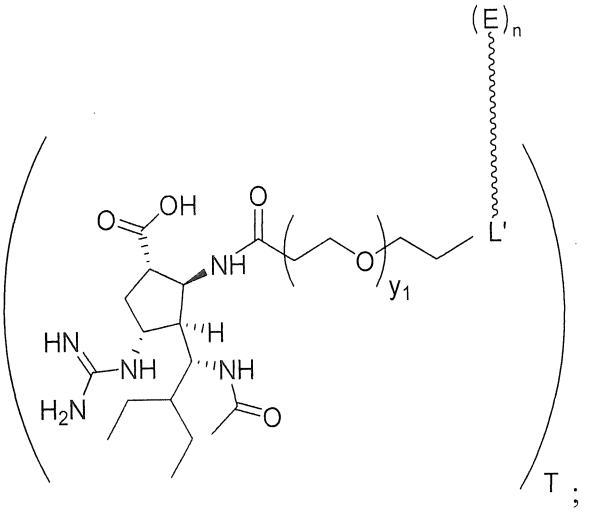
(M-VIII-4)



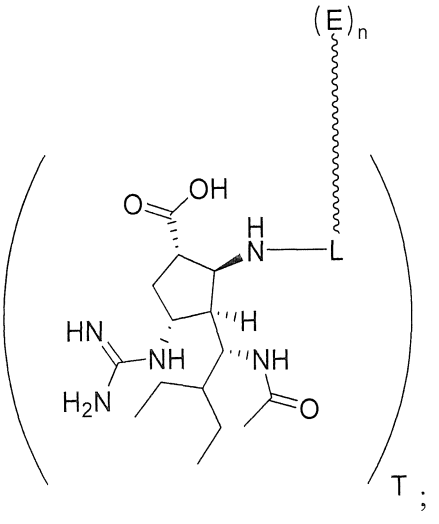
(M-VIII-5)



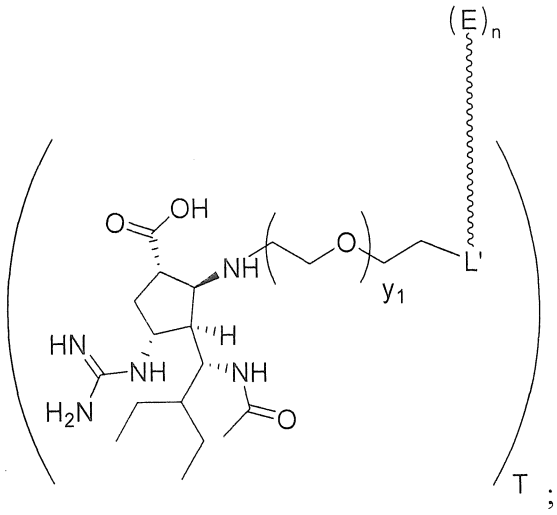
(M-VIII-6)



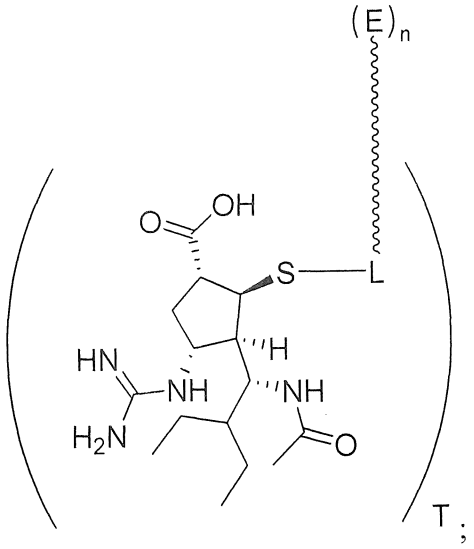
(M-VIII-7)



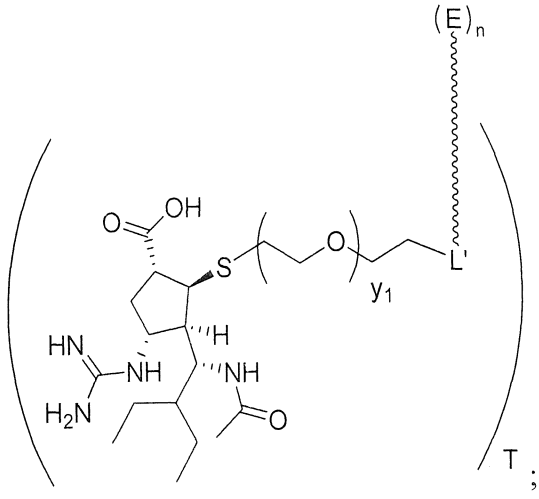
(M-VIII-8)



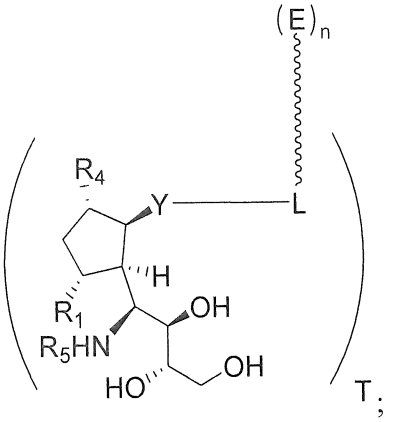
(M-VIII-9)



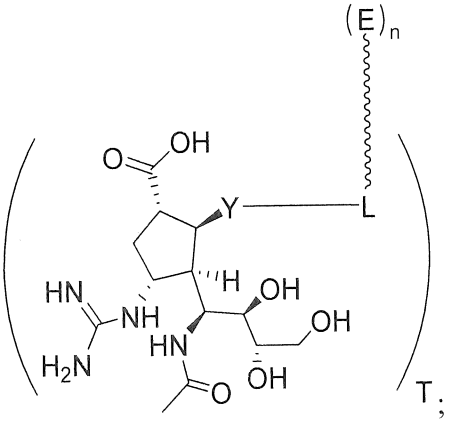
(M-VIII-10)



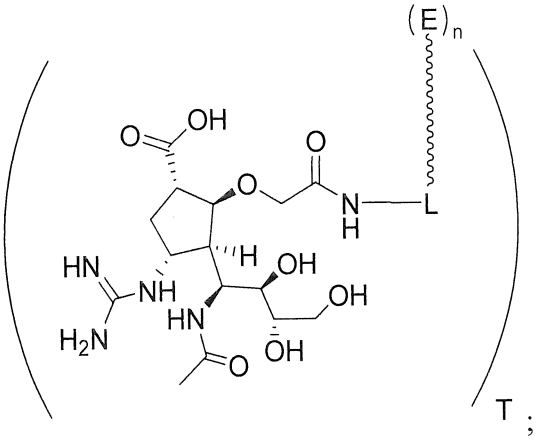
(M-VIII-11)



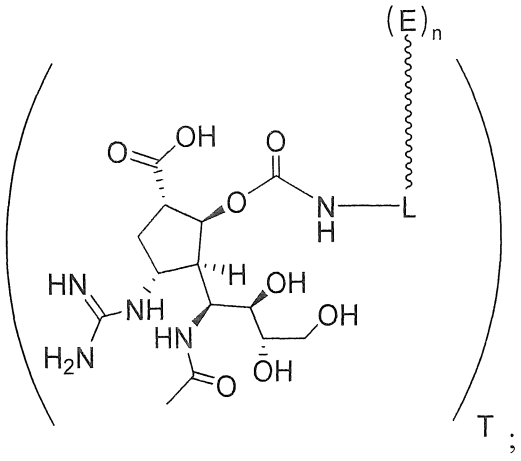
(M-IX)



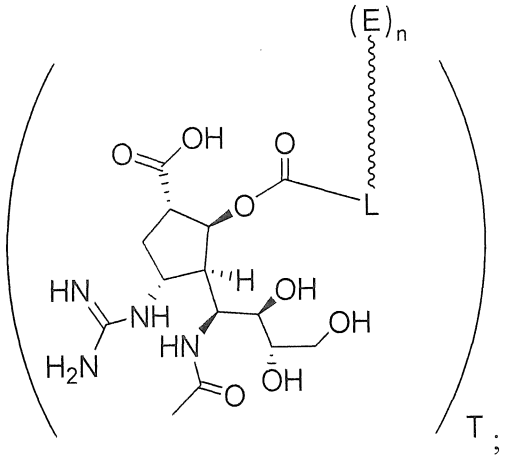
(M-IX-1)



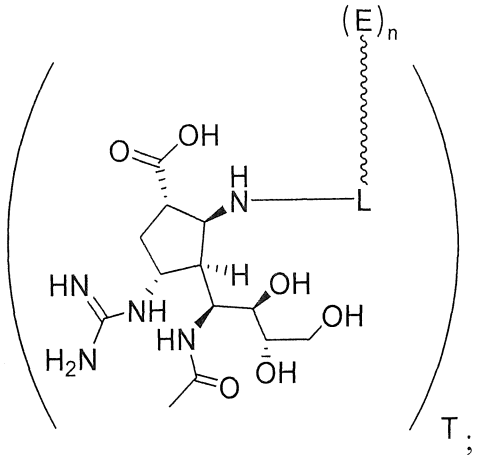
(M-IX-2)



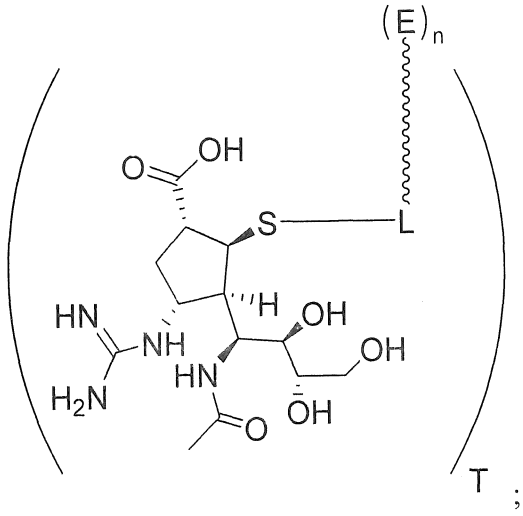
(M-IX-3)



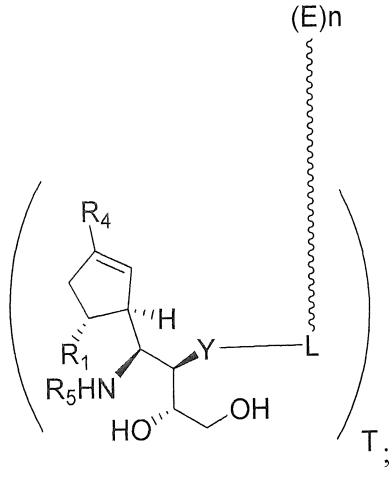
(M-IX-4)



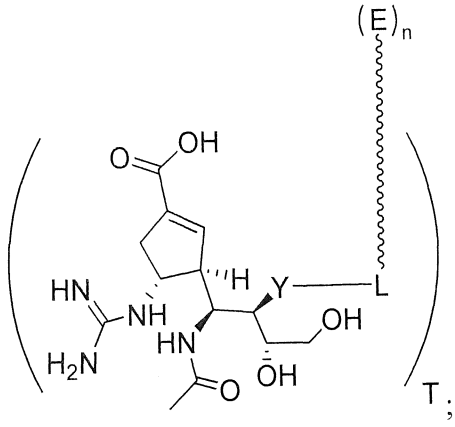
(M-IX-5)



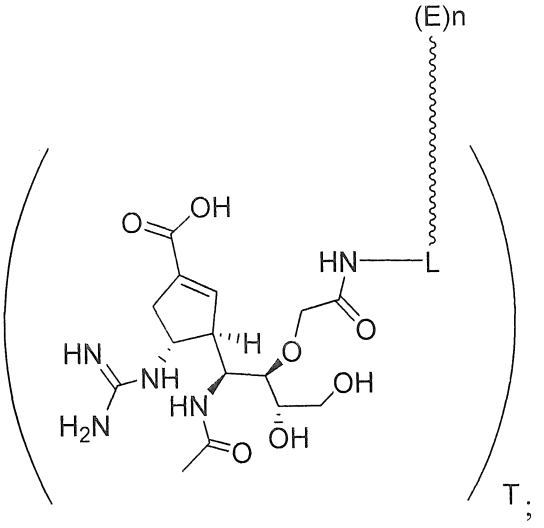
(M-IX-6)



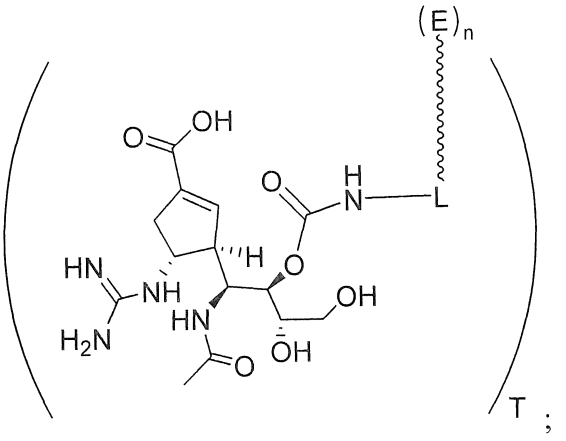
(M-X)



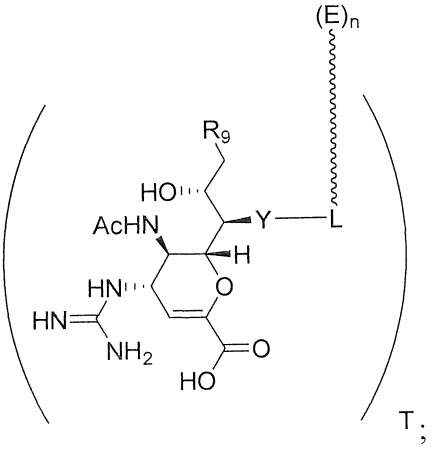
(M-X-1)


(E)n
OH
O
HN
L
O
H
O
HN
NH
OH
HN
H2N
O
OH
T;

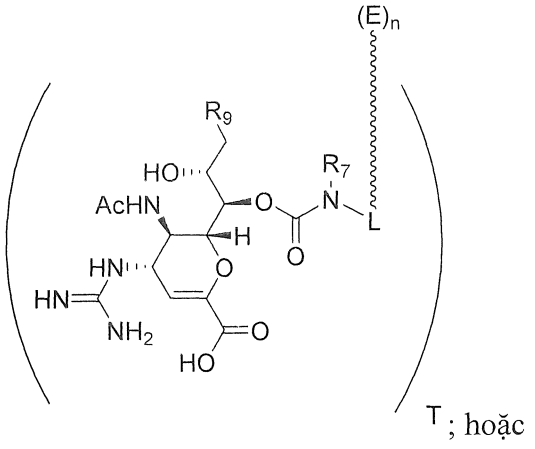
(M-X-2)


(E)n
OH
O
H
N
L
O
H
O
HN
NH
OH
HN
H2N
O
OH
T ;

(M-X-3)

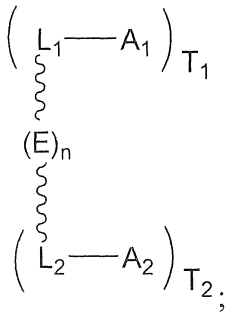

(E)n
R9
HO
Y
L
AcHN
H
HN
O
HN
NH2
O
HO
T;

(M-XI)



; hoặc

(M-XI-1)



;

(M'-I)

hoặc muối dược dụng của nó.

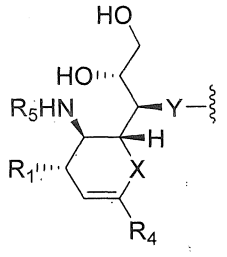
Trong thể liên hợp có miền Fc được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza, như được thể hiện bằng công thức trên đây, khi n là 2, hai monome miền Fc (mỗi monome miền Fc được thể hiện bằng E) dime hóa tạo thành miền Fc.

Các chất đồng phân vùng của thể liên hợp bao gồm zanamivir hoặc các chất tương tự của chúng

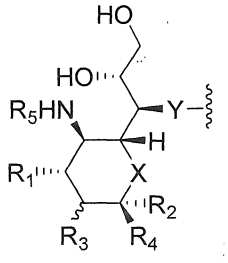
Thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp monome hoặc dime như được mô tả chi tiết trong bản mô tả này) có thể được tạo ra dưới dạng hỗn hợp hoặc các chất đồng phân vùng. Chất đồng phân vùng cụ thể hoặc hỗn hợp của các chất đồng phân vùng có thể được ưu tiên vì các lý do như dễ tổng hợp, ổn định nhiệt, ổn định oxy hóa, dược động học (ví dụ, ổn định chuyển hóa hoặc độ sinh khả dụng), liên kết yếu tố tác động, hoặc hiệu quả điều trị.

Theo một số phương án, thể liên hợp theo sáng chế bao gồm zanamivir hoặc chất tương tự của nó (ví dụ, bất kỳ trong số (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII),

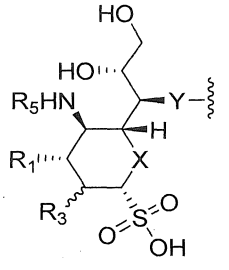
(A-IX), (A-X) hoặc (A-XIII)). Zanamivir hoặc chất tương tự của nó có thể được liên hợp với miền Fc hoặc protein albumin (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) thông qua, ví dụ, vị trí C7 (xem, ví dụ, (A-I), (A-II), (A-X) hoặc (A-XIII)) hoặc thông qua vị trí C9 (xem, ví dụ, (A-VI) hoặc (A-VII)):



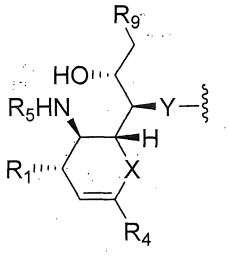
(A-I), liên hợp ở C7,



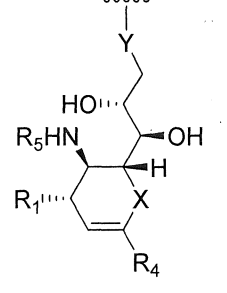
(A-II), liên hợp ở C7,



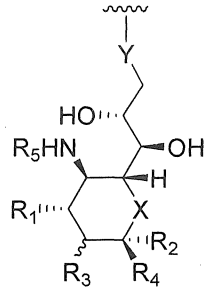
(A-X), liên hợp ở C7,



(A-XIII), liên hợp ở C7



(A-VI), liên hợp ở C9,



(A-VII), liên hợp ở C9.

Sáng chế bao gồm tập hợp của các thể liên hợp monome (ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có công thức (M-I)) trong đó tập hợp của các thể liên hợp bao gồm bất kỳ trong số thể liên hợp monome được mô tả ở đây và một hoặc nhiều chất đồng phân vùng tương ứng của nó. Ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có thể bao gồm (1) zanamivir hoặc chất tương tự của nó được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) ở vị trí C7 với miền Fc hoặc protein albumin, và (2) zanamivir hoặc chất tương tự của nó được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) ở vị trí C9 với miền Fc hoặc protein albumin.

Tập hợp của các thể liên hợp monome có thể có tỷ lệ cụ thể của thể liên hợp được liên kết ở C7 so với thể liên hợp được liên kết ở C9. Ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có thể có về cơ bản 100% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và về cơ bản 0% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 95% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 5% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 90% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 10% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 85% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 15% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 80% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 20% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 75% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 25% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 70% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 30% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 65% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 35% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 60% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 40% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 55% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 45% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 50% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 50% thể liên hợp được liên

kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 45% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 55% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 40% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 60% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 35% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 65% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 30% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 70% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 25% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 75% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 20% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 80% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 15% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 85% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có khoảng 10% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và khoảng 90% thể liên hợp được liên kết ở C-9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có về cơ bản 0% thể liên hợp được liên kết ở C-7 và về cơ bản 100% thể liên hợp được liên kết ở C-9.

Tập hợp của các thể liên hợp có thể có lớn hơn 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 65%, 60%, 55%, hoặc 50% thể liên hợp được liên kết ở C7.

Tập hợp của các thể liên hợp có thể có nhỏ hơn 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, hoặc 1% thể liên hợp được liên kết ở C9.

Sáng chế cũng bao gồm tập hợp của các thể liên hợp dime (ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có công thức (D-I)) trong đó tập hợp của các thể liên hợp bao gồm bất kỳ trong số thể liên hợp dime được mô tả ở đây và một hoặc nhiều chất đồng phân vùng tương ứng của nó. Ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có thể bao gồm (1) C7-C7 dime (ví dụ, cả zanamivir hoặc các nhóm tương tự của nó của dime được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) ở các vị trí C7 tương ứng của chúng với miền Fc hoặc protein albumin), (2) C9-C9 dime (ví dụ, cả zanamivir hoặc các nhóm tương tự của nó của dime được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) ở các vị trí C9 tương ứng của chúng với miền Fc hoặc protein albumin), và/hoặc (3) C7-C7 dime (ví dụ, một nhóm zanamivir hoặc chất tương tự của nó được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) với miền Fc hoặc protein albumin qua vị trí C7 của nó và zanamivir khác hoặc nhóm

tương tự của nó được liên hợp (ví dụ, nhờ yếu tố liên kết) với miền Fc hoặc protein albumin qua vị trí C9 của nó).

Tập hợp của các thể liên hợp dime có thể có tỷ lệ cụ thể của thể liên hợp được liên kết ở C7-C7 với thể liên hợp được liên kết ở C7-C9 và thể liên hợp được liên kết ở C9-C9. Ví dụ, tập hợp của các thể liên hợp có thể có về cơ bản 100% thể liên hợp được liên kết ở C7-C7 và về cơ bản 0% thể liên hợp được liên kết ở C7-C9 hoặc C9-C9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có về cơ bản 100% thể liên hợp được liên kết ở C9-C9, và về cơ bản 0% thể liên hợp được liên kết ở C7-C7 hoặc C7-C9. Tập hợp của các thể liên hợp có thể có về cơ bản 100% thể liên hợp được liên kết ở C7-C9, và về cơ bản 0% thể liên hợp được liên kết ở C7-C7 hoặc C9-C9.

Tập hợp của các thể liên hợp có thể có lớn hơn 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 65%, 60%, 55%, hoặc 50% thể liên hợp được liên kết ở C7-C7.

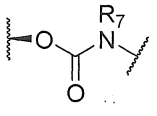
Tập hợp của các thể liên hợp có thể có nhỏ hơn 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, hoặc 1% thể liên hợp được liên kết ở C9-C9.

Tập hợp của các thể liên hợp có thể có nhỏ hơn 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, hoặc 1% thể liên hợp được liên kết ở C7-C9.

Đối với bất kỳ trong số các tập hợp được mô tả trên đây của các chất đồng phân vùng, A_1 và/hoặc A_2 (ví dụ, của (M-I) hoặc (D-I)) có thể được chọn từ zanamivir hoặc bất kỳ trong số các chất tương tự zanamivir được mô tả ở đây (ví dụ, bất kỳ trong số (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) hoặc (A-XIII)). Cụ thể, zanamivir được liên kết ở C7 hoặc các chất tương tự của chúng được mô tả bằng (A-I), (A-II), (A-X) và (A-XIII), và zanamivir được liên kết ở C9 hoặc các chất tương tự của chúng được mô tả bằng (A-VI) hoặc (A-VII). Phương pháp được lấy làm ví dụ để điều chế các chất đồng phân vùng, ví dụ, các chất đồng phân vùng được liên kết ở C7, C9, C7-C7, C7-C9, và C9-C9, được mô tả trong ví dụ 100-103, 123 và 124. Trong một số trường hợp, có thể tốt hơn nếu có 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, hoặc về cơ bản 100% thể liên hợp monome được liên kết ở C7 hoặc thể liên hợp dime được liên kết ở C7-C7. Trong các trường hợp này, có thể tốt hơn nếu điều chế chất trung gian bằng phương pháp tạo ra về cơ bản chất trung gian monome được liên kết ở C7 hoặc dime được liên kết ở C7-C7, như các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong ví dụ 103 và 123. Phương pháp

của ví dụ 103 là ví dụ về phương pháp được sử dụng để tạo ra về cơ bản chất trung gian được liên kết ở C7 hoặc C7-C7 và có thể được sử dụng để điều chế bất kỳ chất trung gian được mô tả ở đây.

Các chất tương tự zanamivir có sự thay đổi (ví dụ, phần tử thế không phải là OH) ở vị trí C9 (ví dụ, các chất tương tự zanamivir được mô tả bởi (A-XIII)) có thể làm tăng tỷ lệ của zanamivir được liên kết ở C7 với zanamivir được liên kết ở C9 bằng cách ngăn chặn sự di chuyển từ zanamivir được liên kết ở C7 sang zanamivir được liên kết ở C9. Ví dụ về các chất tương tự zanamivir được sửa đổi ở C9 được mô tả ở đây (xem, ví dụ, các thể liên hợp được mô tả bởi D-XI hoặc M-XI, ví dụ, thể liên hợp 47 (Int-91) hoặc thể liên hợp 48 (Int-92).

Theo các phương án được ưu tiên, thể liên hợp là thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I), trong đó A_1 và/hoặc A_2 được mô tả bằng công thức (A-I), (A-II), (A-X) hoặc (A-XIII) và Y là  (-O(C=O)NR$_7$-), trong đó R_7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl. Theo các phương án ưu tiên, A_1 và/hoặc A_2 được mô tả bằng công thức (A-I) (ví dụ, zanamivir). Theo các phương án được ưu tiên, R_7 là C1-C20 alkyl (ví dụ, -CH_3, -CH_2CH_3, -$CH_2CH_2CH_3$). Các thể liên hợp như vậy đã được chứng minh là thể hiện sự ổn định gia tăng của liên kết C7, dẫn đến sự di chuyển từ C7 sang C9 ít hơn (xem, ví dụ, các thể liên hợp được mô tả bởi D-II-6 hoặc D-II-7, chẳng hạn như thể liên hợp 45 (Int-83) hoặc thể liên hợp 46 (Int-83)). Do đó, sản phẩm thu được sẽ đồng nhất hơn và thể hiện hiệu quả cao hơn. Thể liên hợp được ưu tiên đồng nhất hơn, có tỷ lệ zanamivir được liên kết với C7 tăng lên (ví dụ, về cơ bản tinh khiết, chẳng hạn như lớn hơn 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tinh khiết), và vẫn giữ được hiệu quả chống lại bệnh cúm.

III. Monome miền Fc và miền Fc

Monome miền Fc bao gồm vùng bản lề, miền hằng định kháng thể C_H2, và miền hằng định kháng thể C_H3. Monome miền Fc có thể thuộc isotyp kháng thể globulin miễn dịch IgG, IgE, IgM, IgA, hoặc IgD. Monome miền Fc cũng có thể thuộc isotyp kháng thể globulin miễn dịch bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, hoặc IgG4). Monome miền Fc có thể thuộc alotyp (dị kiểu) kháng thể globulin miễn dịch

bất kỳ (ví dụ, IGHG1*01 (tức là, G1m(za)), IGHG1*07 (tức là, G1m(zax)), IGHG1*04 (tức là, G1m(zav)), IGHG1*03 (G1m(f)), IGHG1*08 (tức là, G1m(fa)), IGHG2*01, IGHG2*06, IGHG2*02, IGHG3*01, IGHG3*05, IGHG3*10, IGHG3*04, IGHG3*09, IGHG3*11, IGHG3*12, IGHG3*06, IGHG3*07, IGHG3*08, IGHG3*13, IGHG3*03, IGHG3*14, IGHG3*15, IGHG3*16, IGHG3*17, IGHG3*18, IGHG3*19, IGHG2*04, IGHG4*01, IGHG4*03, hoặc IGHG4*02) (như được mô tả trong, ví dụ, Vidarsson et al. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector function. Frontiers in Immunology. 5(520):1-17 (2014)). Monome miền Fc cũng có thể thuộc loài bất kỳ, ví dụ, người, chuột, hoặc chuột nhắt. Dime của monome miền Fc là miền Fc có thể liên kết với thụ thể Fc, là thụ thể nằm trên bề mặt của bạch cầu.

Theo một số phương án, monome miền Fc trong các thể liên hợp được mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm đoạn và/hoặc mất đoạn axit amin so với monome miền Fc có trình tự của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-138. Theo một số phương án, Asn ở monome miền Fc trong các thể liên hợp như được mô tả ở đây có thể được thay bằng Ala để ngăn ngừa sự glycosyl hóa được liên kết với N (xem, ví dụ, các SEQ ID NO: 12-15, trong đó thay thế Asn thành Ala được đánh dấu bằng *). Theo một số phương án, monome miền Fc trong các thể liên hợp được mô tả ở đây cũng có thể chứa các Cys bổ sung (xem, ví dụ, các SEQ ID NO: 9, 10, và 11, trong đó Cys bổ sung được đánh dấu bằng *).

Theo một số phương án, monome miền Fc trong các thể liên hợp như được mô tả ở đây bao gồm nhóm bổ sung, ví dụ, peptit liên kết albumin, peptit tinh chế (ví dụ, peptit hexa-histidin (HHHHHH (SEQ ID NO: 146)), hoặc trình tự tín hiệu (ví dụ, trình tự tín hiệu IL2 MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 147)) gắn vào đầu tận cùng N hoặc C của monome miền Fc. Theo một số phương án, monome miền Fc trong thể liên hợp không chứa bất kỳ loại vùng biến đổi của kháng thể, ví dụ, V_H, V_L, vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), hoặc vùng siêu biến (HVR).

Theo một số phương án, monome miền Fc trong các thể liên hợp như được mô tả ở đây có thể có trình tự ít nhất 95% đồng nhất (ví dụ, 97%, 99%, hoặc 99,5% đồng nhất) với trình tự của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-138 được thể hiện dưới đây. Theo một số phương án, monome miền Fc trong các thể liên hợp như được mô tả ở đây có thể có trình tự của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-138 được thể hiện dưới đây.

SEQ ID NO: 1: Fc-IgG2a chuột với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N (in đậm)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD
VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV
VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPE
EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM
YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 2: Fc-IgG2a chuột trưởng thành

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDP
DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK
VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE
DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 3: Fc-IgG1 người với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N (in đậm) và gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4: Fc-IgG1 người trưởng thành với gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới)

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5: Fc-IgG2a chuột với trình tự tín hiệu IL2 (in đậm) ở đầu tận cùng N và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD
VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV
VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPE

EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM
YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 6: Fc-IgG2a chuột trưởng thành với peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDP
DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK
VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE
DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 7: Fc-IgG1 người với trình tự tín hiệu IL2 (in đậm) ở đầu tận cùng N, gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 8: Fc-IgG1 người trưởng thành với peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C và gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới)

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 9: Fc-IgG1 người với trình tự tín hiệu IL2 (in đậm) ở đầu tận cùng N, gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), hai xystein bổ sung ở vùng bản lề (*), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHH
HH

SEQ ID NO: 10: Fc-IgG1 người trưởng thành với gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), hai xystein bổ sung ở vùng bản lề (*), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 11: Fc-IgG1 người trưởng thành với gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới) và hai xystein bổ sung ở vùng bản lề (*)

MVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12: Fc-IgG2a chuột với trình tự tín hiệu IL2 (in đậm) ở đầu tận cùng N, thay thế Asn thành Ala (*), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD
VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYA*STLR
VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPP
EEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF
MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 13: Fc-IgG2a chuột trưởng thành với thay thế Asn thành Ala (*) và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDP
DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYA*STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK
VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE
DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 14: Fc-IgG1 người với trình tự tín hiệu IL2 (in đậm) ở đầu tận cùng N, gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), thay thế Asn thành Ala (*), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA*ST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 15: Fc-IgG1 người trưởng thành với thay thế Asn thành Ala (*), gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), và peptit hexa-histidin (in nghiêng) ở đầu tận cùng C

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO: 16: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N và các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEE
DL

SEQ ID NO: 18: IgG1 Fc người trưởng thành với các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 19: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm), các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), và cải biến lysin thành serin (*) để ngăn ngừa lysin liên hợp ở vị trí này

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS*
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 20: IgG1 Fc người trưởng thành với các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới) và cải biến lysin thành serin (*) để ngăn ngừa lysin liên hợp ở vị trí này

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS*DTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), cải biến lysin thành serin (*) để ngăn ngừa lysin liên hợp ở vị trí này, yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS(*)DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 22: IgG1 Fc người trưởng thành với các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), cải biến lysin thành serin (*) để ngăn ngừa lysin liên hợp ở vị trí này, yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS(*)DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 23: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), thay thế Asn thành Ala (*), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 24: IgG1 Fc người trưởng thành với các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), thay thế Asn thành Ala (*), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 25: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), các đột biến H310A (*) và H435A (*) để ngăn cản FcRn liên kết, G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLA(*)QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA(*)KGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGGGGGSEQKL
ISEEDL

SEQ ID NO: 26: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), với các đột biến H310A (*) và H435A (*) để ngăn cản FcRn liên kết, G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới, in nghiêng)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA(*)QDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA(*)KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 27: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ C-myc (gạch dưới, in nghiêng) có đột biến đầu tận cùng C (lysin thành phenylalanin, in đậm)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQFLISEE
DL

SEQ ID NO: 28: IgG1 Fc người trưởng thành với các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ C-myc (gạch dưới, in nghiêng) có đột biến đầu tận cùng C (lysin thành phenylalanin, in đậm)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQFLISEEDL

SEQ ID NO: 29: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), thay thế Asn thành Ala (*), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ C-myc (gạch dưới, in nghiêng) có đột biến đầu tận cùng C (lysin thành phenylalanin, in đậm)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)ST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQFLI
SEEDL

SEQ ID NO: 30: IgG1 Fc người trưởng thành với gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới), thay thế Asn thành Ala (*), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ C-myc (gạch dưới, in nghiêng) có đột biến đầu tận cùng C (lysin thành phenylalanin, in đậm)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNG

KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQFLISEEDL

SEQ ID NO: 31: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ C-myc (gạch dưới) có đột biến đầu tận cùng C (lysin thành phenylalanin, in đậm)

MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**TK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQFLISEEDL

SEQ ID NO: 32: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**TK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 33: IgG1 Fc người trưởng thành với đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới) với gốc axit amin MVRS đầu tận cùng N được bổ sung (gạch dưới)

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 34: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, chứa các gốc EPKSS bao gồm vùng bản lề đầy đủ ở đầu tận cùng N của IgG1 Fc người trưởng thành (gạch dưới), thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MKWVTFISLLFLFSSAYSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**DEL**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 35: IgG1 Fc người với trình tự tín hiệu IgG chuột (in đậm) ở đầu tận cùng N, với loại bỏ các gốc bản lề EPKSSD từ đầu tận cùng N của Fc IgG1 của người trưởng thành, alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**DEL**T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36: IgG1 Fc người trưởng thành với đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), với loại bỏ các gốc bản lề EPKSSD từ đầu tận cùng N của Fc IgG1 của người trưởng thành, alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37: IgG1 Fc người trưởng thành với đột biến đôi LS (in đậm và gạch dưới), với loại bỏ các gốc bản lề EPKSSD từ đầu tận cùng N của Fc IgG1 của người trưởng thành, alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 38: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu albumin huyết thanh người (in đậm) ở đầu tận cùng N, đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm), yếu tố liên kết G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và thẻ c-Myc đầu tận cùng C (gạch dưới)

MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**DE**L**T**K
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLISEEDL

SEQ ID NO: 39: Fc IgG1 người trưởng thành, trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
X$_6$HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 40: Fc IgG1 người trưởng thành trong đó X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 41: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), và trong đó X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 42: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**DE**L**T**KNQVSLTCLVKGFYPSDIA

VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 43: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 44: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến đôi LS (in đậm và gạch dưới), và trong đó X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**H
EALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 45: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến đôi LS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HE
ALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 46: Fc IgG1 người trưởng thành với đột biến đôi LS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HE
ALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 47: Fc IgG1 người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), và trong đó X_1 là Met hoặc

Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLX_1IX_2RX_3PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRX_4EX_5TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVX_6HEALHX_7HYT QKSLSLSPG

SEQ ID NO: 48: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 49: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 50: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 51: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 52: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 53: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 54: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ

sung (in nghiêng), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), yếu tố liên kết G4S (in nghiêng), và thẻ C-myc đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLIS EEDL

SEQ ID NO: 55: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (in nghiêng), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), yếu tố liên kết G4S (in nghiêng), thẻ C-myc đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSR**D**E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLIS EEDL

SEQ ID NO: 56: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ sung (in nghiêng), đột biến bộ ba YTE (in đậm/gạch dưới), yếu tố liên kết G4S (in nghiêng), và thẻ C-myc đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLI SEEDL

SEQ ID NO: 57: IgG1 Fc người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG Vh chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), các gốc axit amin ISAMVRS đầu tận cùng N được bổ

sung (in nghiêng), đột biến bộ ba YTE (in đậm/gạch dưới), yếu tố liên kết G4S (in nghiêng), thẻ C-myc đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSR**DEL**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSEQKLI SEEDL

SEQ ID NO: 58: IgG1 người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG1 chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và peptit IgA đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SR**DEL**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSQRNPRL RLIRRHPTLRIPPI

SEQ ID NO: 59: IgG1 người trưởng thành với trình tự tín hiệu MIgG1 chuỗi nặng của chuột nhắt (in đậm), thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), G4S đầu tận cùng C (in nghiêng), và peptit IgA đầu tận cùng C (gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

MGWSCIILFLVATATGVHSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SR**DEL**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGGGGGSQRNPRLR LIRRHPTLRIPPI

SEQ ID NO: 60: Fc IgG1 người trưởng thành, Z_1 là Cys hoặc Ser, và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z**$_1$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I **X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**
$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 61: Fc IgG1 người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**
$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
X$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 62: Fc IgG1 của người trưởng thành (Fc IgG1 người trưởng thành), thay thế Cys thành Ser (#), X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
X$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 63: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 65: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 66: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 67: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**
I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 68: Fc IgG1 của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**
I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**EE**
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 69: IgG1 Fc của người trưởng thành, Z 1 là Cys hoặc Ser, và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z**$_1$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 70: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 71: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 72: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**EEM**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 73: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 74: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 75: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 76: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**
I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 77: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**
I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**EE**
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 78: IgG1 Fc của người trưởng thành, Z_1 là Cys hoặc Ser, và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z_1**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X_1**I**X_2**R**X_3**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X_4**E**X_5**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV**X_6**HEALH**X_7**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 79: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X_1**I **X_2**R**X_3**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X** **$_4$**E**X_5**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X_6**HEALH**X_7**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X_4** E**X_5**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E **M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 82: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 83: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 84: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 85: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I
TR**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 86: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I
TR**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 87: IgG1 Fc của người trưởng thành, Z_1 là Cys hoặc Ser, và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z**$_1$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$
E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 88: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met, X_6 là Met hoặc Leu, và X_7 là Asn hoặc Ser

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I
X$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**
$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 89: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), X_4 là Asp hoặc Glu, và X_5 là Leu hoặc Met

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$
E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 90: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 91: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 92: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 93: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), các đột biến M428L, N434S (in đậm/gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 94: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I
TR**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 95: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba YTE (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I
TR**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 96: IgG1 Fc của người trưởng thành, J_1 là Asn hoặc không có mặt, J_2 là Lys hoặc không có mặt, Z_1 là Cys hoặc Ser, và trong đó X_1 là Met hoặc Tyr, X_2 là Ser hoặc Thr, X_3 là Thr hoặc Glu, X_4 là Asn hoặc Ala, X_5 là Leu hoặc Asp, X_6 là Gln hoặc His, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met, X_9 là Met hoặc Leu, và X_{10} là Asn hoặc Ser

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z_1**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X_1**I
X_2R**X_3**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRV
VSVLTV**X_5**H**X_6**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X_9**HEALH**X_{10}**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 97: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), J_1 là Asn hoặc không có mặt, J_2 là Lys hoặc không có mặt, và trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, X_5 là Leu hoặc Asp, X_6 là Gln hoặc His, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met, và X_{10} là Asn hoặc Ser

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRV
VSVLTV**X_5**H**X_6**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**X_{10}**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 98: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), J_1 là Asn hoặc không có mặt, J_2 là Lys hoặc không có mặt, trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
X_7E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 99: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X$_4$**STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
X$_7$E**X$_8$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 100: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_7 là Asp hoặc Glu và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
X$_7$E**X$_8$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 101: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 102: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EE**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 103: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 104: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 105: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 106: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EE**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 107: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 108: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 109: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_7 là Asp hoặc Glu và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYR
VVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**X$_7$**E**X$_8$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 110: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYR
VVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**D**E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 111: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYR
VVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

R**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 112: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 113: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EE**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 114: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYR
VVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
R**D**E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 115: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYR
VVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

R**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 116: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DE**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 117: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Cys thành Ser (#), thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRV
VSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EE**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 118: IgG1 Fc của người trưởng thành, J_1 là Asn hoặc không có mặt, J_2 là Lys hoặc không có mặt, và trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, X_5 là Leu hoặc Asp, X_6 là Gln hoặc His, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met, và X_{10} là Asn hoặc Ser

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRVVS
VLTV**X_5**H**X_6**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**
$_7$E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**X_{10}**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 119: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), J_1 là Asn hoặc không có mặt, J_2 là Lys hoặc không có mặt, và trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X_7**

E**X$_8$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG**J$_2$**

SEQ ID NO: 120: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_4 là Asn hoặc Ala, và X_7 là Asp hoặc Glu, và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X$_4$**STYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_7$**E
X$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 121: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_7 là Asp hoặc Glu và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_7$**E
X$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 122: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 123: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 124: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 125: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 126: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 127: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 128: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

TV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 129: IgG1 Fc của người trưởng thành, đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 130: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), trong đó X_7 là Asp hoặc Glu và X_8 là Leu hoặc Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVV
SVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**
$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 131: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVV
SVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**
E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 132: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVV
SVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**
E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 133: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 134: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 135: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVV
SVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**
E**L**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 136: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVV
SVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**
E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 137: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(fa) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVS

VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 138: IgG1 Fc của người trưởng thành, thay thế Asn thành Ala (*), đột biến bộ ba DHS (in đậm và gạch dưới), alotyp G1m(f) (in nghiêng đậm)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVS
VLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

Như được xác định trong bản mô tả này, miền Fc bao gồm hai monome miền Fc được dime hóa bằng tương tác giữa miền hằng định kháng thể C_H3, cũng như một hoặc nhiều liên kết disulfua tạo ra giữa các vùng bản lề của hai monome miền Fc dime hóa. Miền Fc tạo ra cấu trúc tối thiểu liên kết với thụ thể Fc, ví dụ, thụ thể Fc-gama (tức là, thụ thể Fcγ (FcγR)), thụ thể Fc-alpha (tức là, thụ thể Fcα (FcαR)), thụ thể Fc-epsilon (tức là, thụ thể Fcε (FcεR)), và/hoặc thụ thể Fc sơ sinh (FcRn). Theo một số phương án, miền Fc theo sáng chế liên kết với thụ thể Fcγ (ví dụ, FcRn, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b)), và/hoặc FcγRIV và/hoặc thụ thể Fc sơ sinh (FcRn).

Theo một số phương án, monome miền Fc hoặc miền Fc theo sáng chế là monome miền Fc không glycosyl hóa hoặc miền Fc (ví dụ, monome miền Fc hoặc và miền Fc duy trì việc gắn vào thụ thể Fc (ví dụ, FcRn). Ví dụ, miền Fc là các biến thể IgG1 không glycosyl hóa duy trì việc gắn vào thụ thể Fc (ví dụ, IgG1 có thay thế axit amin ở N297 và/hoặc T299 của kiểu glycosyl hóa). Các miền Fc không glycosyl hóa được lấy làm ví dụ và phương pháp sản xuất miền Fc không glycosyl hóa là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong Sazinsky S.L. et al., Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors, PNAS, 2008, 105(51):20167-20172, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, miền Fc hoặc monome miền Fc theo sáng chế được thao tác để tăng cường liên kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn). Ví dụ, miền Fc có thể bao gồm đột biến bộ ba tương ứng với M252Y/S254T/T256E (YTE) (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến YTE, ví dụ, SEQ ID NO: 33, SEQ ID

NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 56, hoặc SEQ ID NO: 57). Miền Fc có thể bao gồm đột biến kép (đột biến đôi) tương ứng với M428L/N434S (LS) (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến LS, như SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, hoặc SEQ ID NO: 59). Miền Fc có thể bao gồm đột biến đơn tương ứng với N434H (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến N434H). Miền Fc có thể bao gồm đột biến đơn tương ứng với C220S (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến C220S, như SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, và SEQ ID NO: 95). Miền Fc có thể bao gồm đột biến bốn tương tương với C220S/L309D/Q311H/N434S (CDHS) (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến DHS, như SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, và SEQ ID NO: 117). Miền Fc có thể bao gồm đột biến ba tương tương với L309D/Q311H/N434S (DHS) (ví dụ, IgG1, như IgG1 của người hoặc được nhân hóa có đột biến DHS, như SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, và SEQ ID NO: 138). Miền Fc có thể bao gồm tổ hợp của một

hoặc nhiều đột biến được mô tả trên đây tăng cường liên kết với FcRn. Liên kết với FcRn được tăng cường có thể gia tăng thời gian bán rã thể liên hợp chứa miền Fc. Ví dụ, việc kết hợp của một hoặc nhiều đột biến axit amin gia tăng liên kết với FcRn (ví dụ, đột biến YTE, đột biến LS, hoặc đột biến N434H) có thể gia tăng thời gian bán rã của thể liên hợp 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. 100%, 200%, 300%, 400%, 500% hoặc lớn hơn so với thể liên hợp có miền Fc tương ứng mà không có đột biến làm tăng cường liên kết FcRn. Miền Fc được lấy làm ví dụ có liên kết tăng cường với FcRN và phương pháp sản xuất miền Fc có liên kết tăng cường với FcRN là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong Maeda, A. et al., Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody, MABS, 2017, 9(5):844-853, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, axit amin "tương ứng với" gốc axit amin cụ thể (ví dụ, của SEQ ID NO. cụ thể) cần hiểu là bao gồm gốc axit amin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu là thẳng hàng với gốc cụ thể (ví dụ, của trình tự cụ thể). Ví dụ, bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-138 có thể được gây đột biến để bao gồm đột biến YTE, đột biến LS, và/hoặc đột biến N434H bằng cách gây đột biến "các gốc tương ứng" của trình tự axit amin.

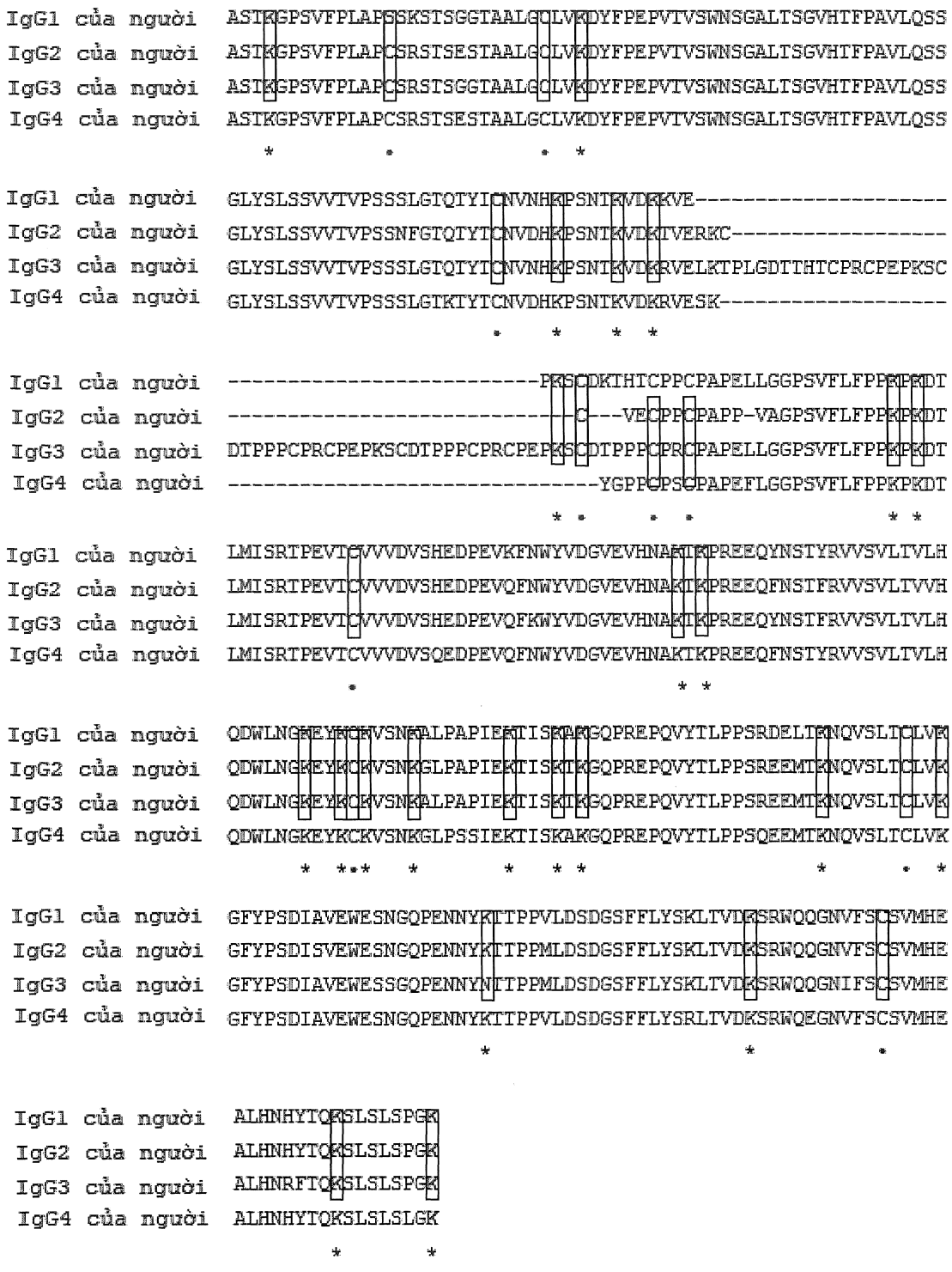
Như được sử dụng trong bản mô tả này, nguyên tử lưu huỳnh "tương ứng với" gốc xystein cụ thể của SEQ ID NO. cụ thể cần hiểu là bao gồm nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu là thẳng hàng với xystein cụ thể của trình tự cụ thể. Sắp hàng trình tự protein đối với IgG1 của người (UniProtKB: P01857; SEQ ID NO: 142), IgG2 của người (UniProtKB: P01859; SEQ ID NO: 143), IgG3 của người (UniProtKB: P01860; SEQ ID NO: 144), và IgG4 của người (UniProtKB: P01861; SEQ ID NO: 145) được nêu dưới đây (sắp hàng bằng phương pháp Sắp hàng nhiều cặp Clustal Omega (Clustal Omega Multiple Pairwise Alignment). Việc sắp hàng này chỉ ra các gốc xystein (ví dụ, nguyên tử lưu huỳnh của gốc xystein) "tương ứng với nhau" (trong các ô và được chỉ ra bằng ký hiệu •). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thực hiện phép sắp hàng như vậy với bất kỳ biến thể IgG theo sáng chế để xác định nguyên tử lưu huỳnh của xystein tương ứng với nguyên tử lưu huỳnh bất kỳ của xystein cụ thể của SEQ ID NO. cụ thể được mô tả ở đây (ví dụ, bất kỳ một trong số

các SEQ ID NO: 1-138). Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định được rằng Cys10 của SEQ ID NO: 10 (xystein đầu tiên của kiểu CPPC bảo toàn của vùng bản lề của miền Fc) tương ứng với, ví dụ, Cys109 của IgG1, Cys106 của IgG2, Cys156 của IgG3, Cys29 của SEQ ID NO: 1, Cys9 của SEQ ID NO: 2, Cys30 của SEQ ID NO: 3, hoặc Cys10 của SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, miền Fc hoặc monome miền Fc theo sáng chế có trình tự của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 39-138 có thể còn bao gồm các axit amin bổ sung ở đầu tận cùng N (Xaa)x và/hoặc các axit amin bổ sung ở đầu tận cùng C (Xaa)z, trong đó Xaa là axit amin bất kỳ và x và z là số nguyên lớn hơn hoặc bằng 0, thường nhỏ hơn 100, tốt hơn là nhỏ hơn 10 và tốt hơn nữa là 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5. Theo một số phương án, các axit amin bổ sung là ít nhất 70% (ví dụ, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) giống hệt với một hoặc nhiều axit amin liên tiếp của SEQ ID NO: 94. Ví dụ, các axit amin bổ sung có thể là axit amin đơn ở đầu tận cùng C tương ứng với Lys330 của IgG1 (SEQ ID NO: 119).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, nguyên tử nitơ "tương ứng với" gốc lysin cụ thể của SEQ ID NO. cụ thể cần hiểu là bao gồm nguyên tử nitơ của gốc lysin bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu là thẳng hàng với lysin cụ thể của trình tự cụ thể. Sắp hàng trình tự protein đối với IgG1 của người (UniProtKB: P01857; SEQ ID NO: 142), IgG2 của người (UniProtKB: P01859; SEQ ID NO: 143), IgG3 của người (UniProtKB: P01860; SEQ ID NO: 144), và IgG4 của người (UniProtKB: P01861; SEQ ID NO: 145) được nêu dưới đây (sắp hàng bằng phương pháp Sắp hàng nhiều cặp Clustal Omega). Phép sắp hàng này chỉ ra các gốc lysin (ví dụ, nguyên tử nitơ của các gốc lysin) "tương ứng với nhau" (trong các ô và được chỉ ra bằng ký hiệu *). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thực hiện phép sắp hàng như vậy với bất kỳ biến thể IgG theo sáng chế để xác định nguyên tử nitơ của lysin tương ứng với nguyên tử nitơ bất kỳ của lysin cụ thể của SEQ ID NO. cụ thể được mô tả ở đây (ví dụ, bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-138). Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định được rằng Lys35 của SEQ ID NO: 10 tương ứng với, ví dụ, Lys129 của IgG1, Lys126 của IgG2, Lys176 của IgG3, Lys51 của SEQ ID NO: 1, Lys31 của SEQ ID NO: 2, Lys50 của SEQ ID NO: 3, hoặc Lys30 của SEQ ID NO: 10.

Phép sắp hàng trình tự protein đối với IgG1 (SEQ ID NO: 142), IgG2 (SEQ ID NO: 143), IgG3 (SEQ ID NO: 144), và IgG4 (SEQ ID NO: 145)



Hoạt hóa tế bào miễn dịch

Thụ thể Fc-gama (FcγR) liên kết với phần Fc của globulin miễn dịch G (IgG) và đóng vai trò quan trọng trong hoạt hóa và điều hòa miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của IgG trong các phức chất miễn dịch (IC) gắn kết với các FcγR với ái lực toàn phần cao, do đó gây ra các tầng (phát) tín hiệu điều hòa quá trình hoạt hóa tế bào miễn dịch. Họ

FcγR của người chứa một vài thụ thể hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, và FcγRIIIb) và một thụ thể ức chế (FcγRIIb). Sự phát tín hiệu FcγR là qua trung gian các miền nội bào chứa kiểu hoạt hóa tyrosin miễn dịch (ITAM) để hoạt hóa FcγR và kiểu ức chế tyrosin miễn dịch (ITIM) đối với thụ thể ức chế FcγRIIb. Theo một số phương án, sự liên kết với FcγR nhờ miền Fc dẫn đến sự phosphoryl hóa ITAM bởi các kinaza thuộc họ Src; quá trình này hoạt hóa các kinaza thuộc họ Syk và gây cảm ứng các mạng lưới tín hiệu xuôi dòng, bao gồm các con đường PI3K và Ras.

Trong các thể liên hợp được mô tả ở đây, phần thể liên hợp bao gồm monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza liên kết và ức chế neuraminidaza virut dẫn đến ức chế sự sao chép của virut, trong khi phần miền Fc của các thể liên hợp liên kết với FcγR (ví dụ, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, và FcγRIIIb) trên tế bào miễn dịch và hoạt hóa thực bào và chức năng tác động, như tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), do đó dẫn đến nhấn chìm và phá hủy hạt virut bởi tế bào miễn dịch và tăng cường hơn nữa hoạt tính kháng virut của các thể liên hợp. Các ví dụ về tế bào miễn dịch có thể được hoạt hóa bởi các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đại thực bào, bạch cầu trung tính, bạch cầu ái toan, bạch cầu ưa bazơ, tế bào lympho, tế bào có tua vùng nang, tế bào giết tự nhiên, và tế bào mast.

Phân bố mô

Sau khi thuốc đi vào hệ tuần hoàn, nó sẽ được phân phối đến các mô của cơ thể. Sự phân bố thường không đồng đều vì sự khác biệt về tưới máu, liên kết mô, độ pH vùng và tính thấm của màng tế bào. Tốc độ xâm nhập của thuốc vào mô phụ thuộc vào tốc độ dòng máu đến mô, khối lượng mô và đặc điểm phân vùng giữa máu và mô. Sự cân bằng phân phối (khi tốc độ vào và ra như nhau) giữa máu và mô đạt được nhanh hơn ở những vùng giàu mạch máu, trừ khi sự khuếch tán qua màng tế bào là bước giới hạn tốc độ. Kích thước, hình dạng, điện tích, liên kết đích, FcRn và cơ chế liên kết đích, đường dùng và công thức ảnh hưởng đến sự phân bố của mô.

Trong một số trường hợp, các thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được tối ưu hóa để phân phối đến mô phổi. Trong một số trường hợp, các thể liên hợp có tỷ lệ nồng độ phân bố trong dịch niêm mạc biểu mô ít nhất bằng 30% nồng độ của các thể liên hợp trong huyết tương trong vòng 2 giờ sau khi dùng. Theo một số phương án, tỷ

lệ của nồng độ ít nhất là 45% trong vòng 2 giờ sau khi sử dụng. Theo một số phương án, tỷ lệ nồng độ ít nhất là 55% trong vòng 2 giờ sau khi sử dụng. Đặc biệt, tỷ lệ nồng độ ít nhất là 60% trong vòng 2 giờ sau khi dùng. Như thể hiện trong Ví dụ 190 và Fig. 98, vào 2 giờ sau khi tiêm, thể liên hợp có mức ELF của miền Fc (SEQ ID NO: 73) đáng ngạc nhiên là ~ 60% mức độ phơi nhiễm trong huyết tương được đo bằng AUC trong suốt thời gian còn lại cho thấy sự phân chia gần như ngay lập tức của thể liên hợp từ huyết tương đến ELF trong phổi. Điều này chứng tỏ rằng thể liên hợp chứa Fc phân bố nhanh chóng đến phổi và duy trì nồng độ cao trong phổi so với nồng độ trong huyết tương.

IV. Protein albumin và peptit liên kết protein albumin

Protein albumin

Protein albumin theo sáng chế có thể là albumin có trong tự nhiên hoặc biến thể của nó, như biến thể được thao tác di truyền của protein albumin có trong tự nhiên. Các biến thể bao gồm đoạn đa hình, mảnh như miền và phân miền, và protein liên hợp. Protein albumin có thể bao gồm trình tự của protein albumin thu được từ nguồn bất kỳ. Tốt hơn, nếu nguồn này là động vật có vú, như người hoặc bò. Tốt nhất, nếu protein albumin là albumin huyết thanh người (HSA), hoặc biến thể của nó. Albumin huyết thanh người bao gồm bất kỳ protein albumin có trình tự axit amin có trong tự nhiên ở người, và biến thể của chúng. Trình tự ghi mã protein albumin có thể thu được bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để phân lập và giải trình tự ADN bổ thể tương ứng với các gen của người. Protein albumin theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin của albumin huyết thanh người (HSA), được cung cấp trong SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140, hoặc trình tự axit amin của albumin huyết thanh chuột (MSA), được cung cấp trong SEQ ID NO: 141, hoặc biến thể hoặc mảnh của nó, tốt hơn là biến thể hoặc mảnh chức năng của nó. Biến thể hoặc mảnh có thể có hoặc có thể không có chức năng, hoặc có thể vẫn giữ chức năng của albumin ở mức độ nhất định. Ví dụ, biến thể hoặc mảnh có thể vẫn giữ khả năng liên kết với thụ thể albumin, như HSA hoặc MSA, ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, hoặc 105% khả năng của albumin bố mẹ (ví dụ, albumin gốc mà từ đó mảnh hoặc biến thể được tạo ra). Khả năng liên kết

tương đối có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Protein albumin có thể là biến thể đa hình có trong tự nhiên của protein albumin, như albumin huyết thanh người. Nói chung, biến thể hoặc mảnh của albumin huyết thanh người sẽ có ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, hoặc 70%, và tốt hơn là 80%, 90%, 95%, 100%, hoặc 105% hoặc hơn của albumin huyết thanh người hoặc hoạt tính liên kết phối tử của albumin huyết thanh chuột.

Protein albumin có thể bao gồm trình tự axit amin của albumin huyết thanh bò. Protein albumin huyết thanh bò bao gồm bất kỳ albumin có trình tự axit amin có trong tự nhiên ở bò sữas, ví dụ, như được mô tả bằng Swissprot có số hiệu lưu giữ P02769, và biến thể của chúng như được xác định trong bản mô tả này. Protein albumin huyết thanh bò cũng bao gồm mảnh albumin huyết thanh bò có chiều dài đầy đủ hoặc biến thể của chúng, như được xác định trong bản mô tả này.

Protein albumin có thể bao gồm trình tự của một albumin có nguồn gốc từ một trong các albumin huyết thanh của chó (ví dụ, số truy cập Swissprot P49822-1), lợn (ví dụ, số truy cập Swissprot P08835-1), dê (ví dụ, sản phẩm Sigma số A2514 hoặc A4164), mèo (ví dụ, số truy cập Swissprot P49064-1), gà (ví dụ, số truy cập Swissprot P19121-1), albumin lòng trắng trứng (ví dụ, albumin lòng trắng trứng gà) (ví dụ, số truy cập Swissprot P01012-1), albumin lòng trắng trứng gà tây (ví dụ, số truy cập Swissprot O73860-1), lừa (ví dụ, số truy cập Swissprot Q5XLE4-1), chuột lang (ví dụ, số truy cập Swissprot Q6WDN9-1), chuột đồng (ví dụ, như được mô tả trong DeMarco et al. International Journal for Parasitology 37(11): 1201-1208 (2007)), ngựa (ví dụ, số truy cập Swissprot P35747-1), khỉ rhesus (ví dụ, số truy cập Swissprot Q28522-1), chuột (ví dụ, số truy cập Swissprot P07724-1), chim bồ câu (ví dụ, theo định nghĩa của Khan et al. Int. J. Biol. Macromol. 30 (3-4), 171-8 (2002)), thỏ (ví dụ, số truy cập Swissprot P49065-1), chuột (ví dụ, số truy cập Swissprot P02770-1) hoặc cừu (ví dụ, số truy cập Swissprot P14639-1), và bao gồm các biến thể và các mảnh của chúng như được định nghĩa ở đây.

Nhiều dạng albumin đột biến tự nhiên là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này này. Các dạng albumin đột biến tự nhiên được mô tả trong, ví dụ, Peters, et al. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., p.170-181 (1996).

Protein albumin theo sáng chế bao gồm các biến thể của protein albumin có trong tự nhiên. Albumin biến thể đề cập đến một protein albumin có ít nhất một đột biến axit amin, chẳng hạn như đột biến axit amin được tạo ra bởi sự cài xen, khuyết đoạn hoặc thay thế, bảo toàn hoặc không bảo toàn, với điều kiện là những thay đổi đó dẫn đến một protein albumin mà ít nhất một đặc tính cơ bản không bị thay đổi đáng kể (ví dụ, không bị thay đổi quá 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% hoặc 40%). Các đặc tính ví dụ có thể xác định hoạt tính của protein albumin bao gồm hoạt tính liên kết (ví dụ, bao gồm tính đặc hiệu liên kết hoặc ái lực với bilirubin, hoặc axit béo như axit béo mạch dài), độ thẩm thấu hoặc tính chất trong một phạm vi độ pH nhất định.

Thông thường, một biến thể protein albumin sẽ có ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60% và tốt hơn là ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% trình tự axit amin đồng nhất với protein albumin có trong tự nhiên, chẳng hạn như protein albumin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 139-141.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế albumin người tái tổ hợp đã được thiết lập tốt (Sleep et al. Biotechnology, 8 (1): 42-6 (1990)), và bao gồm sản xuất albumin người tái tổ hợp cho các ứng dụng trong dược phẩm (Bosse et al. J Clin Pharmacol 45 (1): 57-67 (2005)). Cấu trúc ba chiều của HSA đã được làm sáng tỏ bằng phương pháp tinh thể học tia X (Carter et al. Science. 244 (4909): 1195-8 (1998)); Sugio et al. Protein Eng. 12 (6): 439-46 (1999)). Chuỗi polypeptit HSA có 35 gốc xystein, tạo thành 17 liên kết disulfua và một xystein chưa ghép đôi (ví dụ, tự do) ở vị trí 34 của protein trưởng thành. Cys-34 của HSA đã được sử dụng để liên hợp các phân tử với albumin (Leger et al. Bioorg Med Chem Lett 14 (17): 4395-8 (2004); Thibaudeau et al. Bioconjug Chem 16 (4): 1000-8 (2005)), và cung cấp vị trí để liên hợp đặc hiệu vị trí.

SEQ ID NO: 139 (Albumin huyết thanh người (HSA), biến thể 1)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQ
HKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFF
AKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADL
AKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD

VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDE
FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRN
LGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH
KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 140 (Albumin huyết thanh người (HSA), biến thể 2)
RGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEV
TEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRL
VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTEC
CQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASL
QKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAD
DRADLAKYICENQDSISS
KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKK
VPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK
TPVSDRVTKCCTESLVN
RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP
KATKEQLKAVMDDFAAF
VEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 141 (Albumin huyết thanh chuột (MSA))
RGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEV
TDFAKTCVADESAANCDK
SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERP
EAEAMCTSFKENPTTF
MGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVK
EKALVSSVRQRMKCSSM

QKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECAD
DRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAA
DFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSV
SLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYE
KLGEYGFQNAILVRYTQK
APQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKT
PVSEHVTKCCSGSLVER
RPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPK
ATAEQLKTVMDDFAQFL
DTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

Sự liên hợp các protein albumin

Protein albumin theo sáng chế có thể được liên hợp (ví dụ, bằng liên kết cộng hóa trị) với hợp chất bất kỳ theo sáng chế (ví dụ, bằng phần trình tự liên kết của monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza). Protein albumin có thể được liên hợp với hợp chất bất kỳ theo sáng chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra các thể liên hợp protein phân tử nhỏ. Điều này có thể bao gồm sự liên hợp cộng hóa trị với axit amin tiếp xúc với dung môi, chẳng hạn như xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi. Ví dụ, albumin huyết thanh người có thể được liên hợp với hợp chất theo sáng chế bằng liên kết cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh tương ứng với Cys34 của SEQ ID NO: 139 hoặc Cys40 của SEQ ID NO: 140.

Protein albumin theo sáng chế có thể được liên hợp với hợp chất bất kỳ theo sáng chế thông qua axit amin nằm trong 10 gốc axit amin của đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N của protein albumin. Protein albumin có thể bao gồm sự liên hợp polypeptit ở đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, hoặc 20 axit amin trở lên. Sự liên hợp polypeptit ở đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi, có thể được sử dụng để liên hợp cộng hóa trị hợp chất theo sáng chế (ví dụ, sự liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm thông qua trình tự liên kết).

Protein albumin theo sáng chế bao gồm protein albumin bất kỳ đã được thao tác di truyền để bao gồm một hoặc nhiều gốc xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi, có thể tạo ra vị trí để liên hợp với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm thông qua trình tự liên kết). Tốt nhất là, protein albumin sẽ chứa một xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí hợp chất theo sáng chế.

Các phương pháp ví dụ để sản xuất các biến thể được thao tác di truyền của protein albumin bao gồm một hoặc nhiều gốc xystein có khả năng liên hợp được cung cấp trong Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2017/0081389, được đưa vào đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Tóm lại, các biến thể protein albumin được ưu tiên là các biến thể bao gồm gốc xystein đơn, tiếp xúc với dung môi, không được ghép đôi (ví dụ, tự do), do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí trình tự liên kết với gốc xystein.

Các protein albumin đã được thao tác di truyền để cho phép liên hợp hóa học với gốc xystein chưa ghép đôi, tiếp xúc với dung môi bao gồm các biến thể protein albumin sau:

(a) protein albumin có sự thay thế gốc axit amin không phải là xystein bằng xystein ở gốc axit amin tương ứng với bất kỳ L585, D1, A2, D562, A364, A504, E505, T79, E86, D129, D549 , A581, D121, E82, S270, Q397 và A578 của SEQ ID NO: 139;

(b) protein albumin có sự cài xen của xystein ở vị trí tiếp giáp với phía đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của gốc axit amin tương ứng với bất kỳ L585, D1, A2, D562, A364, A504, E505, T79, E86 , D129, D549, A581, D121, E82, S270, Q397 và A578 của SEQ ID NO: 139;

(c) protein albumin được thao tác di truyền để có một xystein chưa ghép đôi có nhóm thiol tự do ở gốc tương ứng với bất kỳ trong số C369, C361, C91, C177, C567, C316, C75, C169, C124 hoặc C558 của SEQ ID NO: 96 , và có thể hoặc không thể được tạo ra bằng cách gây khuyết đoạn hoặc thay thế gốc tương ứng với C360, C316, C75, C168, C558, C361, C91, C124, C169 hoặc C567 của SEQ ID NO: 139; và/hoặc

(d) bổ sung xystein vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của protein albumin.

Theo một số phương án của sáng chế, kết quả thực của các sự kiện thay thế, khuyết đoạn, thêm đoạn hoặc cài xen của (a), (b), (c) và/hoặc (d) là số lượng gốc

xystein có khả năng liên hợp của trình tự polypeptit được tăng lên so với trình tự albumin bố mẹ. Theo một số phương án của sáng chế, kết quả thực của các sự kiện thay thế, khuyết đoạn, thêm đoạn hoặc cài xen của (a), (b), (c) và/hoặc (d) là số lượng gốc xystein có khả năng liên hợp của trình tự polypeptit là một, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí.

Các biến thể protein albumin được ưu tiên cũng bao gồm các protein albumin có gốc lysin tiếp xúc với dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí của trình tự liên kết với gốc lysin. Các biến thể như vậy có thể được tạo ra bằng cách thao tác di truyền protein albumin, bao gồm phương pháp bất kỳ được mô tả trước đây (ví dụ, cài xen, khuyết đoạn, thay thế, hoặc hợp nhất đầu C hoặc đầu N).

Các peptit liên kết với protein albumin

Sự liên hợp của hợp chất có hoạt tính sinh học với peptit liên kết với protein albumin có thể làm thay đổi dược động học của hợp chất có hoạt tính sinh học, bao gồm cả sự thay đổi mức hấp thu, thâm nhập và khuếch tán ở mô. Theo một phương án được ưu tiên, sự liên hợp của peptit liên kết với protein albumin với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, thông qua trình tự liên kết) làm tăng hiệu lực hoặc giảm độc tính của hợp chất, so với hợp chất riêng lẻ.

Các peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế bao gồm polypeptit bất kỳ có trình tự axit amin từ 5 đến 50 (ví dụ, 5 đến 40, 5 đến 30, 5 đến 20, 5 đến 15, 5 đến 10, 10 đến 50, 10 đến 30, hoặc 10 đến 20) gốc axit amin có ái lực và có chức năng liên kết với protein albumin, chẳng hạn như protein bất kỳ trong số các protein albumin được mô tả ở đây. Tốt hơn là, peptit liên kết với protein albumin liên kết với albumin huyết thanh có nguồn gốc tự nhiên, tốt nhất là albumin huyết thanh người. Peptit liên kết với protein albumin có thể có nguồn gốc khác nhau, ví dụ, tổng hợp, người, chuột nhắt hoặc chuột cống. Các peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế bao gồm các peptit liên kết với protein albumin đã được thao tác di truyền để bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn hoặc năm) gốc xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi, có thể cung cấp vị trí cho sự liên hợp với hợp chất theo sáng chế (ví dụ, sự liên hợp với monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm thông qua trình tự liên kết). Tốt nhất là, peptit liên kết với protein albumin sẽ chứa một xystein hoặc lysin tiếp xúc với dung môi duy nhất, do đó cho phép liên hợp đặc hiệu vị trí của hợp chất theo

sáng chế. Các peptit liên kết với protein albumin có thể chỉ bao gồm các gốc axit amin có trong tự nhiên hoặc có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin không có trong tự nhiên. Khi được bao gồm, gốc axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, chuỗi bên của gốc axit amin không có trong tự nhiên) có thể được sử dụng làm điểm gắn cho hợp chất theo sáng chế (ví dụ, monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza, bao gồm thông qua trình tự liên kết). Các peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng. Các peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế bao gồm peptit liên kết với protein albumin bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ về chúng được cung cấp ở đây.

Peptit liên kết với protein albumin, và các thể liên hợp bao gồm peptit liên kết với protein albumin, tốt hơn là liên kết với protein albumin (ví dụ, albumin huyết thanh người) với ái lực được đặc trưng bởi hằng số phân ly, Kd, nhỏ hơn khoảng 100 μM, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 100 nM, và tốt nhất là không liên kết đáng kể với các protein huyết tương khác. Ví dụ cụ thể về các hợp chất này là các peptit mạch thẳng hoặc mạch vòng, tốt nhất là có chiều dài từ khoảng 10 đến 20 gốc axit amin, được sửa đổi tùy ý ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C hoặc cả hai.

Các peptit liên kết với protein albumin bao gồm các peptit mạch thẳng và mạch vòng bao gồm các công thức chung sau đây, trong đó Xaa là axit amin bất kỳ:

SEQ ID NO: 148
Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Phe-Cys-Xaa-Asp-Trp-Pro-Xaa-Xaa-Xaa-Ser-Cys

SEQ ID NO: 149
Val-Cys-Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-Ile-Cys-Phe

SEQ ID NO: 150
Cys-Tyr-Xaa-Pro-Gly-Xaa-Cys

SEQ ID NO: 151
Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp

SEQ ID NO: 152

Trp-Cys-Asp-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Ala-Xaa-Asp-Leu-Cys

SEQ ID NO: 153

Asp-Leu-Val-Xaa-Leu-Gly-Leu-Glu-Cys-Trp

Các peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế còn bao gồm trình tự peptit bất kỳ sau đây, có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng:

SEQ ID NO: 154	DLCLRDWGCLW
SEQ ID NO: 155	DICLPRWGCLW
SEQ ID NO: 156	MEDICLPRWGCLWGD
SEQ ID NO: 157	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
SEQ ID NO: 158	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
SEQ ID NO: 159	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
SEQ ID NO: 160	EDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 161	RLMEDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 162	MEDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 163	MEDICLPRWGCLWED
SEQ ID NO: 164	RLMEDICLARWGCLWEDD
SEQ ID NO: 165	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
SEQ ID NO: 166	RAPESFVCYWETICFERSEQ
SEQ ID NO: 167	EMCYFPGICWM

Các peptit liên kết với protein albumin của các SEQ ID NO: 154-167 có thể bao gồm thêm các axit amin bổ sung ở đầu tận cùng N (Xaa)x và/hoặc các axit amin bổ sung ở đầu tận cùng C (Xaa)z, trong đó Xaa là axit amin bất kỳ và x và z là một số nguyên lớn hơn hoặc bằng 0, thường nhỏ hơn 100, tốt hơn là nhỏ hơn 10 và tốt hơn là bằng 0, 1, 2, 3, 4 hoặc 5.

Các peptit liên kết với protein với albumin được làm ví dụ khác nữa được cung cấp trong Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2005/0287153, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Sự liên hợp của các peptit liên kết với protein albumin

Peptit liên kết với protein albumin theo sáng chế có thể được liên hợp (ví dụ, thông qua liên kết cộng hóa trị) với hợp chất bất kỳ theo sáng chế (ví dụ, thông qua phần liên kết của monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza). Peptit liên kết với protein albumin có thể được liên hợp với hợp chất bất kỳ theo sáng chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra thể liên hợp peptit-phân tử nhỏ. Điều này có thể bao gồm sự liên hợp cộng hóa trị với nhóm chuỗi bên của gốc axit amin, chẳng hạn như xystein, lysin hoặc axit amin không tự nhiên. Theo cách khác, sự liên hợp cộng hóa trị có thể xảy ra ở đầu tận cùng C (ví dụ, với axit carboxylic ở đầu tận cùng C, hoặc với nhóm chuỗi bên của gốc ở đầu tận cùng C) hoặc ở đầu tận cùng N (ví dụ, với nhóm amino ở đầu tận cùng N hoặc với nhóm chuỗi bên của axit amin đầu tận cùng N).

V. Trình tự liên kết

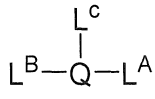
Trình tự liên kết đề cập đến một liên kết hoặc kết nối giữa hai hoặc nhiều thành phần trong thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, giữa hai chất ức chế neuraminidaza trong thể liên hợp được mô tả ở đây, giữa chất ức chế neuraminidaza và vùng Fc hoặc protein albumin trong thể liên hợp được mô tả ở đây, và giữa dime của hai chất ức chế neuraminidaza và miền Fc hoặc protein albumin trong thể liên hợp được mô tả ở đây).

Trình tự liên kết trong thể liên hợp có miền Fc hoặc protein albumin được liên kết cộng hóa trị với các dime của chất ức chế neuraminidaza

Trong thể liên hợp chứa monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết với protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza như được mô tả ở đây, trình tự liên kết trong thể liên hợp (ví dụ, L hoặc L') có thể là một cấu trúc phân nhánh. Như được mô tả thêm ở đây, trình tự liên kết trong thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, L hoặc L') có thể là cấu trúc đa hóa trị, ví dụ, cấu trúc hóa trị hai hoặc hóa trị ba có hai hoặc ba nhánh tương ứng. Theo một số phương án, khi trình tự liên kết có ba nhánh, hai trong số các nhánh này có thể được gắn vào chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và thứ hai và nhánh thứ ba có thể được gắn vào monome miền Fc, và miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết với protein albumin. Theo một số phương án, khi trình tự liên kết có hai nhánh, một nhánh có thể được gắn vào miền Fc

hoặc protein albumin và nhánh kia có thể được gắn vào một trong hai chất ức chế neuraminidaza. Theo các phương án khác, trình tự liên kết có hai nhánh có thể được sử dụng để gắn hai chất ức chế neuraminidaza trên thể liên hợp chứa miền Fc hoặc protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza.

Theo một số phương án, trình tự liên kết trong thể liên hợp có miền Fc hoặc protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza được mô tả bằng công thức (DLI):



(LI)

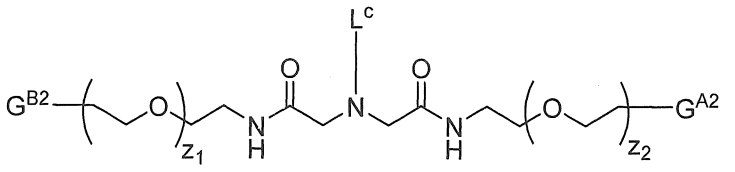
trong đó L^A được mô tả bằng công thức G^{A1}-$(Z^{A1})_{g1}$-$(Y^{A1})_{h1}$-$(Z^{A2})_{i1}$-$(Y^{A2})_{j1}$-$(Z^{A3})_{k1}$-$(Y^{A3})_{l1}$-$(Z^{A4})_{m1}$-$(Y^{A4})_{n1}$-$(Z^{A5})_{o1}$-G^{A2}; L^B được mô tả bằng công thức G^{B1}-$(Z^{B1})_{g2}$-$(Y^{B1})_{h2}$-$(Z^{B2})_{i2}$-$(Y^{B2})_{j2}$-$(Z^{B3})_{k2}$-$(Y^{B3})_{l2}$-$(Z^{B4})_{m2}$-$(Y^{B4})_{n2}$-$(Z^{B5})_{o2}$-G^{B2}; L^C được mô tả bằng công thức G^{C1}-$(Z^{C1})_{g3}$-$(Y^{C1})_{h3}$-$(Z^{C2})_{i3}$-$(Y^{C2})_{j3}$-$(Z^{C3})_{k3}$-$(Y^{C3})_{l3}$-$(Z^{C4})_{m3}$-$(Y^{C4})_{n3}$-$(Z^{C5})_{o3}$-G^{C2}; G^{A1} là liên kết gắn vào Q trong công thức (DLI); G^{A2} là một liên kết gắn vào chất ức chế neuraminidaza đầu tiên (ví dụ, A 1); G^{B1} là một liên kết gắn vào Q trong công thức (DLI); G^{B2} là một liên kết gắn vào chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, A_2); G^{C1} là một liên kết gắn vào Q trong công thức (D-L-I); G^{C2} là liên kết gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic và amin hoạt hóa, isoxyanat và amin, azit và ankyn, và anken và tetrazin); mỗi Z^{A1}, Z^{A2}, Z^{A3}, Z^{A4}, Z^{A5}, Z^{B1}, Z^{B2}, Z^{B3}, Z^{B4}, Z^{B5}, Z^{C1}, Z^{C2}, Z^{C3}, Z^{C4}, and Z^{C5} độc lập là C1-C20 alkylen tùy ý được thế, C1-C20 heteroalkylen tùy ý được thế, C2-C20 alkenylen tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkenylen tùy ý được thế, C2-C20 alkynylen tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkynylen tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkylen tùy ý được thế, C3-C20 heteroxycloalkylen tùy ý được thế, C4-C20 xycloalkenylen tùy ý được thế, C4-C20 heteroxycloalkenylen tùy ý được thế, C8-C20 xycloalkynylen tùy ý được thế, C8-C20 heteroxycloalkynylen tùy ý được thế, C5-C15 arylen tùy ý được thế, hoặc C2-C15 heteroarylen tùy ý được thế; mỗi Y^{A1}, Y^{A2}, Y^{A3}, Y^{A4}, Y^{B1}, Y^{B2}, Y^{B3}, Y^{B4}, Y^{C1}, Y^{C2}, Y^{C3}, và Y^{C4} độc lập là O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc

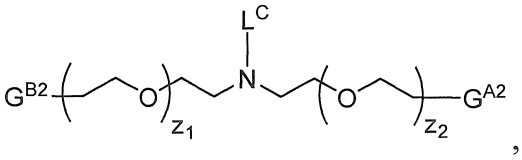
imino; R^i là H, C1-C20 alkyl tùy ý được thế, C1-C20 heteroalkyl tùy ý được thế, C2-C20 alkenyl tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkenyl tùy ý được thế, C2-C20 alkynyl tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkynyl tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkyl tùy ý được thế, C3-C20 heteroxycloalkyl tùy ý được thế, C4-C20 xycloalkenyl tùy ý được thế, C4-C20 heteroxycloalkenyl tùy ý được thế, C8-C20 xycloalkynyl tùy ý được thế, C8-C20 heteroxycloalkynyl tùy ý được thế, C5-C15 aryl tùy ý được thế, hoặc C2-C15 heteroaryl tùy ý được thế; mỗi g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3, và o3 độc lập là 0 hoặc 1; Q là nguyên tử nitơ, C1-C20 alkylen tùy ý được thế, C1-C20 heteroalkylen tùy ý được thế, C2-C20 alkenylen tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkenylen tùy ý được thế, C2-C20 alkynylen tùy ý được thế, C2-C20 heteroalkynylen tùy ý được thế, C3-C20 xycloalkylen tùy ý được thế, C3-C20 heteroxycloalkylen tùy ý được thế, C4-C20 xycloalkenylen tùy ý được thế, C4-C20 heteroxycloalkenylen tùy ý được thế, C8-C20 xycloalkynylen tùy ý được thế, C8-C20 heteroxycloalkynylen tùy ý được thế, C5-C15 arylen tùy ý được thế, hoặc C2-C15 heteroarylen tùy ý được thế.

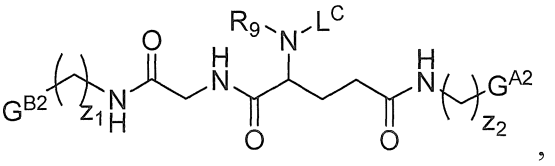
Theo một số phương án, L^C có thể có hai điểm gắn vào miền Fc (ví dụ, hai G^{C2}).

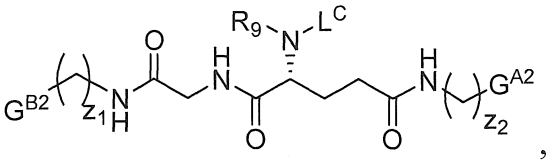
Theo một số phương án, L bao gồm trình tự liên kết polyetylen glycol (PEG). Trình tự liên kết PEG bao gồm trình tự liên kết có cấu trúc đơn vị lặp lại $(-CH_2CH_2O-)_n$, trong đó n là số nguyên từ 2 đến 100. Trình tự liên kết polyetylen glycol có thể tham gia cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (M-I)-(M-XI)). Trình tự liên kết polyetylen glycol có thể tham gia cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và chất ức chế neuraminidaza thứ hai (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Trình tự liên kết polyetylen glycol có thể tham gia cộng hóa trị với dime chất ức chế neuraminidaza và E (ví dụ, trong thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I)-(D-XI)). Có thể chọn một trình tự liên kết polyetylen glycol bất kỳ trong số PEG_2 đến PEG_{100} (ví dụ, PEG_2, PEG_3, PEG_4, PEG_5, PEG_5-PEG_{10}, PEG_{10}-PEG_{20}, PEG_{20}-PEG_{30}, PEG_{30}-PEG_{40}, PEG_{50}-PEG_{60}, PEG_{60}-PEG_{70}, PEG_{70}-PEG_{80}, PEG_{80}-PEG_{90}, PEG_{90}-PEG_{100}). Theo một số phương án, L^c bao gồm trình tự liên kết PEG, trong đó L^c được liên kết cộng hóa trị với mỗi Q và E.

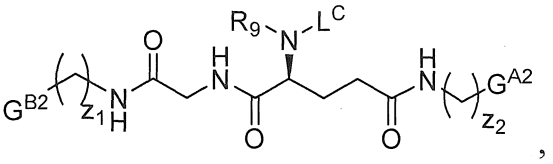
Các trình tự liên kết có công thức (D-L-I) có thể được sử dụng trong các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

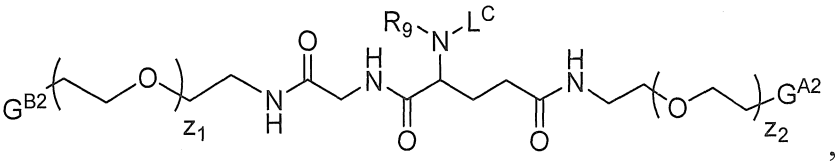


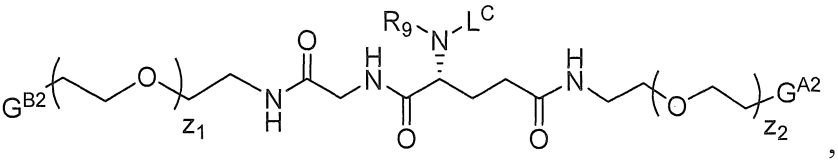


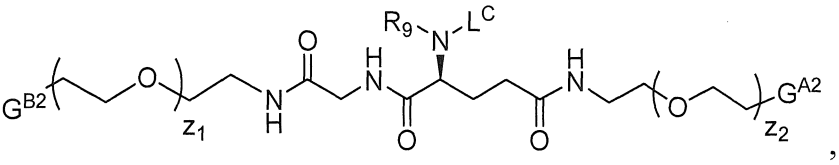


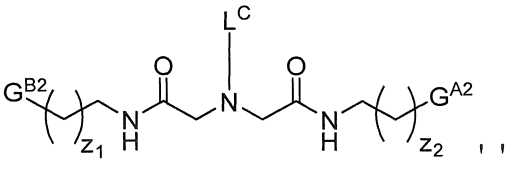


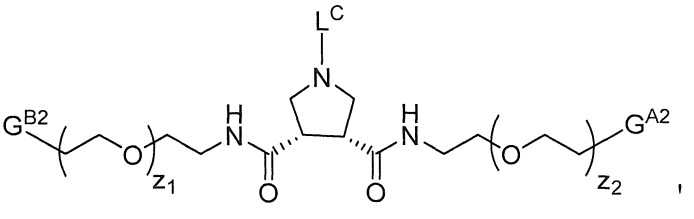


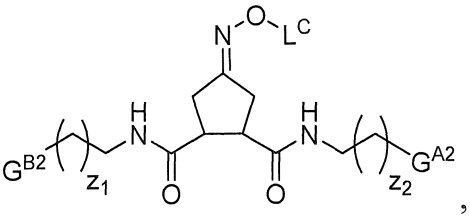


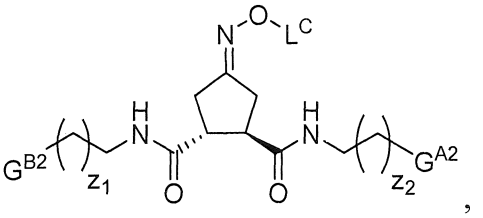


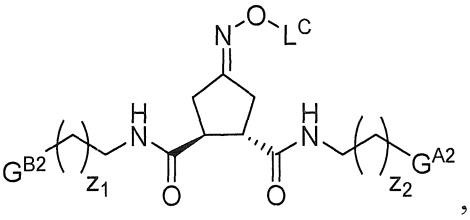


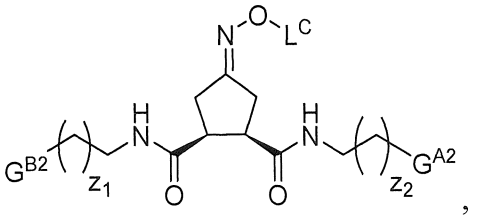


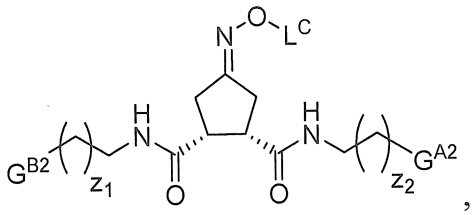


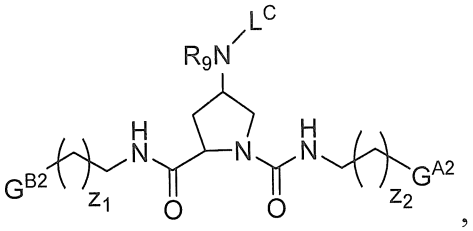


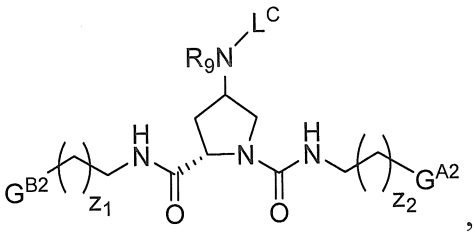


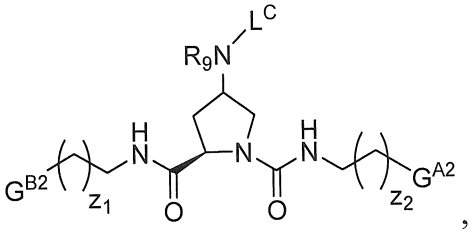


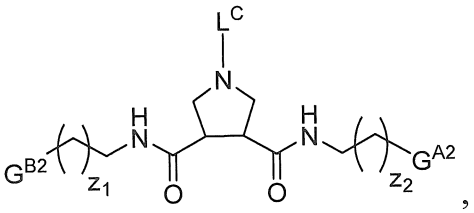


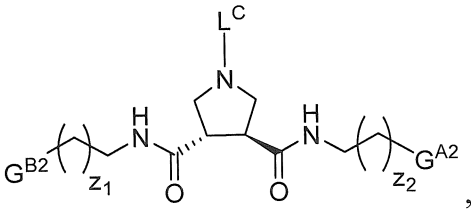

,

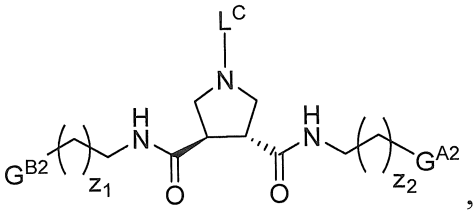

,

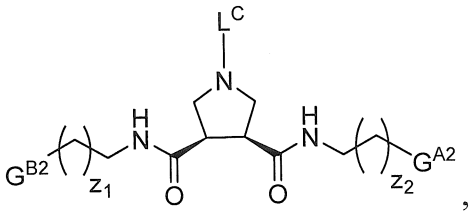

,

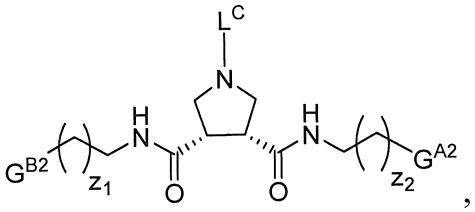

,

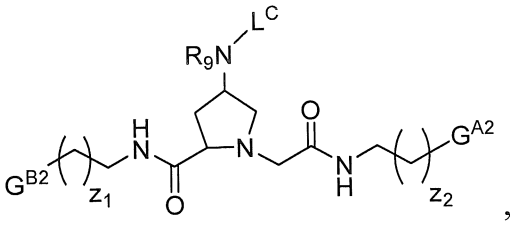

,

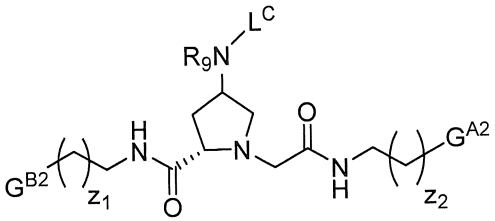

,

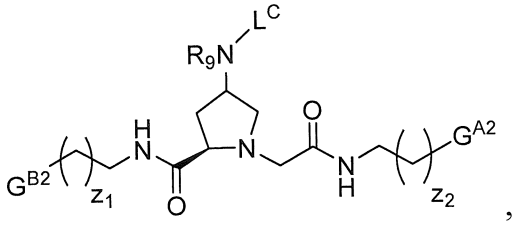

,

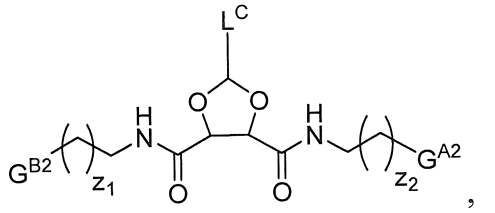

,

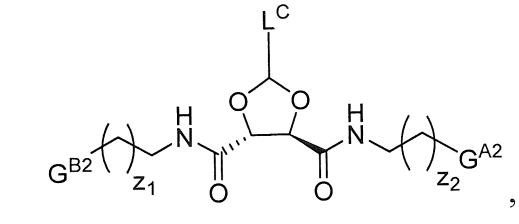

,


,


,

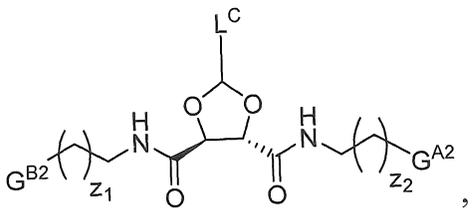

,

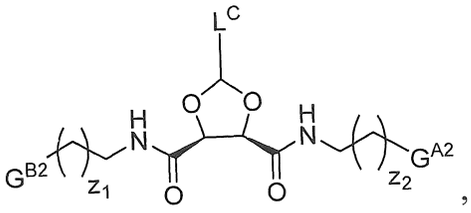

,

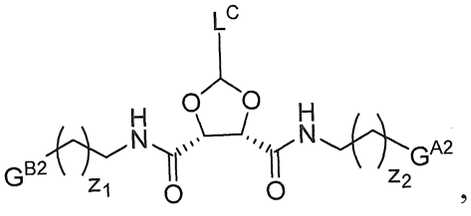

,

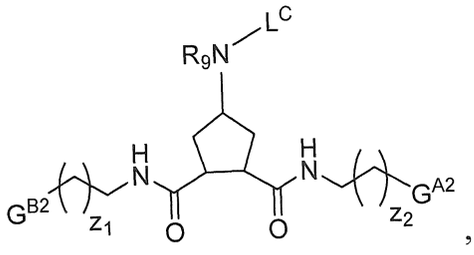
,

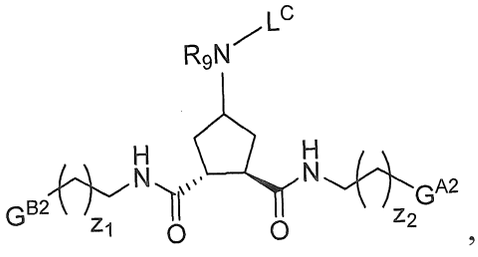
,

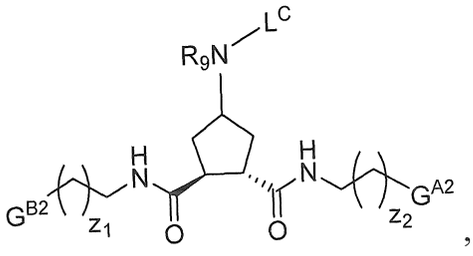

,

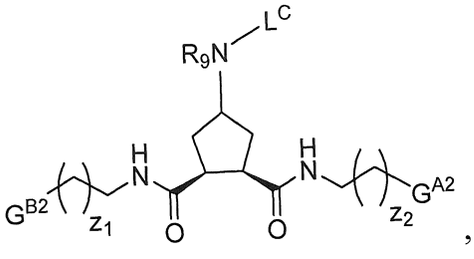

,

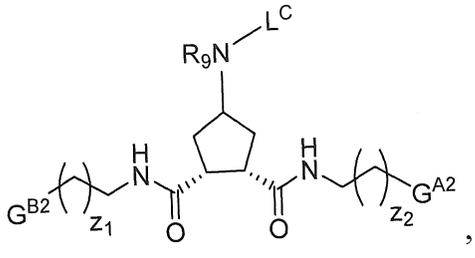

,

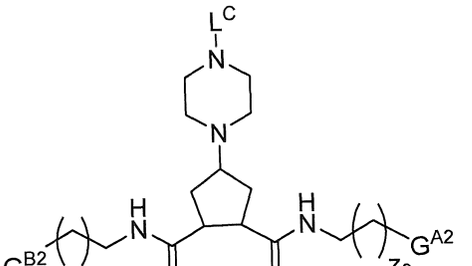

,

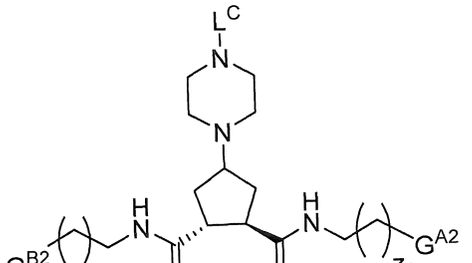

,

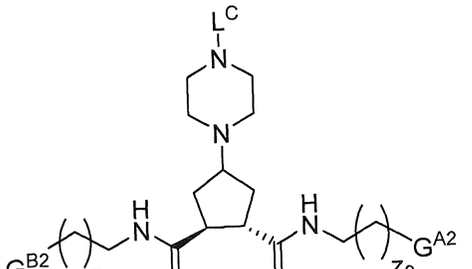

,

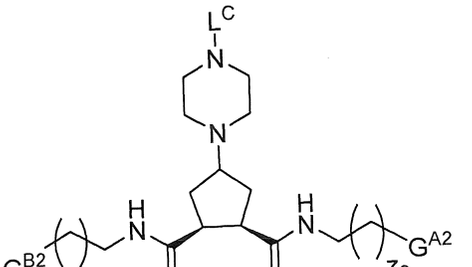

,

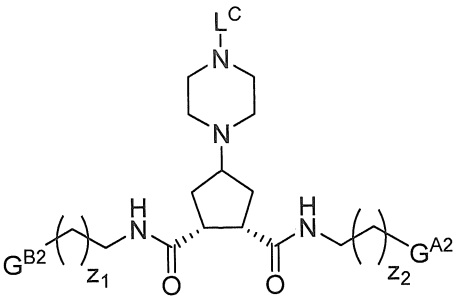

,

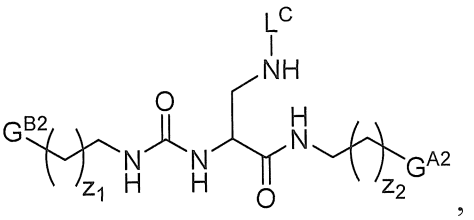

,

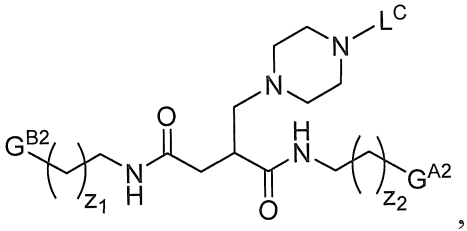

,

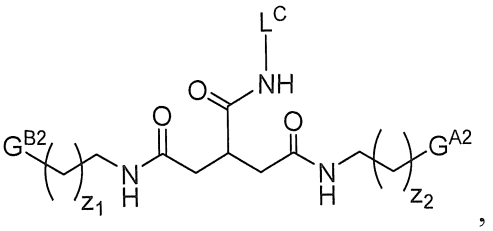

,

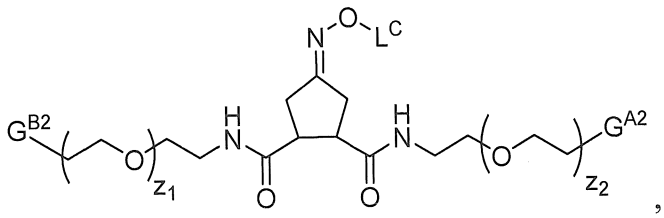

,

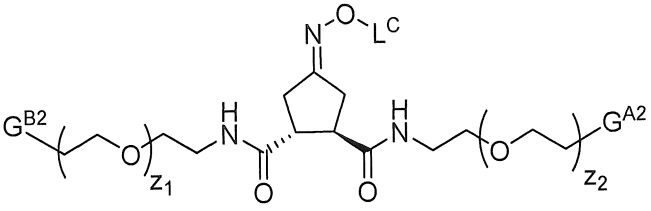

,

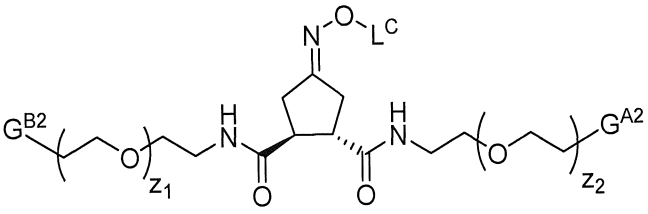

,

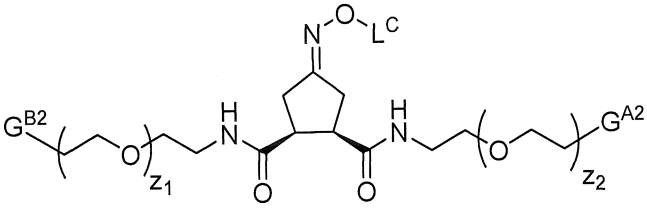

,

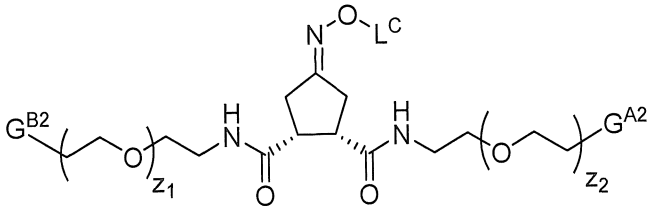

,

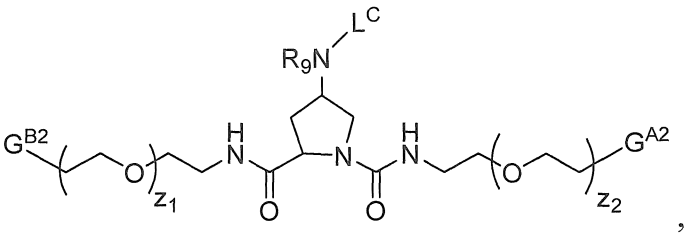

,

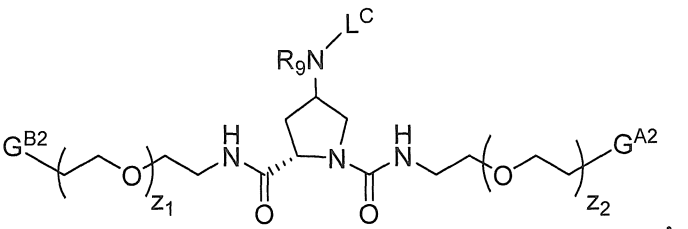

,

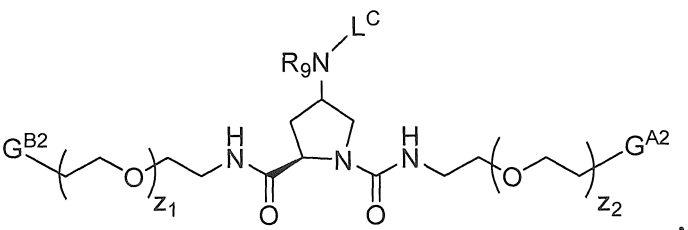

,

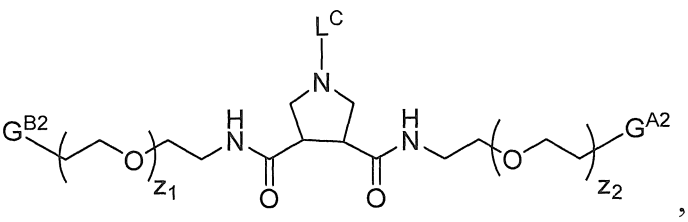

,

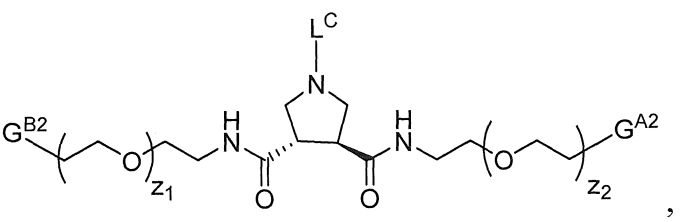

,

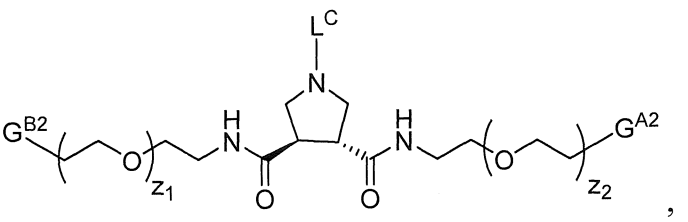

,

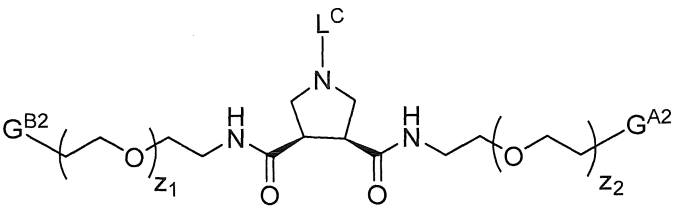

,

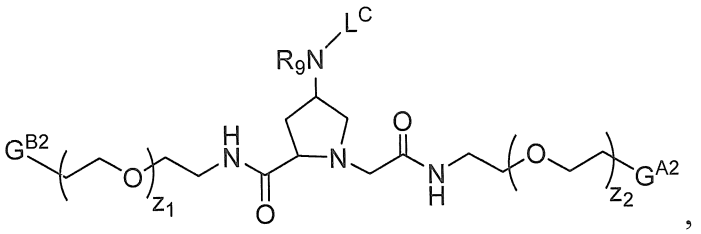

,

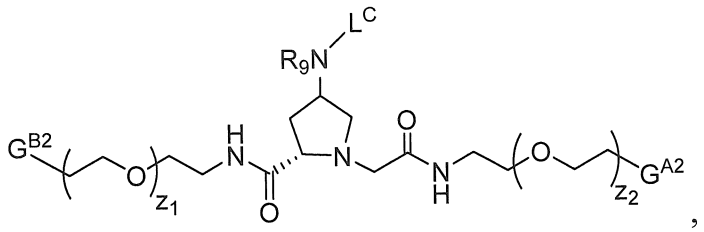

,

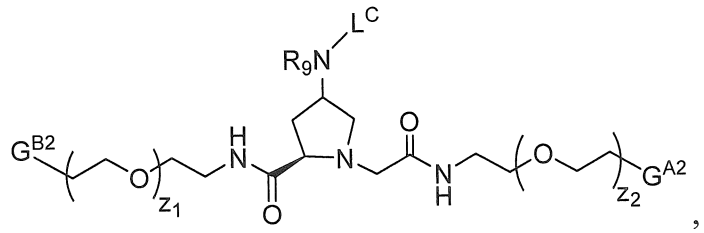

,

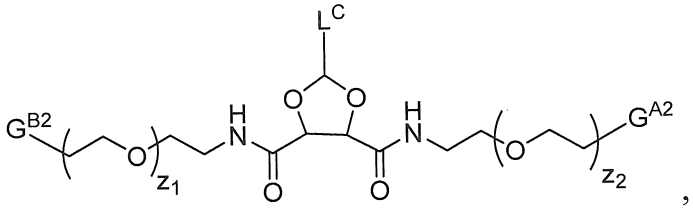

,

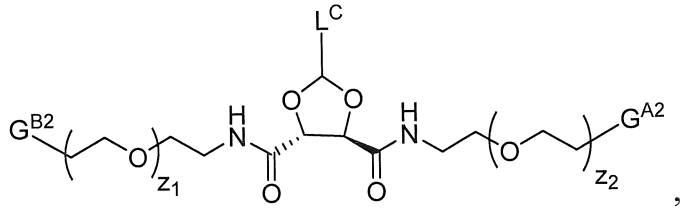


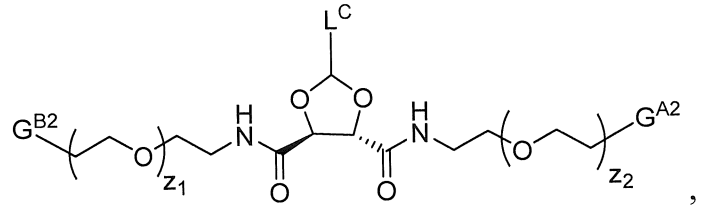


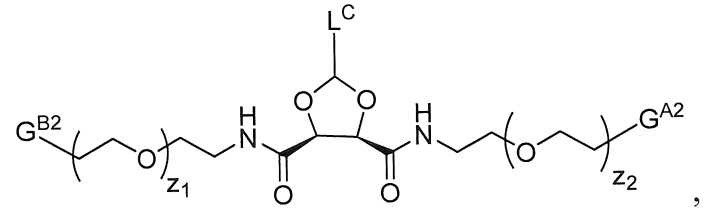


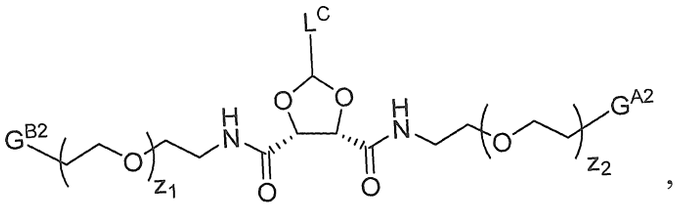




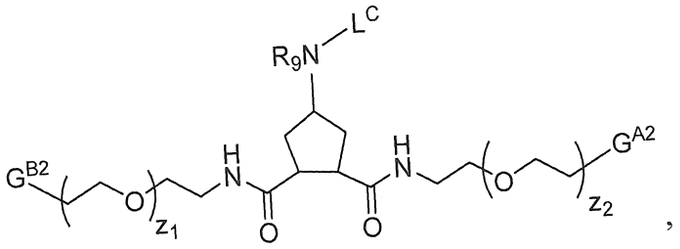




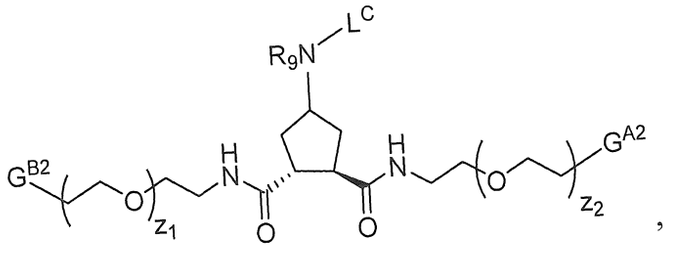




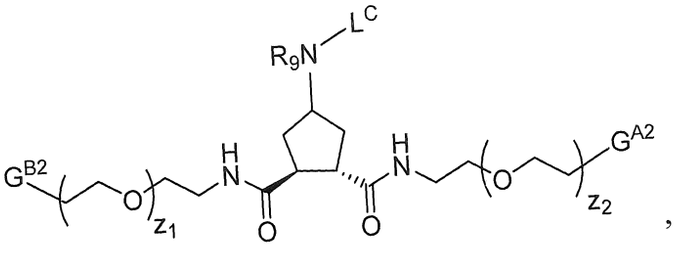
,



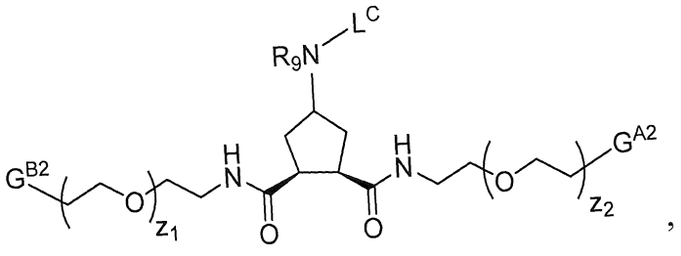
,



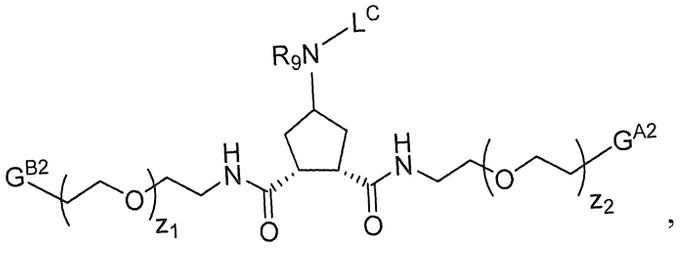
,



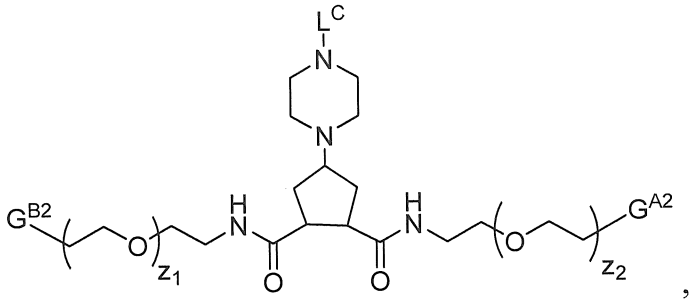
,



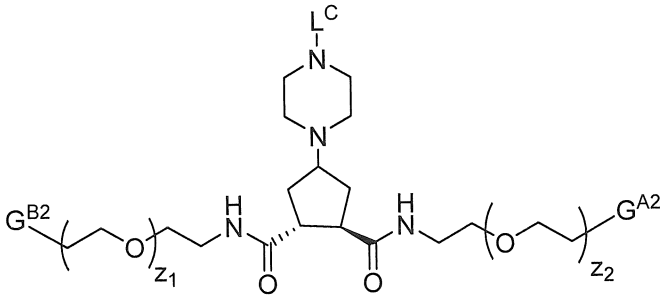
,



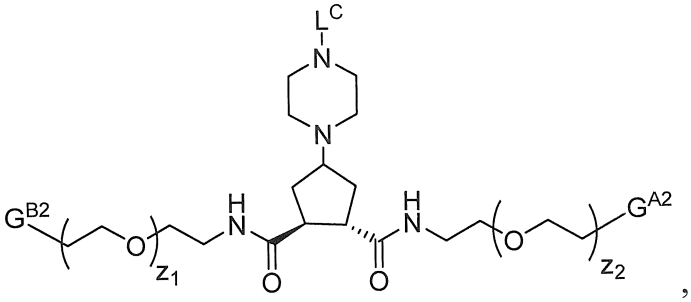
,



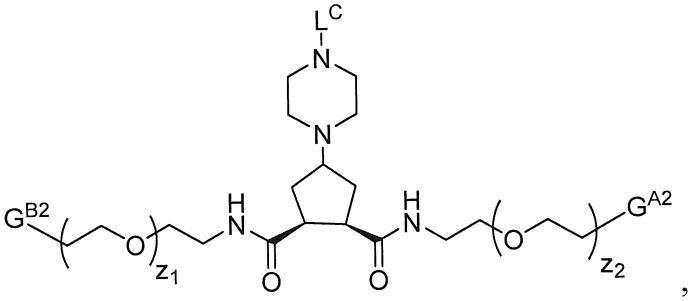
,



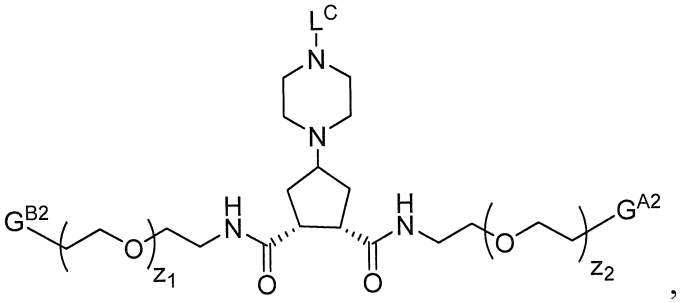
,



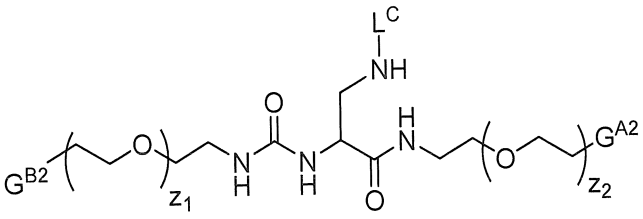
,



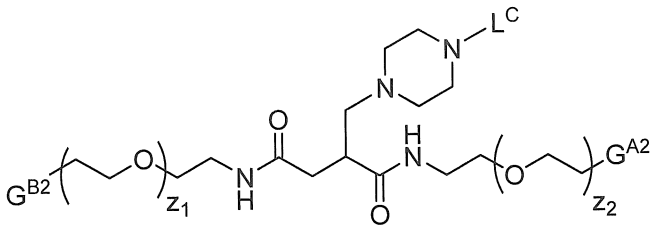
,



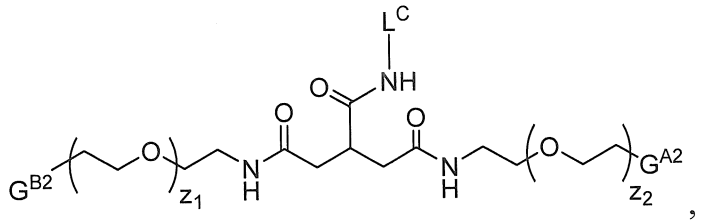
,



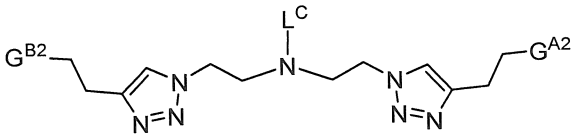
,



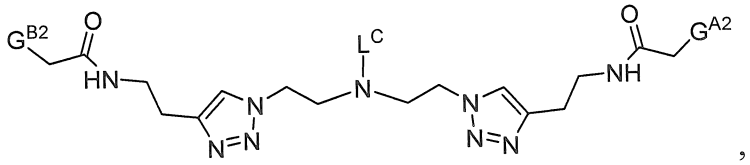
,



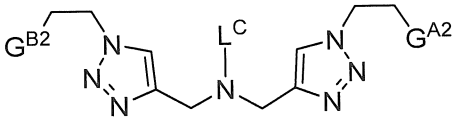
,



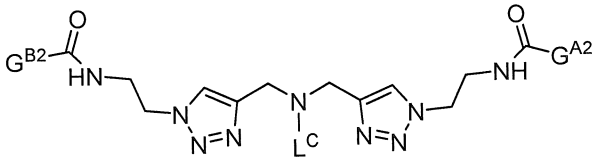
,



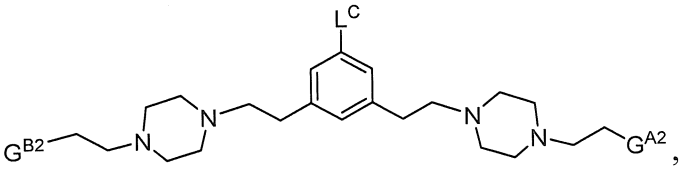
,



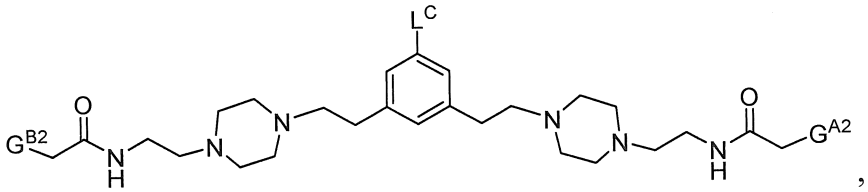
,



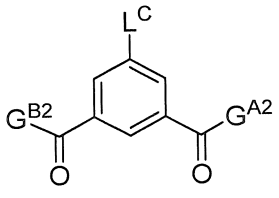
,



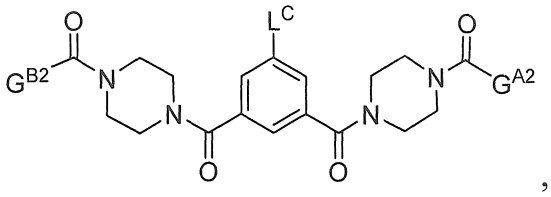
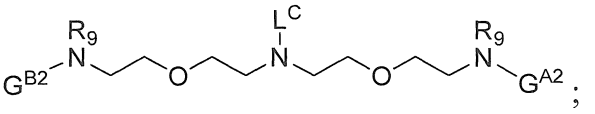
,

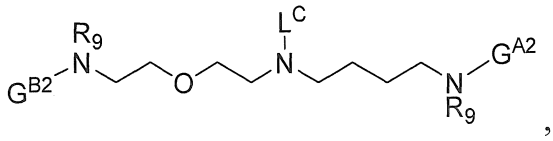
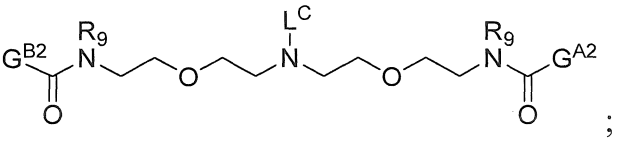


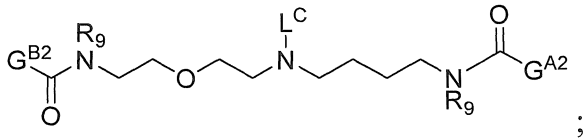
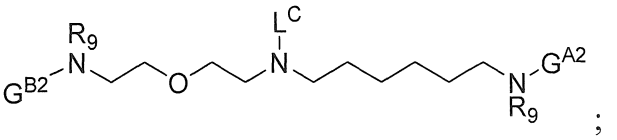
,

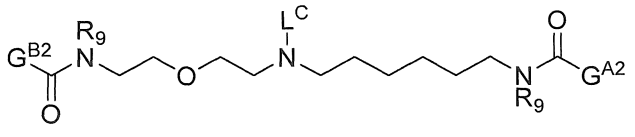


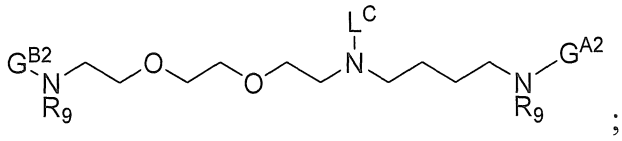
,

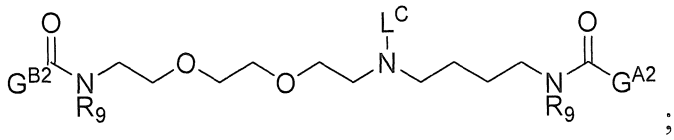

,

;

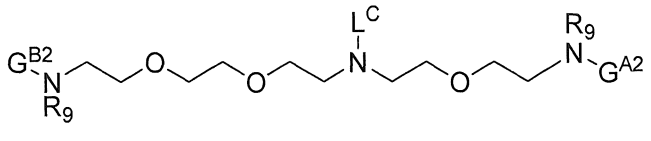

,

;


;

;

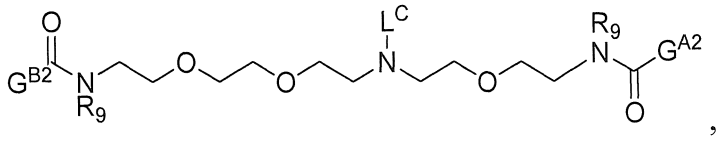

;


;


;

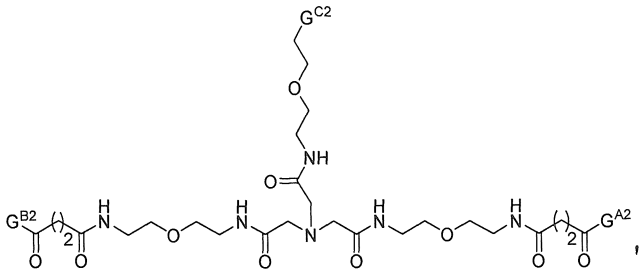

;

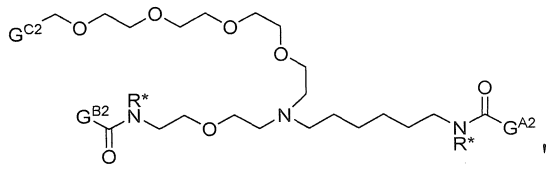
hoặc

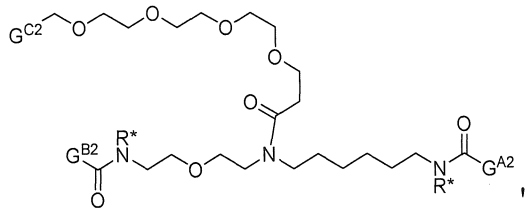

,

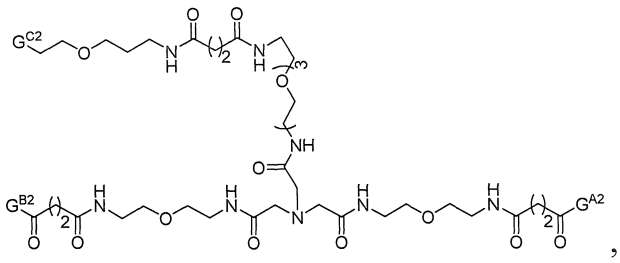
trong đó mỗi z_1 và z_2 độc lập và là số nguyên từ 1 đến 20; và R_9 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

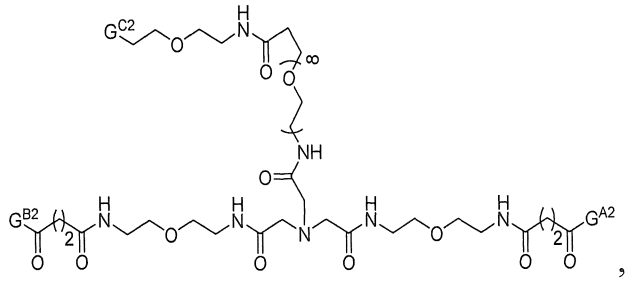
Trình tự liên kết có công thức (D-L-I) cũng có thể bao gồm bất kỳ

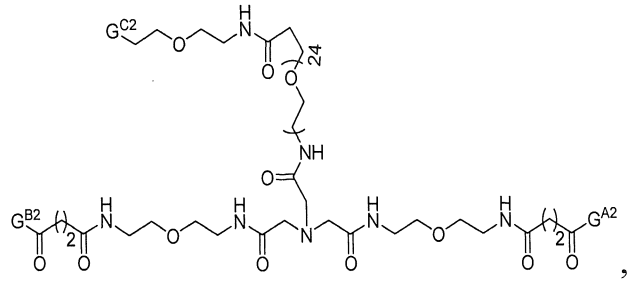


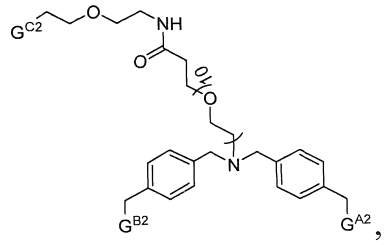


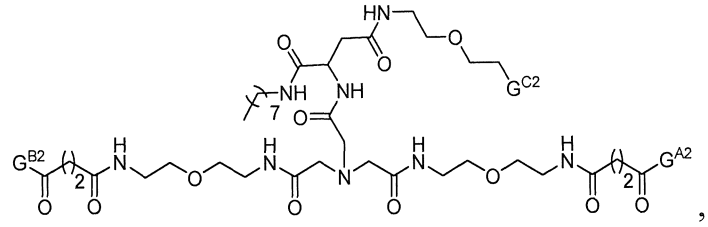


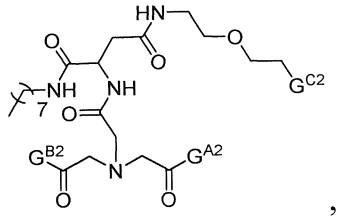


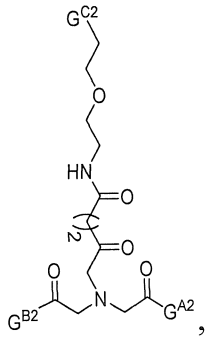


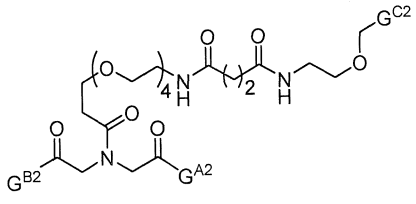


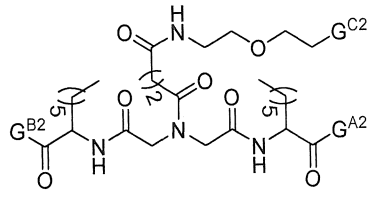


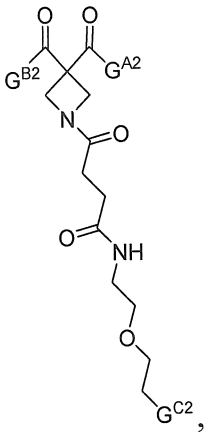
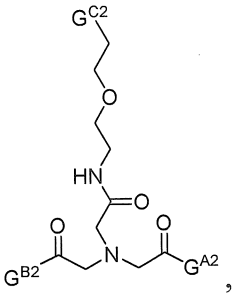
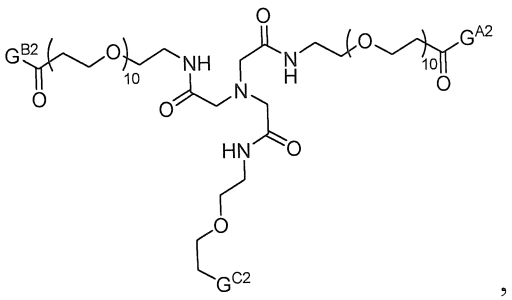
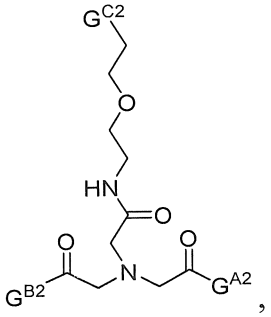
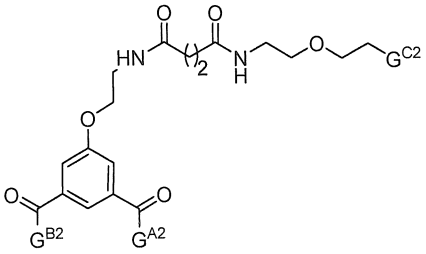
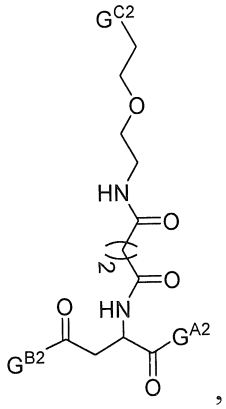
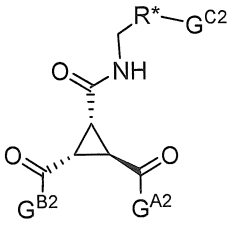
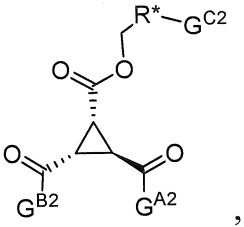
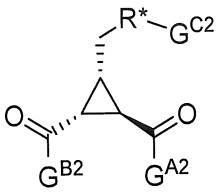
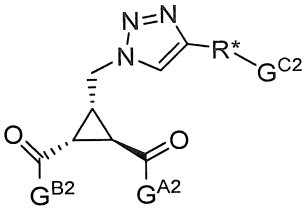
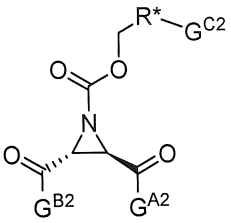
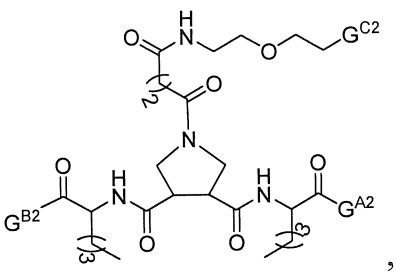
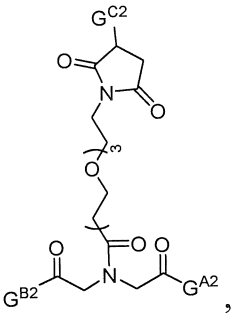
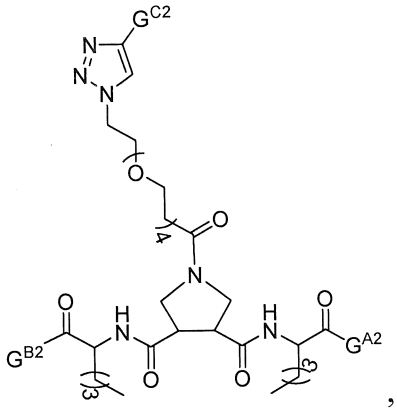


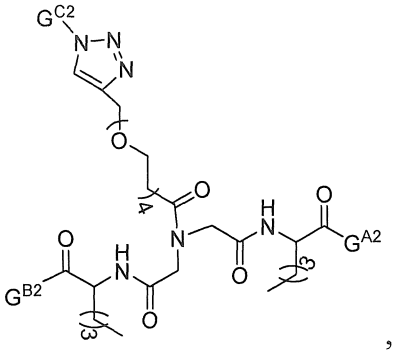
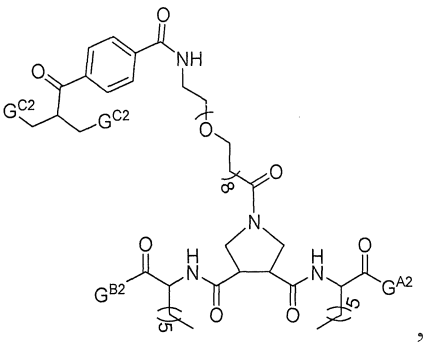
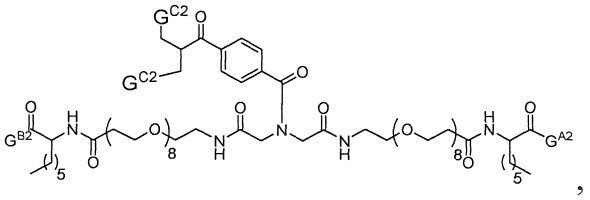
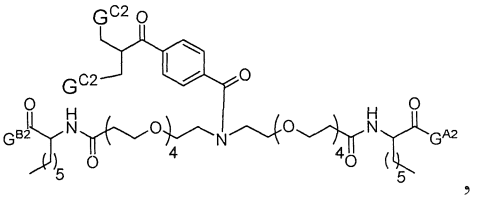
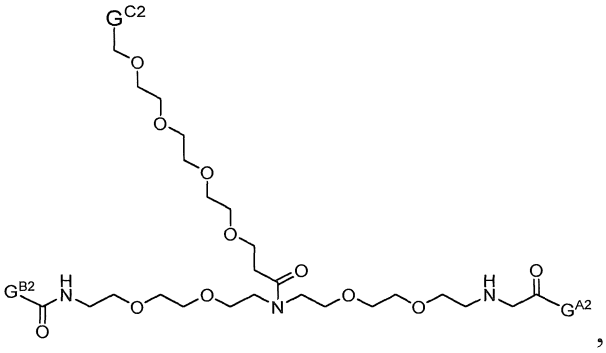
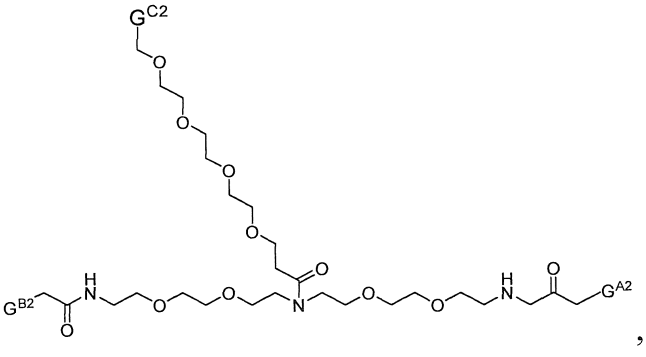
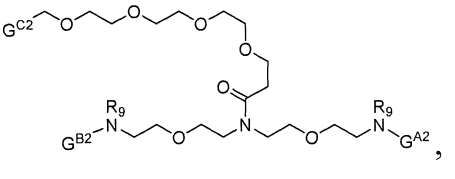
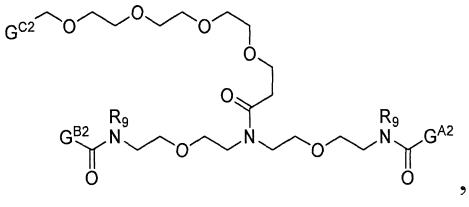
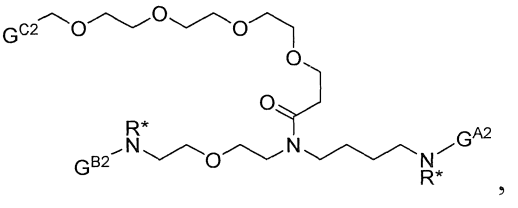
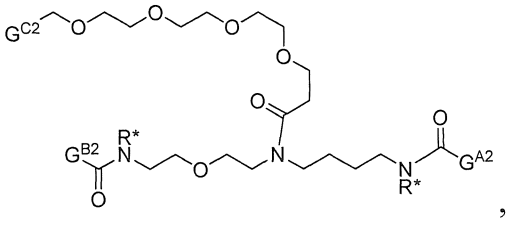
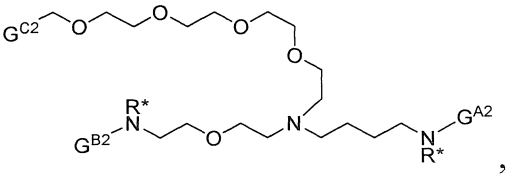


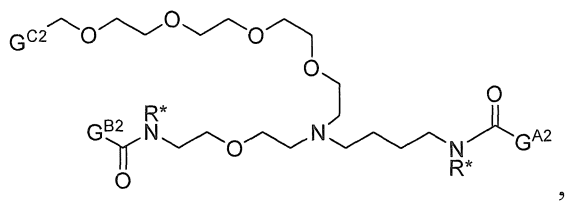
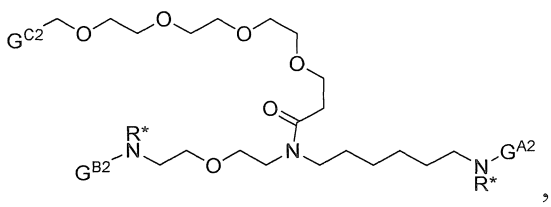
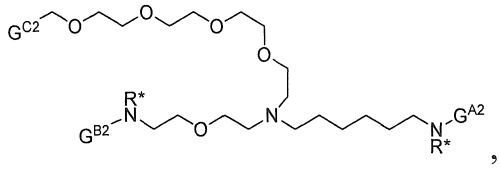
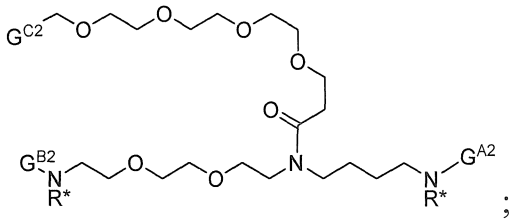
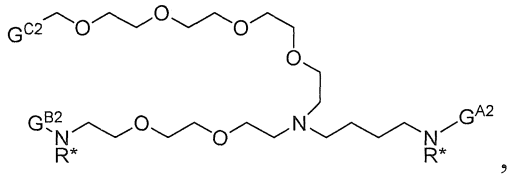
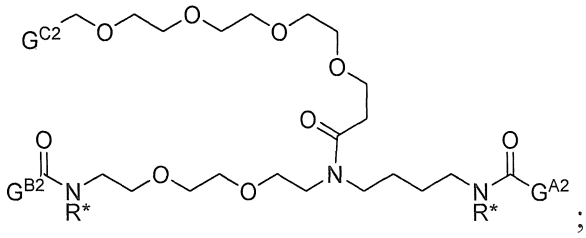
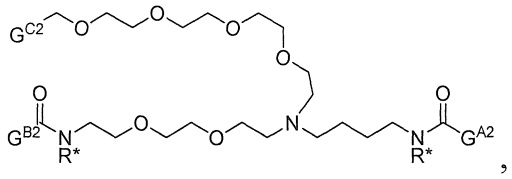
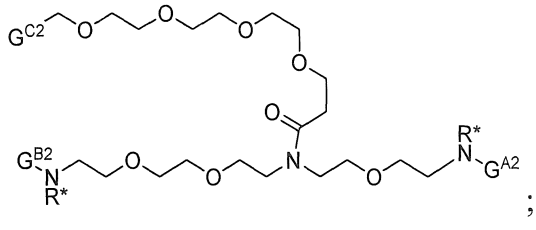
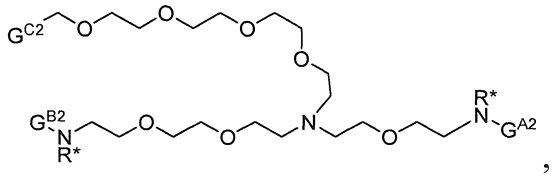
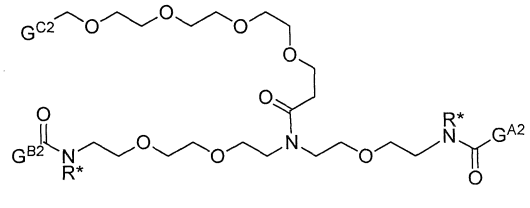
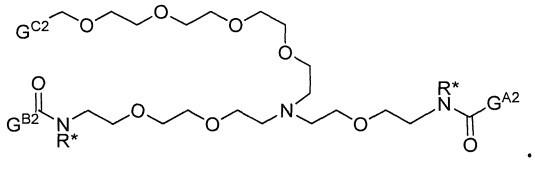







,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

;

,

;

,

;

,

hoặc

.

Các trình tự liên kết trong thể liên hợp có miền Fc hoặc protein albumin được liên kết cộng hóa trị với các monome của chất ức chế neuraminidaza

Trong thể liên hợp chứa monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza như được mô tả ở đây, trình tự liên kết trong thể liên hợp (ví dụ, L, hoặc L') có thể là cấu trúc hóa trị hai có hai nhánh. Một nhánh trong trình tự liên kết hóa trị hai có thể được gắn vào monome của chất ức chế neuraminidaza và nhánh kia có thể được gắn vào monome miền Fc, và miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein

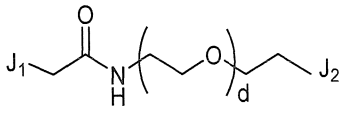
albumin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều monome của chất ức chế neuraminidaza trong các thể liên hợp được mô tả ở đây, mỗi monome này có thể được kết nối độc lập với một nguyên tử trong monome miền Fc, và miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin.

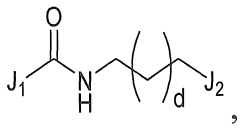
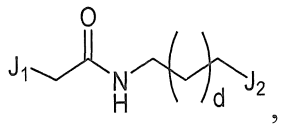
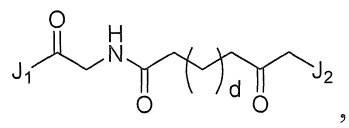
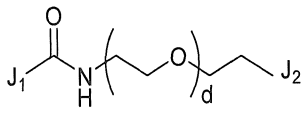
Theo một số phương án, trình tự liên kết được mô tả theo công thức (M-L-I):

$$J^1\text{-}(Q^1)_g\text{-}(T^1)_h\text{-}(Q^2)_i\text{-}(T^2)_j\text{-}(Q^3)_k\text{-}(T^3)_l\text{-}(Q^4)_m\text{-}(T^4)_n\text{-}(Q^5)_o\text{-}J^2$$

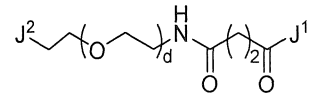
trong đó J^1 là liên kết gắn vào chất ức chế neuraminidaza; J^2 là liên kết gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với miền Fc monome, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic và amin hoạt hóa, isoxyanat và amin, azit và ankyn, và anken và tetrazin); mỗi Q^1, Q^2, Q^3, Q^4, và Q^5, một cách độc lập, là C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý; mỗi T^1, T^2, T^3, T^4 độc lập là O, S, NR^i, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino; R^i là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý; và mỗi g, h, i, j, k, l, m, n, và o độc lập là 0 hoặc 1.

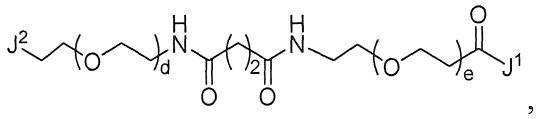
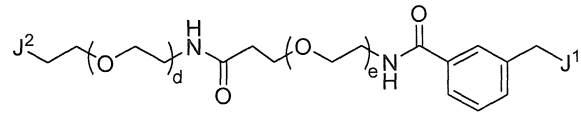
Theo một số phương án, J^2 có thể có hai điểm gắn vào monome miền Fc và miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, hai J^2).

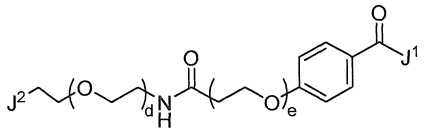
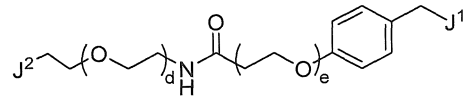
Các trình tự liên kết của công thức (MLI) có thể được sử dụng trong các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 

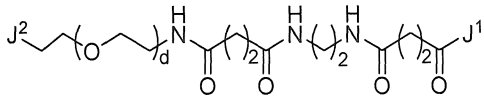
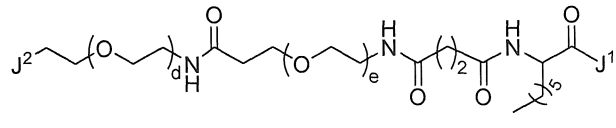
 ,  ,  , hoặc 

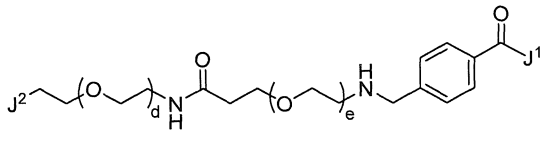
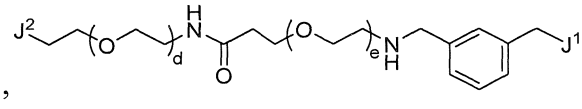
trong đó d là số nguyên từ 1 đến 20 (ví dụ, d là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20).

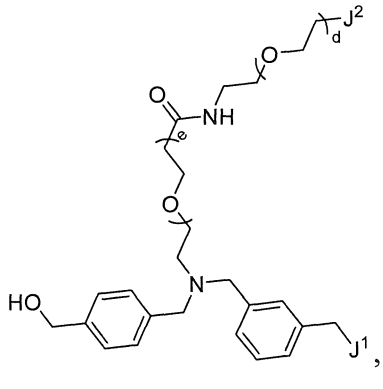
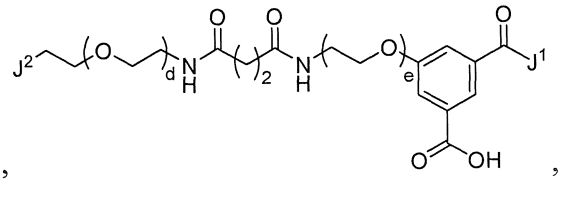
Các trình tự liên kết của công thức (MLI) có thể được sử dụng trong các thể liên hợp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở,  ,

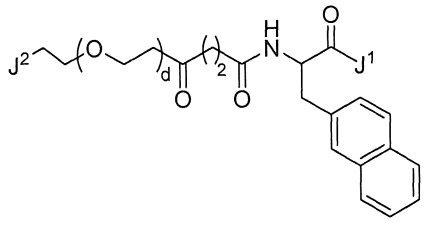
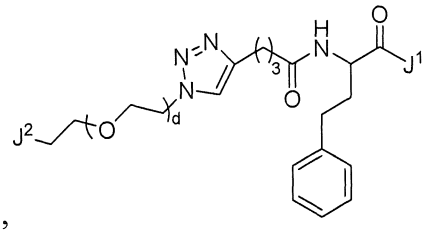
 ,  ,

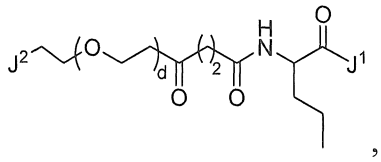
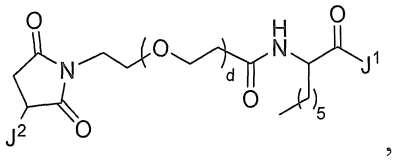
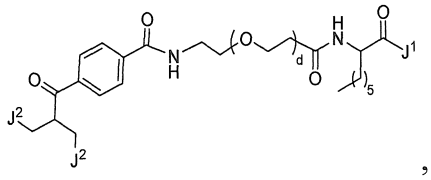
 ,  ,

 ,  ,

 ,  ,

 ,  ,

 ,  ,


,

, và

, trong đó mỗi d và e độc lập là số nguyên từ 1 đến 26.

Nhóm liên kết

Theo một số phương án, trình tự liên kết cung cấp không gian, độ cứng và/hoặc tính linh hoạt giữa chất ức chế neuraminidaza và đơn phân miền Fc, và miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin trong các liên hợp được mô tả ở đây hoặc giữa hai chất ức chế neuraminidaza trong các thể liên hợp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, trình tự liên kết có thể là liên kết, ví dụ, liên kết cộng hóa trị, ví dụ, liên kết amit, liên kết disulfua, liên kết C-O, liên kết C-N, liên kết N-N, liên kết C-S hoặc bất kỳ loại liên kết nào được tạo ra từ phản ứng hóa học, ví dụ, liên hợp hóa học. Theo một số phương án, trình tự liên kết (L hoặc L' như được chỉ ra trong công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) bao gồm không quá 250 nguyên tử (ví dụ, 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14, 1- 16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1-70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160, 1- 170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 hoặc 1-250 nguyên tử; 250, 240, 230, 220, 210, 200 , 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 28 , 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 nguyên tử). Theo một số phương án, trình tự liên kết (L hoặc L) bao gồm không quá 250 nguyên tử không phải là hydro (ví dụ, 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14 , 1-16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1 -70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160 , 1-170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 hoặc 1-250 (các) nguyên tử không phải là hydro; 250, 240, 230 , 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40 , 35, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 nguyên tử không phải là hydro). Theo một số phương án, khung của trình tự liên kết (L hoặc L) bao gồm không quá

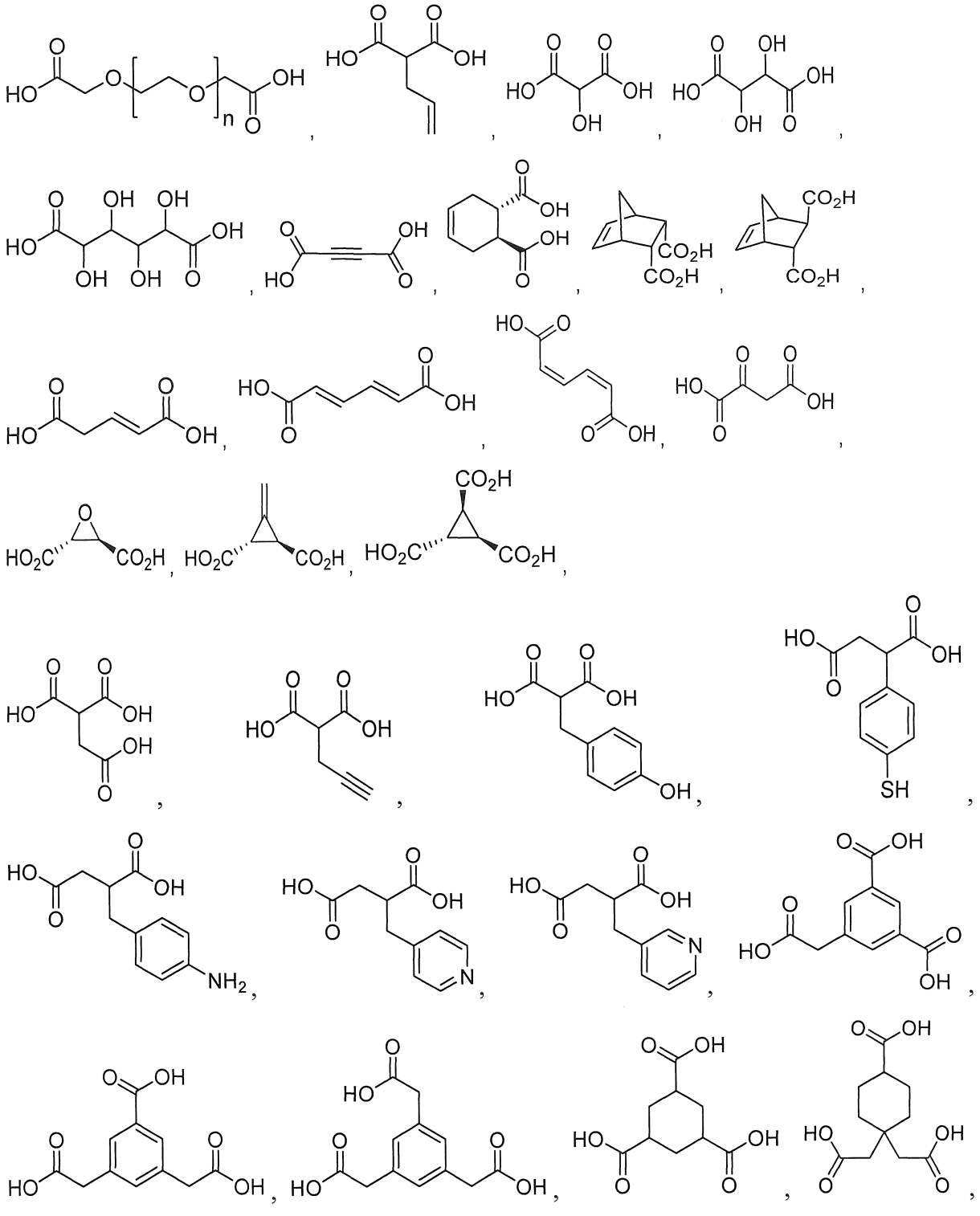
250 nguyên tử (ví dụ, 1- 2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14 , 1-16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1 -70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160 , 1-170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 hoặc 1-250 nguyên tử; 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 nguyên tử). "Khung" của trình tự liên kết dùng để chỉ các nguyên tử trong trình tự liên kết cùng nhau tạo thành con đường ngắn nhất từ phần này của liên hợp đến phần khác của liên hợp. Các nguyên tử trong khung của trình tự liên kết trực tiếp tham gia vào việc liên kết một phần của thể liên hợp với một phần khác của thể liên hợp. Ví dụ, các nguyên tử hydro gắn vào cacbon trong khung của trình tự liên kết không được coi là tham gia trực tiếp vào việc liên kết một phần của thể liên hợp với một phần khác của thể liên hợp.

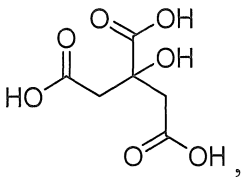
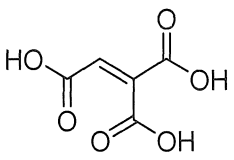
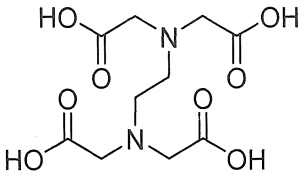
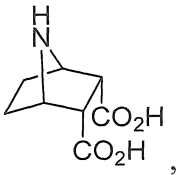
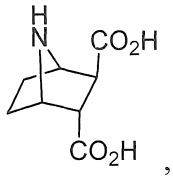
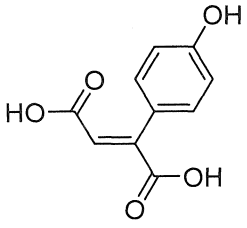
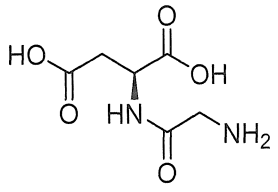
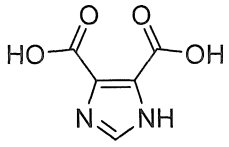
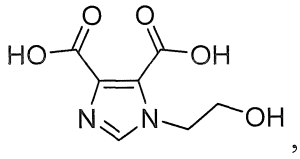
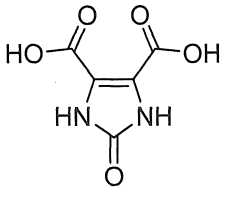
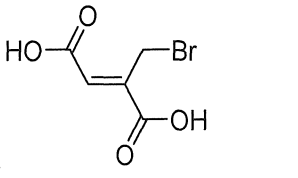
Các phân tử có thể được sử dụng để tạo liên kết (L hoặc L') bao gồm ít nhất hai nhóm chức, ví dụ, hai nhóm axit carboxylic. Theo một số phương án của trình tự liên kết hóa trị ba, hai nhánh của trình tự liên kết có thể chứa hai axit dicarboxylic, trong đó axit carboxylic thứ nhất có thể tạo liên kết cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza thứ nhất trong liên kết và axit carboxylic thứ hai có thể tạo thành liên kết cộng hóa trị với chất ức chế neuraminidaza thứ hai trong liên hợp và nhánh thứ ba của trình tự liên kết có thể tạo liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết CO) với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin trong thể liên hợp. Theo một số phương án của trình tự liên kết hóa trị hai, trình tự liên kết hóa trị hai có thể chứa hai axit carboxylic, trong đó axit carboxylic thứ nhất có thể tạo thành liên kết cộng hóa trị với một thành phần (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza) trong thể liên hợp và axit carboxylic thứ hai có thể tạo thành liên kết cộng hóa trị (ví dụ, liên kết CS hoặc liên kết CN) với thành phần khác (ví dụ, monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin) trong liên kết.

Theo một số phương án, phân tử axit dicarboxylic có thể được sử dụng làm trình tự liên kết (ví dụ, trình tự liên kết axit dicarboxylic). Ví dụ, trong thể liên hợp chứa monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều dime của chất ức chế neuraminidaza, axit carboxylic đầu tiên trong phân tử axit dicarboxylic có

thể tạo liên kết cộng hóa trị với nhóm hydroxyl hoặc amin của chất ức chế neuraminidaza thứ nhất và axit carboxylic thứ hai có thể tạo liên kết cộng hóa trị với nhóm hydroxyl hoặc amin của chất ức chế neuraminidaza thứ hai.

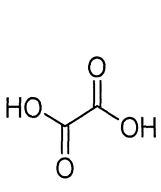
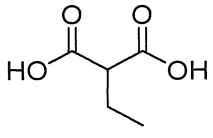
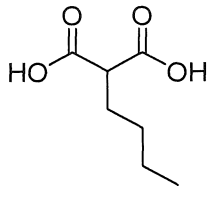
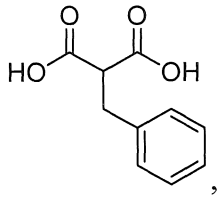
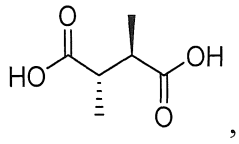
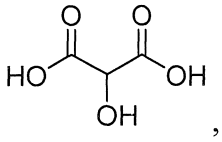
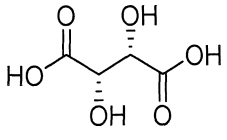
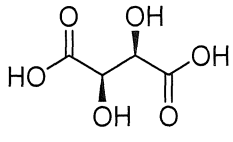
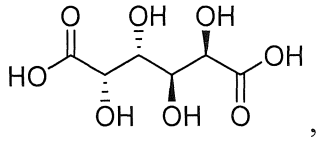
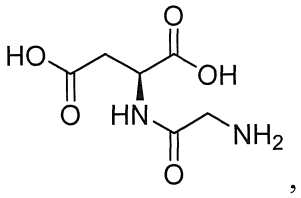
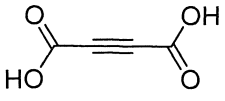
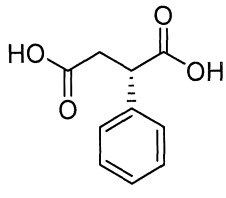
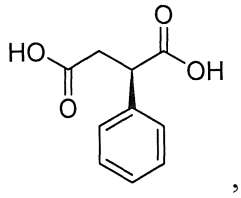
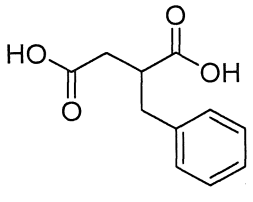
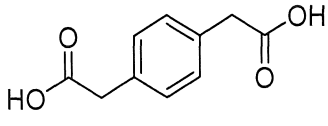
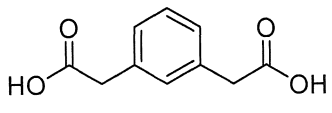
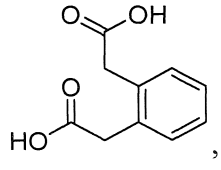
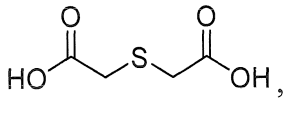
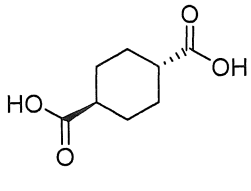
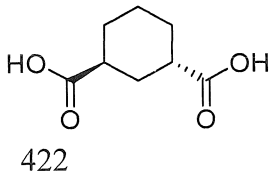
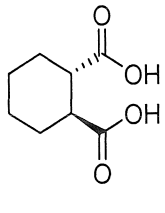
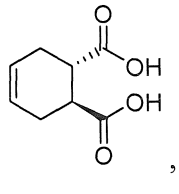
Ví dụ về các phân tử axit dicarboxylic có thể được sử dụng để tạo thành các trình tự liên kết bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

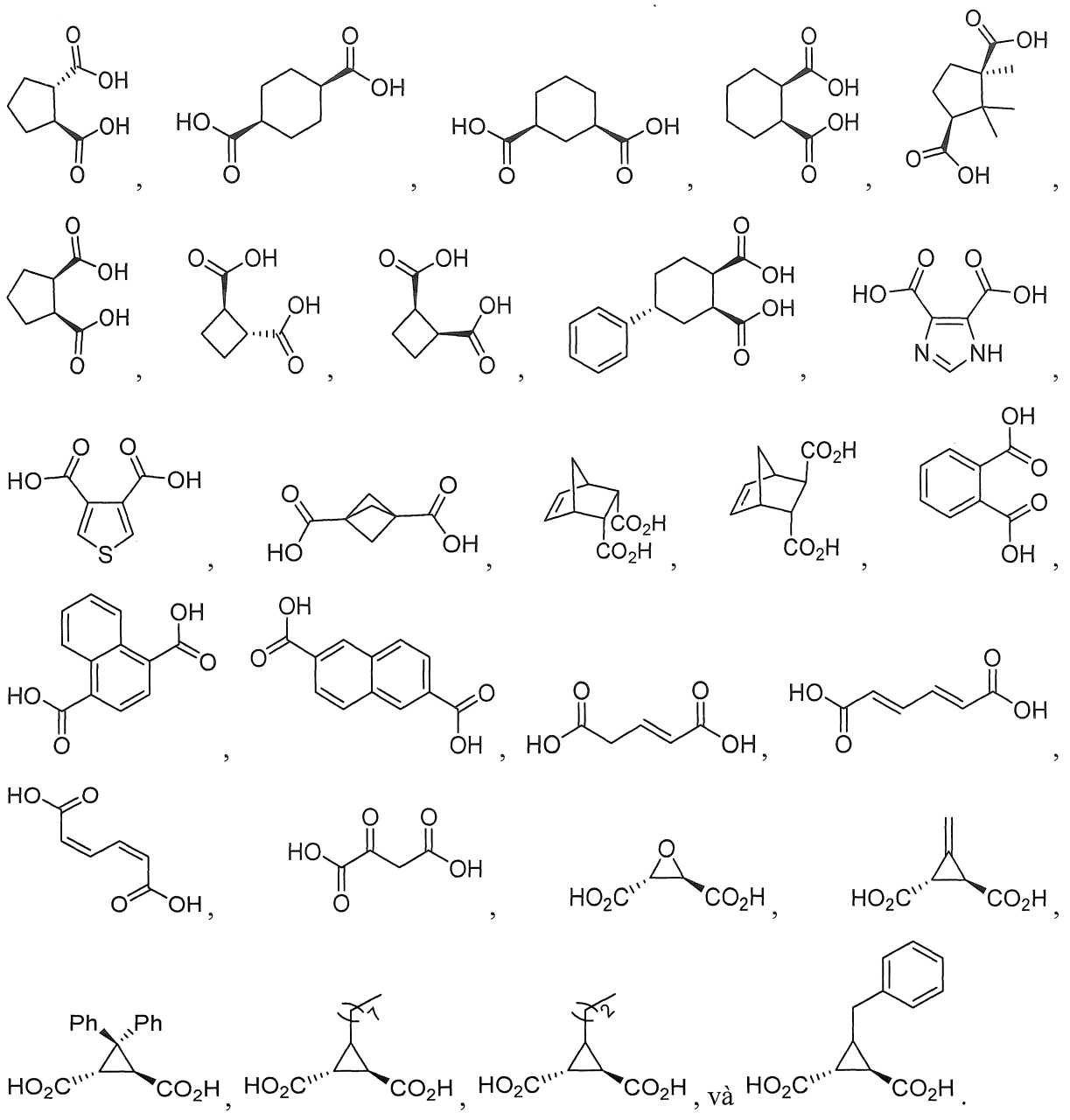


 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , and

trong đó n là số nguyên từ 1 đến 20 (ví dụ, n là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20).

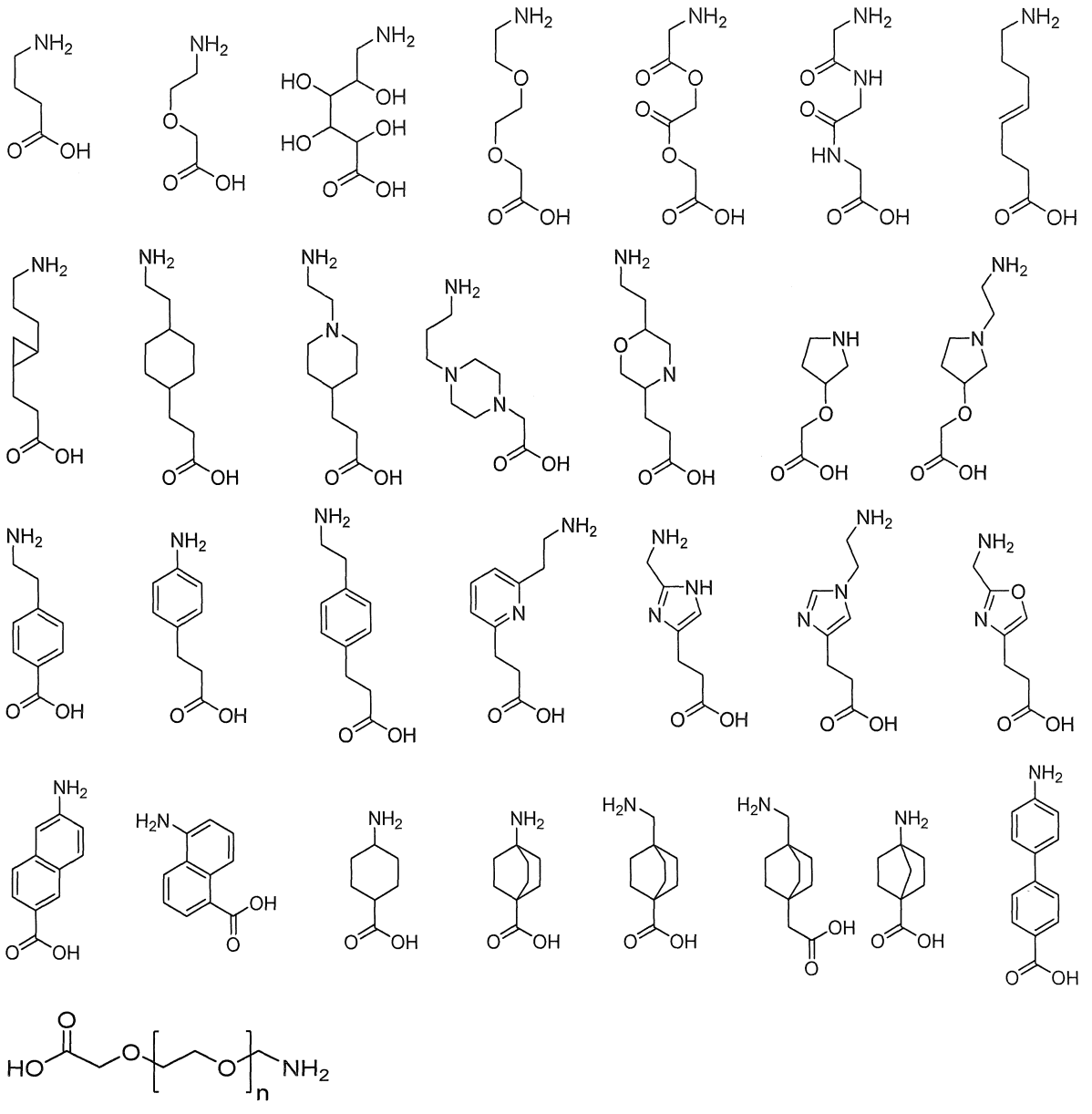
Các ví dụ khác về phân tử axit dicarboxylic có thể được sử dụng để tạo thành các trình tự liên kết bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,



Theo một số phương án, phân tử axit dicarboxylic, chẳng hạn như phân tử được mô tả ở đây, có thể được chức hóa tiếp để chứa một hoặc nhiều nhóm chức bổ sung. Axit dicarboxylic có thể được chức hóa tiếp, ví dụ, để cung cấp điểm gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, bằng trình tự liên kết, chẳng hạn như trình tự liên kết PEG).

Theo một số phương án, khi chất ức chế neuraminidaza được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin, thì nhóm liên kết có thể bao gồm gốc chứa gốc axit carboxylic và gốc amin cách nhau từ 1 đến 25 nguyên tử. Ví dụ về các nhóm liên kết như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

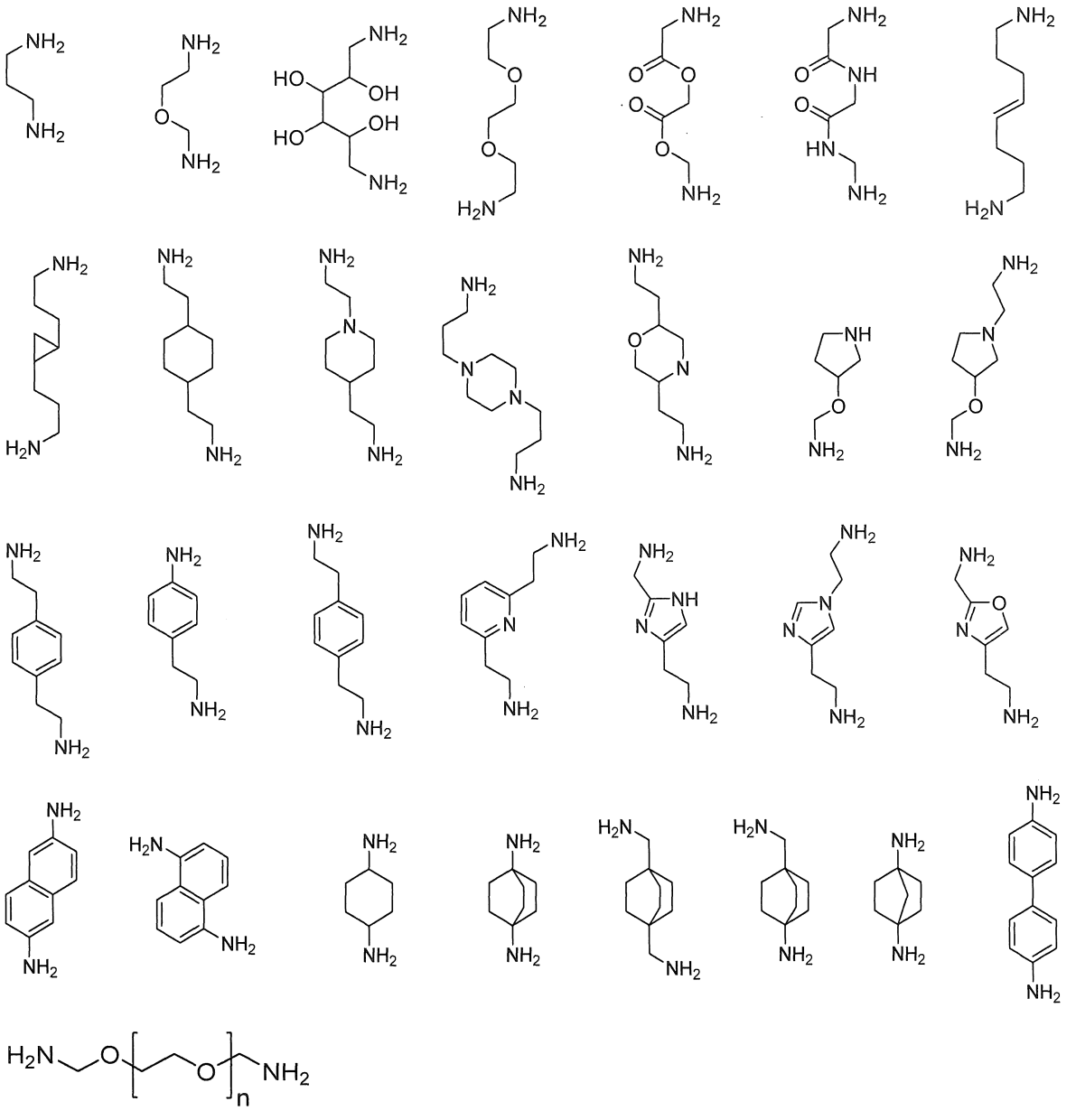


trong đó n là số nguyên từ 1 đến 20 (ví dụ, n là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20).

Theo một số phương án, nhóm liên kết có thể bao gồm gốc chứa gốc axit carboxylic và gốc amin, chẳng hạn như nhóm được mô tả ở đây, có thể được chức hóa tiếp để chứa một hoặc nhiều nhóm chức bổ sung. Các nhóm liên kết như vậy có thể được chức hóa tiếp, ví dụ, để cung cấp điểm gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, bằng trình tự liên kết, chẳng hạn như trình tự liên kết PEG).

Theo một số phương án, khi chất ức chế neuraminidaza được gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin, nhóm liên kết có thể bao gồm gốc chứa hai hoặc nhiều gốc amin (ví

dụ, gốc diamino) cách nhau từ 1 đến 25 nguyên tử. Ví dụ về các nhóm liên kết như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở,



trong đó n là số nguyên từ 1 đến 20 (ví dụ, n là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20).

Theo một số phương án, nhóm liên kết có thể bao gồm gốc diamino, chẳng hạn như nhóm được mô tả ở đây, có thể được chức hóa tiếp để chứa một hoặc nhiều nhóm chức bổ sung. Các nhóm liên kết diamino như vậy có thể được chức hóa tiếp, ví dụ, để cung cấp điểm gắn vào monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin (ví dụ, bằng trình tự liên kết, chẳng hạn như trình tự liên kết PEG).

Theo một số phương án, phân tử chứa nhóm azit có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm azit có thể trải qua quá trình cộng vòng với alkyn để tạo thành liên kết 1,2,3-triazol. Theo một số phương án, phân tử chứa nhóm alkyn có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm alkyn có thể trải qua quá trình cộng vòng với azit để tạo thành liên kết 1,2,3-triazol. Theo một số phương án, phân tử chứa nhóm maleimit có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm maleimit có thể phản ứng với xystein để tạo liên kết C-S. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm axit sulfonic có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm axit sulfonic có thể tạo liên kết sulfonamit với nitơ liên kết trong chất ức chế neuraminidaza. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm isoxyanat có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm isoxyanat có thể tạo liên kết ure với nitơ liên kết trong chất ức chế neuraminidaza. Theo một số phương án, phân tử chứa một hoặc nhiều nhóm haloalkyl có thể được sử dụng để tạo thành trình tự liên kết, trong đó nhóm haloalkyl có thể tạo thành liên kết cộng hóa trị, ví dụ, liên kết C-N và C-O, với chất ức chế neuraminidaza.

Theo một số phương án, trình tự liên kết (L hoặc L') có thể bao gồm nhóm tổng hợp có nguồn gốc từ, ví dụ, polyme tổng hợp (ví dụ, polyme polyetylen glycol (PEG)). Theo một số phương án, trình tự liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, trình tự liên kết có thể là trình tự axit amin (ví dụ, axit amin 1-25, axit amin 1-10, axit amin 1-9, axit amin 1-8, axit amin 1-7, axit amin 1-6 axit, 1-5 axit amin, 1-4 axit amin, 1-3 axit amin, 1-2 axit amin, hoặc 1 trình tự axit amin). Theo một số phương án, trình tự liên kết (L hoặc L') có thể bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý (ví dụ, đơn vị PEG), C2-C20 alkenylen được thế tùy ý (ví dụ, C2 alkenylen), C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý (ví dụ, xyclopropylen, xyclobutylen), C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý (ví dụ, C6 arylen), C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý (ví dụ, imidazol, pyridin), O, S, NR^i (R^i là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl

được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý), P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino.

Hóa học liên hợp

Monome hoặc dime của chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, ở thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) có thể được liên hợp với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin, hoặc peptit liên kết với protein albumin, ví dụ, bằng trình tự liên kết, bằng trình tự liên kết, bằng phương pháp hóa học liên hợp tiêu chuẩn bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp hóa học liên hợp sau đây được đề cập cụ thể, ví dụ, để liên hợp trình tự liên kết PEG (ví dụ, trình tự liên kết PEG được chức hóa) với monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc liên kết với protein albumin peptit.

Sự liên hợp cộng hóa trị của hai hoặc nhiều thành phần trong một thể liên hợp bằng cách sử dụng trình tự liên kết có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp và kỹ thuật tổng hợp hóa học hữu cơ đã biết. Các nhóm chức bổ sung trên hai thành phần có thể phản ứng với nhau để tạo thành liên kết cộng hóa trị. Ví dụ về các nhóm chức phản ứng bổ sung bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic và amin hoạt hóa, isoxyanat và amin, azit và alkyn, alken và tetrazin. Sự liên hợp đặc hiệu vị trí với polypeptit (ví dụ, monome miền Fc, miền Fc, peptit liên kết với Fc, protein albumin hoặc peptit liên kết với protein albumin) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật lấy làm ví dụ về sự liên hợp đặc hiệu vị trí của phân tử nhỏ với miền Fc được cung cấp trong Agarwall. P., et al. Bioconjugate Chem. 26:176-192 (2015).

Các ví dụ khác về các nhóm chức có khả năng phản ứng với các nhóm amin bao gồm, ví dụ, các tác nhân alkyl hóa và axyl hóa. Các tác nhân alkyl hóa đại diện bao gồm: (i) nhóm α-haloaxetyl, ví dụ, XCH_2CO- (trong đó X=Br, Cl, hoặc I); (ii)

nhóm N-maleimit, có thể phản ứng với các nhóm amin thông qua phản ứng kiểu Michael hoặc thông qua quá trình axyl hóa bằng cách bổ sung vào nhóm cacbonyl vòng; (iii) aryl halogenua, ví dụ, nhóm nitrohalo thơm; (iv) alkyl halogenua; (v) aldehyt hoặc xeton có khả năng tạo bazơ Schiff với các nhóm amin; (vi) epoxit, ví dụ, epiclohydrin và bisoxiran, có thể phản ứng với các nhóm amino, sulfhydryl, hoặc hydroxyl phenol; (vii) hợp chất chứa clo của s-triazin, phản ứng với chất ái nhân như nhóm amino, sufhydryl và hydroxyl; (viii) aziridin, phản ứng với chất ái nhân như nhóm amin bằng cách mở vòng; (ix) dietyl este của axit squaric; và (x) α-haloalkyl ete.

Ví dụ về các nhóm axyl hóa phản ứng với amin bao gồm, ví dụ, (i) isoxyanat và isothioxyanat; (ii) sulfonyl clorua; (iii) halogenua axit; (iv) este hoạt động, ví dụ, nitrophenyleste hoặc este N-hydroxysuxinimidyl, hoặc các dẫn xuất của chúng (ví dụ, este azido-PEG_2-PEG_{40}-NHS); (v) anhidrit axit, ví dụ, hỗn hợp, đối xứng, hoặc N-cacboxyanhydrit; (vi) axylazit; và (vii) imidoeste. Aldehyt và keton có thể phản ứng với các amin để tạo thành bazơ Schiff, mà có thể được ổn định thông qua phản ứng amin hóa khử.

Người ta đánh giá cao rằng một số nhóm chức nhất định có thể được chuyển đổi thành các nhóm chức khác trước khi phản ứng, ví dụ, để tạo ra khả năng phản ứng hoặc độ chọn lọc bổ sung. Ví dụ về các phương pháp hữu ích cho mục đích này bao gồm chuyển đổi amin thành carboxyl bằng cách sử dụng các thuốc thử như anhydrit dicarboxylic; chuyển đổi amin thành thiol bằng cách sử dụng thuốc thử như N-axetylhomoxystein thiolacton, S-axetylmercaptosuxinic anhydrit, 2-iminothiolan, hoặc dẫn xuất suxinimidyl chứa thiol; chuyển đổi thiol thành carboxyl bằng cách sử dụng các thuốc thử như α-haloaxetat; chuyển đổi thiol thành amin bằng cách sử dụng thuốc thử như etylenimin hoặc 2-bromoetylamin; chuyển đổi carboxyl thành amin bằng cách sử dụng thuốc thử như carbodiimit, tiếp theo là diamit; và chuyển đổi rượu thành thiol bằng cách sử dụng thuốc thử như tosyl clorua, tiếp theo là phản ứng chuyển hóa este với thioaxetat và thủy phân thành thiol bằng natri axetat.

Theo một số phương án, trình tự liên kết theo sáng chế (ví dụ, L hoặc L', chẳng hạn như L^C của DLI), được liên hợp (ví dụ, bằng phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây) thành E (ví dụ, miền Fc hoặc protein albumin). Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, trình tự liên kết được liên hợp bằng: (a) liên kết thioure (tức là, -NH(C=S)NH-) với lysin của E; (b) liên kết carbamat (tức là, -NH(C=O)-O) với lysin

của E; (c) liên kết amin bằng amin hóa khử (tức là -$NHCH_2$) giữa lysin và E; (d) amit (tức là, -NH-(C=O)CH_2) thành lysin của E; (e) liên hợp xystein-maleimit giữa maleimit của trình tự liên kết với xystein của E; (f) liên kết amin bằng anin hóa khử (ví dụ, -$NHCH_2$) giữa trình tự liên kết và hydrat cacbon của E (ví dụ, nhóm glycosyl của monome miền Fc hoặc miền Fc); (g) cộng hợp xystein được tạo lại liên kết cầu, trong đó trình tự liên kết được liên hợp với hai xystein của E; (h) liên kết oxim giữa trình tự liên kết và hydrat cacbon của E (ví dụ, nhóm glycosyl của monome miền Fc hoặc miền Fc); (i) liên kết oxim giữa trình tự liên kết và gốc axit amin của E; (j) liên kết azido giữa trình tự liên kết và E; (k) axyl hóa trực tiếp của trình tự liên kết thành E; hoặc (l) liên kết thioete giữa trình tự liên kết và E.

Theo một số phương án, trình tự liên kết được liên hợp với E, trong đó liên kết bao gồm cấu trúc -NH(C=NH)X-, trong đó X là O, HN hoặc liên kết. Theo một số phương án, trình tự liên kết được liên hợp với E, trong đó liên kết giữa phần còn lại của trình tự liên kết và E bao gồm cấu trúc -NH(C=O)NH-.

Theo một số phương án, trình tự liên kết (ví dụ, este hoạt động, ví dụ, nitrophenyleste hoặc este N-hydroxysuxinimidyl, hoặc các dẫn xuất của chúng (ví dụ, trình tự liên kết PEG được chức hóa (ví dụ, este azido-PEG_2-PEG_{40}-NHS), được liên hợp với E, với T là (ví dụ, DAR) từ 0,5 đến 10,0, ví dụ, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 hoặc 10,0. Trong những trường hợp này, E-(PEG_2-PEG_{40})-azit có thể phản ứng với Int có trình tự liên kết alkyne tận cùng (ví dụ, L, hoặc L', chẳng hạn như L^C của D-L-I) thông qua liên hợp click. Trong quá trình liên hợp click, phản ứng được xúc tác bằng đồng của azit (ví dụ, Fc-(PEG_2-PEG_{40})-azit) với alkyn (ví dụ, Int có trình tự liên kết alkyn tận cùng (ví dụ, L hoặc L', chẳng hạn như L^C của D-L-I) tạo thành vòng nguyên tử khác loại có 5 cạnh. Theo một số phương án, trình tự liên kết được liên kết với E là alkyne tận cùng và được liên hợp với Int có azit tận cùng. Các phương pháp điều chế lấy làm ví dụ của chế phẩm E-(PEG_2-PEG_{40})-azit được mô tả trong các Ví dụ 7, 8, 61, 84, 88 và 124. Các liên hợp lấy làm ví dụ được điều chế thông qua liên hợp click được thể hiện trên các Fig. 43, 61, và 102. Quy trình

liên hợp hóa học click được mô tả trên Fig. 103. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu được sản phẩm cuối cùng từ quy trình liên hợp hóa học click.

Các chiến lược liên kết mẫu (ví dụ, các phương pháp liên kết một monome hoặc một dime của chất ức chế neuraminidaza với E, chẳng hạn như, thông qua trình tự liên kết) được mô tả thêm trong các Fig. 1, 28, 29, 30, 43 và 61.

VI. Các liệu pháp kết hợp

Chất kháng virut

Theo một số phương án, một hoặc nhiều hợp chất kháng virut có thể được sử dụng kết hợp (ví dụ, được sử dụng đồng thời về cơ bản (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt) hoặc được sử dụng riêng biệt vào những thời điểm khác nhau) với thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)).

Chất kháng virut có thể được sử dụng đồng thời về cơ bản (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt) như các thể liên hợp, hoặc có thể được sử dụng trước hoặc sau các thể liên hợp (ví dụ, trong khoảng thời gian 1 ngày, 2 ngày, 5, ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 6 tháng hoặc 12 tháng hoặc hơn). Theo một số phương án, thể liên hợp được sử dụng bằng cách tiêm (ví dụ, tiêm bắp, tiêm trong da, tiêm trong mũi hoặc tiêm dưới da), và hợp chất kháng virut được sử dụng qua đường miệng. Tốt nhất là, thể liên hợp được dùng theo đường tĩnh mạch, và chất kháng virut được dùng qua đường miệng.

Theo một số phương án, thể liên hợp được sử dụng dự phòng (ví dụ, trước khi đối tượng tiếp xúc với virut) và chất kháng virut được sử dụng sau khi đối tượng bị lây nhiễm virut, được cho là bị lây nhiễm virut hoặc đã tiếp xúc với virut. Theo một số phương án, thể liên hợp và chất kháng virut đều được sử dụng sau khi đối tượng bị lây nhiễm virut, được cho là bị lây nhiễm virut hoặc đã tiếp xúc với virut. Theo một số phương án, thể liên hợp và chất kháng virut đều được sử dụng dự phòng.

Thể liên hợp và chất kháng virut có thể được bào chế trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt. Theo các phương án được ưu tiên, thể liên hợp và chất kháng virut được bào chế trong các dược phẩm riêng biệt (ví dụ, được bào

chế cho các đường dùng khác nhau). Theo một số phương án, thể liên hợp và chất kháng virut được sử dụng đồng thời (ví dụ, về cơ bản là cùng một thời điểm, chẳng hạn như trong vòng 5 phút, 30 phút, 1-6 giờ, 1-12 giờ hoặc 1 ngày) hoặc tuần tự (ví dụ, vào các thời điểm khác nhau, chẳng hạn như cách nhau hơn 1 ngày). Với điều kiện chất kháng virut và thể liên hợp được sử dụng tuần tự, chất kháng virut được dùng theo tỷ lệ 1-50 (ví dụ, 1-15, 10-25, 20-35, 30-45, hoặc 35-50) lần sau khi sử dụng thể liên hợp (ví dụ, các lần dùng 1 ngày, 2, ngày, 5, ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 6 tháng, hoặc 12 tháng, hoặc nhiều hơn sau khi liên hợp).

Trong một số trường hợp, chất kháng virut được sử dụng cho đối tượng cần thuốc một hoặc nhiều lần (ví dụ, 1-10 lần hoặc nhiều hơn; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 lần) hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng, sáu tháng, hàng năm hoặc khi cần về mặt y tế sau khi sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) hoặc (M'-I)).

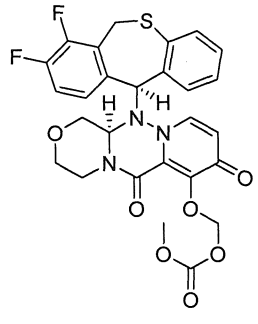
Theo một số phương án, chất kháng virut là chất kháng virut để điều trị virut cúm. Ví dụ, chất kháng virut có thể là chất phong bế kênh ion M2, chất ức chế neuraminidaza (ví dụ, chất ức chế neuraminidaza tác dụng kéo dài), chất ức chế polymeraza, chất ức chế hemagglutinin, chất ức chế protein liên hợp, chất ức chế COX-2 hoặc chất chủ vận PPAR. Chất kháng virut có thể nhắm mục tiêu vào virut hoặc vật chủ. Chất kháng virut để điều trị virut cúm được sử dụng kết hợp với thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của một trong các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) hoặc (M'-I)) có thể được chọn từ pimovidir, oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir, CS-8958, amantadin, rimantadin, xyanovirin-N, chất ức chế endonucleaza phụ thuộc vào mũ (ví dụ, baloxavir marboxil), chất ức chế polymeraza (ví dụ, T-705), chất ức chế PB2 (ví dụ, JNJ-63623872), sialidaza được liên hợp (ví dụ, DAS181), thiazolit (ví dụ, nitazoxanit), chất ức chế COX, chất chủ vận PPAR, kháng thể nhắm mục tiêu vào hemagglutinin (ví dụ, kháng thể đơn dòng như CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A, hoặc VIS410), hoặc siRNA (ARN can thiệp nhỏ) nhắm mục tiêu vào vật chủ hoặc gen virut, hoặc tiền chất của chúng, hoặc muối dược dụng của chúng .

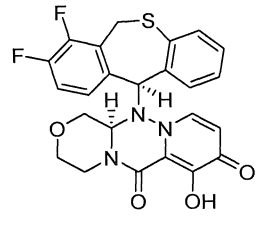
Tốt hơn là, chất kháng virut được hướng đến mục tiêu điều trị khác với thể liên hợp, ví dụ, chất phong bế kênh ion M2, chất ức chế polymeraza, chất ức chế hemagglutinin, chất ức chế sao chép virut (ví dụ, chất ức chế endonucleaza phụ thuộc

vào mũ), chất ức chế protein liên hợp, chất ức chế COX-2, hoặc chất chủ vận PPAR. Tốt nhất là, chất kháng virut là chất ức chế endonucleaza phụ thuộc vào mũ (ví dụ, baloxavir marboxil). Theo một số phương án, chất kháng virut được sử dụng kết hợp với thể liên hợp được mô tả theo công thức (D-II-6). Theo một số phương án, chất kháng virut được sử dụng kết hợp với thể liên hợp được mô tả theo công thức (D-II-7). Theo các phương án được ưu tiên, chất kháng virut (ví dụ, baloxavir marboxil) được sử dụng kết hợp với thể liên hợp được mô tả theo công thức (D-II-6). Tốt nhất là, chất kháng virut (ví dụ, baloxavir marboxil) được sử dụng kết hợp với thể liên hợp được mô tả (D-II-7). Tốt hơn nữa, thể liên hợp là thể liên hợp 45 hoặc thể liên hợp 46.

Baloxavir

Theo một số phương án, baloxavir marboxil (BXM, dạng tiền chất) hoặc axit baloxavir (BXA, dạng hoạt động) hoặc muối bất kỳ của chúng (Omoto et al. Scientific Reports. 8:9633, 2018; Japic CTI-153090; Japic CTI-163417; mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ) có thể được sử dụng kết hợp (ví dụ, được sử dụng đồng thời về cơ bản (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt) hoặc được sử dụng riêng biệt vào những thời điểm khác nhau) với thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) hoặc (M'-I)) .



;


.

(Baloxavir marboxil) (Axit baloxavir)

Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến khoảng 3000 mg, tốt hơn là khoảng 0,1 mg đến khoảng 1000 mg, tốt hơn là khoảng 10 mg đến khoảng 100 mg (ví dụ, khoảng 10 mg, khoảng 20 mg, khoảng 30 mg, khoảng 40 mg, khoảng 50 mg, khoảng 60 mg, khoảng 70 mg, khoảng 80 mg, khoảng 90 mg, hoặc khoảng 100 mg) cho mỗi người lớn một ngày, nếu cần thiết, bằng cách chia nhỏ. Theo một số

phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng với liều lượng hoặc tần suất giảm so với tiêu chuẩn chăm sóc khi được sử dụng kết hợp với thể liên hợp. Thể liên hợp có thể được sử dụng với liều lượng được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng thường xuyên hơn thể liên hợp. Ví dụ, thể liên hợp có thể được dùng 12 tháng, 6 tháng, 3 tháng, 2 tháng, 1 tháng, 3 tuần một lần, 2 tuần một lần hoặc hàng tuần. Baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng có thể được sử dụng ba lần mỗi ngày, hai lần mỗi ngày, một lần mỗi ngày, một lần mỗi 2-6 ngày, một lần mỗi tuần hoặc hai tuần một lần. Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng, được sử dụng một hoặc nhiều lần (ví dụ, 1-10 lần hoặc nhiều hơn; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 lần hoặc hơn) sau (ví dụ, trong vòng 6 tháng, 3 tháng, 2 tháng, 1 tháng, 3 tuần, 2 tuần hoặc 1 tuần) khi sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng qua đường miệng.

Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng, ví dụ, qua đường miệng, với liều lượng từ khoảng 0,01 mg đến khoảng 1000 mg, tốt hơn là khoảng 0,05 mg đến khoảng 500 mg, mỗi ngày. Dạng bào chế và hàm lượng của baloxavir marboxil (XOFLUZA™) là đã biết, với một liều dùng qua đường miệng 40 mg duy nhất cho người lớn từ 40 đến <80 kg và một liều dùng qua đường miệng duy nhất 80 mg cho người lớn ≥80 kg. Dạng bào chế và hàm lượng của baloxavir marboxil (XOFLUZA ™) cho đối tượng trẻ em (ví dụ, đối tượng ≥12 tuổi và ≥40 kg) là đã biết, với một liều dùng qua đường miệng 40 mg duy nhất cho đối tượng trẻ em 40 đến <80 kg và một liều dùng qua đường miệng 80 mg duy nhất cho trẻ em ≥80 kg.

Khi được sử dụng kết hợp với thể liên hợp theo sáng chế, hiệu quả của baloxavir (ví dụ, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng) có thể được tăng cường, ví dụ, bằng tương tác hiệp đồng của baloxavir và thể liên hợp. Điều này có thể cho phép sử dụng baloxavir với liều lượng giảm (ví dụ, so với tiêu chuẩn chăm sóc lâm sàng hiện tại) mà không làm mất tác dụng. Điều này có lợi thế là làm giảm các tác dụng phụ liên quan đến việc sử dụng baloxavir. Theo một số phương án, baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối của chúng được sử dụng với liều lượng giảm hoặc

liều cận lâm sàng (ví dụ, được sử dụng ở liều thấp hơn so với liều không có thể liên hợp được mô tả ở đây và/hoặc thấp hơn tiêu chuẩn chăm sóc lâm sàng hiện tại (ví dụ, liều thấp hơn liều dùng qua đường miệng 40 mg (ví dụ, dùng qua đường miệng từ 0,01 mg đến 40 mg (ví dụ, 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 5,0 mg, 7,5 mg, 10 mg, 15 mg, 18 mg, 20 mg, 23 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, hoặc 38 mg liều))). Baloxavir marboxil (XOFLUZA™) có thể được cung cấp với lượng bất kỳ đủ để điều trị nhiễm virut cúm ở đối tượng trước đây đã từng được sử dụng thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây.

Vắc-xin kháng virut

Theo một số phương án, thể liên hợp bất kỳ trong số các liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của một trong các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M-XI), hoặc (M'-I)) được sử dụng kết hợp với vắc-xin kháng virut (ví dụ, chế phẩm tạo ra phản ứng miễn dịch ở đối tượng hướng đến chống lại virut). Vắc-xin kháng virut có thể được sử dụng đồng thời về cơ bản (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt) như các thể liên hợp, hoặc có thể được sử dụng trước hoặc sau các thể liên hợp (ví dụ, trong khoảng thời gian 1 ngày, 2 ngày, 5, ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 6 tháng hoặc 12 tháng hoặc hơn).

Theo một số phương án, vắc-xin virut bao gồm chất miễn dịch tạo ra phản ứng miễn dịch ở đối tượng chống lại virut cúm A, B, C hoặc virut á cúm. Theo một số phương án, chất sinh miễn dịch là virut bất hoạt (ví dụ, vắc-xin là vắc-xin cúm hóa trị ba chứa virut cúm A, B, C hoặc virut á cúm chứa nguyên liệu đã được tinh chế và bất hoạt hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng). Theo một số phương án, vắc-xin được tiêm dưới dạng tiêm bắp. Theo một số phương án, vắc-xin là vắc-xin virut sống chứa virut sống đã được giảm độc lực (làm yếu). Theo một số phương án, vắc-xin được sử dụng dưới dạng thuốc xịt mũi.

VII. Phương pháp

Các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm, ví dụ, các phương pháp bảo vệ chống lại hoặc điều trị nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm) ở đối tượng và các phương pháp ngăn ngừa, ổn định hoặc ức chế sự phát triển của các hạt virut. Phương pháp điều trị nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm) ở đối tượng bao gồm bước sử

dụng thể liên hợp được mô tả ở đây cho đối tượng (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (DI)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng. Theo một số phương án, lây nhiễm virut là do virut cúm gây ra (ví dụ, virut cúm A, B, C hoặc virut á cúm). Theo một số phương án, lây nhiễm virut là do một chủng virut kháng thuốc. Phương pháp ngăn chặn, ổn định hoặc ức chế sự phát triển của các hạt virut hoặc ngăn chặn sự sao chép và lây lan của virut bao gồm bước tiếp xúc với virut hoặc vị trí dễ bị virut phát triển với thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của công thức bất kỳ (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng.

Sáng chế cũng cung cấp phương pháp bảo vệ chống lại hoặc điều trị nhiễm virut (ví dụ, lây nhiễm virut cúm) ở đối tượng có hoặc có nguy cơ phát triển bệnh lây nhiễm thứ phát (ví dụ, lây nhiễm vi khuẩn thứ cấp, lây nhiễm virut thứ cấp hoặc thứ phát nhiễm nấm), trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng một thể liên hợp hoặc chế phẩm được mô tả ở đây. Sáng chế còn cung cấp thêm phương pháp ngăn ngừa lây nhiễm thứ phát ở đối tượng được chẩn đoán là bị lây nhiễm cúm, trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng một thể liên hợp hoặc chế phẩm được mô tả ở đây. Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát là lây nhiễm do vi khuẩn (ví dụ, Staphylococcus aureus kháng methixilin (MRSA), Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa và/hoặc Haemophilus influenzae), lây nhiễm virut hoặc nhiễm nấm. Theo các phương án cụ thể, lây nhiễm thứ phát là MRSA. Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát là S. pneumoniae. Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát là lây nhiễm đường hô hấp (ví dụ, lây nhiễm đường hô hấp). Theo một số phương án, lây nhiễm thứ phát có liên quan đến (ví dụ, nguyên nhân) viêm phổi (ví dụ, viêm phổi do vi khuẩn hoặc virut). Theo một số phương án, đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh viêm phổi.

Hơn nữa, các phương pháp được mô tả ở đây cũng bao gồm các phương pháp bảo vệ chống lại hoặc điều trị nhiễm virut ở đối tượng bằng cách sử dụng cho đối tượng một thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của một trong các công thức (1)-(5), (DI)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) hoặc (M'-I)). Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc sử dụng chất kháng virut cho đối tượng hoặc vắc-xin kháng virut.

Các phương pháp được mô tả ở đây cũng bao gồm các phương pháp bảo vệ chống lại hoặc điều trị nhiễm virut ở đối tượng bằng cách sử dụng cho đối tượng này (1) thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của một trong các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) và (2) chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut. Các phương pháp được mô tả ở đây cũng bao gồm các phương pháp ngăn chặn, ổn định hoặc ức chế sự phát triển của các hạt virut hoặc ngăn chặn sự sao chép hoặc lây lan của virut, bằng cách cho virut hoặc vị trí dễ bị virut phát triển tiếp xúc với (1) thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) hoặc (M'-I)) và (2) chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut.

Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M- XI), hoặc (M'-I)) được sử dụng trước tiên, tiếp theo là sử dụng chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut một mình. Theo một số phương án, chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut được sử dụng trước tiên, tiếp theo là sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây một mình. Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut về cơ bản được sử dụng đồng thời (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt). Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây hoặc hợp chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut được sử dụng trước tiên, tiếp theo là sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut về cơ bản là đồng thời (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt). Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut được sử dụng trước tiên về cơ bản đồng thời (ví dụ, trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm riêng biệt), tiếp theo là sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây hoặc chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut một mình. Theo một số phương án, khi thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M -XI), hoặc (M'-I)) và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut được sử dụng cùng nhau (ví dụ, về cơ bản đồng thời trong cùng một dược phẩm hoặc riêng biệt, hoặc riêng biệt trong cùng một phác đồ điều trị), ức chế sự sao chép của virut của mỗi thể liên hợp và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut có thể lớn hơn (ví dụ, xảy ra ở nồng độ thấp hơn) so với việc ức chế sự sao chép của virut của từng

thể liên hợp và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut khi chúng được sử dụng đơn lẻ trong phác đồ điều trị.

VIII. Dược phẩm và chế phẩm dược

Thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được bào chế trong dược phẩm để sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được bào chế trong dược phẩm. Theo một số phương án, thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được bào chế kết hợp với chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut trong dược phẩm. Theo một số phương án, dược phẩm chứa thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp được mô tả theo công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M-XI), hoặc (M'-I)) và chất mang và tá dược dược dụng.

Chất mang và tá dược được chấp nhận trong dược phẩm không gây độc cho đối tượng nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng. Chất mang và tá dược được chấp nhận có thể bao gồm chất đệm như phosphat, xitrat, HEPES và TAE, chất chống oxy hóa như axit ascorbic và methionin, chất bảo quản như hexamethoni clorua, octadexyldimetylbenzyl amoni clorua, resorxinol và benzalkoni clorua, protein như albumin huyết thanh người, gelatin, dextran, và các globulin miễn dịch, các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon, các gốc axit amin như glyxin, glutamin, histidin và lysin, và các hydrat cacbon như glucoza, mannoza, sucroza và sorbitol.

Ví dụ về các tá dược khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống bám dính, chất kết dính, chất phủ, chất trợ nén, chất gây rã, thuốc nhuộm, chất làm mềm, chất nhũ hóa, chất độn (chất pha loãng), chất tạo màng hoặc chất phủ, hương liệu, nước hoa, chất trượt (chất tăng độ chảy), chất bôi trơn, chất hấp thụ, chất tạo huyền phù hoặc chất phân tán, hoặc chất làm ngọt. Tá dược ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở: hydroxytoluen được butyl hóa (BHT), canxi cacbonat, canxi phosphat (diaxit), canxi stearat, croscarmeloza, polyvinyl pyrolidon được tạo liên kết chéo, axit xitric, crospovidon, xystein, etylxenluloza, gelatin, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, lactoza, magie stearat, maltitol, mannitol, methionin, metylxenluloza, metyl paraben, xenluloza vi tinh thể, polyetylen glycol, povidon, tinh bột biến tính, propyl paraben, retinyl palmitat, senlac, silic dioxit, natri carboxymetyl xenluloza,

natri xitrat, natri tinh bột glycolat, sorbitol, tinh bột (ngô), axit stearic, axit stearic, sucroza, bột talc, titan dioxit, vitamin A, vitamin E, vitamin C và xylitol.

Các thể liên hợp ở đây có thể có các nhóm ion hóa để có khả năng điều chế dưới dạng muối dược dụng. Các muối này có thể là muối cộng axit liên quan đến axit vô cơ hoặc hữu cơ hoặc các muối có thể, trong trường hợp các dạng axit của các thể liên hợp ở đây được điều chế từ bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Thông thường, các thể liên hợp được điều chế hoặc sử dụng dưới dạng muối dược dụng được điều chế dưới dạng sản phẩm cộng của axit hoặc bazơ dược dụng. Các axit và bazơ dược dụng thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn như axit clohydric, axit sulfuric, axit bromhydric, axit axetic, axit lactic, axit xitric hoặc axit tartaric để tạo thành các muối cộng axit và kali hydroxit, natri hydroxit, amoni hydroxit, cafein, các loại amin khác nhau, và các chất tương tự để tạo thành muối bazơ. Các phương pháp điều chế muối thích hợp đã được thiết lập tốt trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các muối cộng axit đại diện bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối axetat, adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, xitrat, xyclopentanpropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, fumarat, glucoheptonat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptonat, hexanoat, hydrobromua, hydroclorua, hydroiodua, 2-hydroxy-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauryl sulfat, malat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naphtalensulfonat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, phosphat, picrat, pivalat, propionat, stearat, suxinat, sulfat, tartrat, thioxyanat, toluensulfonat, undecanoat, và valerat. Muối kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ đại diện bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri, lithi, kali, canxi, và magie, cũng như amoni không độc, amoni bậc bốn và cation amin, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, amoni, tetrametylamoni, tetraetylamoni, metylamin, dimetylamin, trimetylamin, trietylamin, và etylamin.

Tùy thuộc vào đường dùng và liều lượng, thể liên hợp ở đây hoặc dược phẩm chứa chúng được sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây sẽ được bào chế thành dược phẩm thích hợp để cho phép phân phối dễ dàng. Thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được bào chế để dùng tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch (ví dụ, dưới dạng dung dịch vô trùng và trong hệ dung môi

thích hợp để sử dụng tĩnh mạch), tiêm dưới da, tiêm động mạch, tiêm phúc mạc, tiêm nội sụn, tiêm não, tiêm khớp, tiêm tiền liệt tuyến, tiêm màng phổi, tiêm khí quản, tiêm mũi, tiêm thủy tinh thể, tiêm âm đạo, tiêm trực tràng, bôi ngoài da, tiêm u, phúc mạc, tiêm dưới da, kết mạc, tiêm bàng quang, niêm mạc, tiêm màng tim, tiêm rốn, tiêm nhãn, dùng qua đường miệng (ví dụ, viên nén, viên nang, viên nang cứng, viên nang gel, hoặc si-rô), bôi ngoài da (ví dụ, kem, gel, lotion hoặc thuốc mỡ), dùng khu trú, hít, tiêm hoặc truyền (ví dụ, truyền liên tục, truyền dịch tại chỗ trực tiếp vào tế bào đích, ống thông, rửa, trong kem hoặc chế phẩm lipit). Tùy thuộc vào đường dùng, thể liên hợp ở đây hoặc dược phẩm chứa chúng có thể ở dạng, ví dụ, viên nén, viên nang, thuốc viên, bột, hạt, hỗn dịch, nhũ tương, dung dịch, gel bao gồm hydrogel, bột nhão, thuốc mỡ, kem, cao dán, miếng dán, thiết bị phân phối thẩm thấu, thuốc đạn, thuốc xổ, thuốc tiêm, cấy ghép, thuốc xịt, các chế phẩm thích hợp cho điện chuyển ion hoặc bình xịt. Các chế phẩm có thể được bào chế theo quy trình thực hành dược phẩm thông thường.

Liên hợp được mô tả ở đây có thể được điều chế theo nhiều cách khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để sử dụng làm thuốc điều trị cho người và động vật, thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm hoặc chế phẩm thú y. Tùy thuộc vào đối tượng (ví dụ, con người) được điều trị, phương thức sử dụng và loại điều trị mong muốn, ví dụ, dự phòng hoặc điều trị, thể liên hợp được mô tả ở đây được xây dựng theo những cách phù hợp với các thông số này. Bản tóm tắt về các kỹ thuật này được tìm thấy trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Lippincott Williams & Wilkins (2012); và Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 4th Edition, J. Swarbrick and J. C. Boylan, Marcel Dekker, New York (2013), mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách tham khảo.

Các công thức có thể được bào chế theo cách thích hợp để dùng toàn thân hoặc dùng tại chỗ hoặc cục bộ. Công thức toàn thân bao gồm những công thức được thiết kế để tiêm (ví dụ, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da) hoặc có thể được bào chế để dùng qua da, qua niêm mạc hoặc đường miệng. Công thức thường sẽ bao gồm chất pha loãng cũng như, trong một số trường hợp, chất bổ trợ, chất đệm và chất bảo quản. Các thể liên hợp cũng có thể được sử dụng trong các chế phẩm chứa liposom hoặc dưới dạng vi nhũ tương. Việc dùng toàn thân cũng có thể bao gồm các phương pháp tương đối không xâm lấn như sử dụng thuốc đạn, miếng dán thẩm thấu qua da, truyền

qua niêm mạc và dùng đường mũi. Dùng qua đường miệng cũng thích hợp cho các thể liên hợp ở đây. Các dạng phù hợp bao gồm si-rô, viên nang và viên nén, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm có thể được sử dụng qua đường tiêm dưới dạng chế phẩm tiêm. Dược phẩm để tiêm có thể được bào chế bằng cách sử dụng dung dịch vô trùng hoặc bất kỳ chất lỏng dược dụng nào làm chất dẫn thuốc. Các chế phẩm có thể được bào chế dưới dạng rắn thích hợp cho dung dịch hoặc hỗn dịch trong chất lỏng trước khi tiêm hoặc dưới dạng nhũ tương. Các chất dẫn thuốc dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước vô trùng, nước muối sinh lý và môi trường nuôi cấy tế bào (ví dụ, môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM), môi trường Eagle cải biến α (α-Modified Eagles Medium - α-MEM), môi trường F-12). Các chế phẩm tiêm như vậy cũng có thể chứa một lượng chất phụ trợ không độc như chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất tạo đệm pH, chẳng hạn như natri axetat và sorbitan monolaurat. Các phương pháp bào chế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem ví dụ, Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd Edition, M. Gibson, Taylor & Francis Group, CRC Press (2009).

Các dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng công thức dùng qua đường miệng. Các công thức để sử dụng qua đường miệng bao gồm viên nén chứa (các) thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với tá dược dược dụng không độc. Các tá dược này có thể là, ví dụ, chất pha loãng hoặc chất độn trơ (ví dụ, sucroza, sorbitol, đường, mannitol, xenluloza vi tinh thể, tinh bột bao gồm tinh bột khoai tây, canxi cacbonat, natri clorua, lactoza, canxi phosphat, canxi sulfat, hoặc natri phosphat); chất tạo hạt và chất gây rã (ví dụ, các dẫn xuất của xenluloza bao gồm xenluloza vi tinh thể, tinh bột bao gồm tinh bột khoai tây, natri croscarmelloza, alginat, hoặc axit alginic); chất liên kết (ví dụ, sucroza, glucoza, sorbitol, acaxia, axit alginic, natri alginat, gelatin, tinh bột, tinh bột biến tính, xenluloza vi tinh thể, magie nhôm silicat, carboxymetylxenluloza natri, metylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, ethylxenluloza, polyvinylpyrolidon, hoặc polyetylen glycol); và chất bôi trơn, chất tạo keo và chất chống dính (ví dụ, magie stearat, kẽm stearat, axit stearic, silic oxit, dầu thực vật hydro hóa hoặc bột talc). Các công thức để sử dụng qua đường miệng cũng có thể được cung cấp dưới dạng viên nén nhai, hoặc dưới dạng viên nang gelatin cứng trong đó thành phần hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn trơ (ví dụ, tinh bột

khoai tây, lactoza, xenluloza vi tinh thể, canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc cao lanh), hoặc dưới dạng viên nang gelatin mềm trong đó thành phần hoạt tính được trộn với nước hoặc môi trường dầu, ví dụ, dầu đậu nành, parafin lỏng hoặc dầu ô liu. Bột, hạt và viên nén có thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng các thành phần được đề cập ở trên dưới dạng viên nén và viên nang theo cách thông thường bằng cách sử dụng, ví dụ, máy trộn, thiết bị tầng sôi hoặc thiết bị sấy phun.

Các tá dược dược dụng khác cho công thức dùng qua đường miệng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất tạo màu, chất tạo hương, chất làm dẻo, chất giữ ẩm và chất đệm. Các công thức để sử dụng qua đường miệng cũng có thể được cung cấp dưới dạng viên nén nhai, hoặc dưới dạng viên nang gelatin cứng trong đó thành phần hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn trơ (ví dụ, tinh bột khoai tây, lactoza, xenluloza vi tinh thể, canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc cao lanh), hoặc dưới dạng viên nang gelatin mềm trong đó thành phần hoạt tính được trộn với nước hoặc môi trường dầu, ví dụ, dầu đậu nành, parafin lỏng hoặc dầu ô liu. Bột, hạt và viên nén có thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng các thành phần được đề cập ở trên dưới dạng viên nén và viên nang theo cách thông thường bằng cách sử dụng, ví dụ, máy trộn, thiết bị tầng sôi hoặc thiết bị sấy phun.

Sự giải phóng có kiểm soát quá trình hòa tan hoặc khuếch tán thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của bất kỳ công thức nào trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng có thể đạt được bằng cách phủ thích hợp viên nén, viên nang, viên tròn, hoặc công thức dạng hạt của thể liên hợp, hoặc bằng cách đưa thể liên hợp vào chất nền thích hợp. Lớp phủ giải phóng có kiểm soát có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phủ được đề cập ở trên và/hoặc, ví dụ, senlac, sáp ong, glycowax, sáp thầu dầu, sáp carnauba, rượu stearylic, glyxeryl monostearat, glyxeryl distearat, glyxerol palmitostearat, etylxenluloza, nhựa acrylic, axit dl-polylactic, xenluloza axetat butyrat, polyvinyl clorua, polyvinyl axetat, vinyl pyrolidon, polyetylen, polymetacrylat, metylmetacrylat, 2-hydroxymetacrylat, hydrogel metacrylat, 1,3 butylen glycol, etylen glycol metacrylat và/hoặc polyetylen glycols. Trong công thức chất nền giải phóng được kiểm soát, chất nền cũng có thể bao gồm, ví dụ, metylxenluloza ngậm nước, sáp carnauba và rượu stearylic, carbopol 934, silicon, glyxeryl tristearat, metyl acrylat-metyl metacrylat, polyvinyl clorua, polyetylen và/hoặc flocacbon được halogen hóa.

Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị khi cần. Lượng thành phần hoạt tính, ví dụ, thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)), có trong dược phẩm sao cho liều lượng phù hợp trong phạm vi được chỉ định được cung cấp (ví dụ, liều trong phạm vi 0,01-100 mg/kg cân nặng).

IX. Đường dùng và liều lượng

Theo phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây, các thể liên hợp ở đây có thể được sử dụng theo bất kỳ con đường thích hợp nào để điều trị hoặc bảo vệ chống lại lây nhiễm do virut (ví dụ, lây nhiễm cúm), hoặc để ngăn ngừa, ổn định hoặc ức chế sự sinh sôi hoặc lây lan của virut (ví dụ, virut cúm). Các thể liên hợp được mô tả ở đây có thể được sử dụng cho người, vật nuôi trong nhà, vật nuôi hoặc các động vật khác với chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, việc sử dụng bao gồm việc sử dụng bất kỳ thể liên hợp nào được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp của một trong các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc các chế phẩm tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch (ví dụ, dung dịch vô trùng và trong hệ dung môi thích hợp để sử dụng tiêm tĩnh mạch), tiêm trong da, tiêm trong động mạch, tiêm trong phúc mạc, tiêm trong tổn thương, tiêm trong sọ, tiêm trong khớp, tiêm trong tuyến tiền liệt, tiêm trong màng phổi, tiêm trong khí quản, tiêm trong mũi, tiêm trong dịch kính, tiêm trong âm đạo, tiêm trong trực tràng, dùng tại chỗ, tiêm trong khối u, tiêm trong phúc mạc, tiêm dưới da, tiêm dưới kết mạc, tiêm trong bàng quang, tiêm niêm mạc, tiêm trong màng ngoài tim, tiêm trong rốn, tiêm trong mắt, qua đường miệng (ví dụ, viên nén, viên nang, viên nén dài, viên nang mềm hoặc si-rô), dùng tại chỗ (ví dụ, dạng kem, gel, thuốc xức hoặc thuốc mỡ), dùng tại chỗ, bằng cách hít, tiêm hoặc truyền (ví dụ, truyền liên tục, truyền dịch tại chỗ trực tiếp vào các tế bào đích, ống thông, rửa, trong kem hoặc thành phần lipit). Theo một số phương án, nếu chất kháng virut cũng được sử dụng ngoài thể liên hợp được mô tả ở đây, thì chất kháng virut hoặc dược phẩm chứa chúng cũng có thể được sử dụng theo bất kỳ đường dùng nào được mô tả ở đây.

Liều lượng của thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng phụ thuộc vào các yếu tố bao gồm đường dùng, bệnh cần

điều trị (ví dụ, mức độ và/hoặc tình trạng của nhiễm virut), và các đặc điểm thể chất, ví dụ, độ tuổi, cân nặng, sức khoẻ chung, của đối tượng. Thông thường, lượng thể liên hợp hoặc dược phẩm chứa chúng trong một liều duy nhất có thể là lượng có hiệu quả ngăn ngừa, trì hoãn hoặc điều trị nhiễm virut mà không gây ra độc tính đáng kể. Dược phẩm có thể chứa liều lượng thể liên hợp được đề cập trong bản mô tả này nằm trong khoảng từ 0,01 đến 500 mg/kg (ví dụ, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 , 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 hoặc 500 mg/kg) và theo một phương án cụ thể hơn, nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 30 mg/kg và, theo một phương án cụ thể hơn, nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 30 mg/kg. Theo một số phương án, khi thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (MI)-(M -XI), hoặc (M'-I)) và chất kháng virut hoặc vắc-xin kháng virut được sử dụng kết hợp (ví dụ, về cơ bản đồng thời trong cùng một dược phẩm hoặc riêng biệt, hoặc riêng biệt trong cùng một phác đồ điều trị), liều lượng cần thiết của thể liên hợp được mô tả ở đây có thể thấp hơn liều lượng cần thiết của thể liên hợp khi thể liên hợp được sử dụng một mình trong một phác đồ điều trị.

Thể liên hợp được mô tả ở đây (ví dụ, thể liên hợp có công thức bất kỳ trong số các công thức (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), hoặc (M'-I)) hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được sử dụng cho đối tượng có nhu cầu, ví dụ, một hoặc nhiều lần (ví dụ, 1-10 lần hoặc nhiều hơn; 1, 2, 3, 4, 5, 6 , 7, 8, 9, hoặc 10 lần) hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng, sáu tháng, hàng năm hoặc khi cần về mặt y tế. Liều lượng có thể được cung cấp theo phác đồ liều lượng đơn hoặc nhiều liều lượng. Thời gian giữa các lần dùng thuốc có thể giảm khi tình trạng bệnh được cải thiện hoặc tăng lên khi sức khỏe của bệnh nhân giảm sút. Liều lượng và tần suất dùng thuốc có thể được bác sĩ điều chỉnh phù hợp với các yếu tố thông thường như mức độ lây nhiễm và các thông số khác nhau của đối tượng.

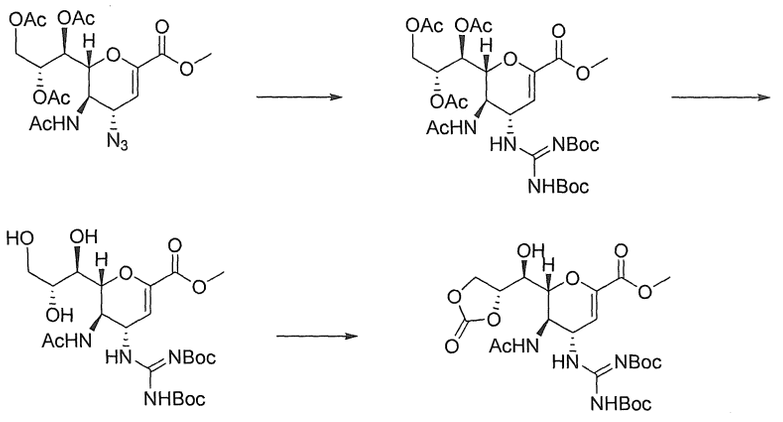
Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này phần mô tả về cách thức sử dụng, điều chế và đánh giá các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây, và được dự định để hoàn toàn mang tính ví dụ cho sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi những gì mà các tác giả sáng chế coi là sáng chế của mình.

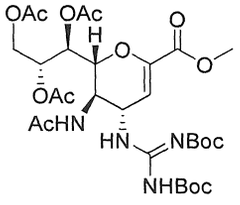
Ví dụ 1: Chuẩn bị cấu trúc Fc

Quá trình dịch mã ngược axit amin bao gồm cấu trúc protein (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 12 và 14) được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp pha rắn. Các mẫu oligonucleotit được tách dòng vào pcDNA3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, Mỹ) tại các vị trí tách dòng BamHI và XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, Mỹ) và bao gồm các trình tự tín hiệu có nguồn gốc từ Interleukin-2 của người hoặc albumin của người. Các plasmit pcDNA3.1 được biến nạp vào các tế bào *E. coli* Top10 (LifeTech). ADN được khuếch đại, chiết và tinh chế bằng cách sử dụng bộ lọc the PURELINK® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (LifeTech). ADN plasmit được phân phối, sử dụng kit chuyển nhiễm ExpiFectamine ™ 293 (LifeTech), vào các tế bào HEK-293 theo quy trình của nhà sản xuất. Các tế bào được ly tâm, lọc và dịch nổi bề mặt được làm sạch bằng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ). Các phân tử đã tinh chế được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 µg mỗi phân tử vào gel, và nhuộm bằng phương pháp nhuộm Blue nhanh. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định (FIG. 2-8). Các làn khử và không khử được ký hiệu là "R" và "NR". Các FIG. 2-8 cho thấy SDS-PAGE không khử và khử của miền Fc được hình thành từ các monome miền Fc có trình tự các SEQ ID NO lần lượt là: 1, 3, 5, 7, 9, 12 và 14.

Ví dụ 2. Tổng hợp chất trung gian Zanamivir



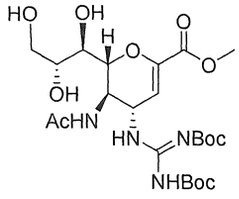
Bước a.



Metyl 5-axetamido-7,8,9-O-triaxetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (4,56 g, 10,0 mmol) được hòa tan trong THF khan (15 mL), và dung dịch được làm lạnh đến khoảng 13°C. Triphenylphosphin (2,89 g, 11 mmol) được bổ sung vào từng phần trong 20 phút. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ khoảng 13°C đến nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó bổ sung từng giọt dung dịch LiOH (24 mg, 1 mmol) trong nước (1,5 mL). Sau khi khuấy trong 28 giờ, hỗn hợp phản ứng được bổ sung N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (3,26 g, 10,5 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (244,4 mg, 2 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1,5 ngày. Sau đó, nó được pha loãng với hỗn hợp tỷ lệ 1: 1 của etyl axetat: hexan (100 mL) và chiết bằng nước (30 mL). Lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat (30 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được cô đặc bằng cách cô quay. Cặn được tinh chế thông qua sắc ký cột pha đảo C18 (150 g, axetonitril 25 đến 70% và nước). Các phân đoạn thu thập được được cô đặc bằng cách cô quay ở nhiệt độ trong phòng. Kết quả là dung dịch nước bị vẩn đục và phần lớn sản phẩm lắng đọng trên bình dưới dạng gel. Sau đó, dung dịch được chiết bằng etyl axetat (150 mL). Lớp hữu cơ được sử dụng để hòa tan lại vật liệu gel. Sau đó, nó được làm khô trên Na_2SO_4, cô đặc bằng cách cô quay, và tiếp tục làm khô trong chân không cao để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng

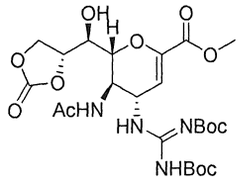
bọt trắng. Thu được 6,24 g, hiệu suất 92,8%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+$ = 673,2.

Bước b.



Làm lạnh dung dịch chứa sản phẩm từ bước a (6,24 g, 9,28 mmol) trong MeOH khan (20 mL) trong bể nước đá và bổ sung từ từ dung dịch natri metoxit 0,5 M trong MeOH (26 mL, 13 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó độ pH của nó được điều chỉnh cẩn thận từ 7 đến 7,5 bằng cách bổ sung từng giọt dung dịch HCl 4 N vào dioxan (3 mL). Dung môi được loại bỏ bằng cách cô quay ở nhiệt độ không lớn hơn nhiệt độ trong phòng. Phần cặn được pha loãng với hỗn hợp 2: 1 của etyl axetat và hexan (150 mL), và dung dịch thu được được chiết bằng nước (20 mL). Lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat (30 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô trên Na_2SO_4, cô đặc bằng cách cô quay, và tiếp tục được làm khô trong chân không cao. Sản phẩm được chuyển sang bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được 5,03 g, hiệu suất 99,2%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+$ = 547,2.

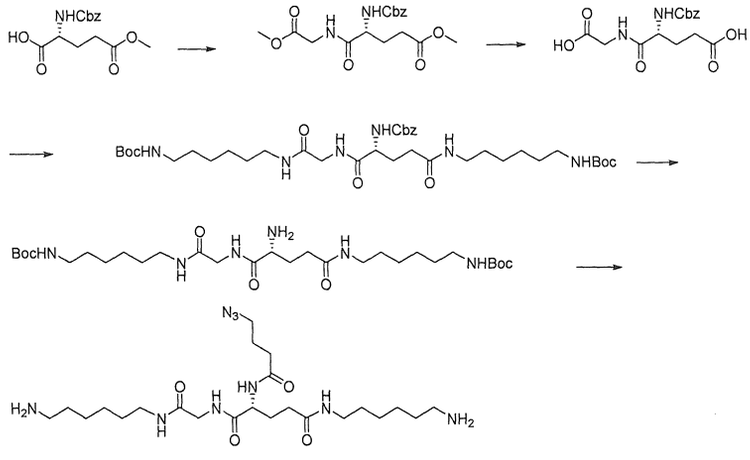
Bước c.



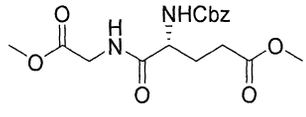
Sản phẩm của bước b (713 mg, 1,3 mmol) trong DCM khan (6 mL) được làm lạnh trong bể nước đá và 4-dimetylaminopyridin (159,8 mg, 1,3 mmol) và DIPEA (520 mg, 4 mmol) được bổ sung. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung từng giọt với dung dịch 4-nitrophenyl cloroformat (356,6 mg, 2,2 mmol) trong DCM khan (2 mL). Sau đó, bể nước đá được lấy ra, và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 3 giờ và được theo dõi bằng LCMS (có thể bổ sung thêm 4-nitrophenyl cloroformat nếu cần). Sau

khi phản ứng hoàn thành, nó được làm lạnh nhanh bằng nước (10 mL), và lớp hữu cơ được chiết và cô đặc bằng cách cô quay. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo C18 (100 g, axetonitril 20 đến 70% và nước). Axetonitril trong các phần đã thu gom được loại bỏ bằng cách cô quay ở nhiệt độ trong phòng. Lớp nước sau đó được chiết bằng hỗn hợp 1: 1 của etyl axetat và hexan (120 mL). Lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat (30 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô trên Na_2SO_4, cô đặc bằng cách cô quay, và tiếp tục được làm khô trong chân không cao để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu trắng. Thu được 520 mg, hiệu suất 70%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 573,2$.

Ví dụ 3. Tổng hợp liên kết cầu nối-1



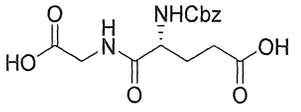
Bước a.



Cho hỗn hợp ZD-glutamic γ-metyl este (2,0 g, 6,77 mmol) và glyxin metyl este HCl (1,282 g, 10,2 mmol) trong DMF khan (7 mL) được bổ sung DIPEA (2,02 g, 15,57 mmol), tiếp theo là HATU (2,66 g, 7,0 mmol) trong các phần trong 25 phút. Sau khi HATU được hòa tan, một lượng DIPEA bổ sung (1,15 g, 8,8 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1,5 giờ, sau đó được chiết bằng dung dịch HCl 5% (100 mL) và EtOAc (100 mL x 2). Lớp hữu cơ được cô đặc bằng cách cô quay. Phần cặn được chiết lại bằng nước (100 mL) và EtOAc/hexan (2: 1, 150 mL). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4, cô đặc bằng cách cô quay và tiếp tục làm khô trong

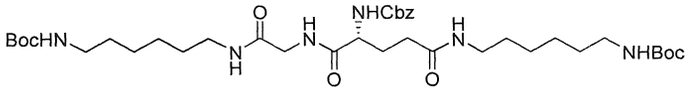
chân không cao tạo thành chất rắn màu trắng. Sản phẩm thô được chuyển sang bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được 2,3 g, hiệu suất 93%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 367$.

Bước b.



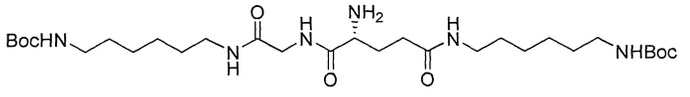
Sản phẩm của bước a (2,3 g, 6,29 mmol) được hòa tan trong hỗn hợp 1: 1 của MeOH và THF (10 mL). Sau khi dung dịch được làm lạnh trong bồn nước đá, dung dịch LiOH monohydrat (630 mg, 15 mmol) trong nước (9 mL) được bổ sung từng phần trong 1,5 giờ. Sau khi khuấy thêm 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng HCl 4N trong dioxan (3,7 mL). Dung môi hữu cơ được loại bỏ một phần bằng cách làm bay hơi ở nhiệt độ trong phòng. Vật liệu còn lại được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (150 g, axetonitril 0 đến 39% và nước). Thu được 2,03 g, hiệu suất 88,7% qua hai bước. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 339,2$.

Bước c.



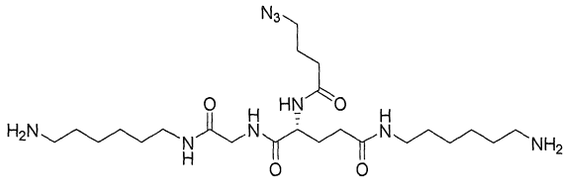
Cho hỗn hợp sản phẩm của bước b (1,41 g, 4,17 mmol) và N-Boc-1,6-diaminohexan (1,99 g, 9,2 mmol) trong DMF khan (6 mL) và DIPEA (1,3 g, 10 mmol), dung dịch HATU (3,5 g, 9,2 mmol) trong DMF (10 mL) được bổ sung vào bằng cách bơm ống tiêm với tốc độ 11 mL/giờ. Sau khi bổ sung hoàn toàn HATU, phản ứng được khuấy thêm 30 phút và được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (150 g, axetonitril 10 đến 50% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,3 g, hiệu suất 42,4%. Ion tìm được của LCMS: $[M+H]^+ = 735$, $[M - Boc + H]^+ = 635,4$.

Bước d.



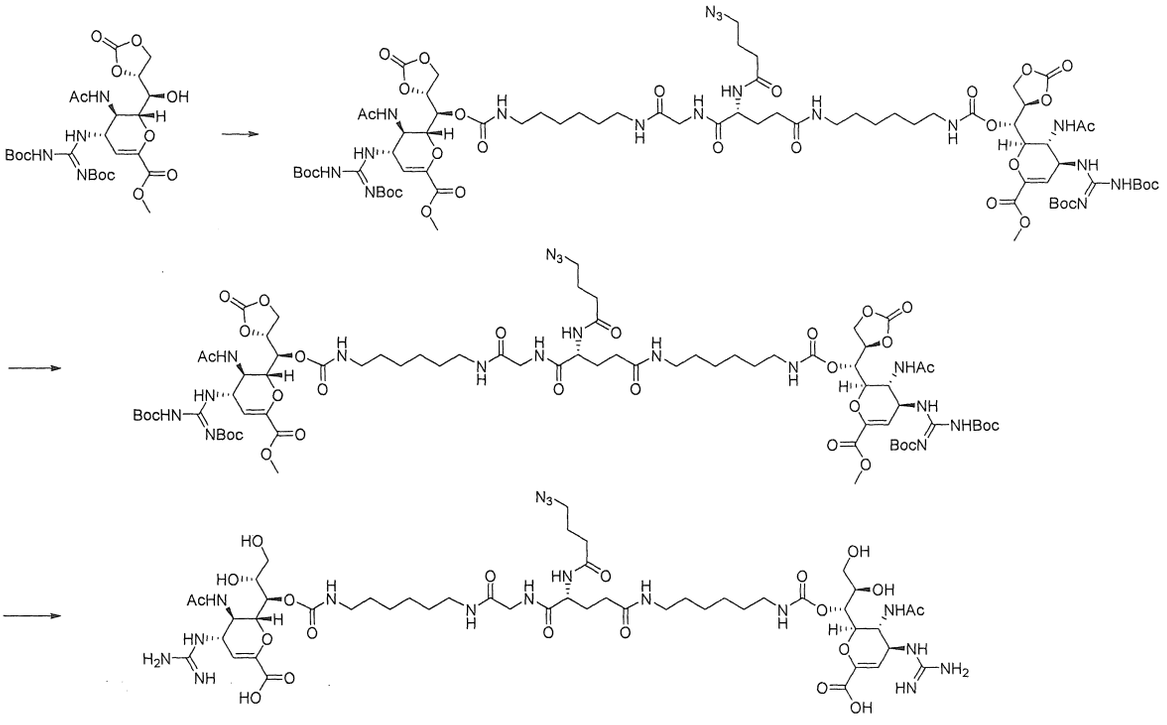
Sản phẩm của bước c (1,3 g, 1,77 mmol) được hòa tan trong MeOH (20 mL), và Pd/C được bổ sung vào dung dịch. Hỗn hợp được khuấy trong điều kiện hydro trong 4 giờ. Pd/C được lọc bỏ, và dịch lọc được cô đặc bằng cách cô quay và tiếp tục được làm khô trong điều kiện chân không cao. Thu được 1,03 g, hiệu suất 96,9%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 601$.

Bước e.

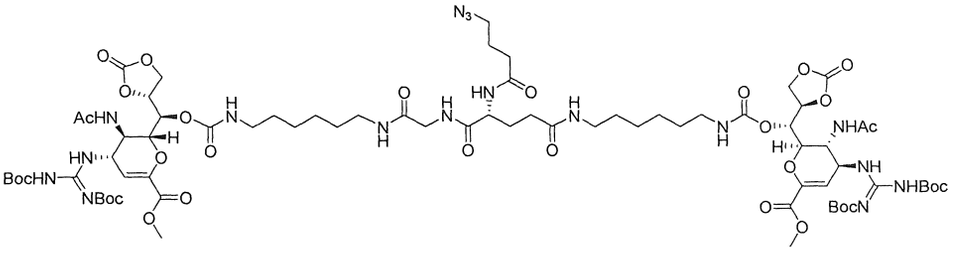


Bình phản ứng được làm khô bằng lửa được xả bằng nitơ và được nạp axit 4-azidobutyric (77 mg, 0,6 mmol), N-hydroxy suxinimit (92 mg, 0,8 mmol) và DMF khan (0,5 mL). Hỗn hợp được khuấy để hòa tan chất rắn, và sau đó DCC (125,5 mg, 0,608 mmol) được bổ sung. Sau khi khuấy trong một giờ, sản phẩm của bước d (300 mg, 0,5 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 giờ và được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (150 g, axetonitril 10 đến 70% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phần đã thu gom được đông khô thành chất rắn màu trắng (LCMS: $[M+H]^+ = 712$, $[M - Boc + H]^+ = 612$). Vật liệu được hòa tan lại trong DCM (~ 2 mL) và TFA (~ 1 mL) và được khuấy trong 15 phút. Sau đó, nó được cô đặc bằng cách cô quay, và phần cặn được tinh chế bằng RPLC (50 g, axetonitril 0 đến 40% và nước). Thu được 255 mg, hiệu suất 68,9%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 512$, $[(M + 2H)/2]^+ = 256$.

Ví dụ 4. Tổng hợp Int- 1

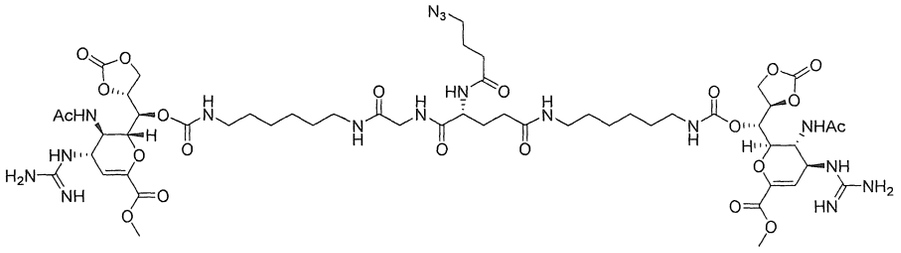


Bước a.



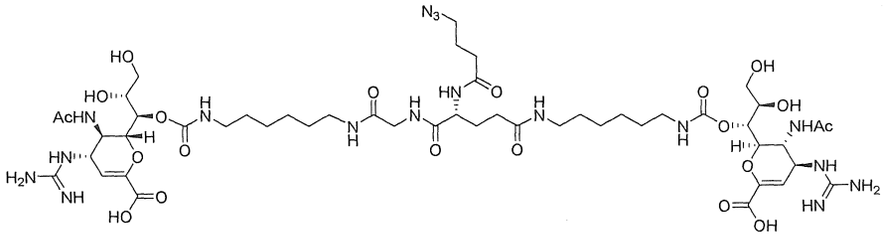
Dung dịch của chất trung gian Zanamivir (Ví dụ 2) (532,5 mg, 0,93 mmol) trong THF khan (2 mL) được bổ sung DMAP (490 mg, 4 mmol), tiếp theo là bis (pentaflophenyl)cacbonat (385 mg, 0,911 mmol). Sau khi khuấy qua đêm, dung dịch liên kết cầu nối-1 (Ví dụ 3) (245,6 mg, 0,332 mmol) trong DMF khan (1 mL) và DIPEA (91 mg, 0,3 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng được tiếp tục trong 2 giờ, sau đó được tinh chế bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 67% và nước). Thu được 135 mg, hiệu suất 23,8%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 845,9$.

Bước b.



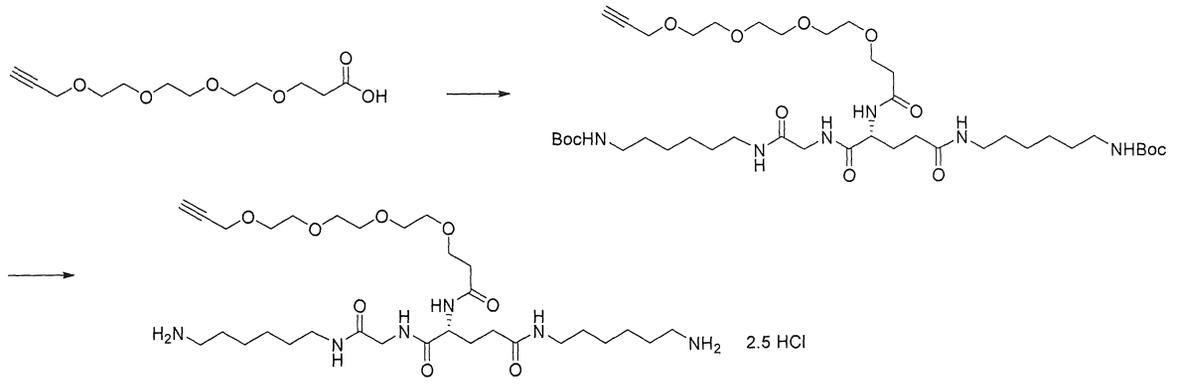
Sản phẩm của bước a (135 mg, 0,079 mmol) được hòa tan trong TFA (0,5 mL), và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (50 g, axetonitril 5 đến 32% và nước). Thu được 88 mg, hiệu suất 85,1%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 654,8$.

Bước c.

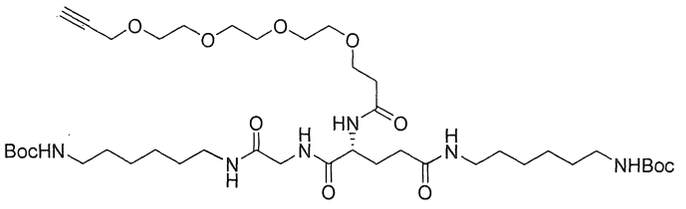


Làm lạnh dung dịch chứa sản phẩm của bước b (88 mg, 0,0673 mmol) trong MeOH (1,5 mL) trong bể nước đá và bổ sung LiOH (5 mg, 0,2 mmol) trong nước (0,5 mL). Sau khi hỗn hợp được khuấy trong 5 giờ, nó được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (0,1 mL) và được tinh chế bằng HPLC (axetonitril 5 đến 20% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 76,4 mg, hiệu suất 78%. Ion tìm được của LCM: $[(M + 2H)/2]^+ = 614,8$.

Ví dụ 5. Tổng hợp liên kết cầu nối-2

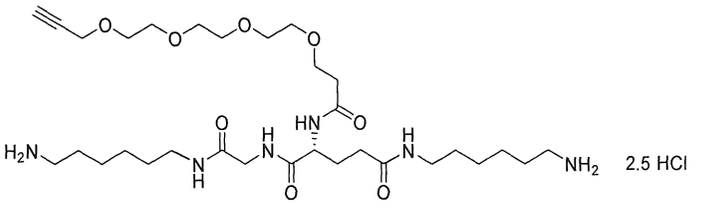


Bước a.



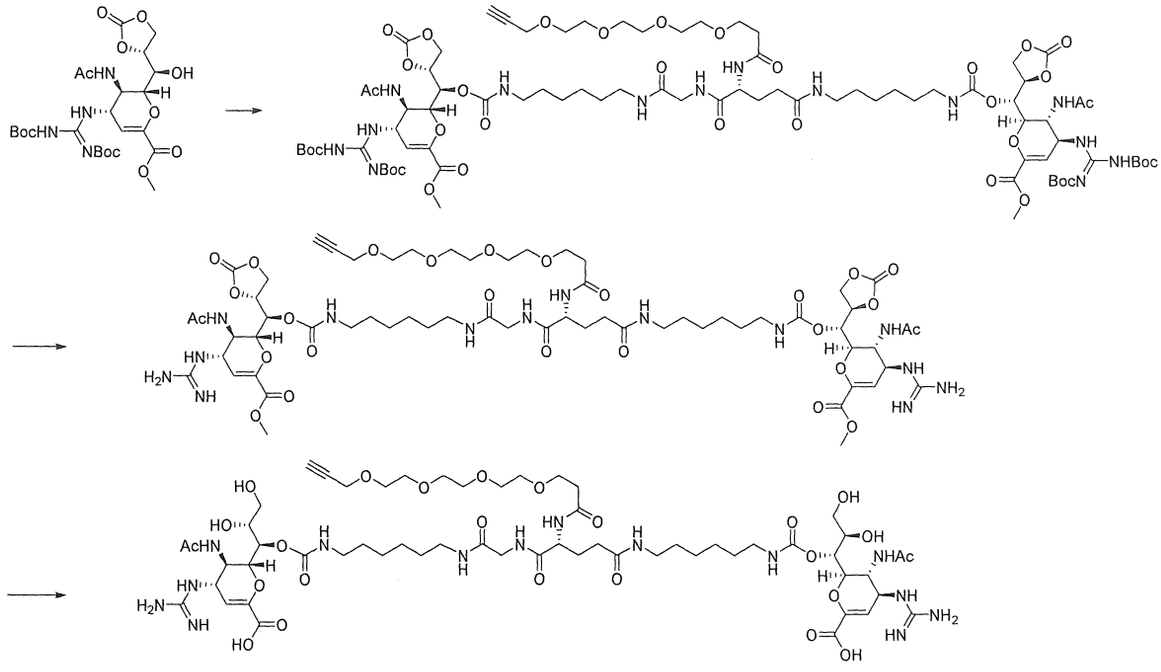
Dung dịch axit propargyl-PEG4-axit (364,4 mg, 1,4 mmol) trong DMF khan (2 mL) được bổ sung HATU (558,9 mg, 1,47 mmol). Sau khi khuấy để hòa tan tất cả chất phản ứng kết hợp, DIPEA (390 mg, 3 mmol) được bổ sung và khuấy trong 10 phút. Bổ sung dung dịch chứa sản phẩm liên kết cầu nối-1 bước d (Ví dụ 3, bước d) (701,1 mg, 1,167 mmol) trong DMF khan (1 mL). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 30 phút và được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 60% và nước). Thu được 830 mg, hiệu suất 84,4%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 843$.

Bước b.

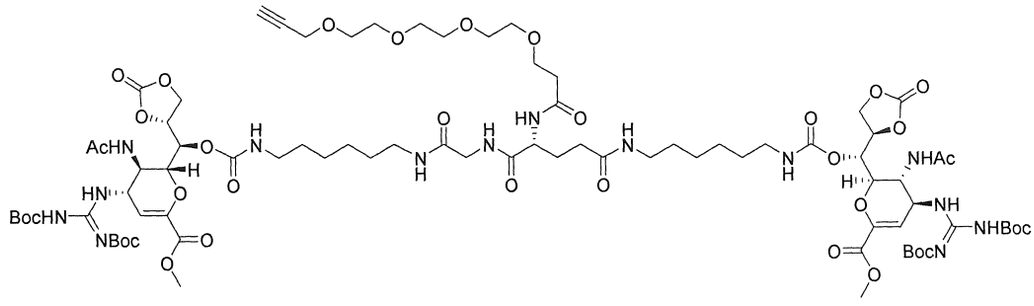


Sản phẩm của bước một được hòa tan trong THF (5 mL) và được xử lý bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (2,5 mL). Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, hỗn hợp phản ứng được cô đặc bằng cách cô quay. Phần còn lại được hòa tan lại trong axetonitril/nước (1: 1, 16 mL), và dung dịch được đông khô. Sản phẩm thô được chuyển sang bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được 761,8 mg, hiệu suất 100%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 643,8$.

Ví dụ 6. Tổng hợp Int-2

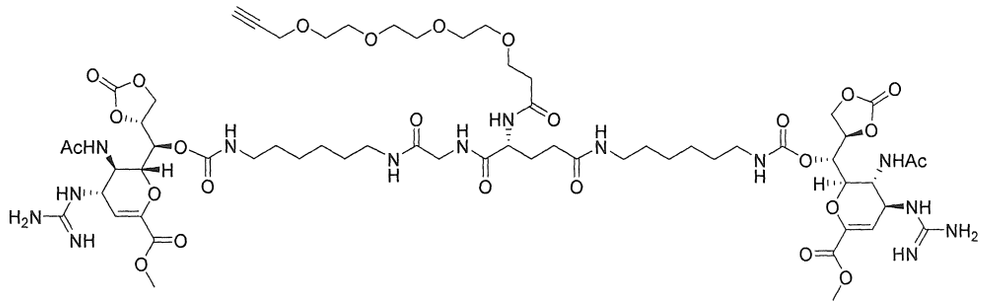


Bước a.



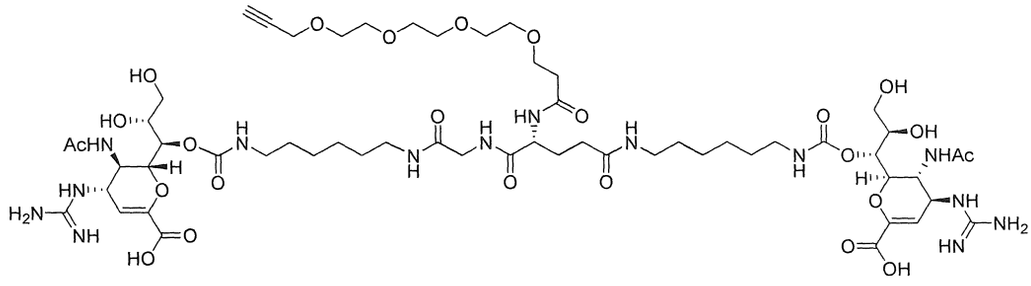
Bình phản ứng được làm khô bằng ngọn lửa được xả bằng nitơ và nạp chất trung gian Zanamivir (Ví dụ 2) (533,6 mg, 0,812 mmol), DMAP (99,8 mg, 0,81 mmol) và DCM khan (1 mL). Sau khi khuấy để hòa tan nguyên liệu ban đầu, dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá và 4-nitrophenyl cloroformat (242 mg, 1,2 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 5 giờ, sau đó được bổ sung vào dung dịch liên kết cầu nối-2 (Ví dụ 5) (228,4 mg, 0,319 mmol) trong DMF khan (1 mL) và DIPEA (130 mg, 1 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm và được tinh chế bằng RPLC (150 g, axetonitril 20 đến 65% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phân đoạn đã thu thập được đông khô. Thu được 178,3 mg, hiệu suất 30,4%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 920,5$, $[(M + 3H)/3]^+ = 614,2$.

Bước b.



Sản phẩm của bước a (178,3 mg, 0,0969 mmol) được hòa tan trong TFA (0,5 mL). Dung dịch được khuấy trong 20 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng HPLC (axetonitril 0 đến 25% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 91,8 mg, hiệu suất 56,8%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 720,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 480,6$.

Bước c.



Sản phẩm của bước b (91,8 mg, 0,055 mmol) được hòa tan trong MeOH (1 mL), và dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá. LiOH monohydrat (21 mg, 0,5 mmol) trong nước (1 mL) được bổ sung từng phần trong hơn 1 giờ. Sau khi khuấy thêm 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (0,3 mL) và được tinh chế bằng HPLC (axetonitril 0 đến 20% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 36,2 mg, hiệu suất 59,4%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 680,3$, $[(M + 3H)/3]^+ = 454,0$.

Ví dụ 7. Tổng hợp h-IgG1 Fc-PEG4-azit

Este PEG4-azidoNHS (hiệu suất 98%, 180 µmol, 9,5 đương lượng, 71,4 mg trong 0,5 mL DMF và được pha loãng thành 3,60 mL với dung dịch đệm PBS pH 7,4

1x) được bổ sung vào dung dịch h-IgG1 Fc (SEQ ID NO: 4) (1103 mg trong 70,0 mL PBS pH 7,4, MW ~ 58.000 Da, 19,0 µmol) và hỗn hợp được lắc nhẹ trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường. Dung dịch được cô đặc bằng thiết bị cô đặc ly tâm (30.000 MWCO) đến thể tích ~ 1,5 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và cô đặc lại. Quy trình rửa này được lặp lại tổng cộng ba lần. Chất phản ứng phân tử nhỏ được loại bỏ bằng quy trình rửa này. Fc-PEG4-azit đậm đặc được pha loãng thành 70,0 mL với dung dịch đệm PBS 1x pH 7,4 và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy đo quang phổ nhìn thấy Nanodrop™ UV (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của h-IgG1). Hiệu suất là định lượng sau khi tinh chế. DAR = 4,3 được xác định bởi MALDI. Giá trị DAR có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi các chất tương đương của este PEG4-azido NHS theo quan hệ gần tuyến tính. Ví dụ, khi 7,0 đương lượng của este PEG4-azit NHS được sử dụng, giá trị DAR sẽ ở mức 3,0.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây có thể bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa cho Fc bao gồm axit amin Lys447 (ví dụ, gốc lysin ở đầu C). Khi biểu hiện, lysin ở đầu C của Fc bị phân cắt theo phương pháp protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu Lys447 (ví dụ, thiếu gốc lysin ở đầu C). Sự có mặt hay vắng mặt của lysin ở đầu C không làm thay đổi tính chất của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 8. Tổng hợp albumin huyết thanh chuột tái tổ hợp (MSA) -PEG4-azit

Este PEG4-azidoNHS (98%, 81,7 umol, 4,5 đương lượng, 32,4 mg trong 0,3 mL DMF và được pha loãng thành 1,63 mL với dung dịch đệm PBS 1x pH 7,4) được bổ sung vào dung dịch albumin huyết thanh chuột tái tổ hợp (SEQ ID NO: 80) (1200 mg trong 75,0 mL PBS pH 7,4, MW ~ 66,000 Da, 18,2 umol) và hỗn hợp được lắc nhẹ trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường. Dung dịch được cô đặc bằng thiết bị cô đặc ly tâm (30.000 MWCO) đến thể tích ~ 1,5 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và cô đặc lại. Quy trình rửa này được lặp lại tổng cộng ba lần. Chất phản ứng phân tử nhỏ được loại bỏ bằng quy trình rửa này. MSA-PEG4-azit đậm đặc được pha loãng thành 75,0 mL với dung dịch đệm PBS 1x pH 7,4 và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng máy quang phổ nhìn thấy

Nanodrop™ UV (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của h-IgG1). Hiệu suất là định lượng sau khi tinh chế. DAR = 3,5 được xác định bởi MALDI. Giá trị DAR có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi đương lượng của este PEG4-azido NHS tương tự như h-IgG1 Fc (Ví dụ 7).

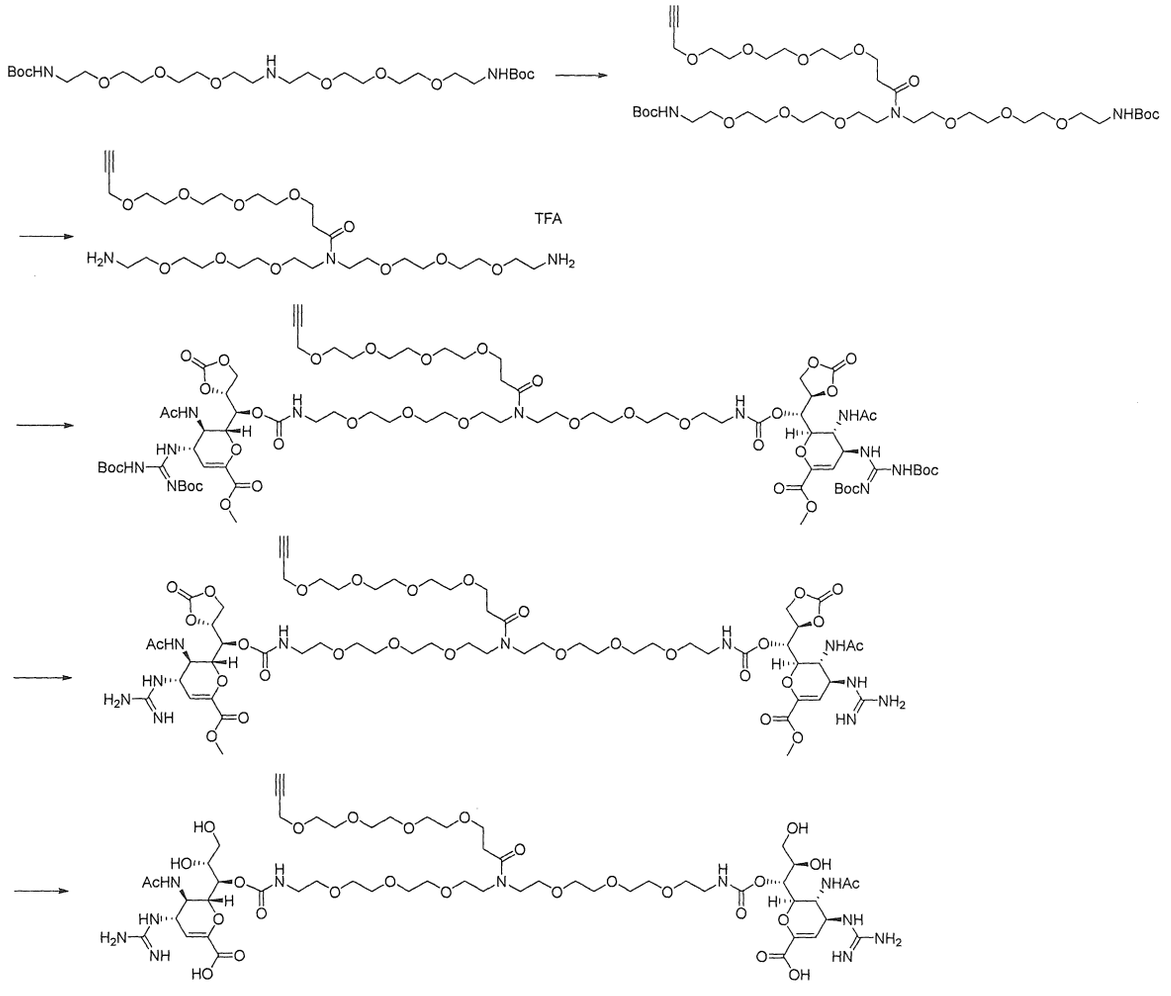
Ví dụ 9. Tổng hợp thể liên hợp 1

Dung dịch PBS của h-IgG1 Fc-PEG4-azit (Ví dụ 7) (50 mg, 2,815 mL, 0,8591 µmol) được bổ sung vào ống ly tâm 15 mL chứa Int-2 (Ví dụ 6) (35,2 mg, 0,02217 mmol). Sau khi hỗn hợp được lắc nhẹ để hòa tan tất cả Int-2, 344 µl dung dịch axit L-ascorbic natri (59,4 mg, 0,3 mmol), đồng (II) sulfat (10 mg, 0,05 mmol) và THPTA (23 mg, 0,05 mmol) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4 (1 mL) được bổ sung. Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ như được mô tả trong Ví dụ 8. Phân tích Maldives TOF sản phẩm cuối cùng được tinh chế cho khối lượng trung bình là 63797 Da (DAR = 3,4). Thu được 27,39 mg, hiệu suất 55%. FIG. 9 thể hiện SDS-PAGE của thể liên hợp 1 không giảm.

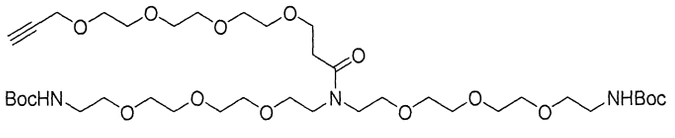
Ví dụ 10. Tinh chế thể liên hợp

Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được tinh chế bằng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. (HiLoad 26/600 Superdex200 pg, GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ). Các phân đoạn chứa thể liên hợp tinh khiết được gộp lại và cô đặc đến khoảng 20 mg/mL bằng thiết bị cô đặc ly tâm (30.000 MWCO). Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng máy quang phổ nhìn thấy Nanodrop™ UV sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của hIgG1 Fc (myc). Các phân tử tinh khiết được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1 µg mỗi phân tử vào gel và nhuộm bằng Instant Blue (Expedeon, San Diego, CA, Mỹ). Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định. Thu được được tính toán và độ tinh khiết được xác định bằng Agilent Analytical HPLC. Đỉnh sản phẩm và MW được Maldives MS tìm thấy và tính toán DAR cuối cùng.

Ví dụ 11. Tổng hợp Int-3

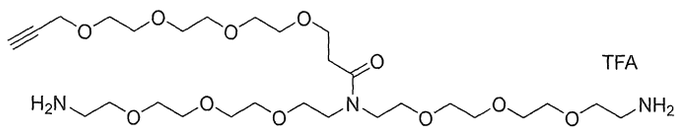


Bước a.



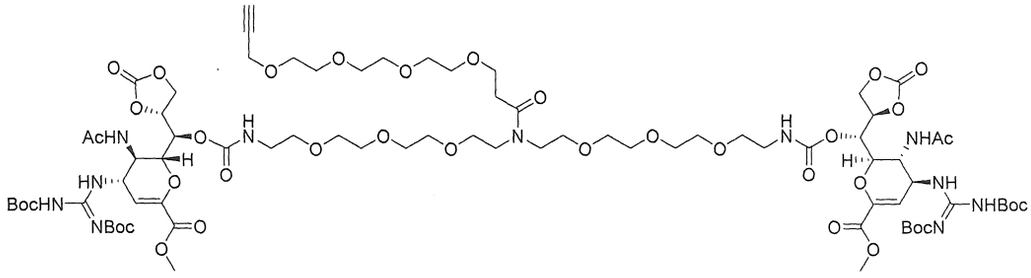
Bổ sung vào dung dịch axit propargyl-PEG4-(260 mg, 1 mmol) và HATU (380,2 mg, 1 mmol) trong DMF khan (1 mL), DIPEA (130 mg). Sau khi khuấy 5 phút, NH-bis (PEG3-Boc) (500 mg, 0,881 mmol) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC 9100 g, axetonitril 5 đến 50% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 683 mg, hiệu suất 95,8%. Các ion tìm được bởi LCMS: $[M+H]^+ = 810,4$, $[M - Boc + H]^+ = 710,4$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 305,8$.

Bước b.



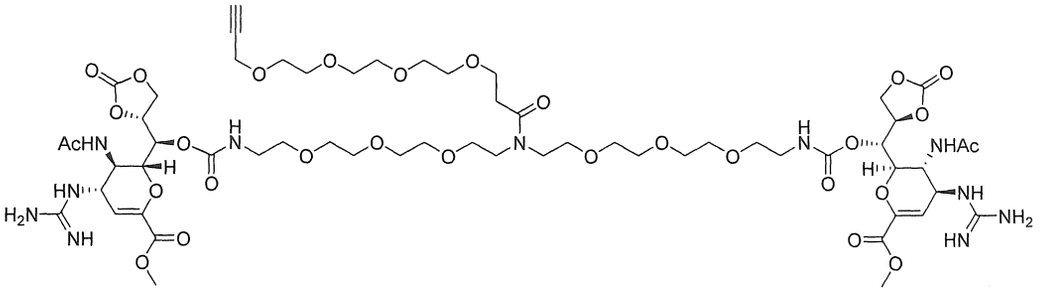
Sản phẩm của bước một được hòa tan trong TFA (1 mL). Dung dịch được khuấy trong 2 giờ và sau đó được tinh chế trực tiếp qua RPLC (100 g, axetonitril 0 đến 30% và nước). Thu được 589 mg, hiệu suất 98,7%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 305,8$.

Bước c.



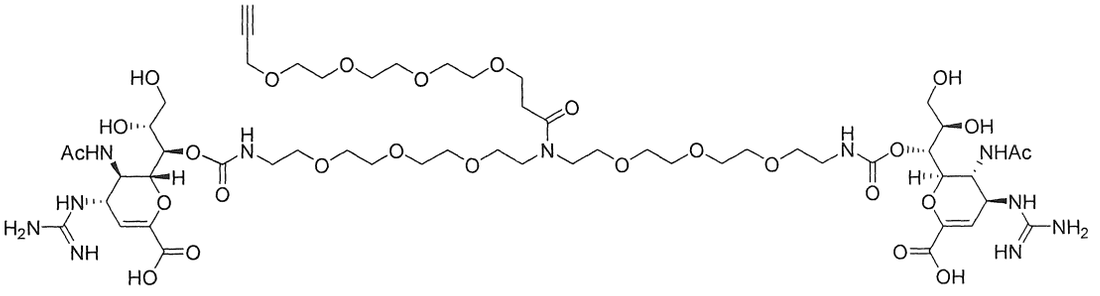
Bình phản ứng được làm khô bằng ngọn lửa được xả bằng nitơ và được nạp chất trung gian Zanamivir (Ví dụ 2) (572 mg, 1 mmol) và DCM khan (1 mL). Sau khi khuấy để hòa tan nguyên liệu ban đầu, dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá và 4-nitrophenyl cloroformat (302,4 mg, 1,5 mmol), tiếp theo là bổ sung DMAP (22,4 mg, 0,2 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 5 giờ, sau đó được làm lạnh nhanh bằng nước (0,2 mL). Sau khi khuấy trong 10 phút, sản phẩm của bước b (256,7 mg, 0,355 mmol) trong DMF khan (1 mL) và DIPEA (163,8 mg, 1,26 mmol) được bổ sung. Tiếp tục khuấy trong 2 giờ và sau đó hỗn hợp phản ứng được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (150 g, axetonitril 20 đến 65% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phân đoạn thu thập được được đông khô. Thu được 422,8 mg sản phẩm mong muốn, sản phẩm bị lẫn một số tạp chất, hiệu suất <69%. Vật liệu được chuyển sang bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 903,9$, $[(M + 3H)/3]^+ = 603,2$.

Bước d.



Sản phẩm của bước c (422,8 mg, <0,245 mmol) được hòa tan trong TFA (1 mL). Dung dịch được khuấy trong 20 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng HPLC (axetonitril 5 đến 25% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 169,7 mg, hiệu suất 29,2% qua hai bước. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 704,0$, $[(M + 3H)/3]^+ = 469,6$.

Bước e.



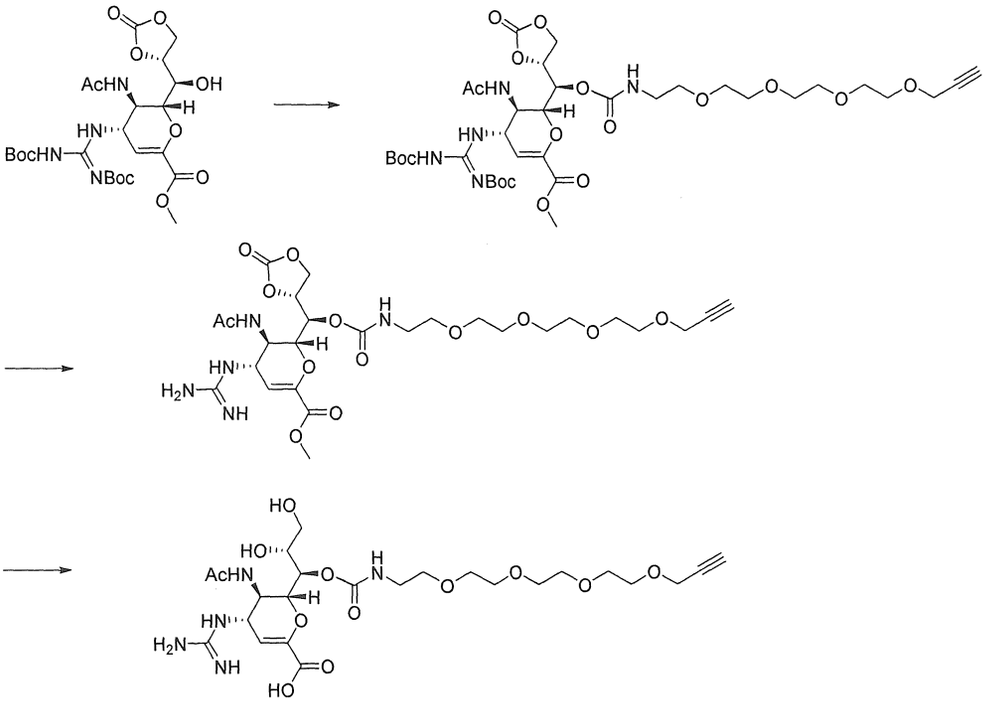
Sản phẩm của bước d (169,7 mg, 0,0923 mmol) được hòa tan trong MeOH (1,5 mL), và dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá. LiOH monohydrat (21 mg, 0,5 mmol) trong nước (1 mL) được bổ sung từng phần trong hơn 1 giờ. Sau khi khuấy qua đêm, hỗn hợp phản ứng được axit hóa bằng dạng hydro Dowex 50W x 8 và được tinh chế qua RPLC (axetonitril 0 đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 107,9 mg, hiệu suất 66,9%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 663,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 442,9$.

Ví dụ 12. Tổng hợp thể liên hợp 2

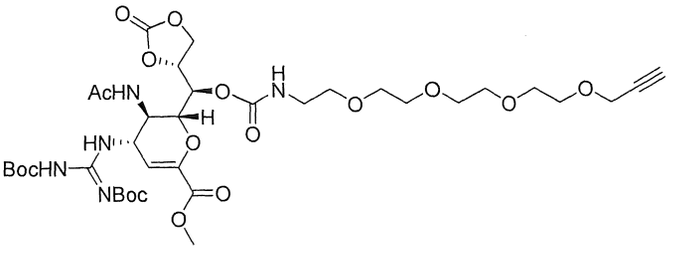
Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 1 (Ví dụ 9) bằng cách sử dụng Int-3 (Ví dụ 11). Phân tích Maldives TOF sản phẩm cuối cùng

được tinh chế cho khối lượng trung bình là 63561 Da (DAR = 3,3). Thu được 43,4 mg, hiệu suất 43%. FIG. 10 thể hiện SDS-PAGE của thể liên hợp 2 không giảm.

Ví dụ 13. Tổng hợp Int-4



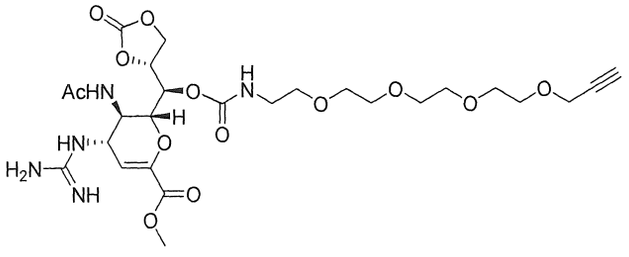
Bước a.



Bình phản ứng được làm khô bằng ngọn lửa được xả bằng nitơ và được nạp chất trung gian Zanamivir (Ví dụ 2) (343,2 mg, 0,6 mmol) và DCM khan (1,5 mL). Dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá và bổ sung DIPEA (234 mg, 1,8 mmol), tiếp theo là 4-nitrophenyl cloroformat (121 mg, 0,6 mmol) và DMAP (67,4 mg, 0,6 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 15 phút, sau đó được bổ sung với một lượng bổ sung 4-nitrophenyl cloroformat (121 mg, 0,6 mmol). Sau khi khuấy trong 2 giờ, nước (0,2 mL) được bổ sung để làm lạnh nhanh cloroformat chưa phản ứng. Sau khi khuấy trong 10 phút, hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào dung dịch propargyl-

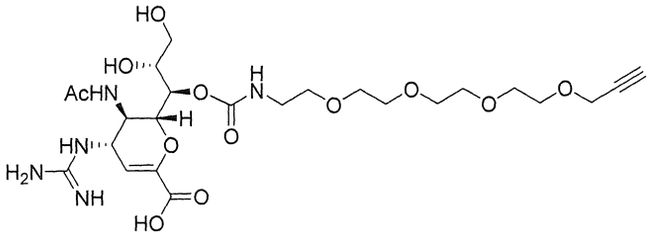
PEG4-amin (185 mg, 0,8 mmol) trong DMF khan (0,5 mL). Phản ứng được tiếp tục trong 1 giờ và sau đó được tinh chế trực tiếp qua RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 60% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phân đoạn thu thập được được đông khô. Thu được 355 mg, hiệu suất 71,3%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+$ = 830,2.

Bước b.



Sản phẩm của bước a (355 mg, 0,428 mmol) được hòa tan trong TFA (1 mL). Dung dịch được khuấy qua đêm, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 5 đến 25% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 260,2 mg, hiệu suất 70,9% qua hai bước. Ion tìm được của LCMS: $[M+H]^+$ = 630,2.

Bước c.

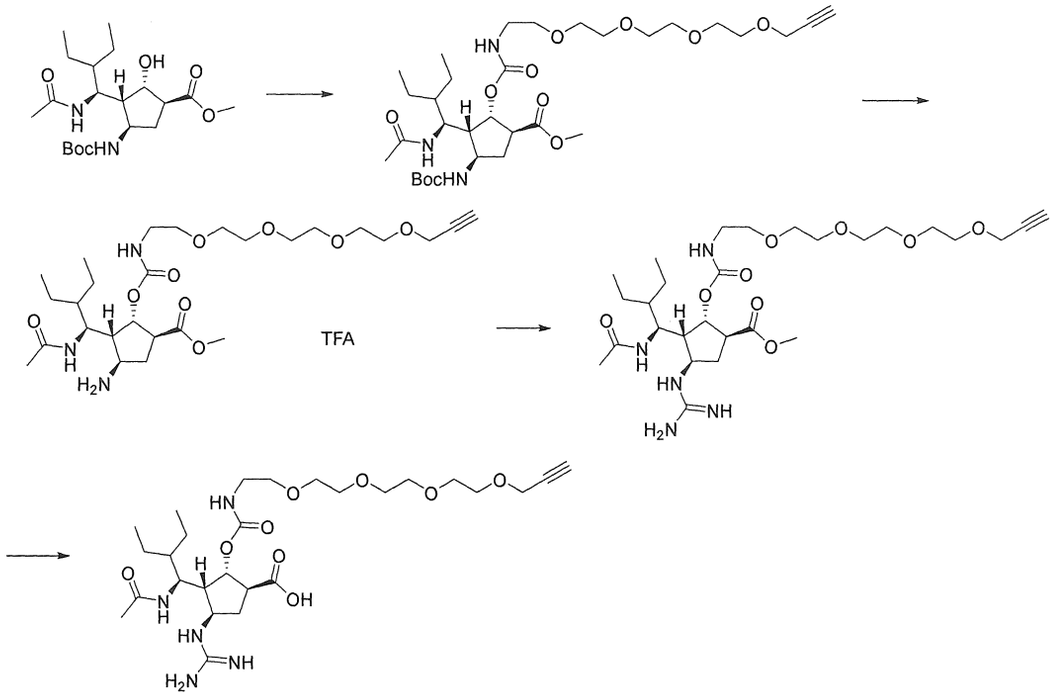


Sản phẩm của bước b (260,2mg, 0,303 mmol) được hòa tan trong MeOH (1,5 mL). Sau khi dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá, dung dịch LiOH monohydrat (42 mg, 1 mmol) trong nước (1 mL) được bổ sung từng phần trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm, sau đó được axit hóa bằng dạng hydro Dowex 50W x 8 và được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 0 đến 50% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 78,1mg, hiệu suất 99%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+$ = 590,2.

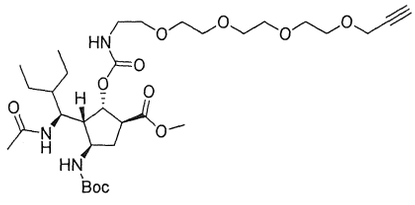
Ví dụ 14. Tổng hợp thể liên hợp 3

Thể liên từ nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 1 (Ví dụ 9) bằng cách sử dụng Int-4 (Ví dụ 13). Phân tích Maldives TOF sản phẩm cuối cùng được tinh chế cho khối lượng trung bình là 61182 Da (DAR = 3,4). Thu được 50,89 mg, hiệu suất 51%. FIG. 11 thể hiện SDS-PAGE của thể liên hợp 3 không giảm.

Ví dụ 15. Tổng hợp Int-5



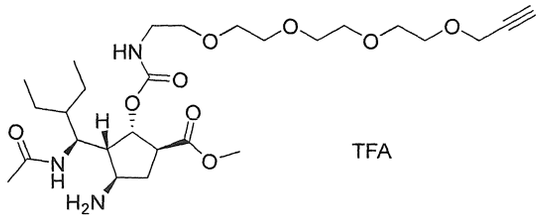
Bước a.



Bình phản ứng làm khô bằng ngọn lửa được rửa bằng nitơ và được tích điện bằng (1S,2S,3R,4R)-metyl 3-((S)-1-axetamido-2-etylbutyl)-4-(tert-butoxycacbonylamino)-2-hydroxyxyclopentancarboxylat (320,4 mg, 0,8 mmol) và DCM khan (2 mL). Dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá và DIPEA (312 mg, 2,4 mmol) được bổ sung, tiếp theo là 4-nitrophenyl cloroformat (161,3 mg, 0,8 mmol) và DMAP (98 mg, 0,8 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 15 phút, sau đó bổ sung một lượng 4-nitrophenyl cloroformat (161,3 mg, 0,8 mmol). Hỗn hợp phản ứng

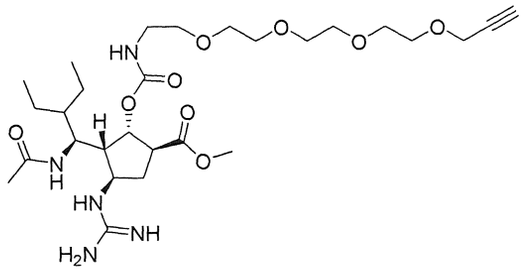
được khuấy trong 2 giờ, sau đó nước (0,2 mL) được bổ sung để làm lạnh nhanh cloroformat chưa phản ứng. Sau khi khuấy trong 10 phút, dung dịch propargyl-PEG4-amin (259 mg, 1,12 mmol) trong DMF khan (0,5 mL) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ và sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 60% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phân đoạn thu thập được được đông khô. Thu được 391,2 mg, hiệu suất 74,4%. Ion tìm được của LCMS: $[M+H]^+ = 658,3$, $[M - Boc + H]^+ = 558,3$.

Bước b.



Sản phẩm của bước a (391,2 mg, 0,595 mmol) được hòa tan trong TFA (0,8 mL), và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 60% và nước). Thu được 323,2 mg, hiệu suất 81%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 558,3$.

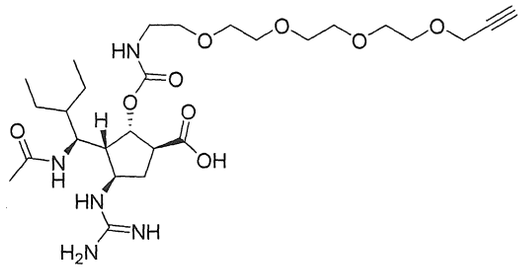
Bước c.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước b (323,2 mg, 0,482 mmol) trong THF (2 mL) được bổ sung N,N'-Bis-Boc-1-guanylpyrazol (224,4 mg, 0,723 mmol) và PIPEA (260 mg, 2 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 ngày và sau đó chiết bằng nước (3 mL) và EtOAc/hexan (1: 1, 8 mL). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 và cô đặc bằng cách cô quay. Phần còn lại được hòa tan lại trong TFA (~ 1mL), và dung dịch được khuấy qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 0 đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Các phân đoạn

thu thập được được đông khô. Thu được 254,2 mg, hiệu suất 83,2%. Các ion tìm được bởi LCMS: $[M+H]^+ = 600,3$, $[M - Boc + H]^+ = 300,6$.

Bước d.

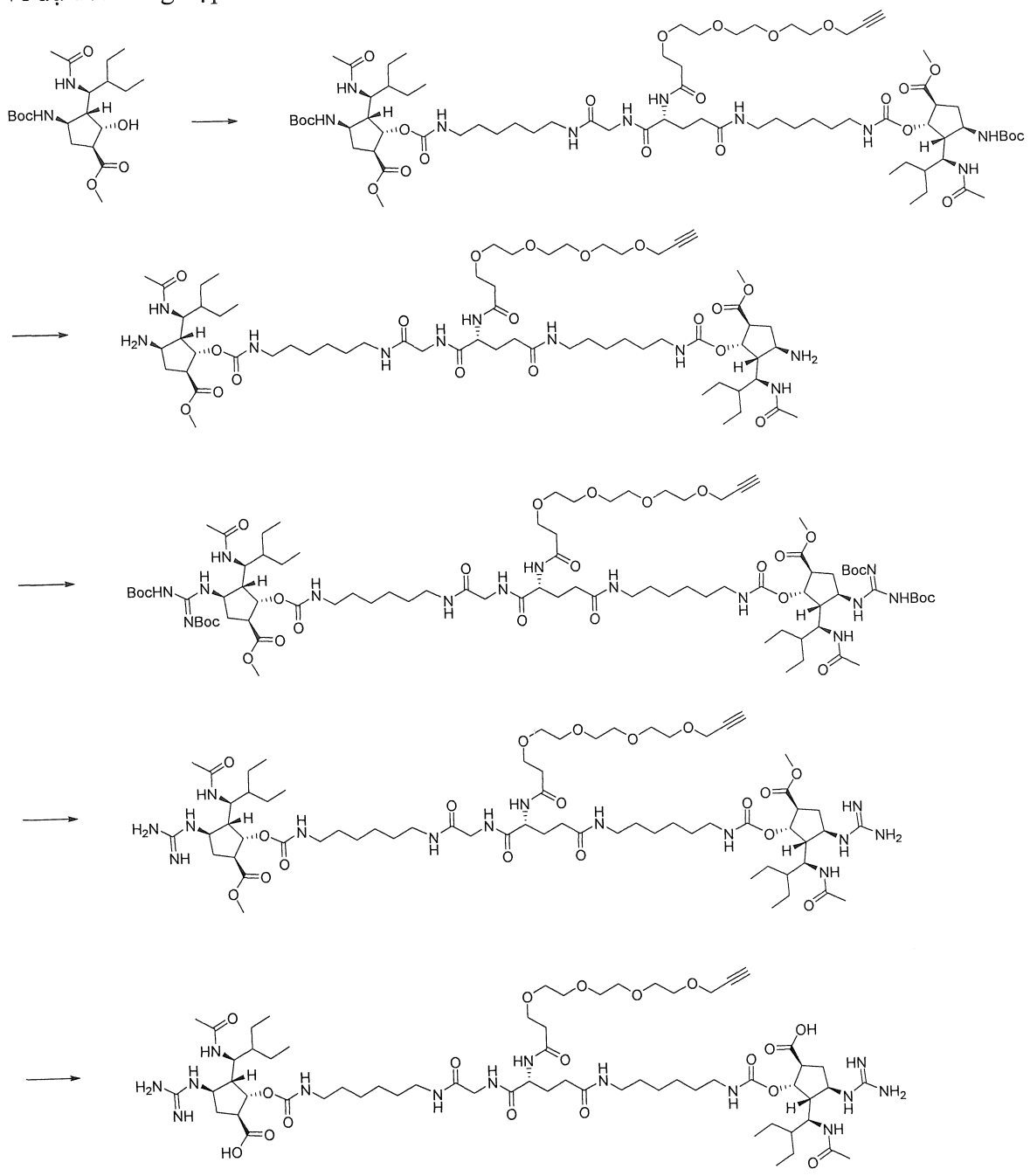


Sản phẩm của bước c (254,2mg, 0,356 mmol) được hòa tan trong THF (1,5 mL), và dung dịch này được làm lạnh trong bể nước đá. $CaCl_2$ dihydrat (419mg, 2,85 mmol) được bổ sung vào, sau đó 1,8 mL KOH (112 mg, 2 mmol) trong nước (2 mL) được bổ sung từng phần trong 1 giờ. Sau khi khuấy thêm 3 giờ, hỗn hợp phản ứng được axit hóa bằng dạng hydro Dowex 50W x 8 và được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 0 đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 102 mg, hiệu suất 49,8%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 586,4$, $[(M + 2H)/2]^+ = 293,8$.

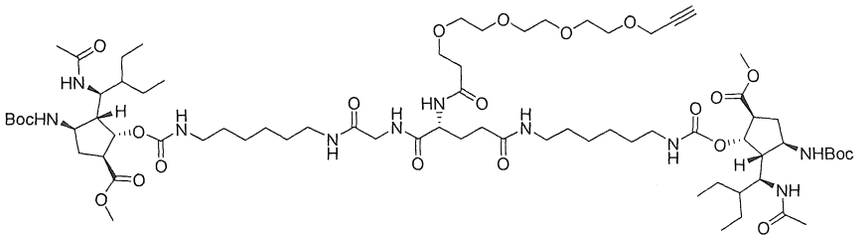
Ví dụ 16. Tổng hợp thể liên hợp 4

Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 1 (Ví dụ 9) bằng cách sử dụng Int-5 (Ví dụ 15). Phân tích Maldives TOF sản phẩm cuối cùng được tinh chế cho khối lượng trung bình là 63002 Da (DAR = 3,4). Thu được 49,315 mg, hiệu suất 49%. FIG. 12 thể hiện SDS-PAGE của thể liên hợp 4 không giảm.

Ví dụ 17. Tổng hợp Int- 6

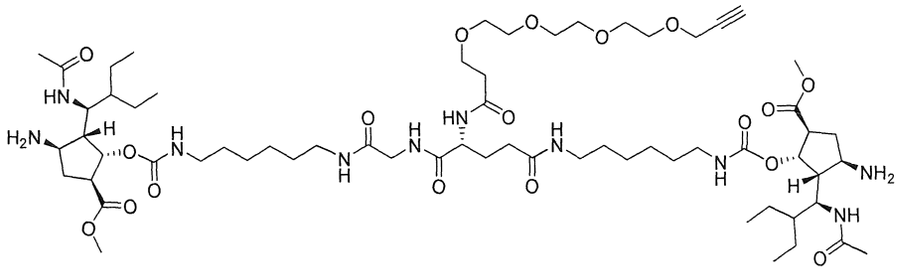


Bước a.



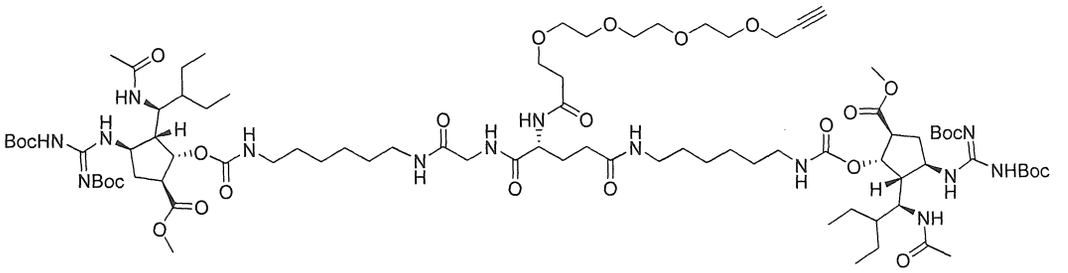
Bình phản ứng làm khô bằng ngọn lửa được rửa bằng nitơ và được tích điện bằng (1S,2S,3R,4R)-metyl 3-((S)-1-axetamido-2-etylbutyl)-4-(tert-butoxycacbonylamino)-2-hydroxy xyclopentancarboxylat (280,4 mg, 0,7 mmol) và DCM khan (1 mL). Sau khi khuấy để hòa tan nguyên liệu ban đầu, DMAP (85,7 mg, 0,7 mmol) được bổ sung vào dung dịch, tiếp theo là bis (pentaflophenyl)cacbonat (295,6 mg, 0,75 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ, sau đó được bổ sung vào dung dịch liên kết cầu nối-2 (Ví dụ 5) (157,5 mg, 0,22 mmol) trong DMF khan (1 mL) và DIPEA (130 mg, 1 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm và được tinh chế bằng RPLC (50 g, axetonitril 5 đến 90% và nước). Các phân đoạn thu thập được được đông khô. Thu được 134,1 mg, hiệu suất 40,7%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 748,6$.

Bước b.



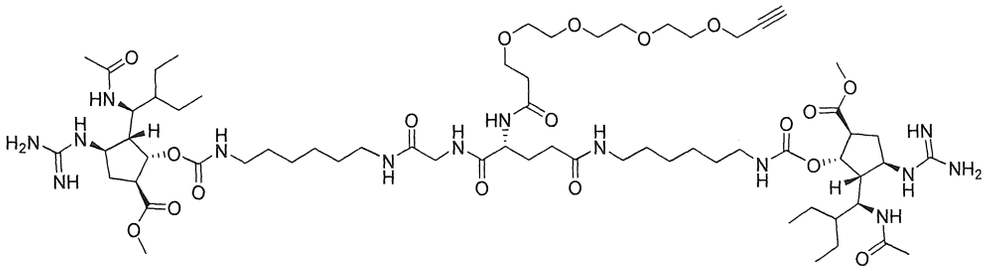
Sản phẩm của bước a (134,1 mg, 0,0896 mmol) được hòa tan trong TFA (0,5 mL). Dung dịch được khuấy trong 20 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (50 g, axetonitril 5 đến 60% và nước). Thu được 108,4 mg, hiệu suất 93,4%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 648,3$, $[(M + 3H)/3]^+ = 432,8$.

Bước c.



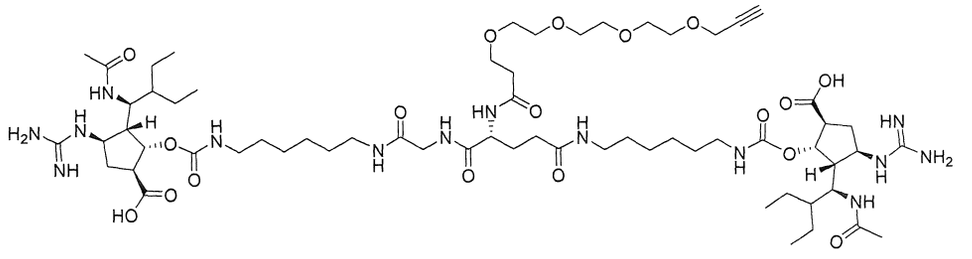
Dung dịch chứa sản phẩm của bước b (108,4 mg, 0,0837 mmol) trong THF khan (1 mL) được bổ sung N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (81,3 mg, 0,285 mmol) và DIEPA (65 mg, 0,5 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 ngày, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 40 đến 75% và nước). Thu được 73,6 mg, hiệu suất 49,4%. Ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 3H)/3]^+ = 594,2$.

Bước d.



Sản phẩm của bước c (73,6 mg, 0,041 mmol) được hòa tan trong TFA (0,5 mL). Dung dịch được khuấy trong 20 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (50 g, axetonitril 5 đến 60% và nước). Thu được 62,1 mg, hiệu suất 94,1%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 690,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 460,8$.

Bước e.

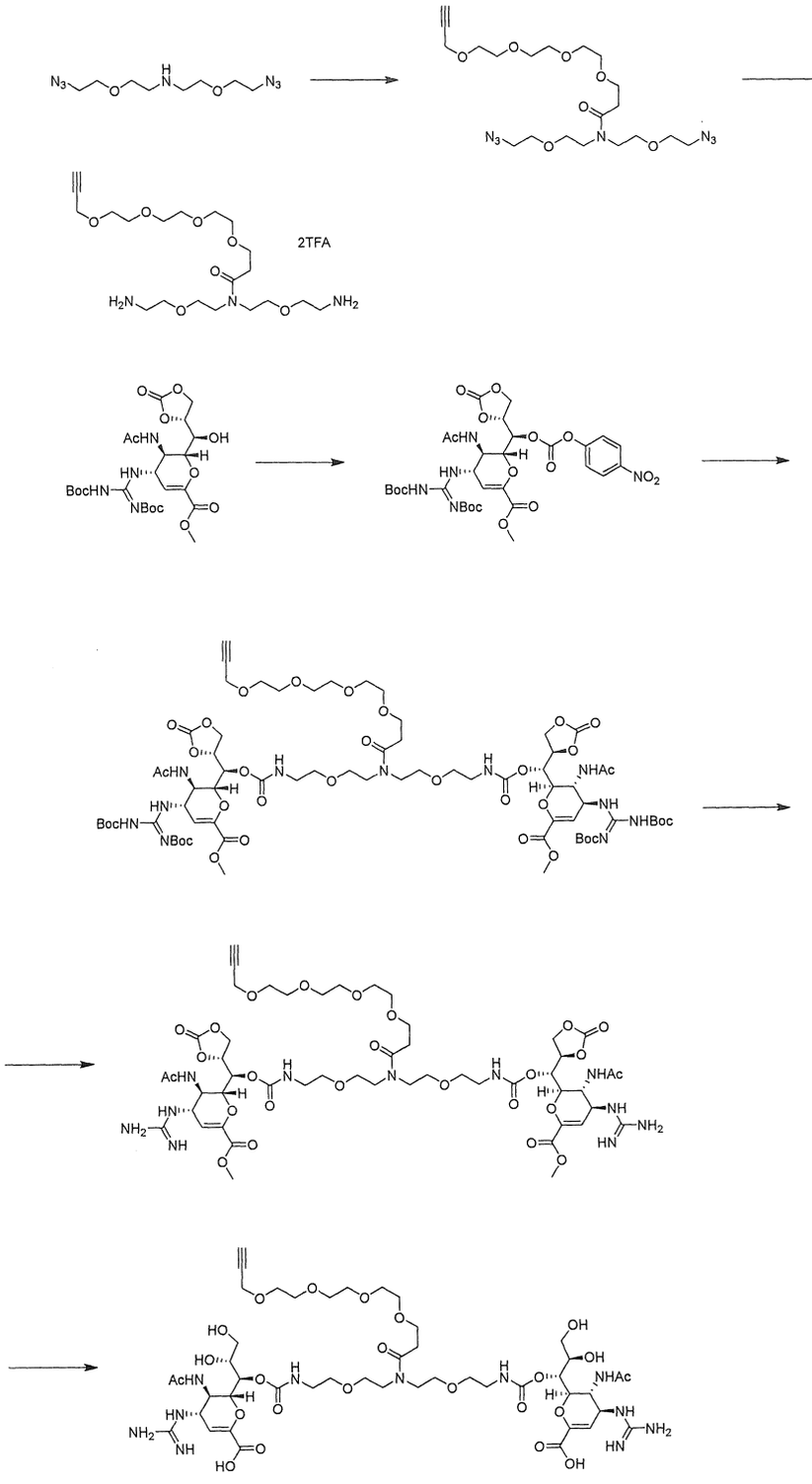


Sản phẩm của bước d (62,1 mg, 0,0386 mmol) trong THF (3 mL) được làm lạnh trong bể nước đá và dung dịch KOH 45% thể tích/thể tích (0,2 mL) được bổ sung từng phần trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ nữa, sau đó được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (0,8 mL) và chiết bằng hexan (10 mL) và nước (1,5 mL). Lớp nước được tinh chế bằng HPLC (axetonitril 0 đến 20% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 36,2 mg, hiệu suất 59,4%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 676,5$, $[(M + 3H)/3]^+ = 451,4$.

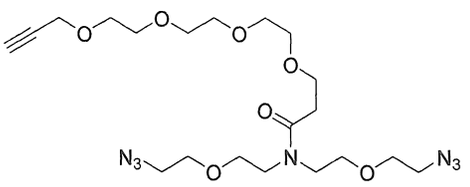
Ví dụ 18. Tổng hợp thể liên hợp 5

Thể liên từ nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 1 (Ví dụ 9) bằng cách sử dụng Int-6 (Ví dụ 17). Phân tích Maldives TOF sản phẩm cuối cùng được tinh chế cho khối lượng trung bình là 63561 Da (DAR = 3,3). Thu được 43,4 mg, hiệu suất 43%. FIG. 13 thể hiện SDS-PAGE của thể liên hợp 5 không giảm.

Ví dụ 19. Tổng hợp Int-7

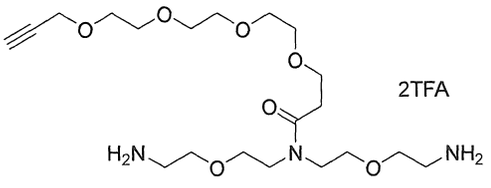


Bước a.



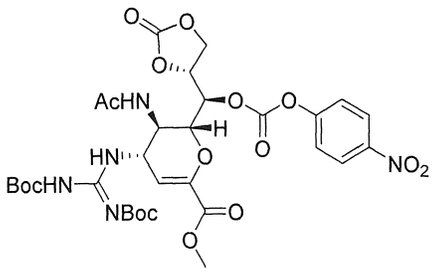
Đối với dung dịch axit propargyl-PEG4-(609 mg, 2,34 mmol) và NH-bis (PEG1-azit) (500 mg, 2,055 mmol) trong DMF khan (2 mL) được bổ sung HATU (889,7 mg, 2,34 mmol) vào các phần trong 5 phút. Sau khi khuấy để hòa tan tất cả chất phản ứng kết hợp, DIPEA (390 mg, 3 mmol) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 40% và nước). Thu được 918 mg, hiệu suất 92%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 486,2$.

Bước b.



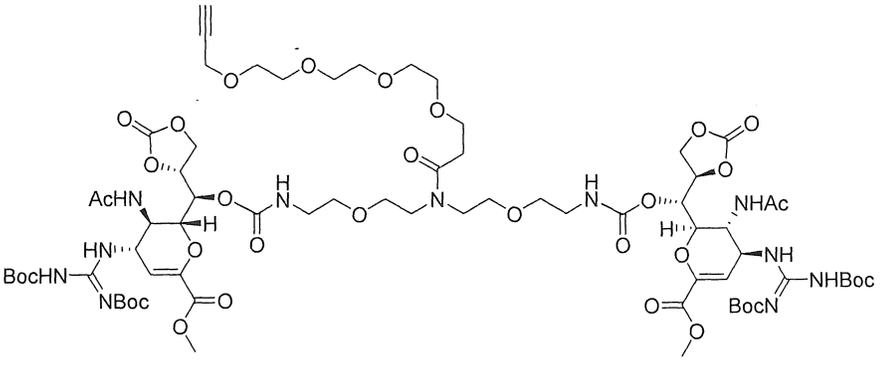
Sản phẩm của bước a (918 mg, 1,89 mmol) được hòa tan trong THF, và dung dịch được làm lạnh đến ~ 13°C. Triphenylphosphin (1,141 g, 4,35 mmol) được bổ sung vào từng phần trong 10 phút. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ ~ 13°C đến nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Bổ sung dung dịch LiOH monohydrat (42 mg, 1 mmol) trong nước (2 mL) và MeOH (1 mL). Sau khi tiếp tục khuấy trong 20 giờ, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng RPLC (100 g, axetonitril 0 đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 825 mg, hiệu suất 65,9%. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 434,4$.

Bước c.



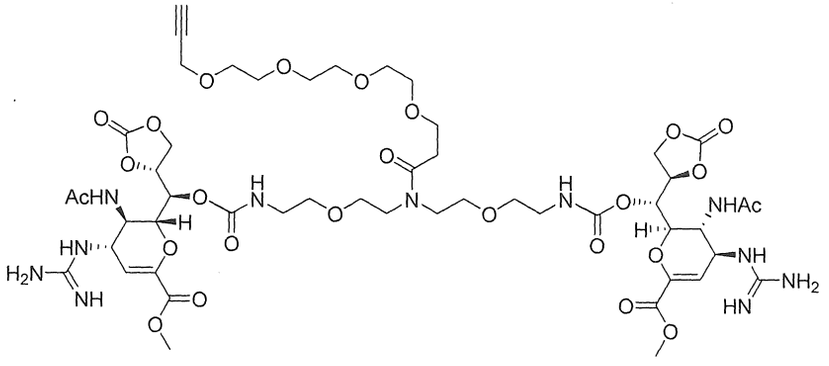
Bình phản ứng được làm khô bằng ngọn lửa được xả bằng nitơ và được nạp chất trung gian Zanamivir (Ví dụ 2) (865 mg, 1,51 mmol) và DCM khan (5 mL). Sau khi khuấy để hòa tan nguyên liệu ban đầu, dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá và 4-nitrophenyl cloroformat (365,3 mg, 1,81 mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là DMAP (152,2 mg, 0,755 mmol). Lấy bể nước đá ra và khuấy hỗn hợp trong 3 giờ. Bổ sung một lượng bổ sung 4-nitrophenyl cloroformat (304,4 mg, 1,51 mmol) và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng nước (1 mL). Sau khi khuấy mạnh trong 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được chiết bằng nước (20 mL x 2) và DCM (20 mL). Lớp hữu cơ được khuấy qua đêm, làm khô bằng Na_2SO_4, và cô đặc bằng cách cô quay. Vật liệu được chuyển sang bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Ion được LCMS tìm thấy: $[M+H]^+ = 738,2$.

Bước d.



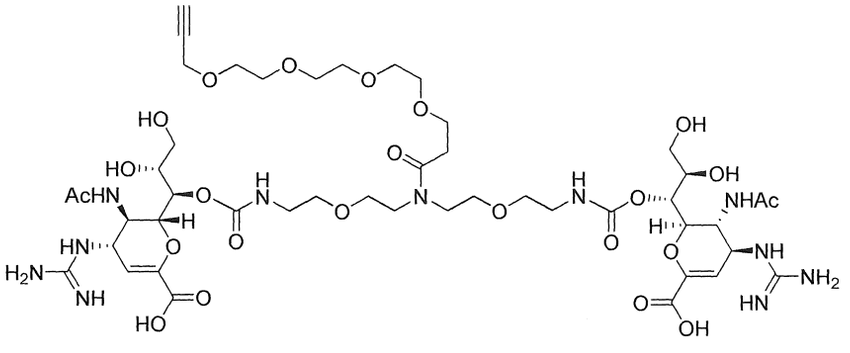
Bổ sung từng giọt dung dịch hỗn hợp của sản phẩm của bước b (429,7 mg, 0,65 mmol) và DIPEA (260 mg, 2 mmol) trong THF khan (1 mL) vào sản phẩm của bước c. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 2 giờ, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 10 đến 65% và nước). Axetonitril trong các phần đã thu gom được loại bỏ bằng cách cô quay ở nhiệt độ trong phòng. Lớp nước không đồng nhất được chiết bằng EtOAc (200 mL), sau đó được chiết ngược lại bằng EtOAc (50 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô trên Na_2SO_4 và cô đặc bằng cách cô quay đến khô. Thu được 442 mg, hiệu suất 41,7%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 815,8$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 765,8$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 716$.

Bước e.



Sản phẩm của bước d (441 mg, 0,271 mmol) được hòa tan trong TFA (1 mL). Dung dịch được khuấy trong 20 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng HPLC (axetonitril 5 đến 20% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 308 mg, hiệu suất 77,9%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 615,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 411$.

Bước f.



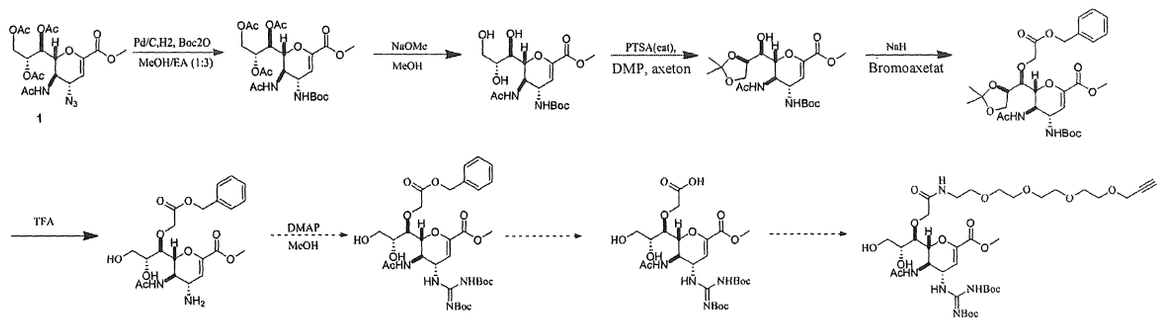
Sản phẩm của bước e (308 mg, 0,211 mmol) được hòa tan trong MeOH (1 mL) và nước (0,5 mL), và dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá. Dung dịch LiOH monohydrat (42 mg, 1 mmol) trong nước (1 mL) được bổ sung từng phần trong hơn 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm, axit hóa bằng dung dịch HCl 4 N trong dioxan (0,25 mL), và được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 0 đến 20% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 198 mg, hiệu suất 64%. Các ion được LCMS tìm thấy: $[(M + 2H)/2]^+ = 575,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 384,2$.

Ví dụ 20. Tổng hợp thể liên hợp 6

Thể liên từ nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 1 (Ví dụ 9) bằng cách sử dụng Int-7 (Ví dụ 19) (SEQ ID NO: 18). Phân tích Maldives TOF sản

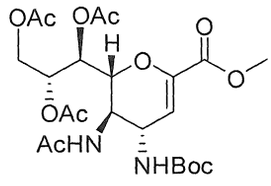
phẩm cuối cùng được tinh chế cho khối lượng trung bình là 62854. Da (DAR = 3,1). Thu được 175,4 mg, hiệu suất 50%. FIG. 14 cho thấy SDS-PAGE không giảm của thể liên hợp 6. Thể liên hợp thu được được mô tả trên Fig. 43.

Ví dụ 21. Tổng hợp Int-8



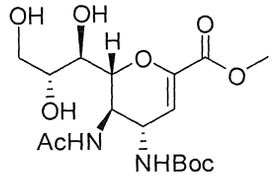
Int-8

Bước a.



Metyl 5-axetoamido-7,8,9-O-triaxetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (1,8 g, 4,0 mmol) được hòa tan vào 40 mL metanol và sau đó được xử lý với 400 mg Pd/C 5% và 1,1 g Boc anhydrit (5,0 mmol), sau đó hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường hydro trong 1 giờ. Paladi-than được loại bỏ bằng cách lọc. Dịch lọc được cô đặc và sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

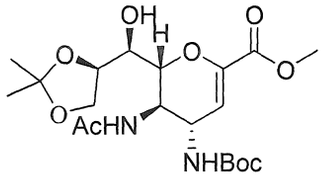
Bước b.



Sản phẩm từ bước trước được hòa tan vào 20 mL metanol khô và sau đó được xử lý từng giọt bằng 2 mL natri metoxit trong metanol (0,5 M) và làm lạnh trong bể nước đá. Sau 2 giờ, tiến trình của phản ứng được xác định bằng LCMS. Hỗn hợp phản

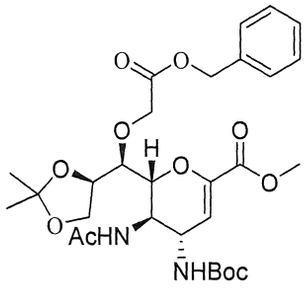
ứng được làm lạnh nhanh bằng HCl 1N đến pH 5-6. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo ngược (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 5% đến 100% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. (Các) ion được LCMS tìm thấy: $(M+H)^+ = 405$

Bước c.



Metyl 5-axetamido-2,6-anhydro-4-[(tert-butoxycacbonyl)amino]-3,4,5-trideoxy-D-erythro-non-2-enonat (0,4 g, 1 mmol) được hòa tan trong 10 mL axeton, 4 mL 2,2-dimethoxypropan và 20 mg axit p-toluenulfonic hydrat (0,1 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được làm lạnh nhanh bằng 1 mL $NaHCO_3$ bão hòa. Hỗn hợp được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo ngược (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 5% đến 100% và nước không có chất cải biến. (Các) ion được LCMS tìm thấy: $(M+H)^+ = 445$.

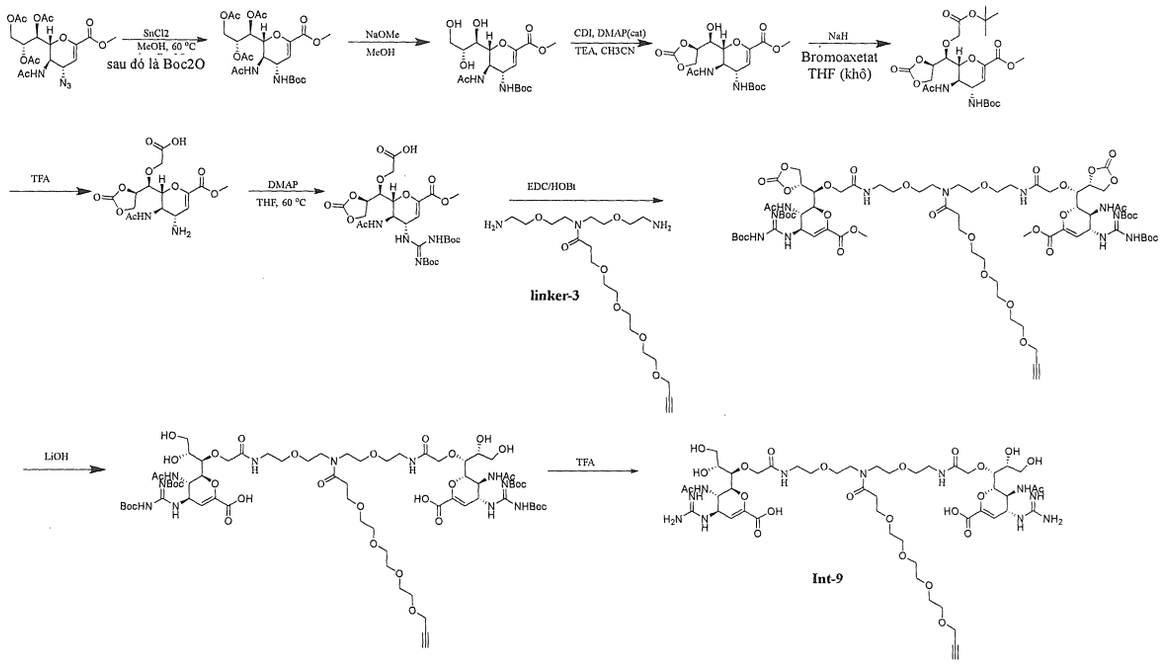
Bước d.



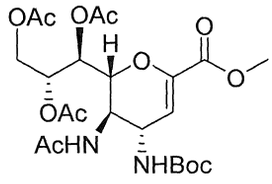
Natri hydrua (40 mg, 60% trong dầu, 1,0 mmol) được bổ sung vào metyl 5-axetamido-2,6-anhydro-4-[(tert-butoxycacbonyl)amino]-3,4,5-trideoxy-8,9-O-(1-metyletyliden)-D-erythro-non-2-enonat (0,25 g, 0,50 mmol) trong 5 mL THF khô có làm lạnh từ bể nước đá. Dung dịch thu được được khuấy trong 0,5 giờ, sau đó benzyl bromoaxetat (0,23 g, 1,0 mmol) được bổ sung. Dung dịch thu được được khuấy trong 2 giờ và được làm lạnh nhanh bằng 5 mL amoni clorua 10% trong nước. Sau đó, dung dịch được pha loãng với 50 mL etyl axetat. Lớp hữu cơ được tách ra và làm khô bằng natri sunfat. Dung dịch hữu cơ đã làm khô được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng

pha đảo ngược (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 5% đến 100% và nước không có chất cải biến. (Các) ion được LCMS tìm thấy: $(M+H)^+ = 593$.

Ví dụ 2 2. Tổng hợp Int-9



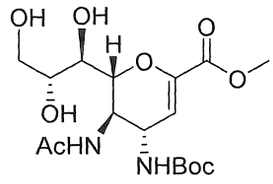
Bước a.



Metyl 5-axetoamido-7,8,9-O-triaxetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (10g, 22mmol) được hòa tan thành 100ml metanol và sau đó đun nóng đến 60°C bằng bể dầu, SnCl2 (5,7g, 20mmol) được bổ sung vào dung dịch thành 3 phần (thận trọng, có khí sinh ra). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút, tại thời điểm đó phản ứng hoàn thành bằng HPLC. Bổ sung từ từ dung dịch sau phản ứng vào dung dịch chứa 50 ml $NaHCO_3$ bão hòa và 50g xelit và khuấy mạnh. Huyền phù đặc thu được được lọc. Dịch lọc được xử lý bằng Boc_2O (6,6g, 30mmol, 1,5 đương lượng). Sau 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch được cô đặc để loại bỏ hầu hết metanol, được hòa tan trong 200ml DCM, và chiết hai lần với 100 ml DCM.

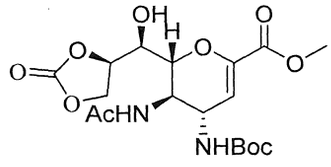
Các chất chiết kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc và sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được thô 12g, hiệu suất 100%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 531.

Bước b.



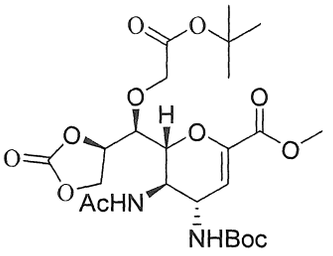
Nguyên liệu từ bước trước được hòa tan vào 60ml metanol khô, tiếp theo là xử lý bằng 10ml natri metoxit trong metanol (0,5 M) trong khi làm lạnh bằng bể nước đá. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS, hoàn thành sau 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng HCl 1N đến pH = 5-6. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 7,2 g các sản phẩm, hiệu suất 80%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 405.

Bước c.



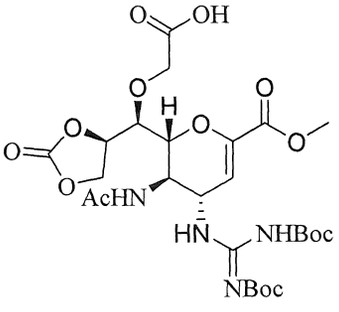
Dung dịch chứa sản phẩm từ bước trước đó (3,5g, 8,5mmol), CDI (2,8g, 2 đương lượng), trimetylamin (4,2ml, 30mmol) và DMAP (240mg, 2mmol) được đun nóng trong axetonitril (50ml) qua đêm, sau đó cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và nước không có chất cải biến. Thu được mong muốn của sản phẩm 2,3 g, hiệu suất 60%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 431.

Bước d.



Natri hydrua (400mg, hiệu suất 60% trong dầu, 10mmol) được bổ sung vào sản phẩm từ bước trước đó (1,45g, 3,3mmol) trong 50 ml THF khô (phản ứng nhạy cảm với độ ẩm) dưới bể nước đá. Dung dịch thu được được khuấy trong 0,5 giờ, sau đó tertbutyl bromo-axetat (2g, 10mmol) được bổ sung vào dung dịch nêu trên, dung dịch thu được được đun nóng đến 60°C trong đêm và được làm lạnh nhanh bằng axit axetic. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước với TFA làm chất cải biến. Thu được 1g, hiệu suất 57%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 593.

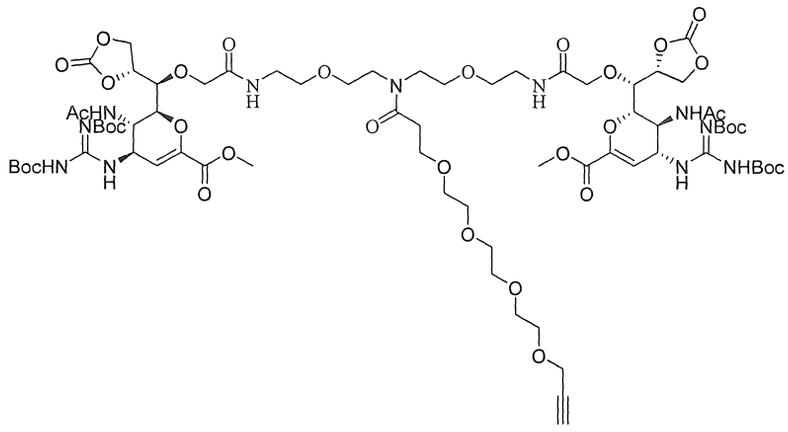
Bước e.



Sản phẩm từ bước trước đó (1,2 g, 2,2 mmol) được khuấy với 10ml TFA ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, và tiến trình khử bảo vệ được LCMS theo dõi. Dung dịch thu được được cô đặc và sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Phần còn lại được hòa tan thành 20 ml THF, sau đó N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (1 g, 3,3 mmol), 4-dimetylaminopyridin (120 mg, 1 mmol) và trietylamin (0,7 ml, 5 mmol) được bổ sung vào dung dịch, và dung dịch thu được được đun nóng đến 60°C trong 2 giờ. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và

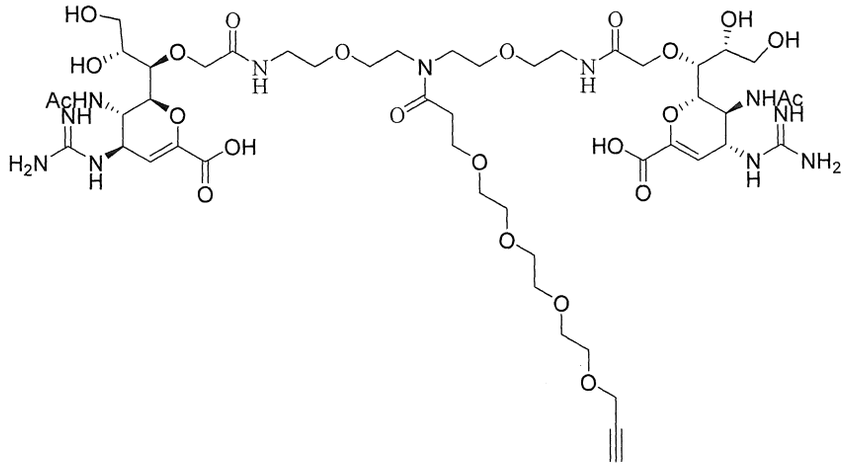
nước không có chất cải biến. Thu được 700mg, hiệu suất 84%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 631.

Bước f.



Đối với dung dịch của liên kết cầu nối-3 (được chuẩn bị như mô tả trong Ví dụ 19) (73mg, 0,14 mmol) và sản phẩm của bước trước đó (200mg, 0,32mmol, 2,2 đương lượng) trong DMF (30 ml) được bổ sung EDC (100 mg, 0,5 mmol), HOAt (65 mg, 3 mmol) và DIEA (0,14 ml, 1 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy qua đêm. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước không có chất cải biến. Thu được 120 mg, hiệu suất 52%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 830.

Bước g.



Lithi hydroxit (24mg, 1mmol) trong 2ml H2O được bổ sung dung dịch chứa sản phẩm từ bước trước đó (120mg, 0,07mmol) trong 2ml THF và 1ml MeOH, LCMS theo dõi tiến trình của phản ứng. Sau khi hoàn thành, dung dịch được bổ sung AMBERLITE® IRN-77, nhựa trao đổi ion để điều chỉnh đến độ pH1, sau đó dung dịch thu được được lọc và dịch lọc được cô đặc và sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Hợp chất thu được được xử lý với 2 ml TFA ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch được khuấy qua đêm ở 40°C, sau đó cô đặc và tinh chế bằng HPLC rửa giải với axetonitril 0% đến 20% và nước, sử dụng TFA làm chất cải biến. Thu được 60 mg, hiệu suất 74%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: $[M/2]^+1 = 589,8$.

Ví dụ 23. Thử nghiệm ức chế neuraminidaza

Thử nghiệm ức chế neuraminidaza sử dụng cơ chất axit 2'-(4-Metylumbeliferyl)-alpha-DN-axeylneuraminic (MUNANA) được thực hiện như mô tả bên dưới. Một cách ngắn gọn, 50 µL neuraminidaza của virut cúm tái tổ hợp đã tinh chế (0,1 ng/µL, 50 mM Tris, 5 mM $CaCl_2$, 200 mM NaCl, pH 7,5) được trộn với 50 µL chất ức chế và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Ít nhất 5 nồng độ của mỗi chất ức chế ở trong phạm vi thích hợp được sử dụng cho mỗi lần lặp lại. Sau khi ủ, 50 µL 400 µM MUNANA trong 50 mM Tris, 5 mM $CaCl_2$, 200 mM NaCl, (pH 7,5) được bổ sung vào dung dịch để bắt đầu phản ứng bằng cách sử dụng pipet 12 đầu (Eppendorf). Mẫu đối chứng dương tính và mẫu đối chứng âm tính được bao gồm trong mỗi làn 12 giếng. Sau khi bắt đầu phản ứng cho từng làn trên đĩa, hỗn hợp phản ứng ngay lập tức được nạp vào máy SpectraMax M5 (Thiết bị phân tử) tại đó huỳnh quang được định lượng trong khoảng thời gian 25 phút ở bước sóng kích thích 365 nm và bước sóng phát xạ 445 nm. Các điểm thời gian đơn lẻ được chọn tại đó mẫu đối chứng dương tính tạo ra tín hiệu huỳnh quang xấp xỉ 1.000. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trong ba lần và giá trị IC50 cho mỗi chất ức chế được tính toán bằng cách khớp hình chữ S của log[chất ức chế] so với tỷ lệ ức chế bằng cách sử dụng GraphPad Prism. FIG. 15 thể hiện biểu đồ của dữ liệu động học dưới dạng RFU/phút trên một phạm vi tuyến tính cho Thể liên hợp 1 và Int-2 cho thấy hiệu quả cao hơn của thể liên hợp 1 dưới dạng chất ức chế neuraminidaza. FIG. 16 và FIG. 17 thể hiện kết

quả thử nghiệm của thể liên hợp 1-6 đối với neuraminidaza rH1N1 và Neuraminidaza rH3N2, tương ứng (Bảng 2).

Bảng 2: Giá trị IC50 cho các thể liên hợp đối với neuraminidaza của H1N1 và H3N2

Số thể liên hợp	H1N1 IC50 (nM)	H3N2 IC50 (nM)
Thể liên hợp 1	3,9	32,5
Thể liên hợp 2	3,7	17,6
Thể liên hợp 3	3,6	38
Thể liên hợp 4	1,9	17,2
Thể liên hợp 5	1,1	14,3
Thể liên hợp 6	4,1	29,8

Ví dụ 24: Thử nghiệm độc tính tế bào

Thể liên hợp 1, 2, 3 và 6 được thử nghiệm về độc tính tế bào. Mười dung dịch pha loãng nối tiếp hai lần của mỗi thể liên hợp bắt đầu ở 10 μM được chuẩn bị trong ba lần để cấy vào các tế bào MDCK trong các đĩa nuôi cấy 96 giếng. Mức sống sót của tế bào được xác định sau 4 ngày xử lý bằng kit CellTiter-GLO. 50% nồng độ độc tế bào (CC_{50}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng XLfit (Bảng 3). Đối với tất cả các hợp chất được thử nghiệm, độc tính tế bào không được quan sát thấy lên đến 10 μM, ngoại trừ thể liên hợp 3. Trong trường hợp thể liên hợp 3, EC_{50} trong thử nghiệm hiệu ứng tế bào (CPE) (xem Ví dụ 23) thấp hơn 725 lần so với CC_{50} trong thử nghiệm này.

Bảng 3: Thử nghiệm độc tính tế bào

Số thể liên hợp	CC_{50} (μM)
Thể liên hợp 1	> 10
Thể liên hợp 2	> 10
Thể liên hợp 3	7,98
Thể liên hợp 6	> 10
PBS	> 10
Zanamivir	> 10

Ví dụ 25. Thử nghiệm hiệu ứng tế bào

Thử nghiệm trung hòa vi mô hóa dựa trên CPE # 1

Để đo khả năng của các thể liên hợp neuraminidaza trong việc bảo vệ tế bào động vật có vú khỏi bị virut cúm lây nhiễm và phá hủy, các thử nghiệm trung hòa vi

mô dựa trên hiệu ứng tế bào (CPE) được tiến hành. Một cách ngắn gọn, hai mươi dung dịch pha loãng nối tiếp hai lần của mỗi thể liên hợp bắt đầu từ 0,25µM được chuẩn bị nhân đôi để cấy trong một giờ với các tế bào MDCK được gieo trong đĩa 96 giếng. Virus INFV CA/09 được bổ sung vào tế bào ở bội số lây nhiễm (MOI) 0,001 trong thời gian ủ trong một giờ. Vào ngày thứ tư sau khi ủ, các tế bào được nhuộm bằng màu tím pha lê và mật độ quang học được đọc để tính toán nồng độ hữu hiệu 50 phần trăm (EC_{50}) của mỗi TA bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng XLfit. Zanamivir được sử dụng làm chất so sánh và mẫu đối chứng dương tính. Fc của người được bao gồm dưới dạng mẫu đối chứng âm tính. Các thể liên hợp 1, 2, 3 và 6 đều thể hiện hiệu suất vượt trội so với mẫu đối chứng zanamivir, cho thấy EC_{50} thấp hơn từ 42 đến 227 lần so với zanamivir (Bảng 4).

Bảng 4: Thử nghiệm trung hòa vi mô hóa dựa trên CPE # 1

Số thể liên hợp	EC_{50} (nM)
1	2,0574
2	4,1487
3	11,007
6	5,2167
PBS	N/C
Fc của người	N/C
Zanamivir †	468,7

N/C: Không tính toán được

† Nồng độ ban đầu 10000 nM

Thử nghiệm trung hòa vi mô hóa dựa trên CPE # 2

Một thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên CPE bổ sung đã được thực hiện để đánh giá thêm hoạt tính in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 7. Tóm lại, các chất thử nghiệm được chuẩn bị ở nồng độ ban đầu là 160 nM và tổng cộng là 10, 2 lần pha loãng được thực hiện. Sau đó, các dung dịch pha loãng chất thử nghiệm được trộn trước với virut Cúm A (INFV CA/09) với bội số lây nhiễm là 0,001 so với đơn lớp. Sau một giờ, chất thử nghiệm + hỗn hợp virut được bổ sung vào các tế bào thận chó Madin-Darby (MDCK) phát triển đến mức hợp lưu 70 - 80% trong điều kiện tiêu chuẩn trong đĩa 96 giếng. Mẫu đối chứng zanamivir được xử lý giống nhau, ngoại trừ nồng độ ban đầu là 9600 nM vì nó được cho là ít mạnh hơn so với các thể liên hợp

đang được thử nghiệm. Sau bốn ngày ủ, đơn lớp được nhuộm bằng màu tím pha lê và mật độ quang học (phản ánh sức khỏe của lớp đơn lớp) được xác định để tính toán nồng độ hữu hiệu 50% (EC_{50}) bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng XLfit (idbs; https: //www.idbs.com).

Như được thể hiện trên Bảng 5, zanamivir ở nồng độ 496 nM làm giảm một nửa tác động gây bệnh tế bào qua trung gian của virut. Ngược lại, thể liên hợp 6 có hoạt tính mạnh hơn khoảng 100 lần với EC_{50} chỉ là 4,64 nM. Thể liên hợp 7, hoạt tính được cải thiện hơn nữa khoảng 15 lần, giảm EC_{50} xuống mức dưới nM.

Bảng 5 : Thử nghiệm trung hòa vi mô hóa dựa trên CPE # 2

Số thể liên hợp	EC_{50} (nM)
6	4,64
7	0,31
Zanamivir	496

Ví dụ 26. Thử nghiệm khả năng sống của tế bào

Tế bào A549 được gieo mầm trong các đĩa 96 giếng một ngày trước khi xử lý hỗn hợp. Tế bào được xử lý bằng Thể liên hợp 3 (FIG. 18A), thể liên hợp 4 (FIG. 18B), hoặc thể liên hợp 6 (FIG. 18C) ở nồng độ 1μM - 10nM trong 24 giờ. Mức sống sót của tế bào sau đó được đo bằng Cell Titer Glow (Promega). Kết quả thể hiện giá trị trung bình và SD (độ lệch chuẩn) của ba bản sao sinh học. Không có tác động nào được quan sát thấy đối với khả năng sống của tế bào đối với liên hợp bất kỳ ở nồng độ bất kỳ ở nồng độ bất kỳ được sử dụng trong thử nghiệm sự sinh trưởng của virut (Ví dụ 27).

Ví dụ 27. Thử nghiệm sự sinh trưởng của virut

Để đo khả năng của các thể liên hợp neuraminidaza trong việc ức chế sự phát triển của các chủng virut cúm gây bệnh quan tâm đến các tế bào biểu mô của người, các thử nghiệm giảm mảng bám của virut được tiến hành. Một cách ngắn gọn, tế bào A549 được gieo mầm trong các đĩa 24 giếng một ngày trước khi xử lý hỗn hợp. Tế bào được xử lý bằng các hợp chất ở nồng độ 1 μM - 10 nM trong 2 giờ và bị nhiễm các chủng virut được chỉ định ở MOI 0,01 trong thời gian ủ trong một giờ. Virut được loại bỏ, tế bào được rửa sạch và các hợp chất được tái áp dụng ở nồng độ 1 μM - 10 nM.

Dịch nổi bề mặt được thu thập tại các thời điểm đã chỉ định và được chuẩn độ bằng phương pháp thử nghiệm mảng bám trong tế bào MDCK. Kết quả thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) của ba bản sao sinh học. Oseltamivir được sử dụng làm mẫu đối chứng so sánh và mẫu đối chứng dương tính. Thể liên hợp 3 (FIGS. 19A-19E), thể liên hợp 4 (FIGS. 20A-E), hoặc thể liên hợp 6 (FIGS. 21A-21E và FIGS. 22A-22E) đều thể hiện hiệu suất vượt trội so với mẫu đối chứng oseltamivir, cho thấy mức mảng bám tương tự hoặc (thường là) giảm vượt trội so với oseltamivir ở nồng độ thấp hơn 100 lần. Ảnh hưởng của các hợp chất (để đánh giá các chất thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào) trên các tế bào A549 được đánh giá cho mỗi chất thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống của tế bào (Ví dụ 26). Một cách ngắn gọn, các tế bào A549 được gieo mầm trong các đĩa 96 giếng một ngày trước khi xử lý hỗn hợp. Tế bào được xử lý bằng các hợp chất ở nồng độ 1 μM - 10 nM trong 24 giờ. Mức sống sót của tế bào sau đó được đo bằng Cell Titer Glow (Promega). Kết quả thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) của ba bản sao sinh học.

Ví dụ 28. Thời gian bán hủy huyết thanh chuột

Các nghiên cứu dược động học (PK) sử dụng các con chuột cái CD-1 (Phòng thí nghiệm Charles River) từ 20 đến 22 gam. Chuột được tiêm IV theo đường tĩnh mạch đuôi, với liều lượng 50 mg/kg vật phẩm (10 ml/kg thể tích liều). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào các thời điểm thích hợp, các con chuột được lấy máu không đến chết (qua hốc mắt, má hoặc tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập trong ống EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu thu thập được được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) và huyết tương được lấy ra để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ huyết tương của thể liên hợp 6 hoặc hIgG1 Fc tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza hoặc các tấm phủ kháng thể kháng hIgG1 và sau đó được phát hiện bằng kháng thể IgG-Fc kháng người được liên hợp với HRP. hIgG1 được thu thập bằng kháng thể kháng hIgG1 Fc. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường

cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

Các tấm Qiagen Ni-NTA HisSorb (Cat số 35061, Qiagen) được phủ bằng Neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Bio) hoặc kháng thể kháng IgG1 Fc trong dung dịch đệm phủ 1X KPL (5150-0041, SeraCare). Trong trường hợp kháng thể kháng IgG1 Fc được sử dụng để bắt giữ chất thử nghiệm, kháng thể kháng IgG1 Fc bắt giữ và phát hiện được chọn để gắn kết với các epitop khác nhau. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Pha loãng theo chuỗi các mẫu huyết tương được dàn mỏng và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: 0,5% sữa bột không béo + 3% huyết thanh dê trong PBS Tween20 0,05%; nồng độ cuối cùng của huyết tương chuột chưa qua xử lý là 1:900). Đường cong chuẩn Fc liên hợp 6 hoặc hIgG1 trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Các dung dịch pha loãng nối tiếp của các mẫu huyết tương được dàn mỏng và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: 0,5% sữa khô không béo + 3% huyết thanh dê trong PBS Tween20 0,05%; nồng độ cuối cùng trong huyết tương chuột nguyên thể là 1:900). Các đường cong chuẩn Fc thể liên hợp 6 hoặc hIgG1 nằm trong khoảng từ 500 - 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300uL PBS với Tween20 0,05%. Thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa (hoặc kháng thể kháng hIgG1 Fc) sau đó được thăm dò bằng kháng thể kháng IgG Fc F(ab')2 Fc của người được liên hợp với HRP (Jackson 709-036-098) pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300uL PBS với Tween20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7 phút. Phản ứng được dừng lại bằng H_2SO_4 1N. Độ hấp thụ được đọc ở 450nm. Quy trình tương tự được sử dụng cho hIgG1 Fc, trong đó chỉ sử dụng kháng thể kháng Fc hIgG1 để bắt giữ. Số lượng thể liên hợp 6 được đo tại các thời điểm khác nhau bằng cách sử dụng neuraminidaza hoặc kháng thể Fc kháng hIgG1 đều tương tự nhau trong phạm vi sai số thực nghiệm, cho thấy thể liên hợp nguyên vẹn ổn định *in vivo*.

Tổng thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc) trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng cách sử dụng trong GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi

tuyến tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Các tham số PK đã được tính toán bằng phần mềm WinNonlin. Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 và hIgG1 Fc được thể hiện trên FIG. 23 và tóm tắt các tham số PK chính được cung cấp trong Bảng 6. Bất ngờ là, sự phơi nhiễm huyết tương và thời gian bán hủy cuối cùng tốt hơn đáng kể đối với thể liên hợp 6 so với hIgG1 Fc kiểu dại. AUC trong 8 ngày cao hơn 3 lần đối với thể liên hợp 6 so với hIgG1 Fc và thời gian bán hủy cuối cùng đối với thể liên hợp 6 là 214 giờ, so với 52 giờ đối với IgG1 Fc của người.

Bảng 6: PK chuột của thể liên hợp 6 so với hIgG1 Fc

	Thời gian bán hủy (giờ)	AUClast (giờ * mg/mL)
Thể liên hợp 6	214	33100
hIgG1	51,8	10600

Ví dụ 29. Hiệu quả của thể liên hợp 6 trong mô hình cúm chuột gây chết: Nghiên cứu số 1

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm INFV A H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột đều được thử thách với 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Nhóm 1-6 được điều trị bằng đường tĩnh mạch, 4 giờ trước khi thử thách (Bảng 7). IgG1 của người (chỉ Fc) được đưa vào làm mẫu đối chứng âm tính bổ sung. Nhóm 7 được dùng Oseltamivir phosphat qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm, dùng hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Tất cả các con chuột đều được theo dõi tình trạng sụt cân (FIG. 24, Bảng 8) và tỷ lệ sống sót (FIG. 25, Bảng 9) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Các con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% với một liều duy nhất ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm, so với tỷ lệ sống sót 20% và 0% ở nhóm đối chứng dùng chất mang và nhóm đối chứng hIgG1. Kết quả có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm chất mang ($p = 0,0135$) mặc dù quy mô nhóm nhỏ ($n = 5$). Khi so sánh với nhóm dùng Oseltamivir phosphat, thể liên hợp 6 cho thấy hiệu quả tương tự ở liều tích lũy thấp hơn 500 lần (tính bằng mg/kg). Chuột ở tất cả

các liều của thể liên hợp 6 đều duy trì cân nặng trong toàn bộ quá trình thử nghiệm, vượt trội hơn nhóm đối chứng dùng Oseltamivir.

Bảng 7: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n = 5	Thử thách Ngày 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virus cúm A, chủng H1N1 A/Texas/36/91 lây nhiễm qua đường mũi	Tá dược (PBS)	N / A	Tiêm tĩnh mạch, một lần một ngày, 4 giờ trước thử thách
2		Fc một mình	50	
3		Thể liên hợp 6	50	
4		Thể liên hợp 6	10	
5		Thể liên hợp 6	2	
6		Thể liên hợp 6	0,4	
7		Oseltamivir (Tamiflu™)	20	PO, hai lần mỗi ngày, 8 giờ sau thử thách trong 5 ngày

Bảng 8: Cân nặng trung bình hàng ngày

Ngày sau khi lây nhiễm	Trọng lượng trung bình hàng ngày (Số chuột chỉ được bổ sung vào Nhóm 1 & 2)						
	Tá dược (PBS)	Fc một mình	Thể liên hợp 6				Oseltamivir phosphat
		50mg/kg	50mg/kg	10mg/kg	2mg/kg	0,4mg/kg	20mg/kg
0	17,9 (5)	17,9 (5)	18,7	19,3	18,5	18,8	18,8
1	18,0 (5)	18,0 (5)	18,8	19,36	18,6	18,8	18,9
2	18,5 (5)	18,8 (5)	19,2	19,6	19,4	18,8	19,2
3	17,7 (5)	17,7 (5)	18,9	19,5	19,1	18,9	19,1
4	17,2 (5)	17,0 (5)	19,5	19,9	19,3	18,9	18,9
5	16,3 (5)	15,8 (5)	19,2	19,8	19,5	18,7	18,8

6	15,6 (4)	15,0 (5)	19,1	19,9	19,5	18,7	18,4
7	15,5 (2)	14,0 (2)	18,8	19,6	19,2	18,9	17,3
8	17,2 (1)		19,1	20,0	19,7	19,2	17,1
9	20,1 (1)		18,7	19,3	19,1	18,8	17,8
10	20,0 (1)		19,1	20,1	19,5	19,3	18,9
11	20,4 (1)		19,0	19,8	19,2	19,2	18,7
12	20,6 (1)		19,6	20,3	19,8	19,3	19,2
13	20,3 (1)		19,2	20,4	19,7	19,7	19,3
14	20,7 (1)		19,5	20,6	19,9	19,8	19,6

Bảng 9: Mức sống sót của chuột

Hợp chất	Liều lượng	Mức sống sót trung bình	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược (P)
Tá dược (PBS)	N/A	7	20	N/A
Fc một mình	50mg/kg	7	0	0,8335
Thể liên hợp 6	50mg/kg	15	100	0,0135
Thể liên hợp 6	10mg/kg	15	100	0,0135
Thể liên hợp 6	2mg/kg	15	100	0,0135
Thể liên hợp 6	0,4mg/kg	15	100	0,0135
Oseltamivir phosphat	20mg/kg BID	15	100	0,0135

Ví dụ 30. Hiệu quả của thể liên hợp 6 trong mô hình cúm chuột gây chết: Nghiên cứu số 2

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm INFV A H3N2 gây tử vong ở chuột cái BALB/c. Thí nghiệm bao gồm 11 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột đều được thử thách với 1xLD90 H3N2 A/Hong Kong/1/68. Nhóm 1-10 được điều trị bằng đường tĩnh mạch, 4 giờ trước khi thử thách (Bảng 10). IgG1 của người (chỉ Fc) được đưa vào làm mẫu đối

chứng âm tính bổ sung. Nhóm 11 được dùng Oseltamivir phosphat qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm, dùng hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Tất cả các con chuột đều được theo dõi tình trạng sụt cân (FIG. 26) và tỷ lệ sống sót (FIG. 27, Bảng 11) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Các con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% với liều duy nhất xuống đến 0,4 mg/kg và tỷ lệ sống sót 80% với liều duy nhất 0,2 mg/kg so với tỷ lệ sống sót 0% ở nhóm đối chứng dùng chất mang và nhóm đối chứng hIgG1. 80% chuột sống sót trong nhóm đối chứng dùng oseltamivir. Kết quả có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm dùng tá dược ($p = 0,0128$) mặc dù quy mô nhóm nhỏ ($n = 5$). Khi so sánh với nhóm dùng Oseltamivir phosphat, thể liên hợp 6 cho thấy hiệu quả tương tự ở liều tích lũy thấp hơn 1000 lần (tính bằng mg/kg). Chuột ở tất cả các liều của thể liên hợp 6 đều duy trì ở mức 0,4 mg/kg trọng lượng của chúng trong vòng 5%, vượt trội so với nhóm đối chứng dùng oseltamivir.

Bảng 10: Thiết kế nghiên cứu

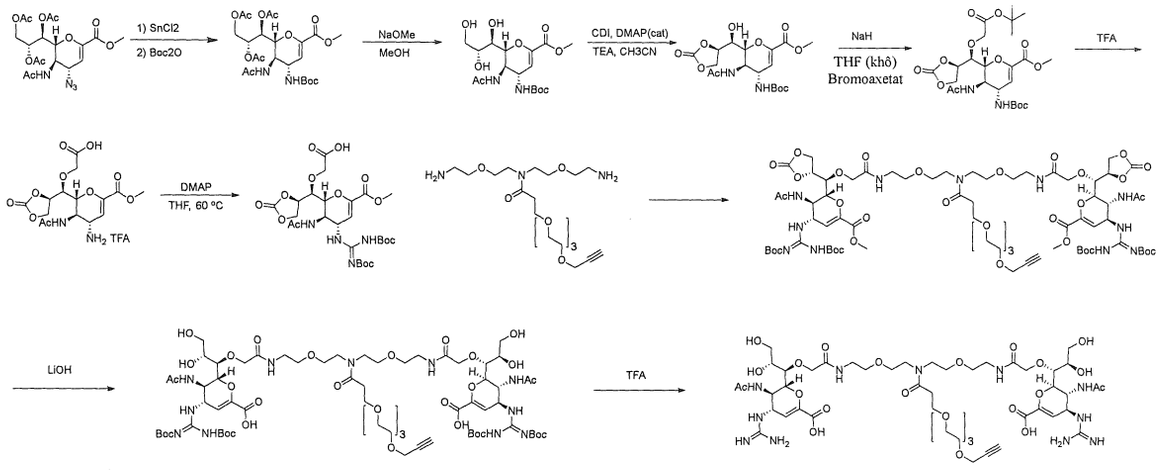
Nhóm n=5	Thử thách ngày 0	Chất thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị	Giá trị đọc/Điểm cuối
1	H3N2 A/ Hong Kong/1/68 qua đường mũi	Tá dược (PBS)	N/A	Tiêm tĩnh mạch (IV), một lần một ngày, 4 giờ trước thử thách	Theo dõi cân nặng và điểm số sức khỏe hàng ngày trong 15 ngày sau thử thách % mức sống sót
2		Fc một mình	50		
3		Thể liên hợp 6	50		
4			2		
5			0,4		
6			0,2		
7			0,1		
8			0,05		
9			0,025		
10			0,0125		
11		Oseltamivi	20	Qua đường	

		r (Tamiflu™)		miệng, hai lần mỗi ngày, 8 giờ sau thử thách trong 5 ngày	

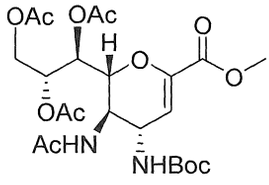
Bảng 11: Tỷ lệ sống sót của chuột

Hợp chất	Liều lượng	Thời gian sống sót trung bình (ngày)	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược (giá trị p)
Tá dược (PBS)	N/A	9	0	N/A
Mẫu đối chứng Fc	50 mg/kg	8	0	0,2498
Thể liên hợp 6	50 mg/kg	15	100	0,002
	2 mg/kg	15	100	0,002
	0,4 mg/kg	15	100	0,002
	0,2 mg/kg	15	80	0,0128
	0,1 mg/kg	9	20	0,8264
	0,05 mg/kg	9	20	0,5769
	0,025 mg/kg	8	20	> 0,9999
	0,0125 mg/kg	11	0	0,4703
Oseltamivir phosphat (BID trong 5 ngày)	20 mg/kg	15	80	0,0052

Ví dụ 31. Tổng hợp Int-10

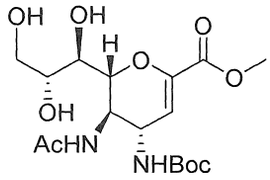


Bước a.



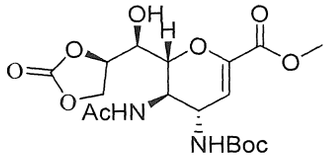
Metyl 5-axetamido-7,8,9-O-triaxetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (SM-1, 10 g, 22 mmol) được hòa tan vào 100 ml metanol và sau đó đun nóng đến 60°C bằng nồi cách thủy, SnCl2 (5,7 g, 20 mmol) được bổ sung vào dung dịch thành 3 phần (thận trọng, khí sinh ra). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút, tại thời điểm đó phản ứng hoàn thành bằng HPLC. Bổ sung từ từ dung dịch sau phản ứng vào dung dịch chứa 50 ml $NaHCO_3$ bão hòa và 50g xelit và khuấy mạnh. Huyền phù đặc thu được được lọc. Dịch lọc được xử lý bằng Boc_2O (6,6 g, 30 mmol, 1,5 đương lượng). Sau 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch được cô đặc để loại bỏ hầu hết metanol, được hòa tan trong 200 ml DCM, và chiết hai lần với 100 ml DCM. Các chất chiết kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc và sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được thô 12 g, hiệu suất 100%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 531.

Bước b.



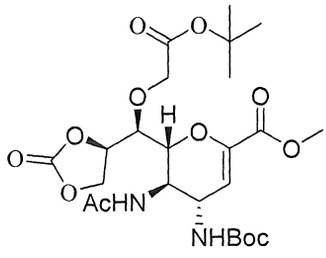
Nguyên liệu từ bước trước được hòa tan vào 60ml metanol khô, tiếp theo là xử lý bằng 10ml natri metoxit trong metanol (0,5 M) trong khi làm lạnh bằng bể nước đá. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS, hoàn thành sau 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng HCl 1N đến pH = 5-6. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 7,2g các sản phẩm, hiệu suất 80%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 405.

Bước c.



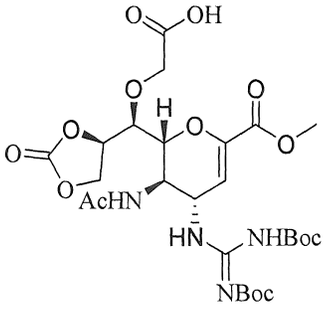
Dung dịch trung gian từ bước trước đó (3,5g, 8,5mmol), CDI (2,8g, 2 đương lượng), trimetylamin (4,2ml, 30mmol) và DMAP (240mg, 2mmol) được đun nóng ở 60°C trong DMF (50 ml) qua đêm, sau đó cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và thu được kết quả mà không cần chất cải biến. Thu được 2,3 g sản phẩm mong muốn, hiệu suất 60%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 431.

Bước d.



Natri hyđrua (400 mg, hiệu suất 60% trong dầu, 10 mmol) được bổ sung vào Int-4 (1,45 g, 3,3 mmol) trong 50 ml THF khô (phản ứng nhạy với độ ẩm) trong bể nước đá. Dung dịch thu được được khuấy trong 0,5 giờ, sau đó tert-butyl bromo axetat (2 g, 10 mmol) được bổ sung vào dung dịch nêu trên. Dung dịch thu được được làm nóng đến 60°C qua đêm và được làm lạnh nhanh bằng axit axetic, cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước với TFA làm chất cải biến. Thu được 1g, hiệu suất 57%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 593. (Phản ứng khá sạch bằng HPLC, nhưng hiệu suất tách thấp)

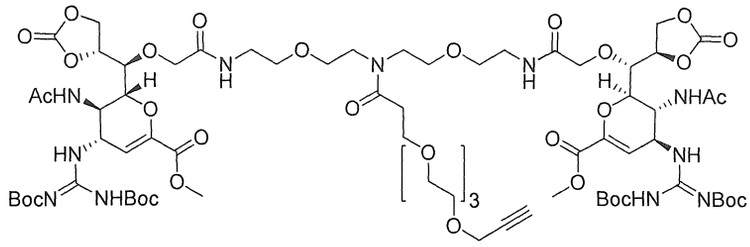
Bước f.



Chất trung gian từ bước trước đó (1,2 g, 2,2 mmol) được khuấy với 10 ml TFA ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Tiến trình khử bảo vệ được theo dõi bằng LCMS. Dung dịch thu được được cô đặc và sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

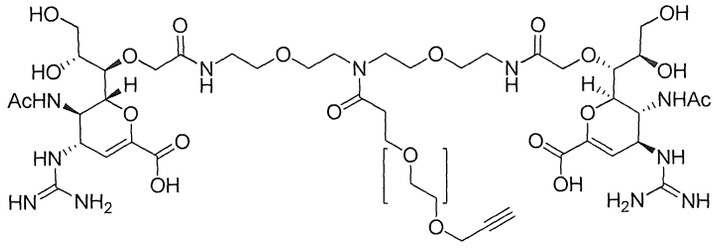
Phần còn lại từ phản ứng trước được hòa tan thành 20 ml THF, sau đó là N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (1 g, 3,3 mmol), 4-dimetylaminopyridin (120 mg, 1 mmol) và trietyl amin (0,7 ml, 5 mmol) được bổ sung vào dung dịch, và dung dịch thu được được đun nóng đến 60°C trong 2 giờ. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước không có chất cải biến. Thu được 700mg, hiệu suất 84%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 631.

Bước g.



Đối với dung dịch của liên kết cầu nối-3 (được điều chế như mô tả trong Ví dụ 19) (73 mg, 0,14 mmol) và chất trung gian từ bước trước. (200 mg, 0,32 mmol, 2,2 đương lượng) trong DMF (30 ml) được bổ sung EDC (100 mg, 0,5 mmol), HOAt (65 mg, 3 mmol) và DIEA (0,14 ml, 1 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy qua đêm. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước không có chất cải biến. Thu được 120 mg, hiệu suất 52%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 830.

Bước h.



Lithi hydroxit (24 mg, 1 mmol) trong 2 ml nước được bổ sung vào dung dịch chất trung gian từ bước trước đó (120 mg, 0,07 mmol) trong 2 ml THF và 1 ml MeOH. Sau khi phản ứng hoàn thành bằng LCMS, dung dịch được làm lạnh nhanh bằng AMBERLITE® IRN-77, nhựa trao đổi ion để điều chỉnh đến độ pH = 1, sau đó dung dịch được lọc và dịch lọc được cô đặc và sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Chất trung gian từ bước trước được xử lý trong 2 ml TFA ở nhiệt độ trong phòng qua đêm ở 40°C. Hỗn hợp phản ứng thô được cô đặc và tinh chế bằng HPLC với 0% đến 20% axetonitril và nước, sử dụng TFA làm chất cải biến. Thu được 60 mg, hiệu suất 74%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: $[M/2]^+1$ = 589,8.

Ví dụ 32. Tổng hợp thể liên hợp 7

Dung dịch Fc-PEG4-azit (mỗi monome miền Fc có trình tự SEQ ID NO: 38) trong dung dịch đệm PBSx1 (100 mg, 1,28 μmol, 6,1 mL, MW = 57260 Da, DAR = 3,6) được bổ sung vào Int -10 (được điều chế như mô tả trong Ví dụ 31) (muối TFA, 44 mg, 0,031 mmol) và các dung dịch PBS pH 7,4 mới chuẩn bị của $CuSO_4$ (0,7 mL 50,0 mM, 20 eq), tris (3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (THPTA, 0,7mL 50,0 mM, 20 đương lượng), và natri ascorbat (1,05 mL 50,0 mM, 30 đương lượng). Dung dịch đồng nhất thu được được khuấy bằng bàn khuấy trong 12 giờ. Các dung dịch thô được pha loãng với PBS pH 7,4 đến nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL, và siêu lọc (10.000 MWCO) đến thể tích 1 mL, hai lần. Sau đó, hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4 và được tinh chế bằng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng máy quang phổ nhìn thấy NANODROP™ UV (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của Fc được sử dụng trong thể liên hợp và được cô đặc đến khoảng 10 mg/mL bằng máy cô đặc ly tâm (10.000 MWCO). Các phân tử tinh khiết được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 μg mỗi phân tử vào gel và nhuộm bằng thuốc nhuộm Instant Blue. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định. Hiệu suất thường là 40-60%. Phân tích MALDI MS cho thấy một dải khối lượng (60000-90000) với khối lượng trung bình là 63633. DAR trung bình = 4,5.

Ví dụ 33. Hiệu quả của thể liên hợp 6 trong mô hình cúm chuột gây chết: Nghiên cứu số 3

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm INFV A H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả chuột đều được thử thách với 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Nhóm 1-6 được điều trị bằng đường tĩnh mạch, 28 ngày trước khi thử thách (Bảng 12). Dung môi (PBS) được đưa vào làm mẫu đối chứng âm tính bổ sung. Nhóm 7 được dùng Oseltamivir phosphat qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Tất cả chuột đều được theo dõi về mức sống sót (FIG. 31A-31F) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Các con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% với một liều duy nhất ở mọi nồng độ xuống đến 2,5 mg/kg, và tỷ lệ sống sót 80% ở liều 1,25 mg/kg, so với tỷ lệ sống sót 0% ở nhóm đối chứng dùng tá dược. Tất cả các con chuột trong nhóm đối chứng dùng Oseltamivir phosphat đều sống sót. Khi so sánh với nhóm dùng Oseltamivir phosphat, thể liên hợp 6 cho thấy hiệu quả tương tự như Oseltamivir ở liều tích lũy thấp hơn 20 lần (tính bằng mg/kg), mặc dù thực tế là tất cả các nhóm thể liên hợp 6 đều được dùng một lần, 28 ngày trước khi lây nhiễm.

Bảng 12 : Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n=5	Thử thách Ngày 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virut cúm A, chủng H1N1 A/ Texas/36/91 theo đường mũi	Tá dược (PBS)	N/A	Tiêm tĩnh mạch, một lần một ngày, 28 ngày trước thử thách
2		Thể liên hợp 6	50	
3		Thể liên hợp 6	10	
4		Thể liên hợp 6	5	
5		Thể liên hợp 6	2,5	
6		Thể liên hợp 6	1,25	
7		Oseltamivir (Tamiflu ™)	20	Qua đường miệng, hai lần mỗi ngày, sau 8 giờ thử thách trong 5 ngày

Ví dụ 34. Hiệu quả của thể liên hợp 6 trong mô hình cúm chuột gây chết: Nghiên cứu số 4

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm INFV A H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c. Thí nghiệm bao gồm 13 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả chuột đều được thử thách với 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Tất cả các nhóm thể liên hợp 6 (8-13) đều được tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 10 mg/kg vào các thời điểm khác nhau, trước và sau khi lây nhiễm, như

được nêu trong Bảng 13. Chỉ có tá dược (PBS) và Fc được đưa vào làm mẫu đối chứng âm tính. Nhóm 3-7 được dùng Oseltamivir phosphat (20 mg/kg) qua đường miệng, bắt đầu tại các thời điểm khác nhau sau khi lây nhiễm, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày, như được nêu trong Bảng 13. Tất cả chuột đều được theo dõi về mức sống sót (FIG. 32A-32F) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% với một liều duy nhất 10 mg/kg khi được điều trị đến 24 giờ sau khi lây nhiễm, và tỷ lệ sống sót là 60 và 80% sau 48 và 72 giờ sau khi lây nhiễm. Trong nhóm dùng Oseltamivir phosphat, tỷ lệ sống sót giảm mạnh xuống còn 0% và 20% trong các nhóm bắt đầu điều trị sau 48 và 72 giờ sau khi lây nhiễm. Các kết quả này cho thấy thể liên hợp 6 có khả năng có cửa sổ điều trị vượt trội hơn so với Oseltamivir trong điều trị lây nhiễm cúm A.

Bảng 13 : Thiết kế nghiên cứu

Nhóm(N=5)	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Thời điểm dùng (giờ)
1	A/Texas/36/91 (H1N1) theo đường mũi	Tá dược (PBS)	Tiêm tĩnh mạch, một lần	---	T-4
2		Chỉ Fc	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T-4
3		Oseltamivir	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	T + 8
4		Oseltamivir	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	T + 24
5		Oseltamivir	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	T + 48
6		Oseltamivir	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	T + 72
7		Oseltamivir	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	T + 96
8		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T-4

9		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T + 8
10		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T + 24
11		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T + 48
12		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T + 72
13		Thể liên hợp 6	Tiêm tĩnh mạch, một lần	10	T + 96

Ví dụ 35. Nghiên cứu độc tính của thể liên hợp 6

Tính an toàn của thể liên hợp 6 được đánh giá trong nghiên cứu độc tính tìm phạm vi liều trên chuột kéo dài 14 ngày. Chuột được dùng 5 mpk, 20 mpk hoặc 50 mpk thể liên hợp 6 bằng cách tiêm tĩnh mạch vào ngày 0 và ngày 7 của nghiên cứu. So với nhóm đối chứng dùng chất mang, không có tác dụng đáng kể nào đối với việc tăng cân (FIG. 33), trọng lượng cơ quan, lượng thức ăn tiêu thụ được quan sát thấy ở liều bất kỳ đã thử nghiệm. Phơi nhiễm huyết tương (đo bằng AUC) tăng theo tỷ lệ với liều. Các kết quả an toàn tiền lâm sàng này phù hợp với chỉ số điều trị cao. Tóm tắt các quan sát được cung cấp trong Bảng 14.

Bảng 14. Tóm tắt nghiên cứu độc tính của công cụ tìm phạm vi liều dùng trên chuột trong 14 ngày

Tham số	Phát hiện ở liều cao nhất (50 mpk), so với tá dược
Quan sát lâm sàng	Không phát hiện được
Huyết học	Không thay đổi so với tá dược
Hóa học lâm sàng	Không thay đổi so với tá dược
Sự đông lại	Không thay đổi so với tá dược
Phân tích nước tiểu	Không thay đổi so với tá dược
Mô bệnh học	Không quan sát thấy

Ví dụ 36. Hiệu quả của thể liên hợp 6 trong liều mô hình cúm chuột gây chết theo ba con đường khác nhau: Nghiên cứu số 5

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây chết ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Texas/36/91) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 15 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột đều được thử thách với virut ở mức 1x LD90 bằng cách tiêm nội mũi với thể tích 50 µl, sau khi được gây mê nhẹ bằng isofluran. Các nhóm 1-14 được điều trị một lần, 4 giờ trước khi thử thách (Bảng 15). Để xác định hiệu lực của thể liên hợp 6 bằng các đường dùng liều khác nhau, nồng độ thể liên hợp phù hợp (10, 2, 0,4 và 0,1 mg/kg) được dùng theo liều tiêm tĩnh mạch (IV), tiêm bắp (IM) hoặc tiêm dưới da (SC). Ngoài nhóm chỉ dùng tá dược (PBS), IgG1 của người (chỉ có Fc) được đưa vào làm mẫu đối chứng âm tính bổ sung (nhóm 2). Nhóm 15 được dùng Oseltamivir phosphat qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Tất cả các con chuột đều được theo dõi về mức sống sót (Bảng 15) trong 14 ngày.

Các con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% vào ngày 14 khi chống lại thử thách bằng cúm (H1N1) với một liều duy nhất 10, 2 hoặc 0,4 mg/kg, bất kể đường dùng liều. Chỉ ở nồng độ chất phản ứng thấp nhất, sự khác biệt ở chuột đơn lẻ giữa liều IV, IM và SC (Bảng 16; tỷ lệ sống sót lần lượt là 60, 80 và 100%). Các kết quả này cho thấy rõ ràng rằng nồng độ thể liên hợp 6 trong phổi có thể đạt được bằng nhiều đường dùng liều.

Bảng 15 : Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n=5	Thử thách Ngày 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng liều	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virut cúm A (H1N1) A/Texas /36/91 qua đường mũi	Tá dược (PBS)	N/A		Liều duy nhất, 4 giờ trước khi thử thách virut
2		Fc một mình	50	IV	
3		Thể liên hợp 6	10	IV	
4		Thể liên hợp 6	2		
5		Thể liên hợp 6	0,4		
6		Thể liên hợp 6	0,1		

7		Thể liên hợp 6	10	IM	
8		Thể liên hợp 6	2		
9		Thể liên hợp 6	0,4		
10		Thể liên hợp 6	0,1		
11		Thể liên hợp 6	10	SC	
12		Thể liên hợp 6	2		
13		Thể liên hợp 6	0,4		
14		Thể liên hợp 6	0,1		
15		Oseltamivir (Tamiflu™)	20	PO	hai lần mỗi ngày, 8 giờ sau thử thách trong 5 ngày

Bảng 16 : Tỷ lệ sống sót của chuột

Chất thử nghiệm	mg/kg	Đường dùng liều	% mức sống sót (Ngày 14)
Tá dược (PBS)	na	IV	0
hIgG1 (chỉ Fc)	10	IV	0
Thể liên hợp 6	10	IV	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		60
Thể liên hợp 6	10	IM	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		80
Thể liên hợp 6	10	SC	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		100
Oseltamivir	20	PO	100

Ví dụ 37. Hiệu quả của thể liên hợp 6 chống lại thể phân lập kháng oseltamivir trong mô hình cúm gây chết ở chuột: Nghiên cứu số 6

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Perth/261/2009) là thể lập được làm thích nghi với chuột mang đột biến H275Y dẫn đến khả năng kháng thuốc ức chế neuraminidaza oseltamivir.

Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột đều được thử thách với A/Perth/261/2009 (H1N1) ở mức 1x LD90 bằng cách tiêm vào mũi với thể tích 50 µl, cho các con chuột được gây mê nhẹ bằng isofluran. Các nhóm 1-9 được điều trị một lần duy nhất bằng đường tĩnh mạch, 4 giờ trước khi thử thách (Bảng 17). Ngoài nhóm chỉ dùng tá dược (PBS), Human IgG1 (chỉ Fc) được đưa vào làm mẫu đối chứng âm tính bổ sung. Nhóm 10 được dùng

Oseltamivir phosphat qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm, dùng hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Tất cả các con chuột đều được theo dõi về mức sống sót (FIG. 34A-34D, Bảng 18) và giảm cân (FIG. 35, Bảng 19) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 cho thấy tỷ lệ sống sót 100% sau khi thử thách bằng cúm (A/Perth/261/2009) với một liều duy nhất 50, 10 và 2 mg/kg. Hơn nữa, mặc dù quy mô nhóm nhỏ (n = 5), các kết quả này có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng dùng tá dược (Bảng 18).

Ở nồng độ thể liên hợp 6 là 0,4, 0,2 hoặc 0,1 mg/kg, tỷ lệ sống sót là 60%, trong khi không có con chuột nào sống sót đến cuối nghiên cứu nếu chỉ dùng liều tá dược (PBS) hoặc hIgG1 (chỉ Fc). Nhóm dùng oseltamivir chỉ có một con chuột duy nhất sống sót (hiệu quả 20%) mặc dù đã được điều trị bằng liều đã chứng minh là có tác dụng bảo vệ chống lại các thể phân lập nhạy với oseltamivir trước đó (20 mg/kg, hai lần mỗi ngày x 5 ngày). Các kết quả này xác nhận rằng virut thử thách có khả năng kháng oseltamivir và nhạy với thể liên hợp 6.

Hiệu lực của thể liên hợp 6 chống lại các thể đột biến có chứa đột biến H275Y được hỗ trợ thêm bởi dữ liệu về cân nặng (FIG. 35, Bảng 19). Các nhóm tiếp nhận một liều của thể liên hợp 6 duy nhất ở nồng độ 2 mg/kg trở lên đã chứng minh được tình trạng giảm cân tạm thời 5% hoặc ít hơn.

Bảng 17: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n=5	Ngày thử thách 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virut cúm A (H1N1) A / Perth / 261/2009 qua đường mũi	Tá dược (PBS)	N/A	Tiêm tĩnh mạch (IV), một lần một ngày, 4 giờ trước thử thách
2		Fc một mình	50	
3		Thể liên hợp 6	50	
4		Thể liên hợp 6	10	

Nhóm n=5	Ngày thử thách 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
5		Thể liên hợp 6	2	
6		Thể liên hợp 6	0,4	
7		Thể liên hợp 6	0,2	
8		Thể liên hợp 6	0,1	
9		Thể liên hợp 6	0,05	
10		Oseltamivir (Tamiflu™)	20	Qua đường miệng, hai lần mỗi ngày, sau 8 giờ thử thách trong 5 ngày

Bảng 18: Tỷ lệ sống sót của chuột

Hợp chất	Liều lượng	Mức sống sót trung bình	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược (P)
Tá dược (PBS)	N/A	7	0	N/A
Fc một mình	50 mg/kg	6	0	ns
Thể liên hợp 6	50 mg/kg	Không xác định	100	0,0027
Thể liên hợp 6	10 mg/kg	Không xác định	100	0,0027
Thể liên hợp 6	2 mg/kg	Không xác định	100	0,0027
Thể liên hợp 6	0,4 mg/kg	Không xác định	60	0,1167

Hợp chất	Liều lượng	Mức sống sót trung bình	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược (P)
Thể liên hợp 6	0,2 mg/kg	Không xác định	60	0,0185
Thể liên hợp 6	0,1 mg/kg	Không xác định	60	0,1047
Thể liên hợp 6	0,05 mg/kg	7	0	0,9241
Oseltamivir phosphat	20 mg/kg BID	7	20	0,3470

Bảng 19 : Cân nặng trung bình hàng ngày

Ngày sau khi lây nhiễm	Trọng lượng trung bình hàng ngày (số con chuột được thể hiện trong ngoặc đơn nếu nhỏ hơn 5 con)									
	Tá dược (PBS)	Fc một mình	Thể liên hợp 6							Oseltamivir phosphat
		50 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	2 mg/kg	0,4 mg/kg	0,2 mg/kg	0,1 mg/kg	0,05 mg/kg	20 mg/kg
0	100 (5)	100 (5)	100	100	100	100	100	100	100	100
1	103 (5)	104 (5)	101	101	102	102	103	105	102	105
2	102 (5)	105 (5)	103	101	103	100	102	102	101	102
3	93 (5)	97 (5)	101	101	98	92	98	95	94	95
4	88 (5)	90 (5)	95	98	99	91	98	92	90	93
5	85 (5)	85 (5)	94	98	98	91	98	92	89	92
6	83 (4)	88 (3)	100	100	99	88	95	85	84 (4)	86
7	79 (3)	90 (2)	103	99	95	90 (3)	94	83 (4)	77 (1)	86 (3)
8	75 (2)	81 (1)	102	99	97	93 (3)	94 (4)	87 (3)	78 (1)	85 (2)
9			106	104	104	101 (3)	101 (4)	95 (3)		86 (2)
10			105	102	103	100 (3)	99 (4)	97 (3)		95 (1)
11			106	102	104	102 (3)	104 (4)	102 (3)		97 (1)
12			108	104	105	102 (3)	105 (3)	107 (3)		104 (1)

13			107	103	105	102 (3)	105 (3)	107 (3)		104 (1)
14			107	103	105	102 (3)	106 (3)	108 (3)		104 (1)
15			100	100	100	100 (3)	100 (3)	100 (3)		100 (1)

Ví dụ 38. Nghiên cứu PK ở chuột trong 7 ngày sau khi tiêm tĩnh mạch chất thử nghiệm

Nghiên cứu dược động học (PK) ở chuột được thực hiện bởi Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO) bằng cách sử dụng chuột đực Sprague Dawley từ 46-49 ngày tuổi. Chuột được tiêm tĩnh mạch theo đường tĩnh mạch đuôi với 75 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều 5 ml/kg). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào các thời điểm thích hợp, các con chuột được lấy máu không đến chết (qua hốc mắt, má hoặc tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập trong ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu thu thập được được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) và huyết tương được lấy ra để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ huyết tương của thể liên hợp 6 hoặc hIgG1 Fc tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza hoặc các đĩa phủ kháng thể kháng hIgG1 và sau đó được phát hiện bằng kháng thể IgG-Fc kháng người được liên hợp với HRP. hIgG1 được thu thập bằng kháng thể kháng hIgG1 Fc. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

Các đĩa Nunc Maxisorp 96 giếng (số lô 12-565-136, ThermoFisher) được phủ neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) hoặc kháng thể kháng IgG1 Fc trong 1X dung dịch đệm phủ KPL (5150-0041, SeraCare). Trong trường hợp kháng thể Fc kháng IgG1 được sử dụng để bắt giữ chất thử nghiệm, các kháng thể Fc kháng IgG1 bắt giữ và phát hiện được lựa chọn để gắn kết các epitop khác nhau. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các dung dịch pha loãng theo chuỗi của các mẫu huyết tương được dàn mỏng và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (dung dịch pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng trong huyết

tương chuột chưa biết là 1: 900). Các đường cong chuẩn Fc thể liên hợp 6 hoặc hIgG1 nằm trong khoảng từ 500 - 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa (hoặc kháng thể Fc kháng hIgG1) sau đó được thăm dò bằng kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng lại bằng H_2SO_4 1N H_2SO_4. Độ hấp thụ được đọc ở 450nm. Một quy trình tương tự được sử dụng cho hIgG1 Fc, trong đó chỉ sử dụng kháng thể Fc kháng hIgG1 để bắt giữ. Số lượng thể liên hợp 6 được đo tại các thời điểm khác nhau bằng cách sử dụng neuraminidaza hoặc kháng thể Fc kháng hIgG1 đều tương tự nhau trong phạm vi sai số thực nghiệm, cho thấy thể liên hợp nguyên vẹn ổn định *in vivo*.

Tổng thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc) trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 và hIgG1 Fc được thể hiện trên FIG. 36. Số lượng thể liên hợp 6 được đo tại các thời điểm khác nhau bằng cách sử dụng neuraminidaza hoặc bắt giữ kháng thể Fc kháng hIgG1 tương tự nhau trong phạm vi sai số thực nghiệm, cho thấy thể liên hợp nguyên vẹn là ổn định *in vivo*.

Ví dụ 39. Nghiên cứu PK chuột 14 ngày sau khi tiêm tĩnh mạch chất thử nghiệm

Các nghiên cứu về Rat PK được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Seventh Wave (Maryland Heights, MO) bằng cách sử dụng chuột Sprague Dawley đực 46-49 ngày tuổi. Chuột được tiêm IV theo đường tĩnh mạch đuôi với 5, 20 hoặc 50 mg/kg chất thử nghiệm (5 ml/kg thể tích liều) ở ngày 1 và 8. Các con chuột được nuôi trong điều kiện chuồng trại tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào các thời điểm thích hợp, các con chuột được lấy máu không đến chết (qua hốc mắt, má, hoặc tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập trong các ống K_2 EDTA để ngăn đông máu. Máu thu được được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và rút huyết tương để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ huyết tương của thể liên hợp 6 tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng kháng thể Fc kháng IgG của người được liên hợp với HRP. hIgG1 được thu thập bằng kháng thể Fc kháng hIgG1. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

Đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ bằng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong dung dịch đệm phủ KPL 1X (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu huyết tương pha loãng theo chuỗi được phủ lên đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng của huyết tương chuột bình thường là 1:900). Đường cong chuẩn thể liên hợp 6 trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Sau đó, thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa được thăm dò bằng kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng lại bằng H_2SO_4 1N H_2SO_4. Độ hấp thụ được đọc ở 450nm.

Tổng thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc) trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng cách sử dụng trong GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (phân tích hình chữ S, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 được thể hiện trên FIG. 37 chứng minh tính tương xứng liều lượng tuyến tính.

Ví dụ 40. Nghiên cứu PK ở chuột trong 28 ngày so sánh việc dùng chất thử nghiệm qua đường tĩnh mạch và tiêm dưới da

Các nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bởi Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO) bằng cách sử dụng chuột đực Sprague Dawley 46-49 ngày tuổi. Chuột được tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da 5 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều 5 ml/kg). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào các thời điểm thích hợp, các con chuột được lấy máu không đến chết (qua hốc mắt, má hoặc tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập trong ống K_2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu thu thập được được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) và huyết tương được lấy ra để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ huyết tương của thể liên hợp 6 hoặc hIgG1 Fc tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng kháng thể Fv kháng IgG của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

Các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ bằng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong dung dịch đệm phủ KPL 1X (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu huyết tương pha loãng theo chuỗi được phủ lên đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng của huyết tương khỉ cynomolgus nguyên thể là 1:2,500). Đường cong chuẩn thể liên hợp 6 nằm trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa sau đó được dò với kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036 -098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1: 1.000 trong dung dịch pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng với H_2SO_4 1N thì dừng lại. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 450nm.

Tổng thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc) trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến

tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 trên FIG. 38 cho thấy nồng độ huyết tương SC và IV hội tụ ở 24 giờ và tương tự nhau trong phạm vi sai số thử nghiệm lên đến 336 giờ.

Ví dụ 41. Nghiên cứu PK ở động vật linh trưởng không phải là người trong 28 ngày sau khi tiêm tĩnh mạch chất thử nghiệm

Nghiên cứu PK ở động vật linh trưởng không phải là người (NHP) được thực hiện bởi BTS Research (San Diego, CA) bằng cách sử dụng khỉ Cynomolgus đực và cái từ 4,5-8 tuổi với cân nặng từ 2,5-6,5 kg. NHP được tiêm tĩnh mạch qua tĩnh mạch hiển hoặc đầu với liều lượng 5 hoặc 20 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều lượng 5 ml/kg). Các con vật được nuôi trong điều kiện nuôi dưỡng tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào các thời điểm thích hợp, các con vật được lấy máu không đến chết (qua tĩnh mạch đùi hoặc tĩnh mạch đầu) với máu được thu thập trong ống K_2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu thu thập được được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) và huyết tương được lấy ra để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ huyết tương của thể liên hợp 6 tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng kháng thể anti-human IgG-Fc gắn HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp bên dưới.

Đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ bằng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong dung dịch đệm phủ KPL 1X (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu huyết tương pha loãng theo chuỗi được phủ lên đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng của huyết tương khỉ cynomolgus nguyên thể là 1:2.500). Đường cong chuẩn thể liên hợp 6 trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Sau đó, thể liên hợp 6 được gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa được dò bằng

kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng lại bằng H_2SO_4 1N H_2SO_4. Độ hấp thụ được đọc ở 450nm.

Tổng lượng thể liên hợp 6 trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Các thông số PK được tính toán bằng phần mềm WinNonlin. Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 được thể hiện trên FIG. 39 và tóm tắt các thông số PK chính được cung cấp trong Bảng 20. Đáp ứng liều là tuyến tính giữa 5 và 20 mg/kg IV, dẫn đến thời gian bán hủy khoảng 9 ngày ở cả hai liều (tương đương với chuột nhắt/chuột cống).

Bảng 20: PK của khỉ Cynomolgus ở thể liên hợp 6

Thể liên hợp 6	Thời gian bán hủy (giờ)	AUClast (giờ * mg/mL)
5 mg/kg IV	230	6240
20 mg/kg IV	197	25400

Ví dụ 42. Nghiên cứu PK phân bố phổi chuột sau khi tiêm tĩnh mạch chất thử nghiệm

Nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực CD-1 6 tuần tuổi. Chuột được tiêm tĩnh mạch theo đường tĩnh mạch đuôi với liều 10 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều 5 ml/kg). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào thời điểm đã chỉ định, các con chuột được an tử để lấy máu (bằng cách chọc tim) trong ống K2EDTA và phổi. Máu được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) để thu được huyết tương. Phổi được cân và đồng nhất trong ống 1,5 ml bằng cách dùng chày dùng một lần vô trùng (Z359947, Sigma) trong 100 µL dung dịch đệm đồng nhất bao gồm 11,64 mL chất phản ứng chiết xuất protein mô (78510, Thermo Scientific), 0,24 ml hỗn hợp chất ức chế proteaza (78410, Thermo Scientific) và 0,12 ml EDTA. Sau 1-2 phút nghiền đồng nhất, thể tích được điều chỉnh đến 1 mL bằng dung dịch đệm nghiền đồng nhất và các mẫu được ủ trên đá trong 20 phút với sự trộn định kỳ bằng cách xoáy nhẹ. Các chất đồng nhất được ly tâm ở 8.000

x g trong 10 phút và phần chất lỏng trong được giữ lại để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ trong huyết tương và phổi của thể liên hợp 6 tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được thu thập trên các đĩa phủ neuraminidaza và phát hiện bằng kháng thể Fc kháng IgG của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp bên dưới.

Đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ bằng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong dung dịch đệm phủ KPL 1X (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu huyết tương pha loãng theo chuỗi được phủ lên đĩa và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng của huyết tương chuột nguyên thể là 1:100). Đường cong chuẩn thể liên hợp 6 trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa sau đó được dò với kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036 -098, Jackson) được pha loãng theo tỷ lệ 1: 1.000 trong dung dịch pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng với H_2SO_4 1N thì dừng lại. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 450nm.

Tổng thể liên hợp 6 trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng cách sử dụng trong GraphPad Prism, phiên bản 6 sau phân tích hồi quy phi tuyến tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) của các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Các đường cong so sánh nồng độ trong huyết tương và phổi của thể liên hợp 6 được thể hiện trên Fig. 40. Bất ngờ là, Cmax phổi đạt được tại t = 1 giờ (19,5 µg/g mô phổi, ~310 nM). Có khoảng 10% phổi tiếp xúc với thể liên hợp 6, so với huyết tương.

Ví dụ 43. Nghiên cứu PK trên chuột trong 5 ngày so sánh việc dùng chất thử nghiệm theo đường IV, SC và IM

Nghiên cứu PK trên chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực CD-1 6 tuần tuổi. Chuột được tiêm tĩnh mạch theo đường tĩnh mạch đuôi với liều 5 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều 5 ml/kg). Chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Vào những thời điểm thích hợp, các con chuột được lấy máu không đến chết (qua hốc mắt, má hoặc tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập trong ống K_2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu thu thập được được ly tâm (2.000 x g, trong 10 phút) và huyết tương được lấy ra để phân tích nồng độ chất thử nghiệm theo thời gian.

Nồng độ trong huyết tương của thể liên hợp 6 tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp kẹp (sandwich) ELISA như sau: Các phân tử thể liên hợp 6 được bắt giữ trên các đĩa phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể Fc kháng IgG của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng hồi quy phi tuyến tính 4PL của đường cong chuẩn thể liên hợp 6 (hoặc hIgG1 Fc). Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp bên dưới.

Đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ bằng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong dung dịch đệm phủ KPL 1X (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu huyết tương pha loãng tuần tự được phủ lên đĩa và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 1% trong PBS Tween 20 0,05% + nồng độ cuối cùng của huyết tương chuột chưa qua xử lý là 1:100). Đường cong chuẩn thể liên hợp 6 trong khoảng từ 500 – 0,230 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa.

Sau khi ủ 2 giờ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Sau đó, thể liên hợp 6 gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa được thăm dò bằng kháng thể Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson) được pha loãng theo tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các đĩa được rửa 8 lần trong 300 µL PBS với Tween 20

0,05% và phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng lại bằng H_2SO_4 1N H_2SO_4. Độ hấp thụ được đọc ở 450nm.

Tổng thể liên hợp 6 trong các mẫu thử nghiệm được nội suy bằng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (phân tích Sigmoidal, 4PL) các đường cong chuẩn thể liên hợp 6. Các đường cong so sánh thể liên hợp 6 được thể hiện trên FIG. 41. Mức độ phơi nhiễm đối với các đường dùng IV, IM và SC tương tự nhau với AUC lần lượt là 2082, 1944 và 2500.

Ví dụ 44. Hiệu quả của chuột và PK đa loài hỗ trợ liều phòng ngừa không thường xuyên ở đối tượng là người

Thang đo tương quan sinh trưởng của liều hiệu quả ở chuột dựa trên các nghiên cứu PK ở chuột nhắt, chuột cống và linh trưởng được sử dụng để dự đoán liều lượng và các thông số PK ở đối tượng là người. Thang đo tương quan sinh trưởng dựa trên diện tích dưới đường cong (AUC) ở liều hiệu quả 2,5 mg/kg trong nghiên cứu phòng ngừa ở chuột kéo dài 28 ngày (xem Ví dụ 33).

Đối với thang đo tương quan sinh trưởng chỉ ở khỉ cynomolgus, độ thanh thải ở người (CL) được tính toán dựa trên dữ liệu PK của khỉ cynomolgus (Ví dụ 41) chỉ bằng cách sử dụng phương trình tương quan sinh trưởng đơn giản: CL(người) = CL(khỉ) • [BW(người)/BW(khỉ)]w, trong đó BW = cân nặng và w là số mũ thang đo cố định ở mức 0,85. Kết quả của thang đo chỉ ở khỉ cynomolgus được cung cấp trong Bảng 21.

Đối với thang đo tương quan sinh trưởng chuột nhắt-chuột cống-Cynomolgus, độ thanh thải của người (CL) từ các loài động vật được biểu diễn theo cân nặng của động vật (BW) trên thang đo log-log theo phương trình tương quan sinh trưởng sau: CL = a•BWx, trong đó a là hệ số và x là số mũ của phương trình tương quan sinh trưởng. Hệ số a và số mũ x được tính từ điểm cắt và độ dốc của đường hồi quy tuyến tính. Kết quả của thang đo chuột-chuột cống-Cyno được cung cấp trong Bảng 22.

Các giá trị độ thanh thải của người được tính toán bằng các thuật toán tương ứng ở trên sau đó được sử dụng để tính liều lượng tương ứng của người cần thiết để đạt được mục tiêu AUC hiệu quả là 3700 ug-giờ/mL (từ liều lượng 2,5 mg/kg ở chuột, Ví dụ 33) bằng cách sử dụng phương trình sau: Liều lượng = CL•AUC.

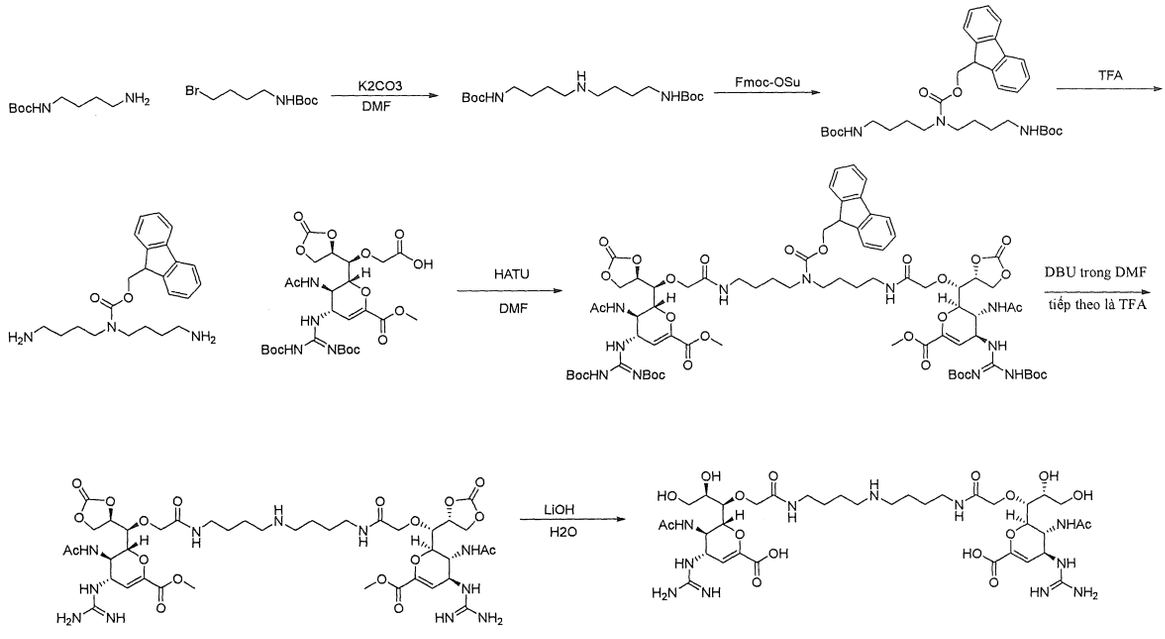
Bảng 21: Thang đo tương quan sinh trưởng chỉ ở khỉ Cynomolgus (β = 0,85)

Khu vực hiệu quả dưới đường cong (AUC)	3700 µg-giờ / mL
Độ thanh thải của người (CL)	0,43 mL/phút
Liều dùng của người	95,46 mg, 1,4 mg/kg

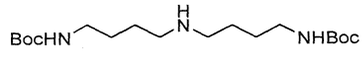
Bảng 22. Thang đo tương quan sinh trưởng tế bào chuột-chuột-chuột (β = 0,97)

Khu vực hiệu quả dưới đường cong (AUC)	3700 µg-giờ / mL
Độ thanh thải của người (CL)	0,59 mL / phút
Liều dùng của người	130,98 mg, 1,9 mg/kg

Ví dụ 45. Tổng hợp Int-11



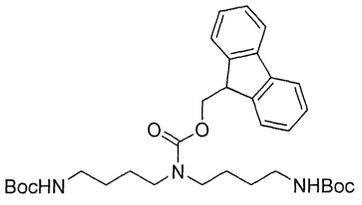
Bước a.



Dung dịch tert-butyl (4-bromobutyl)carbamat (11,2 g, 60 mmol) và tert-butyl (4-aminobutyl)carbamat (10 g, 40 mmol) được hòa tan trong DMF (150 mL) được xử lý bằng kali cacbonat (16,4 g, 120 mmol), sau đó khuấy ở 80°C trong 6 giờ. Hỗn hợp phản ứng được phân chia giữa DCM (500 ml) và nước muối (100 ml). Lớp hữu cơ được tách ra và rửa sạch bằng nước muối sau đó làm khô bằng natri sunfat. Dung dịch

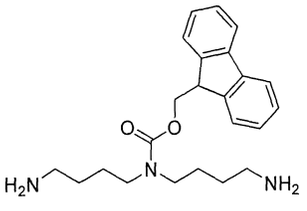
được lọc, cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 11,0g sản phẩm, hiệu suất 77%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M+H = 360,4

Bước b.



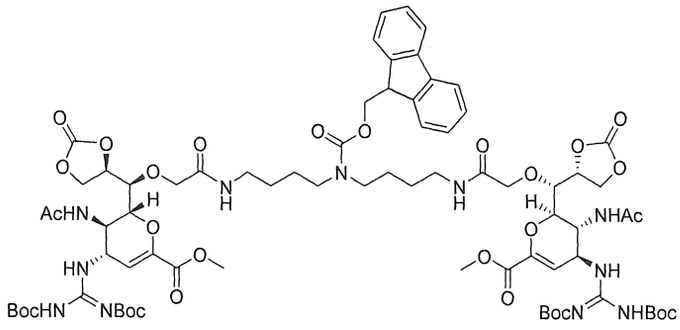
Sản phẩm từ bước trước đó (0,4 g, 1,11 mmol) và Fmoc-OSu (0,45 mg, 1,3 mmol) được hòa tan trong DCM (10 mL), tiếp theo là xử lý bằng N-metylmorpholin (0,22 ml, 2 mmol), và khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước không có TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 450 mg các sản phẩm, hiệu suất 69%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 582,4.

Bước c.



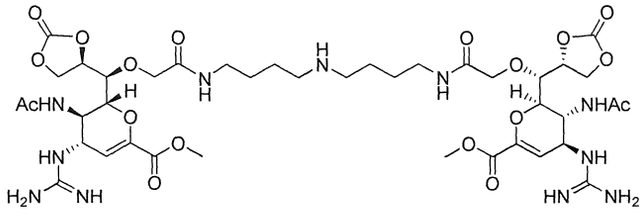
Sản phẩm từ bước trước đó (0,4 g, 0,7 mmol) được xử lý bằng TFA (5 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong 0,5 giờ, sau đó cô đặc đến khô và được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất là định lượng cho bước này. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 382,3.

Bước d.



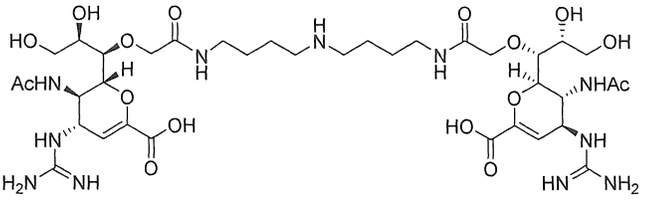
Fmoc diamin (24 mg, 0,063 mmol) từ bước trước được bổ sung vào dung dịch axit carboxylic (80 mg, 0,126 mmol, được mô tả trong quy trình tổng hợp Int-10, bước f) trong DMF (5 mL), tiếp theo là xử lý bằng HATU (50 mg, 0,13 mmol), tiếp theo là N-metylmorpholin (0,06 ml, 0,50 mmol). Sau khi khuấy trong 1 giờ, dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước không có TFA làm chất cải biến. Thu được 80mg, hiệu suất 79%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 803,9.

Bước e.



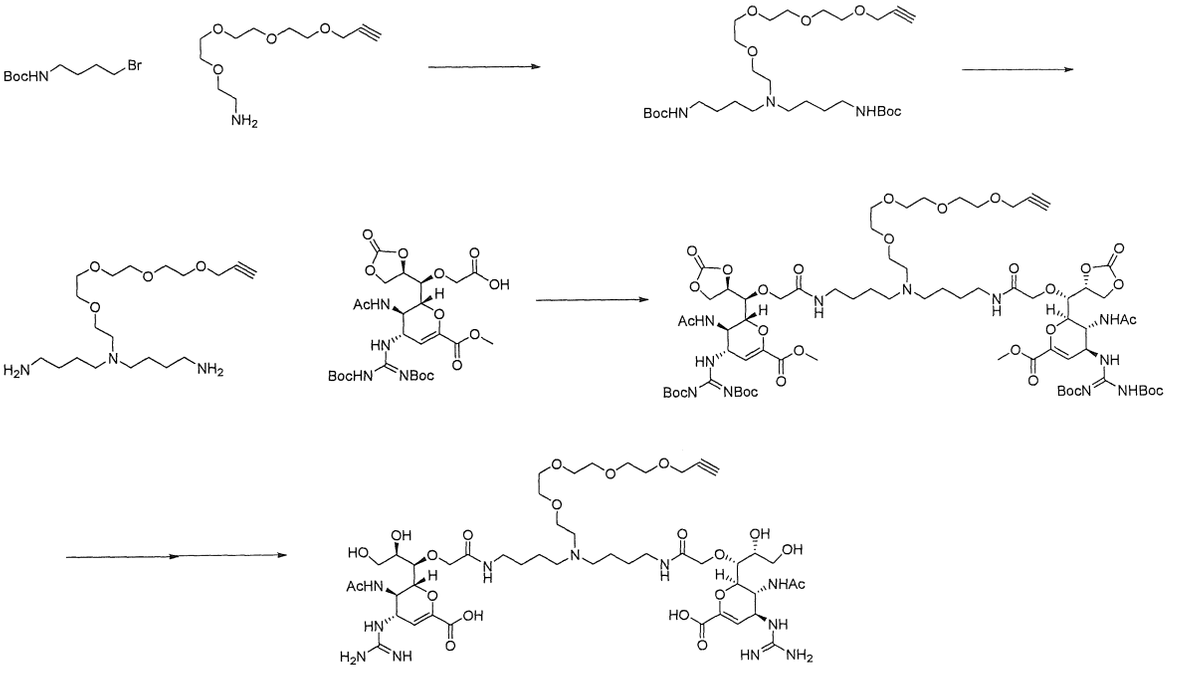
Sản phẩm từ bước trước đó (80 mg, 0,050 mmol) được xử lý với DBU 1% (1,8-diazabixyclo[5.4.0]undec-7-en) trong DMF (2 mL) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Khi phản ứng hoàn thành bằng LCMS (15 phút), nó được cô đặc, tiếp theo là xử lý bằng TFA (2 mL) và khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 52mg sản phẩm dưới dạng muối TFA. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 492,7.

Bước f.

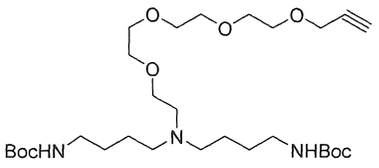


Sản phẩm từ bước trước được hòa tan vào nước (2 mL), tiếp theo là xử lý bằng dung dịch lithi hydroxit (12 mg, 0,50 mmol, trong 1 mL nước). Hỗn hợp phản ứng thu được được theo dõi bằng LCMS. Sau khi khuấy trong 10 phút, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng 0,1 ml axit axetic. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được sản phẩm: 30 mg dưới dạng muối TFA, hiệu suất 66%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 452,7. M / 3 + H = 302,1.

Ví dụ 46. Tổng hợp Int-12

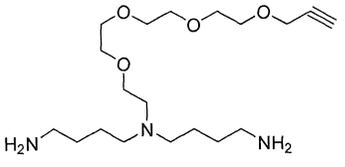


Bước a.



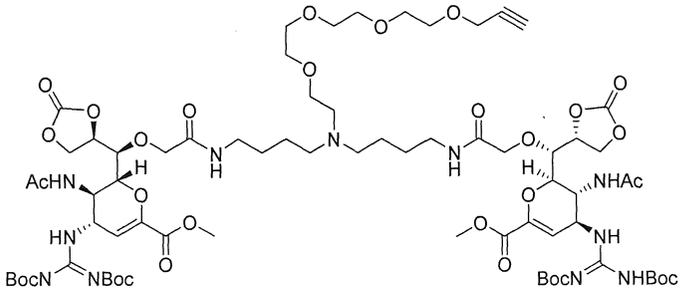
Bổ sung vào dung dịch của tert-butyl (4-bromobutyl)carbamat (4,8g, 19 mmol) và propargyl-PEG4 amin (2 g, 8,6 mmol) trong DMF (50 mL), kali cacbonat (3,6 g, 26 mmol). Dung dịch được khuấy ở 80°C trong 6 giờ, sau đó được phân chia giữa DCM (200 ml) và nước muối (50 ml). Lớp hữu cơ được tách, rửa bằng nước muối, làm khô bằng natri sunfat, lọc và cô đặc, sau đó được tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 3,5 g sản phẩm, hiệu suất 70%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 574,4.

Bước b.



Sản phẩm từ bước trước đó (3,5 g, 8,6 mmol) được xử lý với TFA (20 ml) ở nhiệt độ trong phòng trong 0,5 giờ, sau đó cô đặc đến khô, hòa tan trong nước, đông lạnh, đông khô, và sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất là định lượng cho bước này. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 374,3.

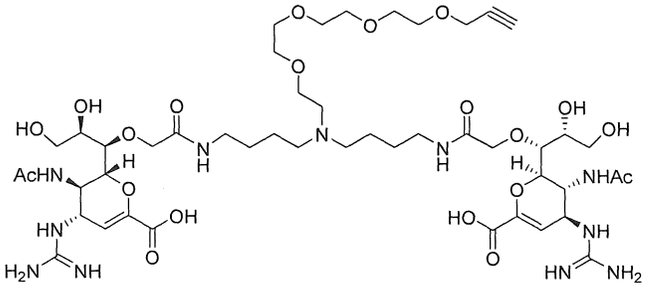
Bước c.



Muối diamin TFA từ bước trước đó (37mg, 0,1 mmol) được bổ sung vào dung dịch axit carboxylic (130 mg, 0,2 mmol, được mô tả trong quy trình tổng hợp Int-10, bước f) trong 10 ml DMF, tiếp theo là xử lý bằng HATU (80 mg, 0,2 mmol), và N-

metylmorpholin (0,25 ml, 2 mmol). Dung dịch thu được được khuấy trong 1 giờ, sau đó được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước không có TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 120mg sản phẩm, hiệu suất 75%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 799,9.

Bước d.



Sản phẩm từ bước trước đó (120 mg, 0,075 mmol) được xử lý bằng 2 ml axit trifloaxetic và khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được cô đặc, hòa tan vào nước (2 mL), tiếp theo là xử lý bằng dung dịch lithi hydroxit (12 mg, 0,5 mmol) hòa tan trong nước (1 mL). Dung dịch thu được được khuấy trong 10 phút, sau đó được tạo hơi axit bằng 0,1 ml axit axetic, được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 30% và nước, sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 48 mg các sản phẩm dưới dạng muối TFA, hiệu suất 57%. (Các) ion được LCMS tìm thấy: M/2+H = 559,757. M / 3 + H = 373,5.

Ví dụ 47. Tổng hợp thể liên hợp 8

Dung dịch h-IgG1 Fc-PEG4-azit trong dung dịch đệm PBSx1 (100 mg, 1,71 μmol, 7,011 mL, MW = 58200 Da, DAR = 3,7) được bổ sung vào phân tử nhỏ dẫn xuất alkyn (muối Int-12 TFA, 45 mg, 0,031mmol) và các dung dịch PBS pH 7,4 mới chuẩn bị gồm $CuSO_4$ (0,7 mL 50,0 mM, 20 đương lượng), tris (3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (THPTA, 0,7mL 50,0 mM, 20 đương lượng) và natri ascorbat (1,05 mL của 50,0 mM, 30 đương lượng). Dung dịch đồng nhất thu được được khuấy bằng bàn khuấy trong 12 giờ. Các dung dịch thô được pha loãng với PBS pH 7,4 đến nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL, và siêu lọc (10.000 MWCO) đến thể

tích 1mL, hai lần. Sau đó, hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4 và được tinh chế bằng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng máy quang phổ nhìn thấy NANODROP™ UV (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của Fc được sử dụng trong thể liên hợp và được cô đặc đến khoảng 10 mg/mL bằng máy cô đặc ly tâm (10.000 MWCO). Các phân tử tinh khiết được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 µg mỗi phân tử vào gel, và nhuộm bằng thuốc nhuộm Instant Blue. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định (FIG. 42). Hiệu suất thường là 40-60%. Phân tích MALDI MS cho thấy phạm vi khối lượng (60000-90000) với khối lượng trung bình là 62358. DAR trung bình = 3.

Ví dụ 48. So sánh hiệu lực *in vitro* và *in vivo* của các chất ức chế được chọn với thể liên hợp Fc của chúng trong các thử nghiệm CPE và trong mô hình cúm gây chết chuột

Để chứng minh rằng sực liên hợp của các chất ức chế neuraminidaza được mô tả ở đây với Fc làm tăng hoạt tính của chúng trong các thử nghiệm sao chép virut và trong các mô hình hiệu quả *in vivo*, các tác giả sáng chế đã so sánh hoạt tính của các chất ức chế không liên hợp được chọn với thể liên hợp Fc của chúng trong các thử nghiệm hiệu ứng tế bào (CPE) và trong mô hình nhiễm cúm gây chết chuột. Đối với thử nghiệm trung hòa vi mô CPE, mười lần pha loãng theo chuỗi hai lần của mỗi chất thử nghiệm (TA), bắt đầu từ 160 nM hoặc 400 nM (9600 nM đối với mẫu đối chứng zanamivir và oseltamivir), đã được chuẩn bị theo cặp để cấy trong một giờ với INFV A (A/CA/09 H1N1) ở bội số lây nhiễm (MOI) 0,001 và INFV B ở MOI 0,01 trong thời gian ủ một giờ. Hỗn hợp TA-virut sau đó được bổ sung vào các tế bào MDCK được gieo mầm trong các đĩa 96 giếng và ủ trong một giờ. Vào ngày thứ 3 sau khi lây nhiễm INFV A và ngày thứ 5 sau khi lây nhiễm INFV B (B/Brisbane), các tế bào được cố định và nhuộm bằng tinh thể tím và mật độ quang học được đọc để tính nồng độ hiệu quả 50 phần trăm (EC50) của mỗi TA bằng mô hình đáp ứng liều lượng XLfit. Độc tính tế bào nội tại của mỗi TA cũng được đánh giá bằng cách sử dụng mười mức pha loãng theo chuỗi hai lần của mỗi TA bắt đầu từ 160 nM hoặc 400 nM được chuẩn bị theo cặp để cấy tế bào MDCK trong các đĩa nuôi cấy 96 giếng. Mức sống sót của tế bào được xác định sau 3 và 5 ngày điều trị bằng bộ dụng cụ CellTiter-Glo. 50% nồng

độ độc tính tế bào (CC50) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng XLfit. Không quan sát thấy độc tính tế bào đối với TA bất kỳ ở nồng độ cao nhất đã thử nghiệm. Tóm tắt về thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên CPE được thể hiện trong Bảng 23.

Bảng 23. Thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên CPE

	EC_{50} so với INFV A (nM)	EC_{50} so với INFV B (nM)
Oseltamivir	390,0	1065,0
Zanamivir	264,8	382,6
Int-7 (Gốc hướng đích tương ứng với thể liên hợp 6)	665,7	106,6
Int-12 (Gốc hướng đích tương ứng với thể liên hợp 8)	15,4	0,6
Thể liên hợp 6	4,0	52,1
Thể liên hợp 8	0,6	0,3

Dữ liệu tóm tắt trong Bảng 23 chứng minh rằng các dạng liên hợp Fc của dime neuraminidaza có hoạt tính vượt trội trong thử nghiệm trung hòa vi mô CPE so với đối tác không liên hợp của chúng. Các cải thiện lần lượt là gấp 166 lần và 2 lần so với INFV A và INFV B khi so sánh thể liên hợp 6 với Int-7. Các cải thiện lần lượt là gấp 26 lần và 2 lần so với INFV A và INFV B khi so sánh thể liên hợp 8 với Int-12.

Thể liên hợp 6 được so sánh với dime của chất ức chế neuraminidaza mạnh nhất từ nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 23 (Int-11, dime chỉ tương ứng với Int-12 mà không có liên kết cầu nối trime cho phép liên hợp với Fc) trong mô hình nhiễm cúm IAV H1N1 gây chết sử dụng chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/08/1934, hay còn gọi là PR8) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột với LD90 khoảng 30 đơn vị hình thành mảng bám (pfu) trên mỗi con chuột.

Thí nghiệm bao gồm 8 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột đều được thử thách với PR8 ở mức LD90 gấp 10 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích 50 µl, cho các con chuột được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Các nhóm được điều trị một lần bằng tá dược, chỉ có hIgG1 Fc, thể liên hợp 6 hoặc Int-11 qua đường tĩnh mạch, 2 giờ sau khi

thử thách (Bảng 24; nhóm 1-6). Nhóm 7 được tiêm Int-11 (15 mg/kg) hai lần mỗi ngày (bid) trong 5 ngày, cũng bằng đường tĩnh mạch. Nhóm 8 được tiêm oseltamivir (15 mg/kg) qua đường miệng (PO), hai lần mỗi ngày, trong 5 ngày. Tất cả các con chuột đều được theo dõi về mức sống sót (Bảng 25) và tình trạng giảm cân (dữ liệu không được thể hiện) trong 10 ngày sau khi thử thách bằng virut.

Như dự kiến, các con chuột được điều trị bằng tá dược hoặc hIgG1 Fc chỉ chết vì lây nhiễm vào ngày thứ 7 (Bảng 25). Các con chuột được điều trị bằng 10 liều (tổng cộng 150 mg/con chuột) oseltamivir cho thấy sự trì hoãn tử vong đáng kể về mặt thống kê nhưng chỉ có một con sống sót cho đến ngày thứ 10. Tất cả các con chuột được dùng một liều của thể liên hợp 6 duy nhất ở mức 0,3 hoặc 3 mg/kg đều sống sót đến cuối nghiên cứu và cho thấy tăng cân tịnh trong suốt quá trình thử nghiệm. Điều quan trọng là tất cả các con chuột được dùng Int-11 ở mức 0,3 hoặc 3 mg/kg đều chết trong quá trình nghiên cứu, với sự trì hoãn tử vong tối thiểu (2 ngày hoặc ít hơn) so với các nhóm đối chứng chỉ dùng tá dược và Fc hIgG1. Vì hIgG1 Fc không có hoạt tính kháng virut vốn có (nhóm 2), điều này cho thấy hoạt tính của thể liên hợp 6 được cải thiện đáng kể là kết quả của tính ái lực được cải thiện do sự hiển thị đa hóa trị trên Fc, như được gợi ý bởi các kết quả được tóm tắt trong Bảng 23, cũng như dược động học được cải thiện và việc đóng góp từ sự tham gia miễn dịch qua trung gian Fc. Sự khác biệt về hoạt tính giữa dime của chất ức chế đơn lẻ và thể liên hợp 6 có ý nghĩa thống kê ở cả hai nồng độ liều (so sánh nhóm 3 và 6, và nhóm 4 và 5; Bảng 25). Trên cơ sở khối lượng, cần liều tích lũy Int-11 lớn hơn 500 lần để quan sát thấy hiệu quả tương đương với thể liên hợp 6.

Bảng 24 : Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n=5	Ngày thử thách 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virut cúm A (H1N1) A/Puerto Rico/08/1934 qua	Tá dược (PBS)	N/A	Tiêm tĩnh mạch, một liều duy nhất bắt đầu từ 2 giờ sau khi lây nhiễm
2		Chỉ dùng hIgG1 Fc	3	

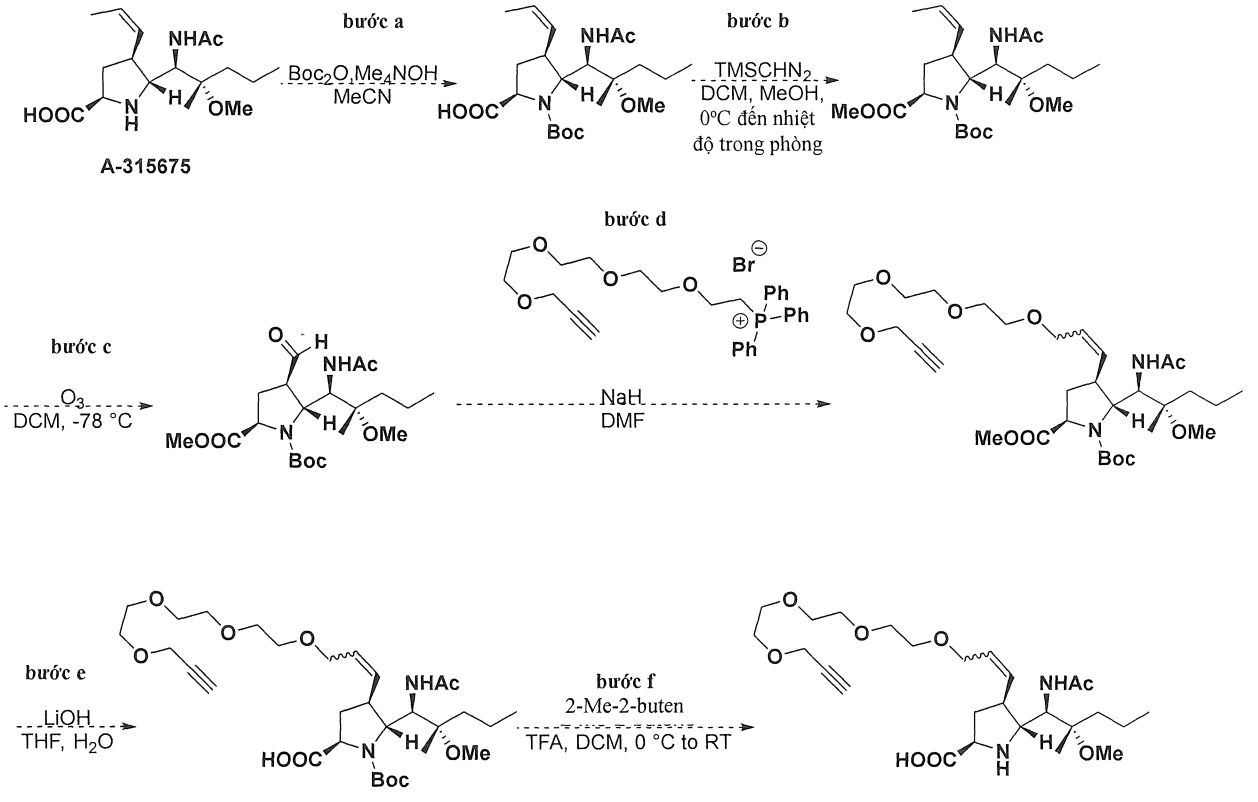
Nhóm n=5	Ngày thử thách 0	Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
3	đường mũi	Thể liên hợp 6	3	
4		Thể liên hợp 6	0,3	
5		Int-11	0,3	
6		Int-11	3	
7		Int-11	15	Tiêm tĩnh mạch, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày bắt đầu từ 2 giờ sau khi lây nhiễm
8		Oseltamivir (TAMIFLU ™)	20	Qua đường miệng, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày bắt đầu từ 2 giờ sau khi lây nhiễm

Bảng 25: Tỷ lệ sống sót của chuột

Nhóm	Chất thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Phác đồ định liều	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược	Mức ý nghĩa đối với Int-11 0,3 mg/kg* hoặc 3 mg/kg^
1	Tá dược (PBS)		Tiêm tĩnh mạch, một lần	0		
2	chỉ dùng hIgG1 Fc	3	Tiêm tĩnh mạch, một lần	0	NS	
3	Thể liên	3	Tiêm tĩnh	100	0,0027	0,0035 ^

Nhóm	Chất thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Phác đồ định liều	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược	Mức ý nghĩa đối với Int-11 0,3 mg/kg* hoặc 3 mg/kg^
	hợp 6		mạch, một lần			
4	Thể liên hợp 6	0,3	Tiêm tĩnh mạch, một lần	100	0,0027	0,0027 *
5	Int-11	0,3	Tiêm tĩnh mạch, một lần	0	0,0027	
6	Int-11	3	Tiêm tĩnh mạch, một lần	0	0,0027	
7	Int-11	15	Tiêm tĩnh mạch, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	100	0,0027	
8	Oseltamivir	15	Dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	20	0,0027	

Ví dụ 49. Tổng hợp Int-13 (axit (5R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(4S)-E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]-pyrolidin-(2R)-carboxylic)



Bước a. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Hỗn hợp khuấy chứa axit (5R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(4S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-carboxylic, muối HCI (được điều chế theo tài liệu tham khảo JACS, 2002, 124, 4716-4721; 1,0 mmol) trong axetonitril (10 mL) được bổ sung trimetylamoni hydroxit (1,5 mmol). Sau khi khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng di-tert-butyldicacbonat (4 đương lượng mol) được bổ sung. Khi phản ứng hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được pha loãng bằng nước (10 ml). Etyl axetat (10 ml) được bổ sung, và dung dịch nước axit sulfuric 1 M được bổ sung cho đến khi lớp nước đạt pH ~ 3. Lớp nước được rửa bằng hai phần nhỏ bổ sung của etyl axetat (10 mL). Các chất hữu cơ gom lại được làm khô trên natri sulfat, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước b. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong diclometan (5,0 mL) và metanol (1,0 mL) được bổ sung từ từ (trimetylsilyl)diazometan (1,1 mmol). Hỗn hợp này được khuấy cho đến khi hoàn thành, trong khi nhiệt độ được nhẹ nhành cho phép đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước c. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-formylpyrolidin-1-carboxylic.

Hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1 mmol) trong diclometan (15 mL) được làm lạnh đến -78°C. Ozon được sục qua dung dịch cho đến khi màu xanh nhạt của ozon hòa tan vẫn tồn tại. Nitơ được sục qua dung dịch cho đến khi màu xanh biến mất, sau đó dimetyl sulfua (4,0 mmol) được bổ sung, bình được chuyển vào tủ đông (-20°C) và để yên trong 1 giờ. Dung dịch được cô đặc và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước d. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]pyrolidin-1-carboxylic.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa propargyl-PEG4-phosphoni bromua (1,0 mmol) trong DMF (5,0 mL) được bổ sung natri hydrua (1,1 mmol), và sau 10 phút nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Tiếp tục khuấy trong 1 giờ, sau đó tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-formylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) được bổ sung trong DMF (1,0 mL). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch amoni clorua bão hòa. Dung dịch nước được chiết vài lần bằng etyl axetat, và các pha

hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối, làm khô, và bay hơi. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước e. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxy-(3S) E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]pyrolidin-1-carboxylic.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxymetyl-(3S)-E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]pyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong tetrahydrofuran (12,0 mL) và nước (3,0 mL) được bổ sung lithi hydroxit (1,1 mmol). Tiếp tục khuấy và nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh sau 15 phút. Khi hoàn thành, dung dịch được đưa đến độ pH axit bằng cách bổ sung lượng dư của nhựa AMBERLITE® IRN-77. Hỗn hợp được lọc và sản phẩm lọc được cô bằng kỹ thuật chân không, thu được hợp chất nêu ở đề mục. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước f. Axit (5R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(4S)-E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]-pyrolidin-(2R)-carboxylic.

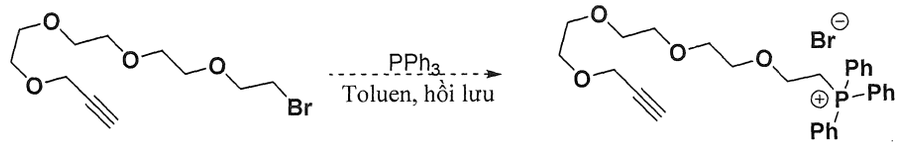
Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-carboxy-(3S) E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]pyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) và 2-metyl-2-buten (0,5 mL) trong diclometan (8,0 mL), được bổ sung axit trifloaxetic (4,0 mL). Sau 10 phút, nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Ví dụ 50. Tổng hợp thể liên hợp 9

Dung dịch chứa hIgG1 Fc-PEG4-azit trong PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (100 mg, 1,71 μmol, 7,011 mL, MW = 58,200 Da, DAR = 3,7) được bổ sung vào PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (2,45 mL) chứa Int-13 (axit (5R)-((1R)-axetylamino-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(4S)-E/Z-[3-(propargyl-PEG4)-propenyl]-pyrolidin-(2R)-

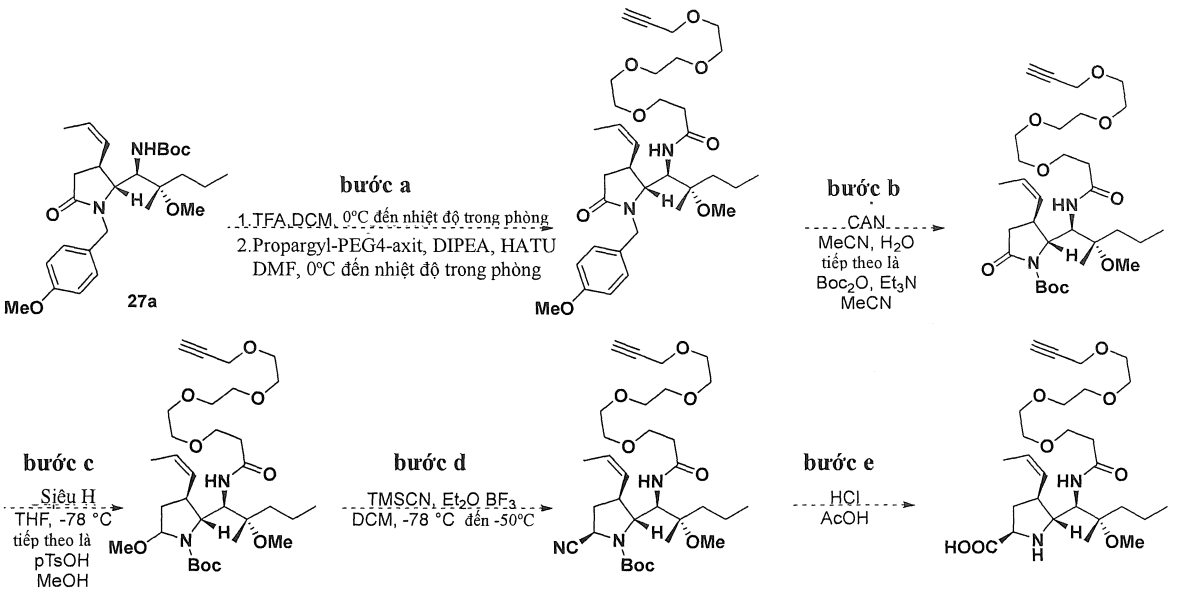
carboxylic) (0,031 mmol), đồng sulfat (0,62 mmol), tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (0,62 mmol), và natri ascorbat (0,93 mmol). Dung dịch đồng nhất thu được được lắc nhẹ bằng bàn rung trong 12 giờ. Dung dịch thô được pha loãng bằng PBS pH 7,4 đến nồng độ cuối là 1mg/mL, và được siêu lọc (10.000 MWCO) đến thể tích là 1 mL, trong hai lần. Hỗn hợp thô sau đó được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của Fc được sử dụng trong liên hợp, và được cô đến khoảng 10 mg/mL bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (10.000 MWCO). Các phân tử đã tinh chế được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 ug mỗi phân tử vào gel, và nhuộm bằng cách sử dụng thuốc nhuộm Instant Blue. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định. Phân tích MALDI MS được sử dụng để xác định DAR trung bình.

Ví dụ 51. Tổng hợp propargyl-PEG4-phosphoni bromua.



Hỗn hợp chứa propargyl-PEG4-bromua (1,0 mmol) và triphenylphosphin (1,2 mmol) trong toluen (10 mL) được hồi lưu. Khi hoàn thành, hỗn hợp được làm lạnh đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Chất rắn được lọc và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm bất kỳ.

Ví dụ 52. Tổng hợp Int-14 (axit (5R)-[(1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl]-(4S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-carboxylic, muối HCl)



Bước a. N-{(2.S)-metoxy-((1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-(propargyl-PEG4)-carboxyamit.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa tert-butyl este của axit {(2S)-metoxy-(1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-carbamic (nó được điều chế theo tài liệu tham khảo JACS, 2002, 124, 4716-4721; 1,0 mmol) trong diclometan khô (5 mL) được bổ sung axit trifloaxetic (10 mmol), và nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành, dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan trong diclometan (20 mL) và được chiết bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được tách, làm khô (natri sulfat), lọc và bay hơi. Amin thô được hòa tan trong DMF (5 mL) và được xử lý ở 0°C trong điều kiện khuấy với axit propargyl-PEG4 (1,1 mmol), diisopropyletylamin (3,0 mmol) và HATU (1,1 mmol). Khi phản ứng hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được đưa vào etyl axetat (15 ml), và được rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10 mL), tiếp theo là dung dịch nước axit sulfuric 1 M (10 mL). Các chất hữu cơ gom lại được làm khô trên natri sulfat, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước b. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy chứa N-{(2.S)-metoxy-(1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-(propargyl-PEG4)-carboxyamit (1,0 mmol) trong hỗn hợp chứa axetonitril và nước (10:1, 5 mL) được bổ sung xeri amoni nitrat (2,0 mmol) theo các phần nhỏ ở 45°C trong 1 giờ, và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (5 mL). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL), các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat) và bay hơi để thu được chất thô mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Nguyên liệu được hòa tan trong axetonitril (5 mL), di-tert-butylcacbonat được bổ sung (1,5 mmol) tiếp theo là trietylamin (2,0 mmol) và DMAP (xúc tác). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (5 mL). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL), và các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat). Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước c. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R/S)-metoxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy ở -78°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong THF (8 mL) được bổ sung SUPER-HYDRIDE® (1 M trong THF, 2,2 mmol). Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (4 mL) và hydro peroxyt 30% (5 giọt). Hỗn hợp được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy thêm trong 30 phút và lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat) và dung môi được bay hơi để thu được hemiamin, được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Dung dịch chứa sản phẩm nêu trên trong metanol (16 mL) được bổ sung hydrat của axit p-toluensulfonic (0,1 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm và được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10 mL). Metanol được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm, nước (10 mL) được bổ sung vào phần cặn thu được và được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL). Các chất hữu cơ được tách và làm khô bằng nước muối và natri sulfat, được lọc

và cô. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước d. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-xyano-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy ở -78°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R/S)-metoxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong diclometan (20 mL) được bổ sung trimetylsilyl xyanua (2,0 mmol) tiếp theo là bo triflorua dietyl eterat (1,2 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy từ -78°C đến -50°C trong khoảng thời gian hơn 3 giờ. Dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (40 mL) được bổ sung và lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 15 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat), lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được bao gồm hỗn hợp chứa dẫn xuất xyano epime được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước e. Axit (5R)-[(1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl]-(4S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-carboxylic, muối HCI.

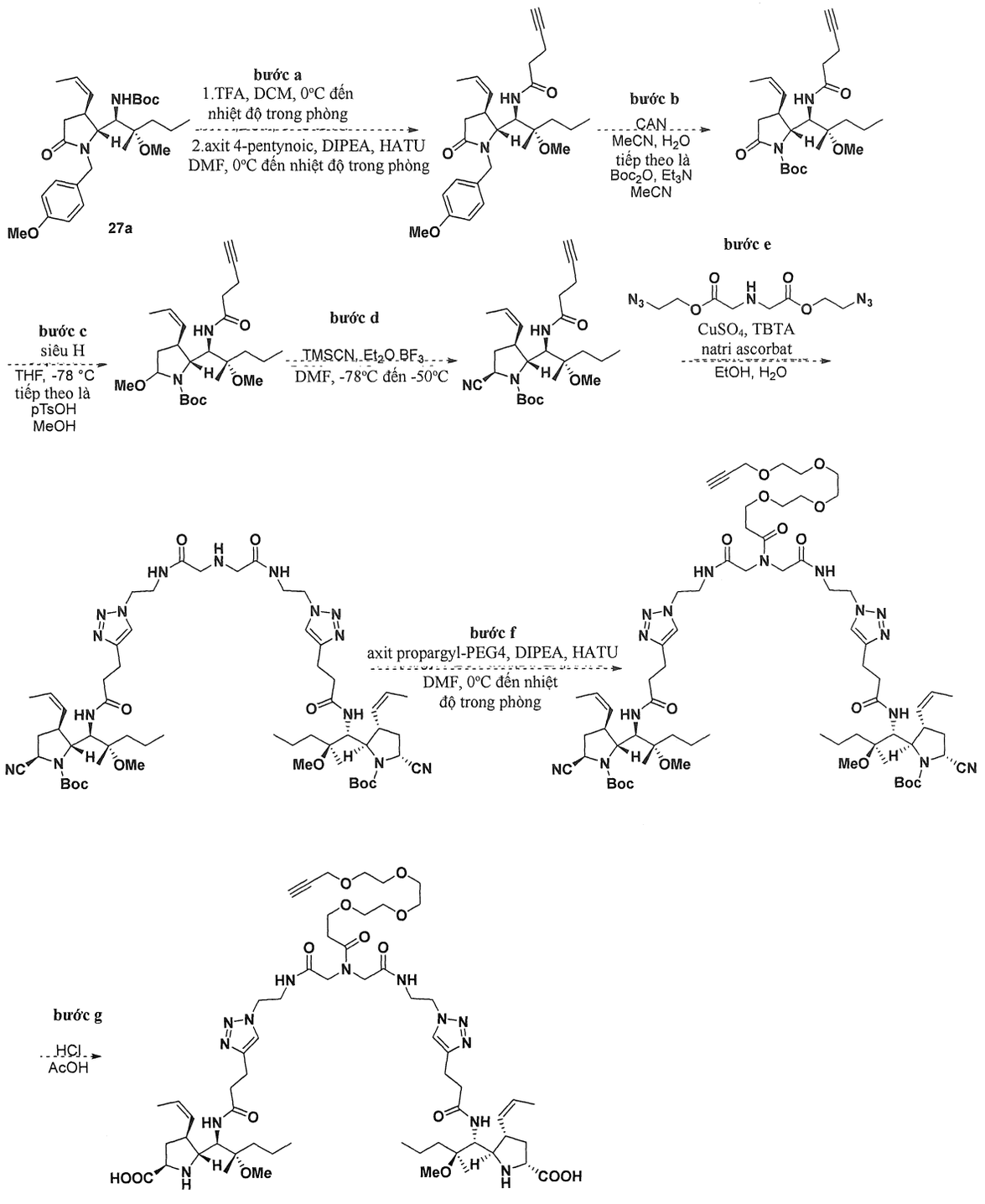
Dung dịch chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-xyano-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong AcOH (10 mL), 12N HCI (10 mL) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi hoàn thành, dung môi được bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Ví dụ 53. Tổng hợp thể liên hợp 10

Dung dịch chứa hIgG1 Fc-PEG4-azit trong PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (100 mg, 1,71 μmol, 7,011 mL, MW = 58,200 Da, DAR = 3,7) được bổ sung vào PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (2,45 mL) chứa Int-14 axit ((5R)-[(1R)-(propargyl-PEG4-carboxyamit)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl]-(4S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-carboxylic, muối HCI) (0,031 mmol), đồng sulfat (0,62 mmol), tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (0,62 mmol), và natri ascorbat (0,93 mmol). Dung

dịch đồng nhất thu được được lắc nhẹ bằng bàn rung trong 12 giờ. Dung dịch thô được pha loãng bằng PBS pH 7,4 đến nồng độ cuối là 1mg/mL, và được siêu lọc (10.000 MWCO) đến thể tích là 1 mL, trong hai lần. Hỗn hợp thô sau đó được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của Fc được sử dụng trong liên hợp, và được cô đến khoảng 10 mg/mL bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (10.000 MWCO). Các phân tử đã tinh chế được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 µg mỗi phân tử vào gel, và nhuộm bằng cách sử dụng thuốc nhuộm Instant Blue. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định. Phân tích MALDI MS được sử dụng để xác định DAR trung bình.

Ví dụ 54. Tổng hợp Int-15, muối HCI



Bước a. N-{(2.S)-metoxy-((1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-(3-butynyl)-carboxyamit.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa tert-butyl este của axit {(2S)-metoxy-(1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-

carbamic (nó được điều chế theo tài liệu tham khảo JACS, 2002, 124, 4716-4721; 1,0 mmol) trong diclometan khô (5 mL) được bổ sung axit trifloaxetic (10 mmol), và nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành, dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan trong diclometan (20 mL) và được chiết bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được tách, làm khô (natri sulfat), lọc và bay hơi. Amin thô được hòa tan trong DMF (5 mL) và được xử lý ở 0°C trong điều kiện khuấy với axit 4-pentynoic (1,1 mmol), diisopropyletylamin (3,0 mmol) và HATU (1,1 mmol). Khi phản ứng hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được đưa vào Etyl axetat (15 ml), và được rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10 mL), tiếp theo là dung dịch nước axit sulfuric 1 M (10 mL). Các chất hữu cơ gom lại được làm khô trên natri sulfat, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước b. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(4-pentynoyl)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy chứa N-{(2.S)-metoxy-((1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-(3-butynyl)-carboxyamit (1,0 mmol) trong hỗn hợp chứa axetonitril và nước (10:1, 5 mL) được bổ sung xeri amoni nitrat (2,0 mmol) theo các phần nhỏ ở 45°C trong 1 giờ, và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (5 mL). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL), các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat) và bay hơi để thu được chất thô mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Nguyên liệu được hòa tan trong axetonitril (5 mL), di-tert-butylcacbonat được bổ sung (1,5 mmol) tiếp theo là trietylamin (2,0 mmol) và DMAP (xúc tác). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (5 mL). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL), và các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat). Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước c. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(4-pentynoyl)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R/S)-metoxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy ở -78°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)- (2R)-((1R)-(4-pentynoyl)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong THF (8 mL) được bổ sung SUPER-HYDRIDE® (1 M trong THF, 2,2 mmol). Sau 30 phút hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (4 mL) và 30% hydro peroxyt (5 giọt). Hỗn hợp được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy thêm trong 30 phút và lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat) và dung môi được bay hơi để thu được hemiamin, được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Dung dịch chứa sản phẩm nêu trên trong metanol (16 mL) được bổ sung hydrat của axit p-toluensulfonic (0,1 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm và được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10 mL). Metanol được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm, nước (10 mL) được bổ sung vào phần cặn thu được và được chiết bằng EtOAc (3 x 10 mL). Các chất hữu cơ được tách và làm khô bằng nước muối và natri sulfat, được lọc và cô. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước d. tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(4-pentynoyl)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R)-xyano-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic.

Dung dịch khuấy ở -78°C chứa tert-butyl este của axit (2R)-((1R)-(4-pentynoyl)-(2S)-metoxy-(2S)-metylpentyl)-(5R/S)-metoxy-(3S)-Z-propenylpyrolidin-1-carboxylic (1,0 mmol) trong diclometan (20 mL) được bổ sung trimetylsilyl xyanua (2,0 mmol) tiếp theo là bo triflorua dietyl eterat (1,2 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy từ -78°C đến -50°C trong khoảng thời gian hơn 3 giờ. Dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (40 mL) được bổ sung và lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 15 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được làm khô (natri sulfat), lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được bao gồm hỗn hợp chứa dẫn xuất xyano epime được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước e.

Hỗn hợp khuấy chứa N-{(2.S)-metoxy-((1R)-[1-(4-methoxybenzyl)-5-oxo-(3S)-Z-propenylpyrolidin-(2R)-yl]-(2S)-metylpentyl}-(3-butynyl)-carboxyamit (1,0 mmol), bis-[N'-(2-azidoetyl)]-iminodiaxetic amit (0,5 mmol), 1H-1,2,3-triazol-4-metanamin, 1-(phenylmetyl)-N,N-bis[1-(phenylmetyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]metyl]-(0,1 mmol) và natri ascorbat (1,0 mmol) trong etanol (5 mL) và nước (5 mL), được bổ sung đồng sulfat (0,1 mmol). Khi hoàn thành, phản ứng được xử lý bằng SiliaMetS TAAcONa (0,3 mmol) trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được lọc và tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước f.

Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm trung gian từ bước e. (1,0 mmol), axit propargyl-PEG4 (1,05 mmol), và DIPEA (3,0 mmol) trong DMF (10 mL) được bổ sung HATU (2,0 mmol). Tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước g. Int-15, muối HCl

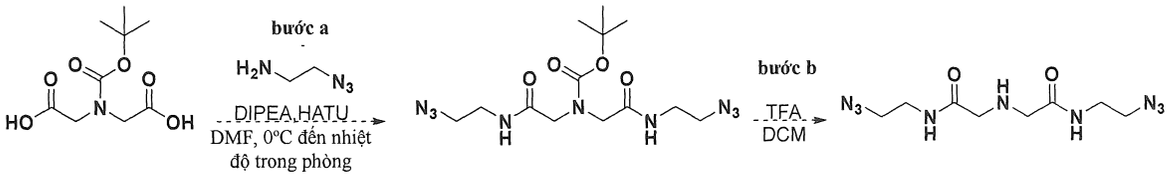
Dung dịch chứa sản phẩm trung gian từ bước f. (1,0 mmol) trong AcOH (10 mL), 12N HCI (10 mL) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi hoàn thành, dung môi được bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Nếu cần, phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Ví dụ 55. Tổng hợp thể liên hợp 11

Dung dịch chứa hIgG1 Fc-PEG4-azit trong PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (100 mg, 1,71 μmol, 7,011 mL, MW = 58,200 Da, DAR = 3,7) được bổ sung vào PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (2,45 mL) chứa Int-15 muối HCI (0,031 mmol), đồng sulfat (0,62 mmol), tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (0,62 mmol), và natri ascorbat (0,93 mmol). Dung dịch đồng nhất thu được được lắc nhẹ bằng bàn rung trong 12 giờ. Dung dịch thô được pha loãng bằng PBS pH 7,4 đến nồng độ cuối là 1mg/mL, và được

siêu lọc (10.000 MWCO) đến thể tích là 1 mL, trong hai lần. Hỗn hợp thô sau đó được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa MabSelect Sure (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ), tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của Fc được sử dụng trong liên hợp, và được cô đến khoảng 10 mg/mL bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (10.000 MWCO). Các phân tử đã tinh chế được phân tích bằng cách sử dụng gel Bis Tris SDS PAGE 4-12% bằng cách nạp 1-2 µg mỗi phân tử vào gel, và nhuộm bằng cách sử dụng thuốc nhuộm Instant Blue. Mỗi gel bao gồm một thang trọng lượng phân tử với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử được chỉ định. Phân tích MALDI MS được sử dụng để xác định DAR trung bình.

Ví dụ 56. Tổng hợp bis-[N'-(2-azidoetyl)]-iminodiaxetic amit.



Bước a. Bis-[N'-(2-azidoetyl)]-N-Boc-iminodiaxetic amit.

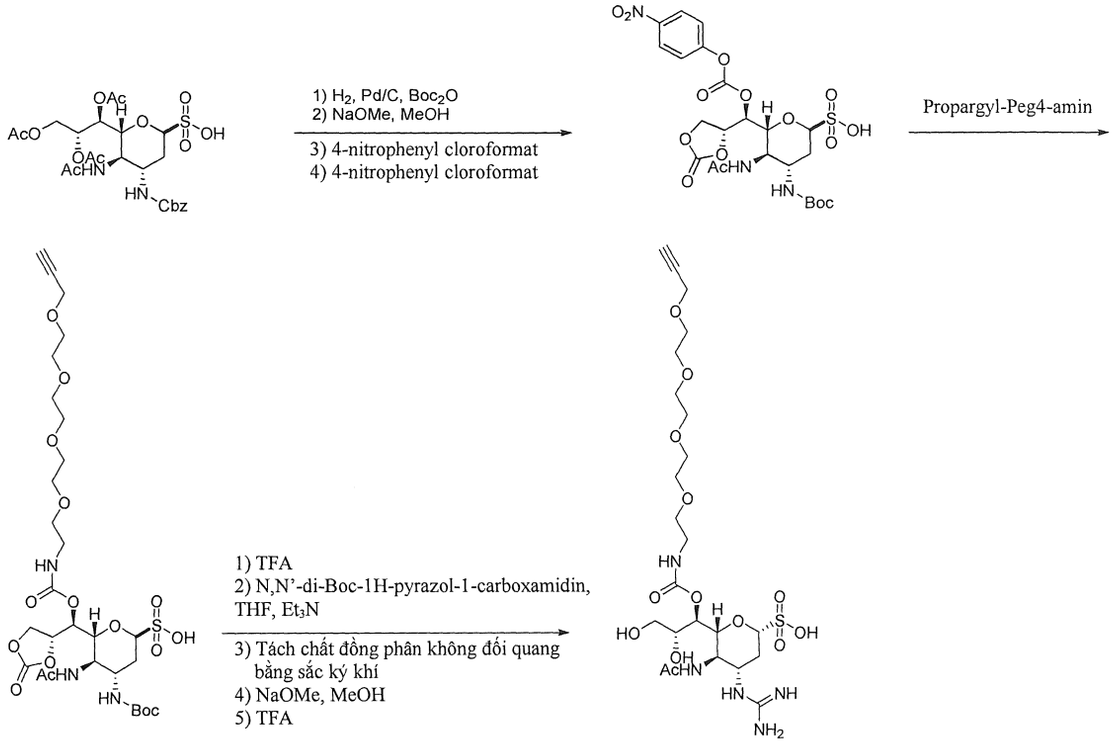
Dung dịch khuấy ở 0°C chứa Axit N-Boc-iminodiaxetic (1,0 mmol), 2-azidoetan-1-amin hydroclorua (2,0 mmol), và DIPEA (6,0 mmol) trong DMF (10 mL) được bổ sung HATU (2,0 mmol). Tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

Bước b. Bis-[N'-(2-azidoetyl)]-iminodiaxetic amit.

Hỗn hợp khuấy ở 0°C chứa Bis-[N'-(2-azidoetyl)]-N-Boc-iminodiaxetic amit (1,0 mmol) và 2-metyl-2-buten (0,5 mL) trong diclometan (8,0 mL), được bổ sung axit trifloaxetic (4,0 mL). Sau 10 phút, nhiệt độ được tăng lên đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để thu được sản phẩm mong muốn.

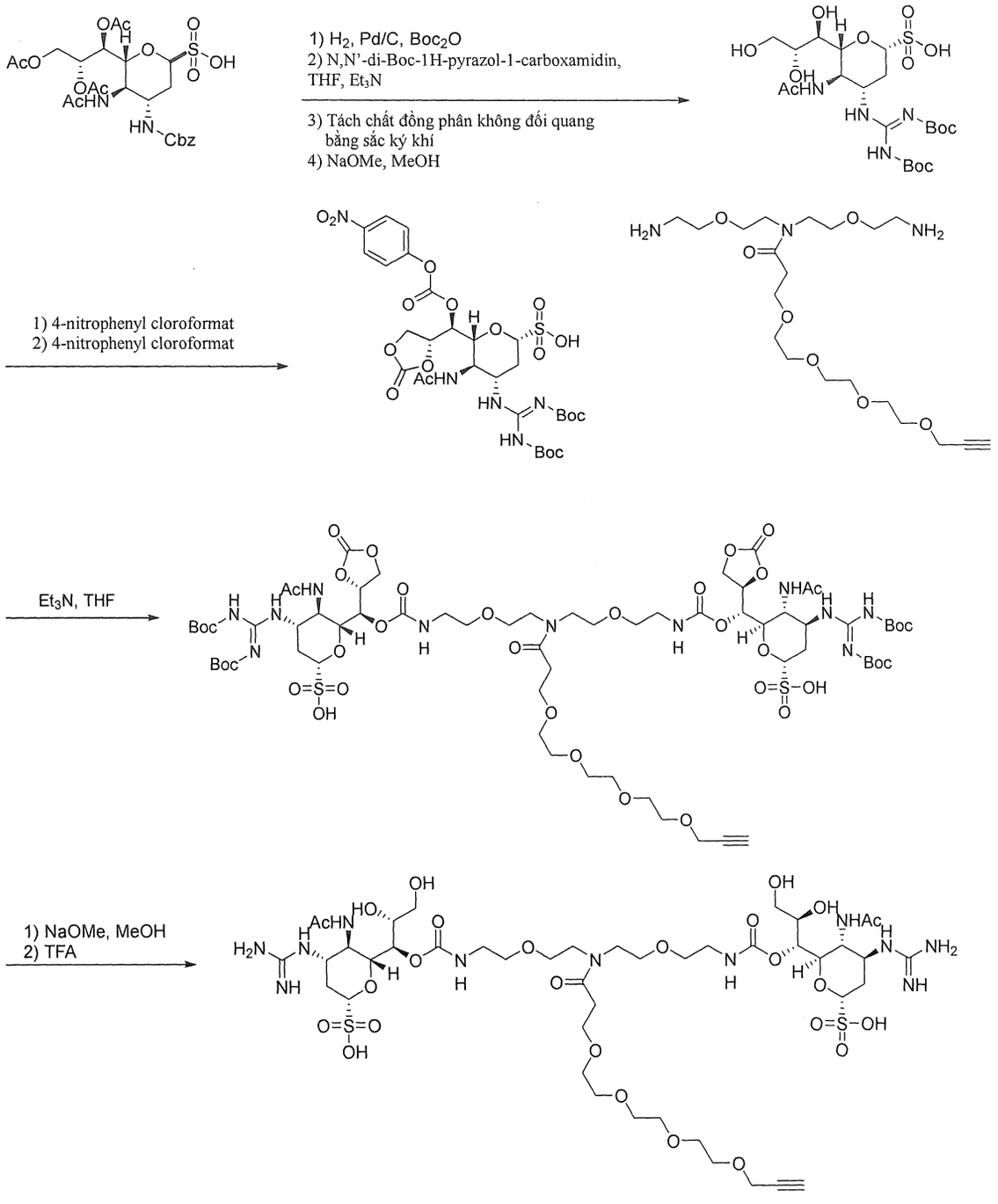
Ví dụ 57. Tổng hợp Int-16

Monome của sulfozanamivir được liên hợp với liên kết cầu nối PEG4-alkyn và có thể được liên hợp tiếp với miền Fc hoặc protein albumin được sản xuất theo sơ đồ tổng hợp sau. Nguyên liệu ban đầu Sulfozanamivir được sản xuất theo Hadházi et al. Chất tương tự sulfozanamivir có hoạt tính kháng virut cúm tiềm năng. ChemMedChem Comm. 13:785-789 (2018).



Ví dụ 58. Tổng hợp Int-17

Dime của sulfozanamivir được liên hợp với liên kết cầu nối PEG4-alkyn và có thể được liên hợp tiếp với miền Fc hoặc protein albumin được sản xuất theo sơ đồ tổng hợp sau. Nguyên liệu ban đầu Sulfozanamivir được sản xuất theo Hadházi et al. Chất tương tự sulfozanamivir có hoạt tính kháng virut cúm tiềm năng. ChemMedChem Comm. 13:785-789 (2018).

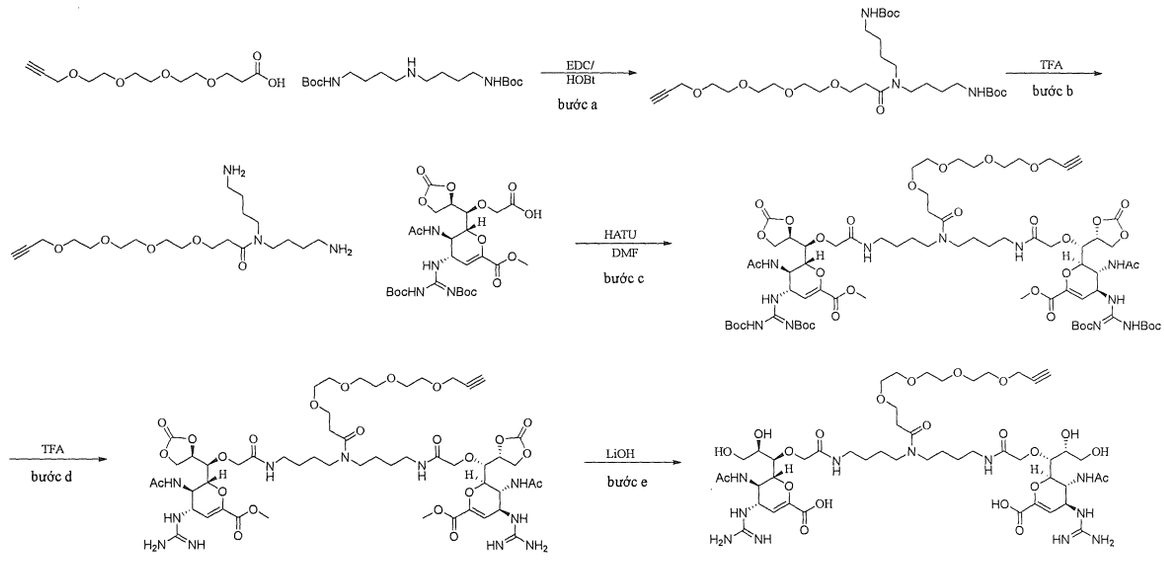


Ví dụ 59. Tổng hợp thể liên hợp 12

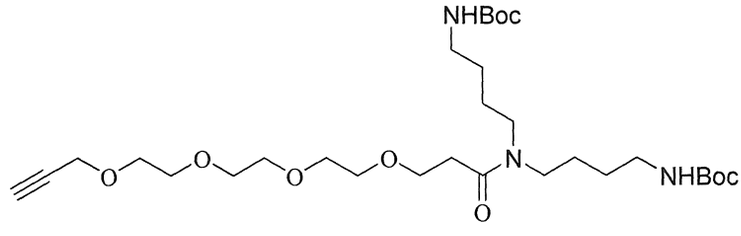
Dung dịch chứa Fc aglycosyl hóa được chức hóa azido (70 mg, 4,7 mL, 1,3709 µmol) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (29,8 mg, 0,0216 mmol, Int-7). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung với 206 µl hỗn hợp dung dịch chứa axit L-ascorbic natri (59,4 mg, 0,3 mmol), đồng (II) sulfat (15,9 mg, 0,1 mmol), và THPTA (43,5 mg, 0,1 mmol)

trong dung dịch đệm PBS pH 7,4 (1 ml). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ như được mô tả trong Ví dụ 8. Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,177 Da (DAR = 3,6). Thu được 10,1 mg, hiệu suất 14%. SDS-PAGE không khử của thể liên hợp 12 được cung cấp trên FIG. 54.

Ví dụ 60. Tổng hợp Int-18



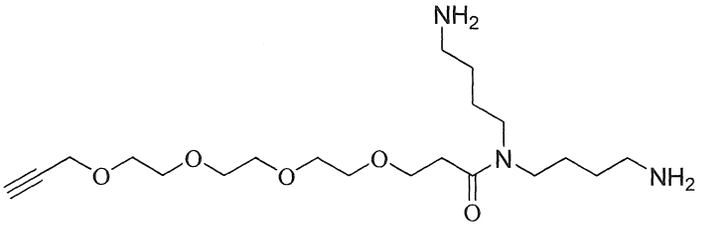
Bước a. Tổng hợp tert-butyl (17-{4-[(tert-butoxycacbonyl)amino]butyl}-16-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-17-azahenicos-1-yn-21-yl)carbamat



Dung dịch chứa di-tert-butyl [azanediyldi(butan-4,1-diyl)]biscarbamat (1,5g, 4,17mmol từ Ví dụ 45, Bước a) và axit propargyl-PEG4 (1,08g, 4,17 mmol) trong DCM (40 mL) được bổ sung EDC (1,0 g, 5 mmol), HOBt (650 mg, 5 mmol), và DIEA (1,4 ml, 10 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải

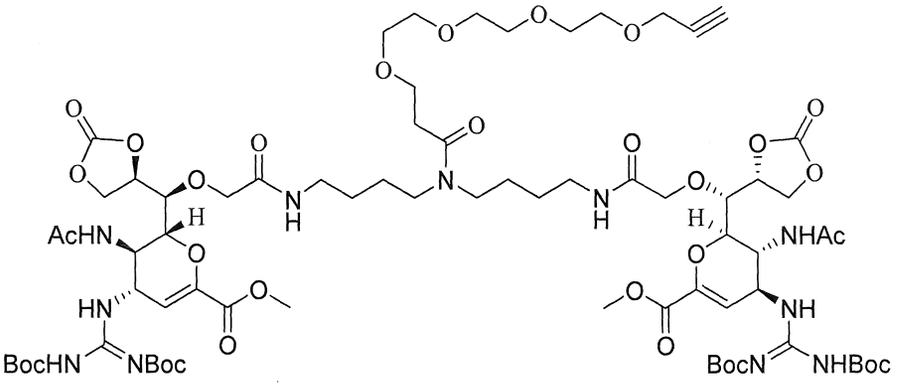
với axetonitril 10% đến 100% và nước không có chất cải biến. Thu được 1,9 g, hiệu suất 76%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =602,4.

Bước b. Tổng hợp N,N-bis(4-aminobutyl)-4,7,10,13-tetraoxahexadec-15-yn-1-amit



Tert-butyl (17-{4-[(tert-butoxycacbonyl)amino]butyl}-16-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-17-azahenicos-1-yn-21-yl)carbamat (1,90, 3,1 mmol) được xử lý bằng 20 ml TFA ở nhiệt độ trong phòng trong 0,5 giờ, sau đó được cô đặc đến khô và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất là định lượng cho bước này. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =402,3.

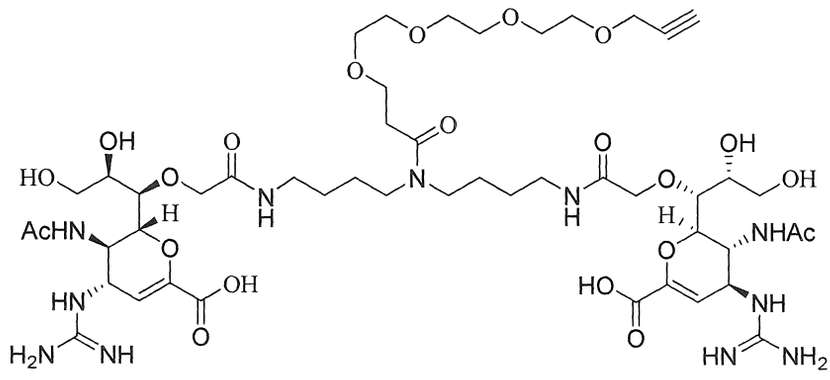
Bước c. Tổng hợp Int-18 được bảo vệ hoàn toàn



N,N-bis(4-aminobutyl)-4,7,10,13-tetraoxahexadec-15-yn-1-amit (0,150 g, 0,32 mmol) được bổ sung dung dịch chứa ete được liên kết với axit zanamivir (0,400 g, 0,63 mmol, được mô tả trong Ví dụ 31, Bước f) trong DCM (10 mL), sau đó được xử lý bằng EDC (0,200 g, 1,0 mmol), HOBt (0,135 g, 1,00 mmol), và DIEA (0,14 ml, 1,00 mmol) ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA 0,1%

không làm chất cải biến. Thu được 310 mg các sản phẩm, hiệu suất 60,3%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =813,9.

Bước d. Tổng hợp Int-18



Sản phẩm từ bước trước đó (300 mg, 0,18 mmol) được xử lý bằng axit trifloaxetic (2 mL) và được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được cô đặc, hòa tan lại trong nước (2 mL), sau đó được xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (24 mg, 1 mmol) hòa tan trong nước (1 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy 10 phút, sau đó làm lạnh nhanh bằng 0,1 ml axit axetic, được cô và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 140 mg các sản phẩm, hiệu suất 52%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =573,8, M/3+H =382,9.

Ví dụ 61. Tổng hợp PEG4-azido Fc cho thể liên hợp 13a

Điều chế dung dịch este PEG4-azidoNHS 0,05M trong DMF/PBS

Este PEG4-azido NHS (80,5 mg) được hòa tan trong DMF (0,50 mL) ở 0°C và được pha loãng đến 4,063 mL bằng cách bổ sung 3,50 mL PBS 1x dung dịch đệm ở 0°C. Dung dịch này được sử dụng để điều chế PEG4-azido Fc khác với nhiều giá trị tỷ lệ thuốc-kháng thể (DAR) bằng cách điều chỉnh đương lượng của Este PBS PEG4-azido NHS này x1 dung dịch.

Điều chế PEG4-azido Fc

PBS của este PEG4-azidoNHS 0,05M x1 dung dịch đệm (0,0984 mL, 4,92 µmol, 2,5 đương lượng) được bổ sung dung dịch chứa h-IgG1 Fc (105 mg trong 5,031 mL PBS pH 7,4, MW~53,360 Da, 1,968 µmol) và hỗn hợp được lắc nhẹ trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch được cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (30.000 MWCO) đến thể tích là ~1,5 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được cô đặc lại. Quy trình rửa được thực hiện lặp lại trong tổng ba lần. Chất phản ứng azido không phản ứng được loại bỏ bằng quy trình này. Fc-PEG4-azit đã cô đặc được pha loãng đến 5,03 mL bằng PBS pH 7,4 1x dung dịch đệm và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của h-IgG1). Hiệu suất là định lượng sau khi trao đổi dung dịch đệm/tinh chế.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây có thể bao gồm trình tự axitt nucleic mã hóa trình tự axit amin của Fc bao gồm Lys447 (ví dụ, gốc lisin đầu tận cùng C) và/hoặc trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và, khi có mặt, trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự axit amin thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và, khi có mặt trong cấu trúc biểu hiện, trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 62. Tổng hợp thể liên hợp 13a

Điều chế dung dịch chất phản ứng Click: $CuSO_4$ 0,0050M trong PBS dung dịch đệm: 20,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 25,0 mL PBS x1, sau đó lấy 22,0 mL dung dịch $CuSO_4$ ở trên và được bổ sung 189,4 mg BTTAA và 1090 mg Na Ascorbat để thu được dung dịch trong ($CuSO_4$ 0,0050M, BTTAA 0,020M và natri ascorbat 0,25M).

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (100 mg, 4,79 mL, 1,87 µmol, SEQ ID NO: 35) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn, Int-18 (11,2 mg, 0,00750 mmol, được điều chế trong Ví dụ 60). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, dung dịch được xử lý bằng 3,00 mL dung dịch chất

phản ứng Click ở trên. Dung dịch đồng nhất không màu thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế thể liên hợp chung trong Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 55,913 Da (DAR = 1,7). Thu được 54,0 mg, hiệu suất 54%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 13a bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 13a được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 63. Tổng hợp thể liên hợp 13b, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, thể liên hợp 13e, thể liên hợp 13f, và thể liên hợp 13g

PEG4-azido Fc cho thể liên hợp 13b, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, thể liên hợp 13e, thể liên hợp 13f, và thể liên hợp 13g được điều chế tương tự như PEG4-azido Fc của thể liên hợp 13a (Ví dụ 61) điều chỉnh số lượng đương lượng của Este PEG4-azido NHS như được mô tả trong bảng dưới đây. Thể liên hợp 13b, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, thể liên hợp 13e, thể liên hợp 13f, và thể liên hợp 13g được điều chế tương tự như thể liên hợp 13a trong Ví dụ 62 tại đó số lượng đương lượng của gốc hướng đích (Int-18) được điều chỉnh dựa trên giá trị DAR mong muốn (Bảng 26), và thể tích của dung dịch chất phản ứng Click được sử dụng là giống như thể tích được dùng trong quy trình cho Ví dụ 62. Giá trị DAR, trọng lượng phân tử và hiệu suất được liệt kê trong bảng dưới đây. Các thể liên hợp sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ như được mô tả trong Ví dụ 8. SDS-PAGE không khử của các thể liên hợp 13a-13g được cung cấp trên FIG. 55.

Bảng 26: Hiệu suất của các thể liên hợp 13a-13g

Tên mẫu	Đương lượng của Este PEG4-azido NHS	DAR (trung bình)	Khối lượng MALDI Da (trung bình)	Gốc hướng đích (TM)	Đương lượng của TM	Loại protein	Hiệu suất (%)
Thể liên hợp 13a	2,5	1,7	55913	Int-18	4	hIgG1 Fc	54%
Thể liên hợp 13b	4,5	2,7	57278	Int-18	6	hIgG1 Fc	50%
Thể liên hợp 13c	6,5	3,8	58908	Int-18	8	hIgG1 Fc	60%
Thể liên hợp 13d	8,5	4,7	60149	Int-18	10	hIgG1 Fc	54%
Thể liên hợp 13e	11	5,8	61726	Int-18	12	hIgG1 Fc	55%
Thể liên hợp 13f	18	8,2	65146	Int-18	16	hIgG1 Fc	53%
Thể liên hợp 13g	25	10,3	68153	Int-18	20	hIgG1 Fc	45%

Ví dụ 64. Độ ổn định *in vitro* của thể liên hợp 6

Để chứng minh độ ổn định in vitro của thể liên hợp 6 bằng cách sử dụng cả huyết tương tươi được xử lý bằng K2EDTA và vi thể gan của chuột và người. Độ ổn định của huyết tương người và chuột *in vitro* được xác định bằng cách so sánh tỷ lệ thuốc trên kháng thể (DAR) sau 24 giờ ủ trong huyết tương ở 37°C bằng phát hiện khối phổ MALDI-TOF. Độ ổn định vi thể gan bằng cách sử dụng vi thể chuột và người cũng được thực hiện sau khi ủ trong 24 giờ ở 37°C với phát hiện khối phổ MALDI-TOF. Điều này nhằm xác định các vị trí có khả năng không ổn định về mặt chuyển hóa trên protein Fc, liên kết cầu nối hoặc gốc đích.

64.1 Chuẩn bị mẫu có độ ổn định huyết tương

Trước tiên, 60 µL thể liên hợp 6 ở 3 mg/ml được trộn với 120 µL huyết tương. Mỗi loại huyết tương được chia nhỏ thành 2 ống. Một phần nhỏ được đông lạnh ngay lập tức từ mỗi loại huyết tương. Phần nhỏ còn lại được đặt trong bể nước (37°C) trong 24 giờ. Hạt MAGNE® Protein A (Promega) được làm cân bằng bằng cách xoáy nhẹ các hạt thành huyền phù. Trong hai lần lặp lại cho cả hai loại huyết tương, 50 µL huyền phù hạt được bổ sung vào ống vi ly tâm dung tích 1,5 mL và đặt lên giá từ tính trong 10 giây. Sau 10 giây, dung dịch đệm cất giữ được loại bỏ và gạn ra. 500 dung

dịch gắn kết/đệm rửa (BSA 0,1% trong 1x PBS pH 7,4) được bổ sung vào ống vi ly tâm dung tích 1,5 mL chứa các hạt. Các hạt được trộn (xoáy) và đặt lên giá từ tính trong 10 giây. Sau 10 giây, dung dịch gắn kết/đệm rửa được loại bỏ và gạn ra. 50 µL dung dịch đệm (1x PBS, pH 7,4) được bổ sung vào ống vi ly tâm chứa các hạt. 50 µL hỗn hợp plasma được bổ sung vào các hạt và được xoáy nhẹ để trộn. Bằng cách sử dụng thiết bị lắc dạng ống, mẫu được trộn ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút, đảm bảo các hạt còn lại trong huyền phù. Sau khi trộn, ống được đặt lên giá từ tính trong 10 giây và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. 500 µL dung dịch đệm (1x PBS, pH 7,4) được bổ sung và được xoáy nhẹ để trộn. Sau khi trộn, ống được đặt lên giá từ tính trong 10 giây, tiếp theo là loại bỏ và gạn dung dịch đệm rửa. Bước rửa được thực hiện lặp lại cho tổng 2 lần rửa. Sau 2 lần rửa với 500 µL dung dịch đệm (1x PBS, pH 7,4), 3 lần rửa với lần lượt 500 µL, 200 µL, và 100 µL nước được thực hiện. Thể tích thích hợp của nước được bổ sung vào ống và được xoáy nhẹ để trộn kỹ và sau đó đặt lên giá từ tính trong 10 giây trước khi loại bỏ và gạn nước ra. Sau khi rửa lần thứ ba bằng nước, 30 µL dung dịch đệm rửa giải (nước:axetonitril:TFA với tỷ lệ 90:10:0,4) được bổ sung vào các hạt. Bằng cách sử dụng thiết bị lắc dạng ống, dung dịch đệm rửa giải và mẫu được trộn trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi trộn, ống được đặt lên giá từ tính trong 10 giây, dung dịch đệm rửa giải, chứa mẫu, được loại bỏ và giữ. 2 µL mẫu được trộn với 2 µL ma trận MALDI (20 mg/mL axit Sinapic với tỷ lệ 70:30:0,1 nước:axetonitril:TFA) và được tạo vết lên đĩa đích MALDI bằng cách sử dụng kỹ thuật lớp kép. Mẫu sau đó được phân tích bằng quang phổ khối MALDI-TOF.

64.2 Chuẩn bị mẫu vi thể gan

10x dung dịch đệm được điều chế với 500 mM Tris-HCl ở pH 7,5 và 50 mM magie clorua hexahydrat. ACV-006 được pha loãng đến 50 µM trong 1x PBS, pH 7,4. Vi thể gan được rã đông và xoáy. Một phần nhỏ của mỗi loại vi thể gan (người và chuột nhắt) được giết bằng nhiệt ở 70°C trong 15 phút để sử dụng làm mẫu đối chứng. Hỗn hợp phản ứng được điều chế cho cả hai loài theo Bảng 27. Các ống được ủ trong bể nước (37°C) trong 24 giờ. Các mẫu được chiết để phân tích bằng cách sử dụng hạt MAGNE® Protein A (Promega) theo quy trình từ mục 59.1.

Bảng 27: Nồng độ vi thể cuối cùng 0,5 mg/mL với 5 µM thể liên hợp 6

	Giết bằng nhiệt	Sống
Tổng cộng	400 µL	400 µL
Nước	286 µL	286 µL
10x dung dịch đệm	40 µL	40 µL
Vi thể (20 mg/mL)	10 µL	10 µL
Hợp chất (50 µM)	40 µL	40 µL
Dung dịch tái tạo NADPH A	20 µL	20 µL
Dung dịch tái tạo NADPH B	4 µL	4 µL

64.3 Mẫu và phân tích dữ liệu

Các mẫu được thu thập bằng cách sử dụng Bruker Compass Flex Control, phiên bản 3.4 để thu được phổ khối MALDI-TOF quét đầy đủ (Bảng 28). BSA được sử dụng làm chất chuẩn nội cho phạm vi khối lượng thu thập. Dữ liệu được phân tích thêm bằng phần mềm Bruker Compass Flex Analysis, phiên bản 3.4. Ngoài ra, mẫu DAR của mẫu đối chứng được so sánh với mẫu DAR của mẫu thử nghiệm.

Bảng 28: Thông số của máy quang phổ khối (MS)

Máy quang phổ khối	Bruker Microflex LT
Phát hiện	
Khoảng khối lượng	17-141 kDa
Tốc độ lấy mẫu và cài đặt số hóa	0,5
Độ lợi của máy dò	2,05x
Điều chỉnh độ lệch cơ sở	0%
Độ lệch tương tự	0,5 mV
Tần số laze	60 Hz
Máy quang phổ	
Nguồn ion 1 (IS1)	20,03 kV
Nguồn ion 2 (IS2)	18,12 kV (90,5% IS1)
Ống kính	7,17 kV (35,8% IS1)
Chiết xuất ion được tạo xung	1010 ns
Chất mang mẫu	
Di chuyển ngẫu nhiên	Mẫu một phần

Tia laze	100/phần
Tổng số tia laze	500
Hình ảnh ở định dạng Raster	20
Giới hạn đường kính của hình ảnh ở định dạng Raster	2000 µm
Thiết lập	
Độ lệch bộ giảm suy laze tổng thể	0%
Độ lệch bộ giảm suy laze	20%
Khoảng giảm suy laze	30%
Độ nhạy của bộ số hóa (Toàn thang đo)	100 mV
Độ lệch tuyến tính tương tự của bộ số hóa	0,5 mV
Độ lệch tuyến tính số của bộ số hóa	0 cnt
Điện áp khuếch đại tuyến tính cơ sở của bộ dò	2500 V
Điện áp khuếch đại tuyến tính tăng cường của bộ dò	0 V
Hiệu chỉnh	
Albumin huyết thanh bò	[M+2H], [M+H], [2M+H]

64.4 Kết quả

Hợp chất thử nghiệm, thể liên hợp 6 (FIG. 43), được thử nghiệm về độ ổn định in vitro ở cả huyết tương tươi và vi thể gan được xử lý bằng K2EDTA của chuột và người.

Thể liên hợp 6 được tăng đột ngột vào huyết tương K2EDTA tươi của chuột và người ở nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Huyết tương được chia thành 2 phần nhỏ, một phần nhỏ được đông lạnh ngay lập tức và phần nhỏ còn lại được ủ trong bể nước ở 37°C trong 24 giờ. Vào cuối thời gian ủ, các mẫu được chiết từ ma trận huyết tương bằng hạt từ tính MAGNE® Protein A. Sau khi ủ huyết tương, các mẫu được phân tích bằng quang phổ khối MALDI-TOF về sự thay đổi DAR. Thể liên hợp 6 ở cả chuột (FIG. 44) hoặc người (FIG. 45) đều không phát hiện thấy quá trình ủ huyết tương tạo ra sự thay đổi bất kỳ trong DAR.

Độ ổn định vi thể gan của thể liên hợp 6 được thử nghiệm ở nồng độ cuối cùng là 5 µM trong 50 mM, dung dịch đệm Tris-HCl pH 7,5 chứa vi thể gan có hoạt tính hoặc được giết bằng nhiệt ở nồng độ cuối cùng là 0,5 mg/mL và MgCl2 ở nồng độ

cuối cùng là 5 mM. Tất cả các mẫu được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C, và dung dịch tái tạo nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADPH) được sử dụng để cung cấp khả năng tiếp cận của đồng yếu tố liên tục trong quá trình ủ. Việc ủ được thực hiện trong 24 giờ. Ở cuối thời điểm ủ, các mẫu được chiết từ ma trận vi thể bằng hạt từ tính Protein A. Sau khi ủ vi thể gan, các mẫu được phân tích bằng quang phổ khối MALDI-TOF về sự thay đổi DAR. Thể liên hợp 6 trong cả ủ vi thể gan của chuột (FIG. 46) hoặc người (FIG. 47) đều không phát hiện thấy tạo ra sự thay đổi bất kỳ trong DAR.

Độ ổn định huyết tương in vitro sau khi ủ ở 37°C trong 24 giờ, cho thấy sự thiếu hụt mức suy giảm của Fc thể liên hợp 6, liên kết cầu nối, hoặc gốc hướng đích ở chuột nhắt hoặc người. Tương tự sự thiếu hụt mức suy giảm quan sát được sau khi ủ ở cả vi thể gan chuột nhắt và người, gợi ý về sự vắng mặt của chất chuyển hóa. Kết quả của các nghiên cứu về độ ổn định *in vitro* này ủng hộ rằng đây là một hợp chất ổn định với các chất phân hủy có thể có nguy cơ sinh học.

Ví dụ 65. Hiệu lực của thể liên hợp 13 ở các tỷ lệ thuốc-kháng thể (DAR) khác nhau chống lại cúm A (H1N1) trong mô hình chuột gây chết.

Thể liên hợp 13 được đánh giá chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây ra lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 13 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg).

Các nhóm 1-13 tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV), 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm hoặc tá dược (PBS). Nghiên cứu này đã đánh giá 4 cấu trúc DAR khác nhau của thể liên hợp 13 tương ứng với thể liên hợp 13a, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, và thể liên hợp 13g (DAR là 1,7, 3,8, 5,8, và 10,3, lần lượt). Tổng hợp thể liên hợp 13a, thể liên hợp 13c, thể liên hợp 13d, và thể liên hợp 13g được mô tả trong Ví dụ 61-Ví dụ 63. Mỗi cấu trúc được đánh giá ở 0,03, 0,1, và 0,3 mg/kg. Thiết kế nghiên cứu chung cho mỗi thể liên hợp được tóm tắt trong Bảng 29.

Bảng 29: Thiết kế nghiên cứu chung của bản quét DAR

Nhóm	Thể liên hợp	DAR	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Thể tích liều (ml/kg)
1	Thể liên hợp 13a	1,7	IV, T+2 giờ	0,3	5
2	Thể liên hợp 13a	1,7	IV, T+2 giờ	0,1	5
3	Thể liên hợp 13a	1,7	IV, T+2 giờ	0,03	5
4	Thể liên hợp 13c	3,8	IV, T+2 giờ	0,3	5
5	Thể liên hợp 13c	3,8	IV, T+2 giờ	0,1	5
6	Thể liên hợp 13c	3,8	IV, T+2 giờ	0,03	5
7	Thể liên hợp 13d	5,8	IV, T+2 giờ	0,3	5
8	Thể liên hợp 13d	5,8	IV, T+2 giờ	0,1	5
9	Thể liên hợp 13d	5,8	IV, T+2 giờ	0,03	5
10	Thể liên hợp 13g	10,3	IV, T+2 giờ	0,3	5
11	Thể liên hợp 13g	10,3	IV, T+2 giờ	0,1	5
12	Thể liên hợp 13g	10,3	IV, T+2 giờ	0,03	5
13	Tá dược (PBS)	Na	IV, T+2 giờ	na	5

Tất cả các cấu trúc đều có khả năng bảo vệ hoàn toàn ở liều 0,3 mg/kg, ngược lại, không có cấu trúc nào có hoạt tính ở liều 0,03 mg/kg (tỷ lệ sống sót 0% cho tất cả các nhóm) cho thấy liều thấp này là dưới liều ngưỡng có hiệu quả. Tuy nhiên, các nhóm tiếp nhận 0,1 mg/kg thể liên hợp có thể được phân biệt (Bảng 30). Ở mức liều lượng này các thể liên hợp với DAR là 1,7, 3,8, và 5,8 có tính bảo vệ cao hơn đáng kể so với chuột chỉ được điều trị bằng tá dược (p=0,0027). Cấu trúc DAR cao (10,3) tuy nhiên không có khả năng bảo vệ đáng kể hơn so với chuột chỉ được điều trị bằng tá dược (p=0,091). Cơ chế cơ bản khiến cấu trúc DAR cao mất hoạt tính hiện vẫn chưa được biết rõ nhưng có thể do một số yếu tố gây ra, bao gồm sự can thiệp vào quá trình tái chế kháng thể, dẫn đến thời gian bán hủy ngắn hơn.

Bảng 30: Nghiên cứu phạm vi DAR (các nhóm dùng liều 0,1 mg/kg)

Thể liên hợp	DAR	% mức sống sót	Mức ý nghĩa*
Thể liên hợp 13a	1,7	60	p=0,0027
Thể liên hợp 13c	3,8	40	p=0,0027
Thể liên hợp 13d	5,8	80	p=0,0027
Thể liên hợp 13g	10,3	0	p=0,091**
* = Mức ý nghĩa so với chuột chỉ được xử lý bằng tá dược (PBS) bằng thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox). ** = Không có ý nghĩa			

Ví dụ 66. Hiệu lực *in vivo* của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12

Thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12, tương tự như đột biến Fc tại N297A, được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây chết ở chuột BALB/c cái (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/34) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột. Thí nghiệm bao gồm 5 con chuột cho mỗi nhóm. Chuột được gây mê bằng ketamin/xylazin (150/10 mg/kg) và được thử thách với virut cúm ở mức LD95 gấp 3-5 lần bằng cách tiêm vào mũi với thể tích 30 µL. Một liều điều trị duy nhất được dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch, 2 giờ sau khi lây nhiễm. PBS được dùng làm mẫu đối chứng âm tính. Tất cả các con chuột được theo

dõi về % mức giảm cân (FIG. 48) và mức sống sót (FIG. 49) trong 15 ngày sau khi thử thách.

Ví dụ 67. Gắn kết IIIA thụ thể Fcγ in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12

Gắn kết của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12, tương tự như đột biến Fc tại N297A, được đánh giá chống lại FcγRIIIA bằng ELISA. Đĩa được phủ 1 µg/mL FcγRIIIA tái tổ hợp của người. Ngày tiếp theo, đĩa được phong bế bằng BSA 1% dung dịch trong 1 giờ. Các thể liên hợp được bổ sung vào đĩa trong phạm vi liều đáp ứng từ 0,01 - 1000 nM và ủ trong 2 giờ. Gắn kết được phát hiện bằng cách ủ với kháng thể kháng Fc của người được liên hợp với peroxidaza trong 1 giờ và tiếp theo ủ với chất phản ứng cơ chất TMB trong 10-15 phút.

Gắn kết được xác định bằng cách đọc độ hấp thụ ở 450 nm (FIG. 50 và FIG. 51).

Ví dụ 68. Phân tích mẫu huyết tương thể liên hợp 6 in vivo

Thể liên hợp 6 trong mẫu huyết tương được định lượng bằng ELISA phát hiện bắt giữ neuraminidaza. Tóm lại, các phân tử được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgC-Fc của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 6. Mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp bên dưới.

Đĩa Nunc Maxisorp 96 giếng (Mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ 0,1 U/giếng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong 1X dung dịch đệm phủ KPL (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Dung dịch pha loãng theo chuỗi chứa mẫu huyết tương được dàn mỏng và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 0,5% trong PBS Tween 20 0,025% + nồng độ cuối của huyết tương khỉ cynomolgus nguyên thể là 1:2,500). Các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 6 nằm trong khoảng từ 0,230 đến 500 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa. Sau 2 giờ ủ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS bằng Tween 20 0,05%. Thể liên hợp gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa sau

đó được dò bằng Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được rửa 8 lần trong 300 µL PBS bằng Tween 20 0,05% và được phát triển bằng cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng bằng H_2SO_4 1N. Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm. Thể liên hợp 6 trong các mẫu huyết tương được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (Phân tích hình chữ S, 4PL) các đường cong tiêu chuẩn.

Nồng độ huyết tương trung bình thu được sau đó được sử dụng để tính toán các thông số dược động học bằng phân tích không phân chia bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 7.0.

Độc tính động học (TK), các nhóm 2 (IV, 5 mg/kg) và 3 (IV, 20 mg/kg)

Các nồng độ là tương đương giữa các con vật đực và cái trong cùng một nhóm liều vào Ngày 1 (Bảng 31) và Ngày 8 (Bảng 32) sau khi dùng. Mức phơi nhiễm huyết tương trung bình dường như tăng theo liều lượng trong cả hai ngày. Sau khi dùng liều thứ hai, mức tích tụ nhẹ khoảng 30% đã được ghi nhận trên các nhóm liều khác nhau. Đồ thị của nồng độ huyết tương trung bình các ngày 1 và 8 trên các nhóm liều khác nhau được thể hiện trên FIG. 52.

Bảng 31: Độc tính động học Ngày 1

Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Nồng độ (µg/mL) ở thời gian (giờ)									Tmax (giờ)	Cmax (µg/mL)	AUC0-t (µg•giờ/mL)
			0,083	1	2	4	8	24	72	120	168			
5	IV	F	112	78,8	85,8	71,0	75,1	52,5	38,6	18,5	22,3	0,083	112	6190
	IV	M	101	84,6	107	75,3	72,5	38,1	29,8	35,3	15,8	2	107	5970
		Trung bình	107	81,7	96,5	73,2	73,8	45,3	34,2	26,9	19,0	1,04	110	6080
20	IV	F	449	510	353	331	303	134	105	63,6	46,6	1	510	18800
	IV	M	448	422	485	373	329	160	96,0	76,2	53,4	2	485	20500
		Trung bình	449	466	419	352	316	147	100	69,9	50,0	1,50	497	19600

Bảng 32: Độc tính động học ngày 8

Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Nồng độ (µg/mL) ở thời gian (giờ)									Tmax (giờ)	Cmax (µg/mL)	AUC0-t (µg•hr/mL)
			0,083	1	2	4	8	24	72	120	168			
5	IV	F	111	111	99,3	82,3	100	52,2	46,7	35,0	33,9	1	111	7970
	IV	M	113	114	113	78,4	74,4	54,7	35,2	47,1	28,2	1	114	7700
		Trung bình	112	112	106	80,4	87,3	53,5	41,0	41,1	31,0	1	112	7830
20	IV	F	398	359	319	315	298	190	126	99,3	85,5	0,083	398	23900
	IV	M	391	443	354	435	263	219	143	142	83,8	1	443	27800
		Trung bình	394	401	337	375	280	205	134	120	84,7	0,542	420	25800

Dược động học (PK), các nhóm 4 (IV, 10 mg/kg) và 5 (SC, 10 mg/kg)

Sau khi dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch, nồng độ huyết tương từ các động vật đực và cái là tương đương. Độ thanh thải rất thấp, dẫn đến thời gian bán hủy cuối cùng dài quan sát được sau khi dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch (Bảng 33A và Bảng 33B).

Bảng 33A: Nồng độ huyết tương đối với động vật đực và cái

Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Nồng độ (µg/mL) ở thời gian (giờ)											
			0,083	1	2	4	8	24	72	120	168	336	504	672
5	IV	F	166	174	220	153	144	58,6	40,6	21,2	20,7	14,7	n/a	2,7
5	IV	M	191	135	258	161	154	71	43,7	47,6	32	22,9	n/a	5,3

Bảng 33B: PK parameters đối với động vật đực và cái

Tmax (giờ)	C0 (µg/mL)	Cmax (µg/mL)	AUClast (giờ*µg/mL)	AUCINF_obs (giờ*µg/mL)	Chu kỳ bán rã (giờ)	Cl_obs (mL/phút/kg)	Vss_obs (mL/kg)	Vz_obs (mL/kg)
1	166	220	13700	14400	170	0,00579	68,9	85,1
1	204	258	19400	20800	183	0,004	56,6	63,2

Sau khi dùng bằng cách tiêm dưới da, thời gian để đạt nồng độ tối đa đạt được là 72 giờ sau khi dùng thuốc nhưng nồng độ có thể đo được trong vòng 672 giờ sau khi dùng thuốc (Bảng 34A và Bảng 34B). Tính sinh khả dụng sau khi dùng SC, liều lượng cao khoảng 139%. So sánh nồng độ huyết tương theo thời gian giữa liều dùng 10 mg/kg IV và SC được thể hiện trên FIG. 53.

Bảng 34A: Nồng độ huyết tương đối với động vật đực và cái

Đường dùng	Liều lượng (mg/kg)	Giới tính	Nồng độ (µg/mL) ở thời gian (giờ)											
			0,083	0,5	1	4	8	24	72	120	168	336	504	672
SC	10	F	n/a	1,9	5,3	23,1	39,5	54	58,6	66,9	54	28,4	18,9	6,4
SC	10	M	n/a	0,3	2,1	19,9	28,1	46,8	64,9	54,7	57,2	26,8	25,5	8,6

Bảng 34B: Thông số PK đối với động vật đực và cái

Tmax (giờ)	Cmax (µg/mL)	AUC0-t (µg×hr/mL)	F (%)
120	66,9	22600	137%
72	64,9	23300	141%

Ví dụ 69. Hiệu lực của thể liên hợp 6 chống lại chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) ở mô hình chuột gây chết

Thể liên hợp 6 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây ra lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg). Tỷ lệ tử vong và cân nặng được ghi lại hàng ngày và con chuột bất kỳ giảm 20% cân nặng được coi là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV), 2 giờ sau khi thử thách virut của thể liên hợp 6, mẫu đối chứng hIgG1 Fc, hoặc tá dược (PBS). Các con chuột tiếp nhận oseltamivir được dùng thuốc qua đường miệng, hai lần mỗi ngày, trong 5 ngày, bắt đầu 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 35.

Bảng 35: Thiết kế nghiên cứu đối với nghiên cứu Cúm A/PR/8/34 (h1N1)

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Thể tích liều (ml/kg)	# chuột
1	Tá dược	IV, T+2 giờ	na	5	5
2	hIgG1 Fc	IV, T+2 giờ	10	5	5
3	Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x5, T+2 giờ	20	5	5
4	Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x5, T+2 giờ	5	5	5
5	Thể liên hợp 6	IV, T+2 giờ	10	5	5
6	Thể liên hợp 6	IV, T+2 giờ	2	5	5
7	Thể liên hợp 6	IV, T+2 giờ	0,4	5	5

Như mong đợi, chuột tiếp nhận tá dược hoặc chỉ hIgG1 Fc đã lây nhiễm vào ngày 6. Tương tự, chuột được xử lý bằng oseltamivir ở liều lượng thấp (5 mg/kg; hai lần mỗi ngày trong 5 ngày) đạt tỷ lệ tử vong theo ngày 8 (Bảng 36). Tuy nhiên, chuột

tiếp nhận 20 mg/kg oseltamivir với cùng phác đồ dùng liều được bảo vệ hoàn toàn (p=0,0027). Ngược lại với kết quả nhìn thấy với oseltamivir, chuột được xử lý bằng thể liên hợp 6 được bảo vệ hoàn toàn ở tất cả các mức liều lượng (10, 2, và 0,4 mg/kg) từ một liều dùng IV duy nhất (p=0,0027).

Bảng 36: Mức sống sót đối với nghiên cứu Cúm A/PR/8/34 (H1N1) (Ngày 14)

Chất thử nghiệm	Liều lượng	% mức sống sót	Mức ý nghĩa*
hIgG1 Fc	10	0	p=0,85**
Oseltamivir	20	100	p=0,0027
Oseltamivir	5	0	p=0,091**
Thể liên hợp 6	10	100	p=0,0027
Thể liên hợp 6	2	100	p=0,0027
Thể liên hợp 6	0,4	100	p=0,0027
* = Mức ý nghĩa so với chuột chỉ được xử lý bằng tá dược (PBS) bằng thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox). ** = Không có ý nghĩa			

Hiệu lực của thể liên hợp 6 được hỗ trợ thêm bởi các phép đo cân nặng hàng ngày. Như mong đợi, chuột được xử lý bằng tá dược hoặc hIgG1 Fc chứng minh sự giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt quá 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi là đã chết (Bảng 37). Nhóm được xử lý bằng oseltamivir ở 5 mg/kg cũng cho thấy sự sụt cân đều đặn cho đến khi đạt tỷ lệ tử vong ở ngày 8. Chuột được xử lý bằng oseltamivir ở liều cao (20 mg/kg) cho thấy tình trạng giảm cân ổn định nhưng chậm hơn, đạt 14% ở ngày thứ 8 trước khi hồi phục.

Ngược lại với chuột của nhóm đối chứng và nhóm được điều trị bằng oseltamivir, các nhóm tiếp nhận thể liên hợp 6 duy trì cân nặng khỏe mạnh trong suốt quá trình nghiên cứu ngay cả ở nồng độ liều thấp nhất (0,4 mg/kg) (Bảng 37). Giảm cân tạm thời lớn nhất ở những con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 6 chỉ là 2% ở ngày 14 trong nhóm liều 2 mg/kg. Bằng cả hai phép đo mức sống sót và cân nặng, thể liên hợp 6 đã chứng minh khả năng bảo vệ mạnh mẽ khỏi Chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 với một liều tiêm tĩnh mạch duy nhất thấp tới 0,4 mg/kg

Bảng 37: Dữ liệu cân nặng của chuột (% BW so với ngày 0). Trung bình 5 con chuột; *dữ liệu không được bao gồm khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau thử thách	Tá dược (PBS)	hIgG1 Fc (mg/kg)	Oseltamivir (mg/kg)		Thể liên hợp 6 (mg/kg)		
		10	20	5	10	2	0,4
0	100	100	100	100	100	100	100
1	99	99	102	99	103	102	101
2	102	102	103	96	104	102	103
3	96	96	102	95	102	102	100
4	89	88	100	90	103	100	100
5	82	81	95	89	102	99	99
6	77	77	98	90	102	100	101
7			90	84	103	101	102
8			86	78	105	101	102
9			91		101	102	102
10			95		102	101	103
11			97		102	101	102
12			97		101	99	102
13			97		103	100	102
14			96		104	98	101

Ví dụ 70. Tổng hợp thể liên hợp 14

Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự như thể liên hợp 13a (Ví dụ 62) bằng cách sử dụng PEG-azido-Fc (SEQ ID NO:35) và Int-7 (Ví dụ 19). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,502. Da (DAR = 2,1). Thu được 43,4 mg, hiệu suất 43,4%.

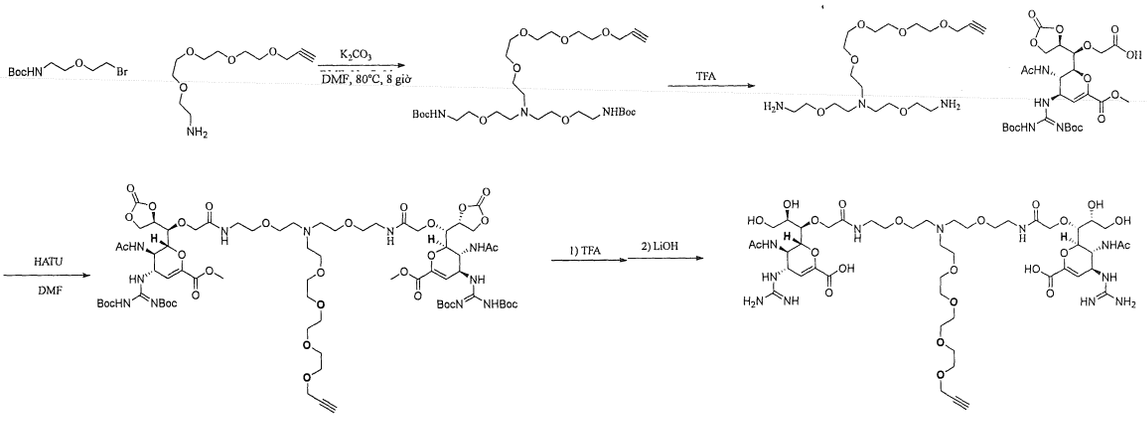
Ví dụ 71. Tổng hợp thể liên hợp 15

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-12 (Ví dụ 46). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,528. Da (DAR = 2,2). Thu được 40,0 mg, hiệu suất 40,0%.

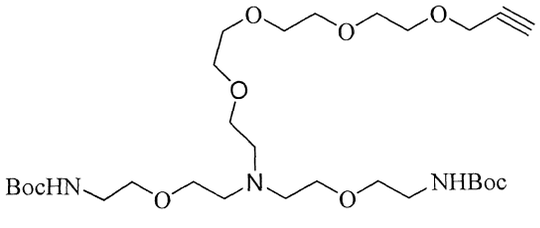
Ví dụ 72. Tổng hợp thể liên hợp 16

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-10 (Ví dụ 31). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,507. Da (DAR = 2,1). Thu được 41,7 mg, hiệu suất 42%.

Ví dụ 73. Tổng hợp Int-19



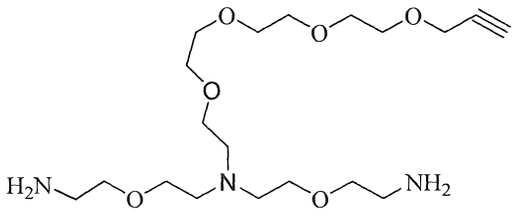
Bước a.



Dung dịch chứa tert-butyl [2-(2-bromoetoxy)etyl]carbamat (1,8 g, 6,6 mmol) và propargyl-PEG4 amin (0,7 g, 3,0 mmol) trong 30ml DMF được bổ sung kali cacbonat (1,2 g, 9 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 80°C trong 6 giờ, và sau đó chia phần vào giữa DCM (200 mL) và nước muối (50 mL). Lớp hữu cơ được tách và được

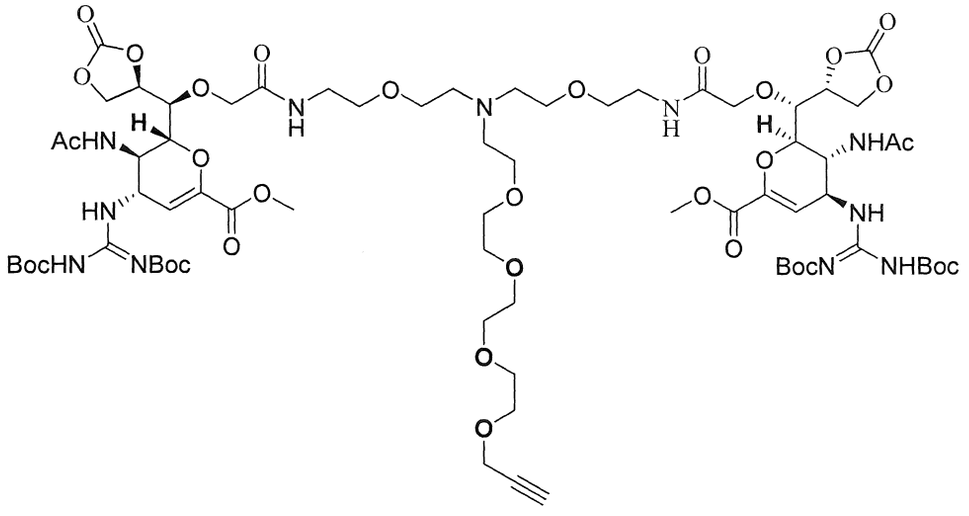
rửa bằng nước muối và được làm khô bằng natri sulfat khan. Khi lọc, sản phẩm lọc thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 1,0 g các sản phẩm, hiệu suất 65%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =606,4.

Bước b.



Sản phẩm từ bước trước đó (1,0 g, 1,6 mmol) được xử lý bằng TFA (10 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong 0,5 giờ, sau đó được cô đặc đến khô và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất là định lượng cho bước này. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =406,3.

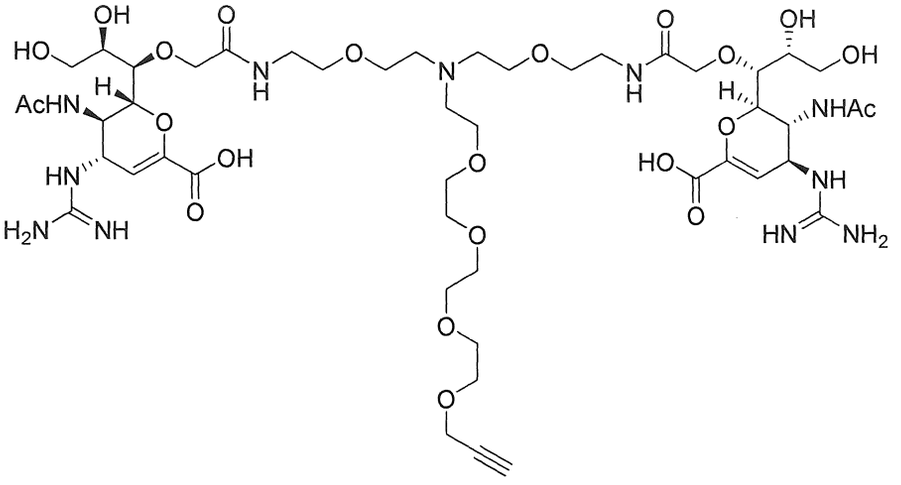
Bước c.



Sản phẩm từ bước trước đó (120 mg, 0,17 mmol) được xử lý bằng dung dịch chứa axit ete zanamivir (230 mg, 0,38 mmol, Ví dụ 31) trong 10 ml DMF. Dung dịch này được bổ sung EDC (100 mg, 0,5 mmol), HOBt (65 mg, 0,5 mmol), và DIEA (0,14 ml, 1 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó

tinh chế bằng và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA không làm chất cải biến. Thu được 180mg các sản phẩm, hiệu suất 60,2%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =816,9.

Bước d.

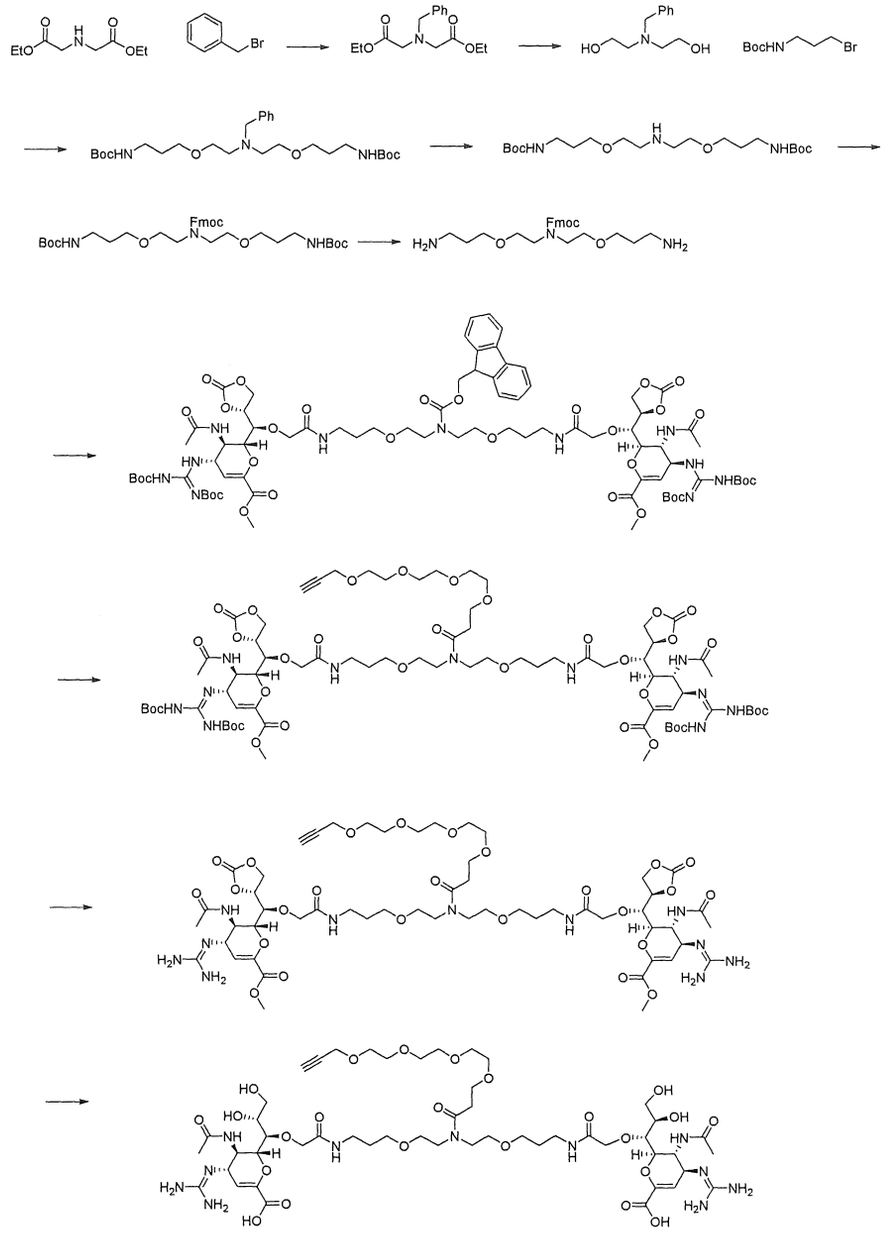


Sản phẩm từ bước trước đó (180 mg, 0,11 mmol) được xử lý bằng axit trifloaxetic (2 mL) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được cô đặc và được hòa tan vào nước (2 mL), sau đó được xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (24 mg, 1 mmol) hòa tan trong H2O (1 mL). Hỗn hợp phản ứng thu được được khuấy 10 phút, sau đó làm lạnh nhanh bằng 0,1 ml axit axetic. Dung dịch được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 140 mg sản phẩm, hiệu suất 52%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M/2+H =575,8, M/3+H =384,2.

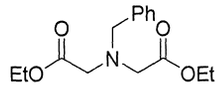
Ví dụ 74. Tổng hợp thể liên hợp 17

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-19 (Ví dụ 73). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,672. Da (DAR = 2,2). Thu được 36,7 mg, hiệu suất 36,7%.

Ví dụ 75. Tổng hợp Int-20



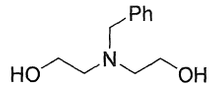
Bước a.



Dung dịch chứa dietyl iminodiaxetat (3,1 g, 16,06 mmol) trong DMF khan (36 mL) được bổ sung benzyl bromua (2,38 mL, 19,64 mmol) và kali cacbonat (6,44 g, 46,46 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 70°C trong 16 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng nước và được chiết

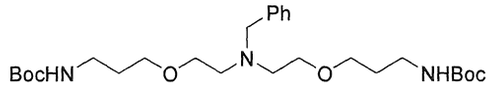
bằng tertiarybutylmetylete (3 x 100 mL). Các lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 và lọc sau đó được cô. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký silica gel pha thường (Isco, etyl axetat 0 đến 10% và hexan). Thu được 3,13 g, hiệu suất 69,8%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 280,2.

Bước b.



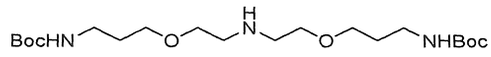
Dung dịch chứa este di-etyl từ bước a (3,2 g, 11,2 mmol) trong THF khan (5 mL) được bổ sung từ từ vào bình đáy tròn chứa LiALH4 (425 mg, 14,2 mmol) trong THF (2 mL) trong điều kiện khí Nitơ ở 0°C. Ống tiêm được xúc rửa bằng THF (2 x 5 mL). Hỗn hợp thu được được để ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Metanol (2 mL) được bổ sung từ từ để làm lạnh nhanh hỗn hợp phản ứng tiếp theo là bổ sung dung dịch nước NaOH (1 mL). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ sau đó lọc trong điều kiện chân không. Sản phẩm lọc được cô đặc và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Thu được 2,4 g, hiệu suất 109%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 196,2.

Bước c.



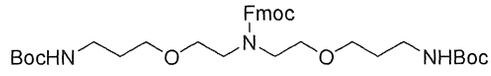
Sản phẩm từ bước trước đó (1,02 g, 5,24 mmol) trong THF khan (4 mL) được bổ sung từ từ vào bình chứa NaH (độ tinh khiết 60%, 2,09 g, 52,4 mmol) và THF (5 mL) ở 0°C trong điều kiện khí Nitơ. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ tiếp theo là bổ sung từng giọt 3-(Boc-amino)propylbromua (3,8 g, 15,7 mmol) trong THF (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 3 ngày. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0°C sau đó được làm lạnh nhanh bằng nước (6 mL) và được khuấy trong 1 giờ. Nó được chiết bằng etyl axetat (2 x 100 mL). Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước HCl 1N và nước muối. Nó được làm khô trên Na_2SO_4, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký pha thường (Isco, metanol 0 đến 5% và diclometan). Thu được 984 mg, hiệu suất 37%. Ion được LCMS phát hiện [M+H]+ = 510,0.

Bước d.



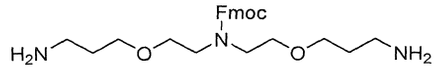
Paladi hydroxit (543 mg, 0,77 mmol) được bổ sung vào bình chứa sản phẩm của bước c (985,3 mg, 1,93 mmol) trong metanol khan (19,5 mL), trong điều kiện khí quyển H2. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Sau đó, nó được lọc qua tầng xelit và được rửa bằng metanol, và cô đặc. Phần cặn được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Thu được 828,6 mg, hiệu suất 102%. Ion được LCMS phát hiện [M+H]+ = 420,0.

Bước e.



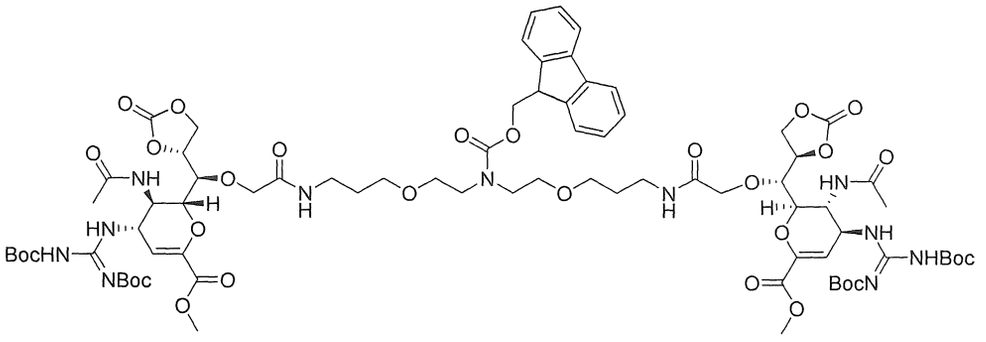
Sản phẩm của bước d (829 mg, 1,97 mmol) trong H2O:THF (1:1, 16 mL) được làm lạnh đến 0°C. Dung dịch này được bổ sung Na2CO3 (314 mg, 2,96 mmol) tiếp theo là bổ sung este Fmoc N-hydroxysuxinimit (826 mg, 2,37 mmol). Hỗn hợp thu được được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy cho đến khi hoàn thành bởi LCMS, sau đó được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối và làm khô trên Na_2SO_4, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký pha thường (Isco, etyl axetat 0 đến 60% và hexan). Thu được 784 mg, hiệu suất 62%. Ion được LCMS phát hiện [M+H-Boc]+ = 542,0.

Bước f.



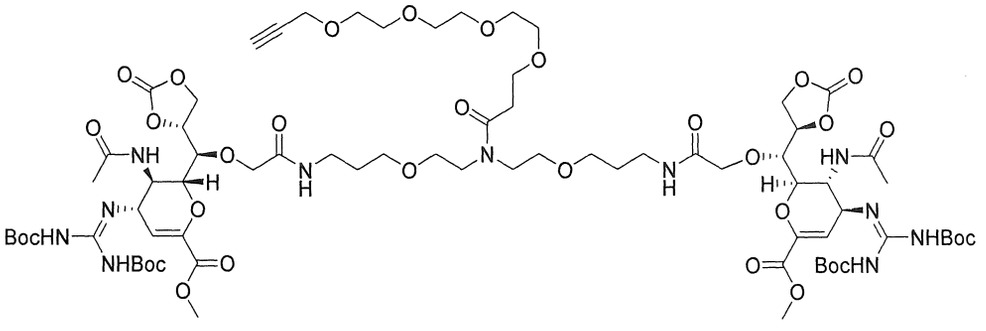
Sản phẩm của bước e (1,01 g, 1,57 mmol) được khuấy trong TFA (5 mL) và CH2Cl2 (9 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ sau đó được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng RPLP (Isco, metanol 5 đến 100% và nước mà không có chất cải biến). Thu được 903 mg, hiệu suất 86%. Ion được LCMS phát hiện [M+H]+ = 442,2.

Bước g.



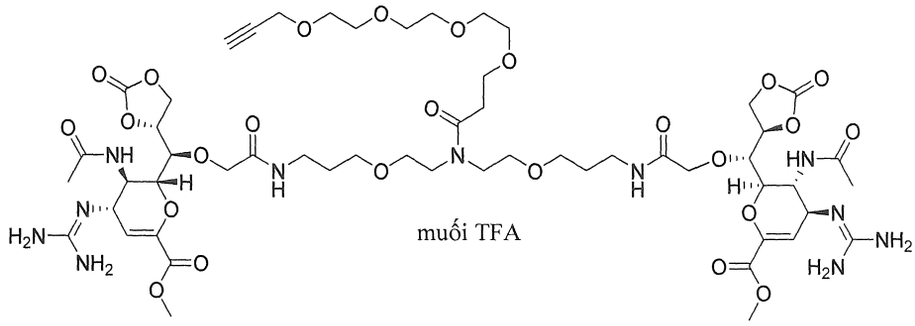
Hỗn hợp chứa axit ete zanamivir (340 mg, 0,49 mmol), sản phẩm của bước f (111 mg, 0,25 mmol, Ví dụ 31) và HATU (206 mg, 0,53 mmol) trong DMF khan (3 mL) được bổ sung DIEA (162 mg, 1,23 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (Isco, metanol 30 đến 100% và nước mà không có chất cải biến). Thu được 249 mg, hiệu suất 61%. Ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 833,8.

Bước h.



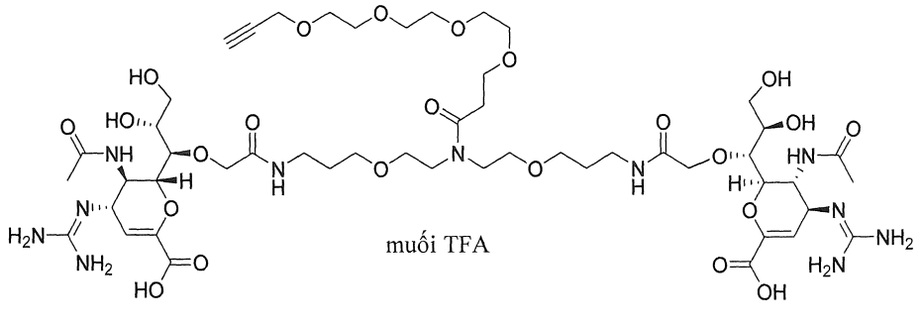
Dung dịch chứa sản phẩm của bước g (249 mg, 0,15 mmol) trong DMF khan (0,5 mL) được bổ sung SilaMetS Thiol (1,2 g, 1,47 mmol) và 1,8-diazabixyclo[5.4.0]undec-7-en (12 mg, 0,07 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1,5 giờ, sau đó lọc trực tiếp vào lọ chứa HATU (69 mg, 0,18 mmol), axit propargyl PEG-4 (43 mg, 0,16 mmol) và DIEA (43 mg, 0,33 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (Isco, metanol 30 đến 100% và nước mà không có chất cải biến). Thu được 298 mg, hiệu suất 118%. Ion được LCMS phát hiện [(M+2H-Boc)/2]+ = 843,9.

Bước i.



Sản phẩm của bước h (298 mg, 0,18 mmol) được hòa tan trong TFA (3 mL) và CH2Cl2 (3 mL), và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Sau đó, nó được cô trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế bằng HPLC (ACCQ Isco, axetonitril 0 đến 25% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 112 mg, hiệu suất 44%. Các ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 643,8 và [(M+3H)/3]+ = 429,6.

Bước j.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước i (112 mg, 0,072 mmol) trong MeOH (4 mL) và nước (2 mL) được bổ sung LiOH (10,6 mg, 0,43 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó được axit hóa với TFA và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (ACCQ Isco, axetonitril 0 đến 25% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 37 mg, hiệu suất 36%. Các ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 603,8, [(M+3H)/3]+ = 402,9.

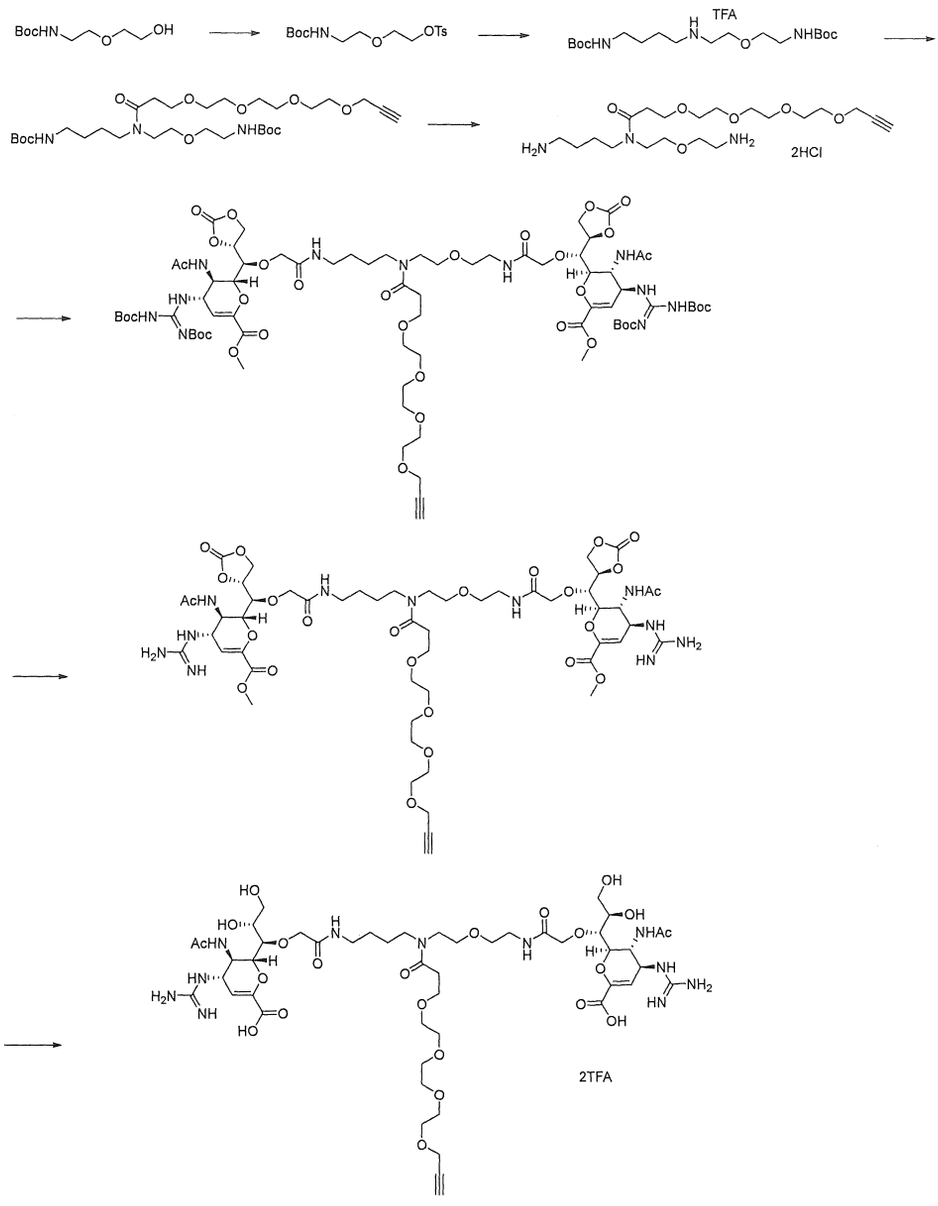
Ví dụ 76. Tổng hợp thể liên hợp 18

Dung dịch chứa Fc aglycosyl hóa được chức hóa azido (100 mg, 5,4 mL, 1,87 µmol, SEQ ID NO: 35) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử

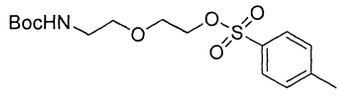
nhỏ được dẫn xuất alkyn (16,1 mg, 0,011 mmol, Int-20). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung vào 3 mL dung dịch trộn sơ bộ chứa axit L-ascorbic natri (149 mg, 0,75 mmol, 0,25 M), đồng (II) sulfat (2,4 mg, 0,015 mmol, 0,005 M) và BTTAA (25,8 mg, 0,6 mmol, 0,02 M) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4. Dung dịch thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế thể liên hợp chung trong Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56826 Da (DAR 2,2). Thu được 36,64 mg, hiệu suất 37%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 18 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 18 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 77. Tổng hợp Int-21



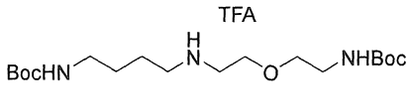
Bước a.



Dung dịch chứa 2-(2-Boc-aminoetoxy) etanol (6,15 g, 30 mmol) trong DCM khan (60 ml) được bổ sung DIPEA (7,8 g, 60 mmol) và DMAP (366,6 mg, 3 mmol). P-toluensulfonyl clorua (6,86 g, 36 mmol) sau đó được bổ sung thành từng phần hơn 30 phút. Sau khi hỗn hợp thu được được khuấy trong 3 ngày, nó được cô đặc bằng cách cô quay và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 20% đến 70%/nước không có chất

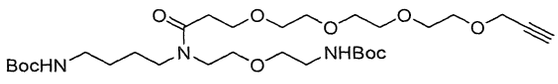
cải biến). Thu được 3,71 g, hiệu suất 34,4%. Ion được LCMS phát hiện: [M -Boc + H]+ = 260.

Bước b.



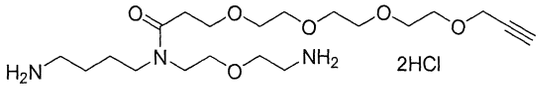
Dung dịch chứa sản phẩm của bước a (2,1 g, 5,83 mmol) trong THF khan (10 ml) được bổ sung natri cacbonat (1,24 g, 11,7 mmol) và mono-N-Boc-1,4-diaminobutan (1,32 g, 7 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 60°C trong 1 ngày. Muối sau đó được lọc ra, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cách cô quay. Phần cặn được tinh chế qua RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 50% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,94 g, hiệu suất 88,6%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 376,0.

Bước c.



Dung dịch chứa axit propargyl PEG-4 (781 mg, 3 mmol) và HATU (1,14 g, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml) được bổ sung DIPEA (390 mg, 3 mmol), tiếp theo là bổ sung dung dịch sản phẩm của bước b (940 mg, 2,5 mmol) và DIPEA (390 mg, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút, sau đó được tinh chế trực tiếp qua RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 80% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 960,2 mg, hiệu suất 65,3%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 618,3, [M - Boc + H]+ = 518,3.

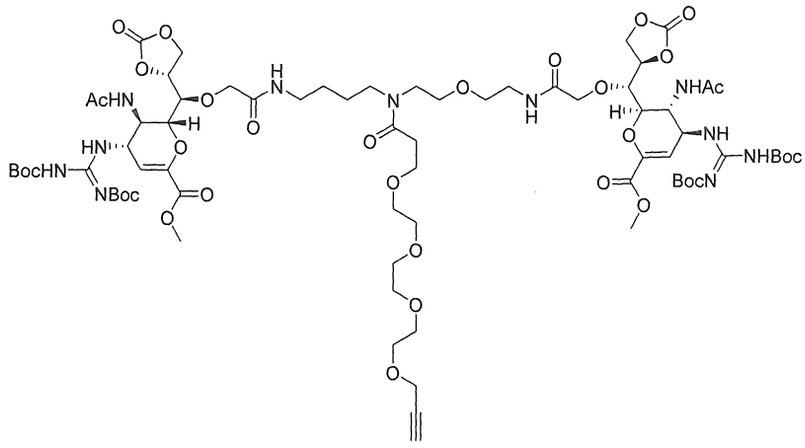
Bước d.



Sản phẩm của bước c (960,2 mg, 1,63 mmol) được hòa tan trong THF khan (6 ml). dung dịch HCl 4N trong dioxan (4 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Sau đó, nó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được chiết bằng

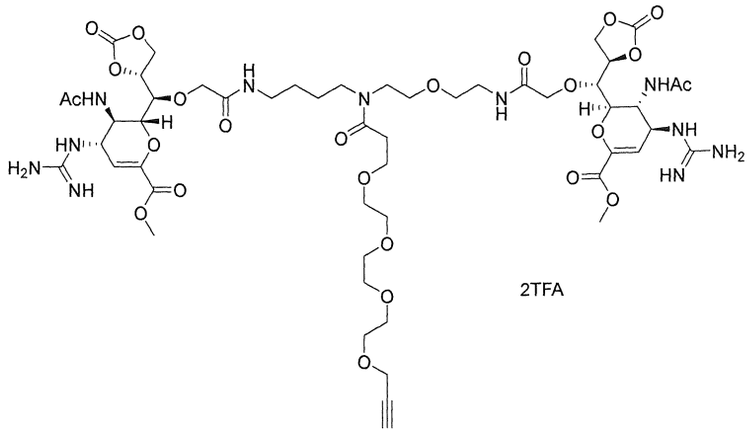
nước (3 ml x 3) và etyl axetat (10 ml). Lớp nước kết hợp được đông khô. Thu được 760 mg, hiệu suất 95,1%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 418,0.

Bước e.



Hỗn hợp chứa axit ete zanamivir (315 mg, 0,5 mmol) và HATU (190 mg, 0,5 mmol) trong DMF khan (1 ml) được bổ sung thành các phần dung dịch chứa sản phẩm diamin của Bước d (148 mg, 0,3 mmol) và DIPEA (165 mg, 1,5 mmol) trong DMF khan (1 ml) hơn 20 phút. Sau khi bổ sung, phản ứng được khuấy thêm trong 30 phút và tinh chế trực tiếp bằng RPLC (50 g, axetonitril 30 đến 90% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 233 mg, hiệu suất 56,7%. Ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 821,3.

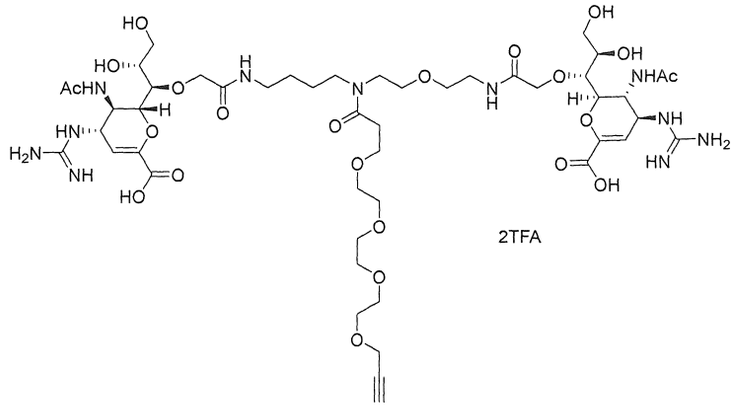
Bước f.



Sản phẩm của bước e (233 mg, 0,142 mmol) được hòa tan trong TFA (1,5 ml), và dung dịch được gia nhiệt ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, nó được cô và tinh chế trực

tiếp bằng RPLC (axetonitril 0% đến 30% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 120 mg, hiệu suất 57,4%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 621,4, [(M + 3H)/3]+ = 414,7.

Bước g.

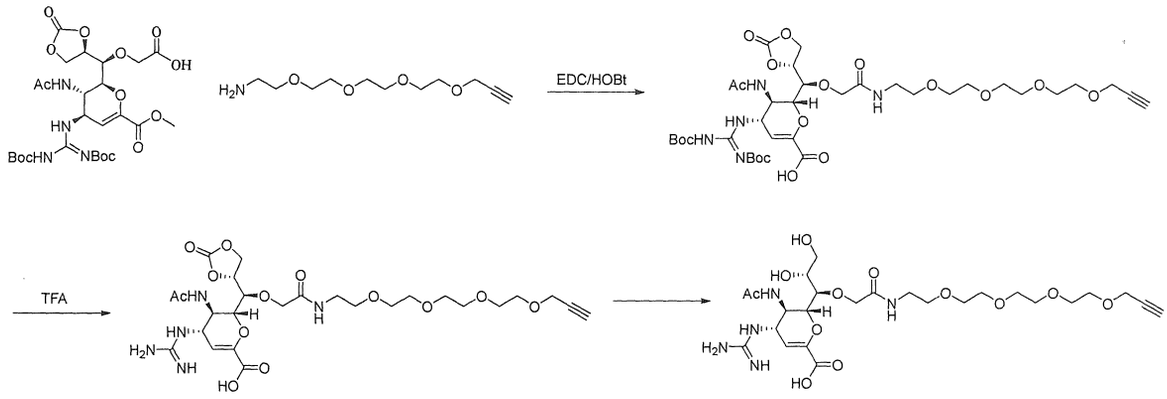


Dung dịch chứa sản phẩm của bước f (120 mg, 0,0816 mmol) trong MeOH (2 ml) được bổ sung dung dịch LiOH monohydrat (63 mg, 1,5 mmol) trong nước (2 ml). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1,5 giờ và sau đó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (0,5 ml) và được tinh chế bằng HPLC (axetonitril 0 đến 15% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 98,2 mg, hiệu suất 86,6%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 581,8,[(M + 3H)/3]+ = 388,2.

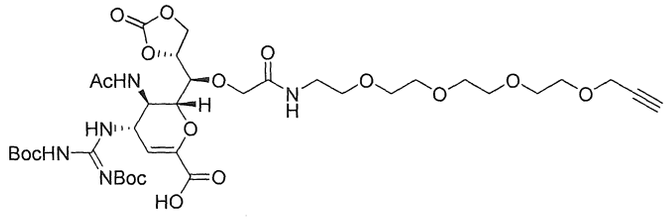
Ví dụ 78. Tổng hợp thể liên hợp 19

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-21 (Ví dụ 78). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,548. Da (DAR = 2,1). Thu được 39,7 mg, hiệu suất 39,7%.

Ví dụ 79. Tổng hợp Int-22

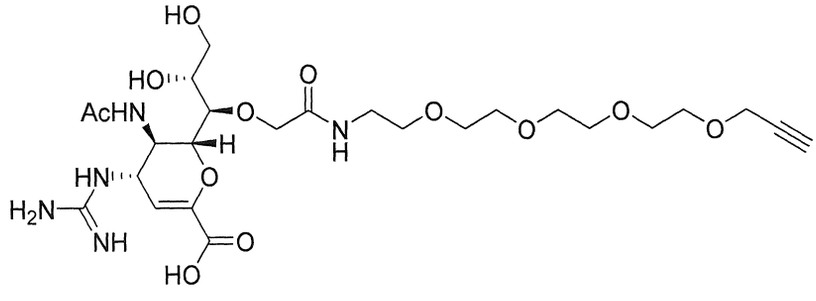


Bước a.



Hỗn hợp chứa axit ete zanamivir (1,8 g, 2,8 mmol Ví dụ 31) và propargyl-PEG4-amin (0,82 g, 3,5 mmol. 1,2 đương lượng) trong diclometan (50 mL), được bổ sung EDC (1,0 g, 5 mmol), HOBt (0,65g, 5 mmol), và DIEA (1,4 ml, 10 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, được cô, và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước với TFA 0,1% không làm chất cải biến. Thu được 1,35g các sản phẩm, hiệu suất 50,2%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =830,4.

Bước b.



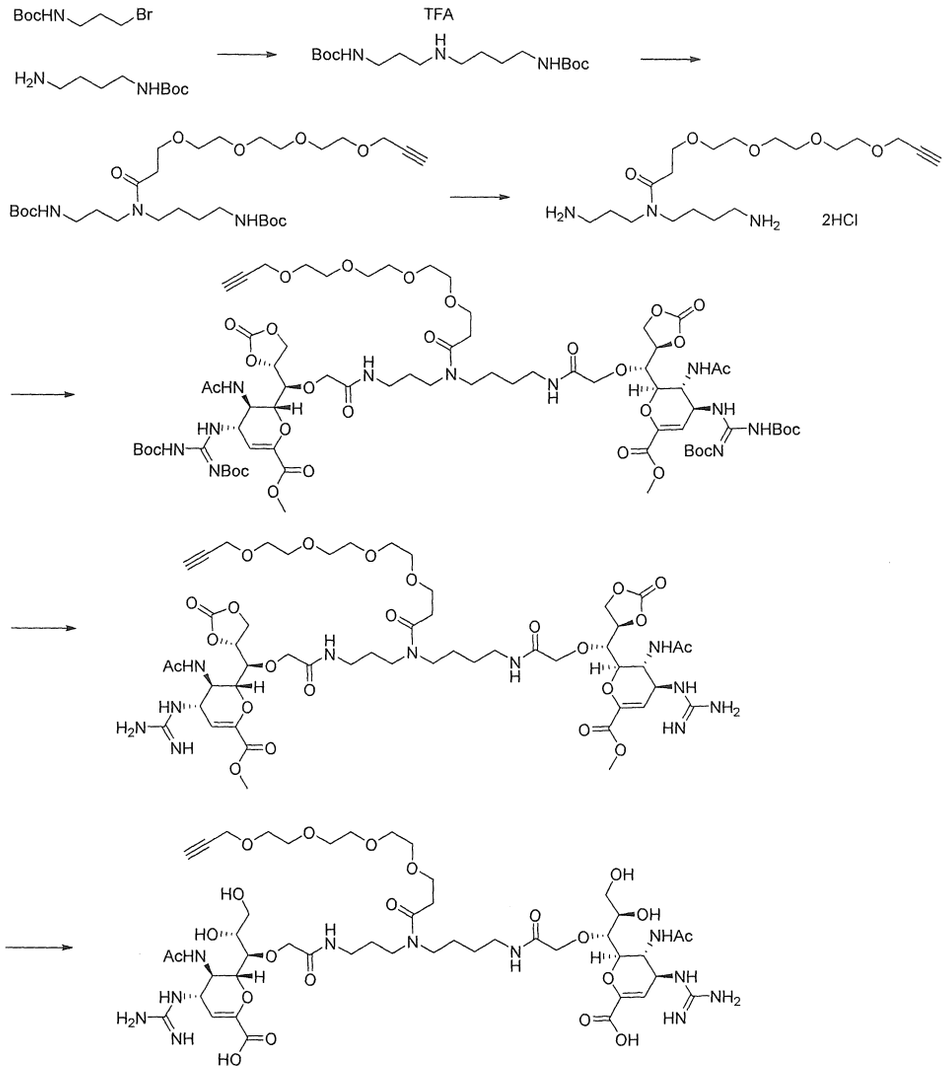
Sản phẩm từ bước trước đó (1,35 g, 1,6 mmol) được xử lý bằng axit trifloaxetic (20 mL) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được cô đặc, hòa

tan trong nước (10 mL) và MeOH (10 mL), sau đó được xử lý bằng dung dịch lithi hydroxit (120mg, 5mmol) trong nước (10 mL). Dung dịch phản ứng được khuấy 10 phút, sau đó làm lạnh nhanh bằng 0,5 ml axit axetic. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 0% đến 50% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 510 mg các sản phẩm, hiệu suất 52,8%. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =604,3.

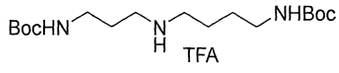
Ví dụ 80. Tổng hợp thể liên hợp 20

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-22 (Ví dụ 79). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 55,508. Da (DAR = 2,3). Thu được 37,0 mg, hiệu suất 37,0%.

Ví dụ 81. Tổng hợp Int-23

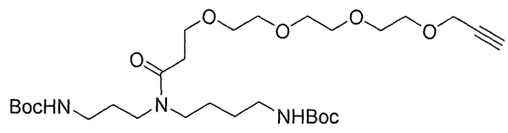


Bước a.



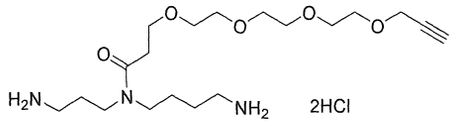
Dung dịch chứa N-Boc-1,4-diaminobutan (941,5 mg, 5 mmol) trong THF khan (10 ml) được bổ sung natri cacbonat (1,06 g, 10 mmol) và 3-(Boc-amino)propylbromua (1,43 g, 6 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 50°C trong 1 ngày. Muối sau đó được lọc, và cô bằng cách cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 50% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,35 g, hiệu suất 58,8%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 346,0.

Bước b.



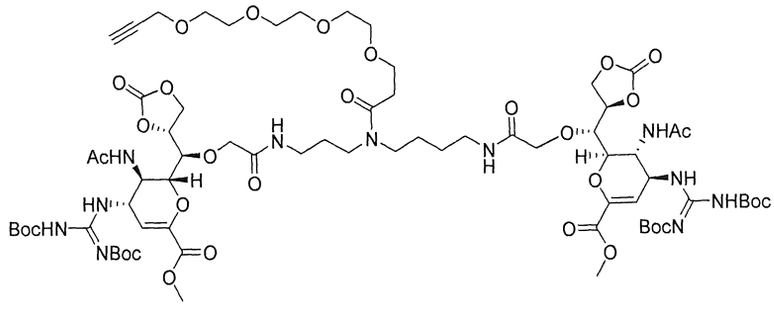
Dung dịch chứa axit propargyl PEG-4 (781 mg, 3 mmol) và HATU (1,14 g, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml) được bổ sung DIPEA (390 mg, 3 mmol), tiếp theo là bổ sung dung dịch sản phẩm của bước a (863,8 mg, 2,5 mmol) và DIPEA (390 mg, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 80% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,19 g, hiệu suất 81%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 588,3.

Bước c.



Sản phẩm của bước b (1,19 g, 2,02 mmol) được hòa tan trong THF khan (6 ml). dung dịch HCl 4N trong dioxan (4,5 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 ngày. Sau đó, nó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được chiết bằng nước (3 ml x 3) và etyl axetat (15 ml). Lớp nước kết hợp được đông khô. Thu được 940 mg, hiệu suất định lượng. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 388,3.

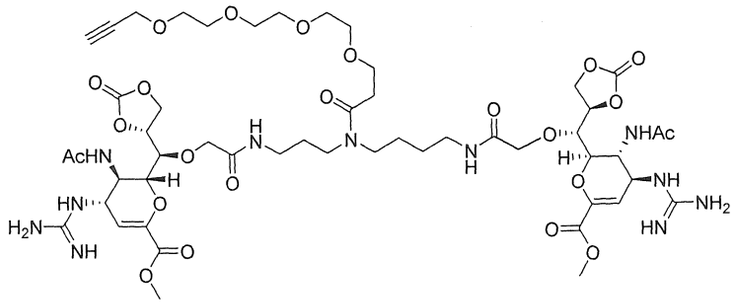
Bước d.



Hỗn hợp chứa axit ete zanamivir (315 mg, 0,5 mmol, Ví dụ 31) và HATU (209,1 mg, 0,55 mmol) trong DMF khan (1 ml) được bổ sung DIPEA (65 mg, 0,5 mmol). Sau 5 phút, dung dịch chứa sản phẩm của bước c (170 mg, 0,439 mmol) và

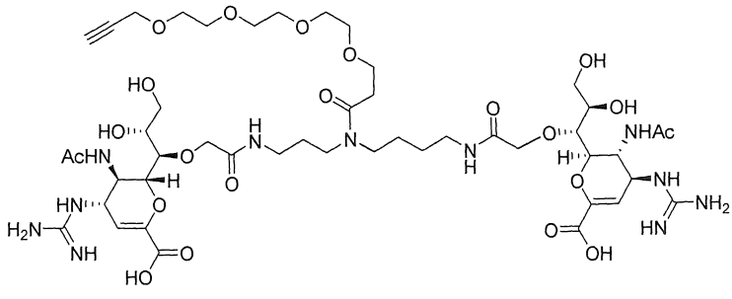
DIPEA (130 mg, 1 mmol) trong DMF khan (1 ml) được bổ sung thành các phần hơn 20 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy thêm trong 30 phút, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (50 g, axetonitril 30 đến 90% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 208 mg, hiệu suất 51,6%. Ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 806,7.

Bước e.



Sản phẩm của bước d (208 mg, 0,129 mmol) được hòa tan trong TFA (1,5 ml), và dung dịch được gia nhiệt ở 30°C trong 30 phút. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (100 g, axetonitril 0 đến 30% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 134 mg, hiệu suất 72%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 606,8, [(M + 3H)/3]+ = 405,0.

Bước f.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước e (134 mg, 0,093 mmol) trong MeOH (2 ml) được bổ sung dung dịch chứa LiOH monohydrat (63 mg, 1,5 mmol) trong nước (2 ml). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1,5 giờ và sau đó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (0,5 ml) và được tinh chế bằng HPLC (axetonitril 0 đến 15% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1%

làm chất cải biến). Thu được 78,4 mg, hiệu suất 62%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 566,4, [(M + 3H)/3]+ = 378,4.

Ví dụ 82. Tổng hợp thể liên hợp 21

Thể liên hợp này được điều chế tương tự như Ví dụ 62 (Thể liên hợp 13a) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 35, Ví dụ 61) và Int-23 (Ví dụ 81). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56,503. Da (DAR = 2,2). Thu được 34,4 mg, hiệu suất 34%.

Ví dụ 83. Hoạt tính của các thể liên hợp 13 đến 21 chống lại virut cúm A H7N9 đường lây truyền cao và hai thể phân lập virut cúm B trong thử nghiệm tác động gây bệnh tế bào (CPE)

Tổng cộng 9 thể liên hợp (Bảng 38) được chạy ở nồng độ 100, 10, 1, và 0,1 nM và so với ribavirin trong thử nghiệm CPE. Thử nghiệm CPE tuân theo phương pháp chuẩn, nhưng tóm lại, đã sử dụng 80-100% lớp đơn hợp lưu của tế bào MDCK trong đĩa 96 giếng. Đối với các thử nghiệm này, các chất thử nghiệm được bổ sung làm ba lần và ủ ở 37°C (+ CO_2 5%) cho đến khi hiệu quả CPE có thể nhìn thấy rõ ràng. Khi CPE được ghi nhận, các lớp tế bào được nhuộm bằng màu đỏ trung tính 0,011% trong khoảng 2 giờ. Sau đó, hỗn hợp với tỷ lệ 50:50 của dung dịch đệm Sorensen xitrat/etanol được bổ sung và để ủ trong 30 phút, sau đó A540 được đọc trên máy quang phổ và giá trị EC50/CC50 được tính toán bằng phân tích hồi quy.

Tất cả các thể liên hợp có hoạt tính đáng kể chống lại chủng cúm B/Florida/4/2006, với giá trị EC50 nằm trong khoảng từ 3,05 đến 33,5 nm (Bảng 39). Trung bình, các thể liên hợp đã chứng minh hiệu lực mạnh gấp 275 lần so với ribavirin (EC50 là 3.250 nM). Hoạt tính của các thể liên hợp chống lại cúm B/Brisbane/60/2008 rất giống với những gì đã thấy ở B/Florida với ngoại trừ thể liên hợp 14, có EC50 lớn hơn 100 nM.

Quan trọng là, tất cả các thể liên hợp cũng có hoạt tính cao chống lại chủng cúm A/Anhui/1/2013 (H7N9) đường lây truyền cao. EC50 trung bình cho tất cả các thể liên hợp là 21,2 nM chống lại thể phân lập này (nằm trong khoảng từ 12 đến 28,5 nM), so với 14.000 nM đối với ribavirin. Cuối cùng, không phát hiện thấy tác dụng

gây độc tế bào trực tiếp của các thể liên hợp trên lớp đơn MDCK ở nồng độ đã thử nghiệm.

Bảng 38: Thể liên hợp và đặc tính

Thể liên hợp	Int	Miền Fc	DAR	Liên kết cầu nối	Lưu ý
13	18	SEQ ID NO: 35	2,2	15 nguyên tử	ete, dime
14	7	SEQ ID NO: 35	2,1	15 nguyên tử	carbamat, dime
15	12	SEQ ID NO: 35	2,2	15 nguyên tử	ete, dime
16	9	SEQ ID NO: 35	2,1	17 nguyên tử	ete, dime
17	19	SEQ ID NO: 35	2,2	17 nguyên tử	ete, dime
18	20	SEQ ID NO: 35	2,2	19 nguyên tử	ete, dime
19	21	SEQ ID NO: 35	2,1	16 nguyên tử	ete, dime
20	22	SEQ ID NO: 35	2,3	na	ete, monome
21	23	SEQ ID NO: 35	2,2	14 nguyên tử	ete, dime

Bảng 39: Hoạt tính của các thể liên hợp trong thử nghiệm CPE chống lại dạng cúm phụ

Thể liên hợp	EC50 (nM)*		
	A/Anhui/1/2013 (H7N9) (gia cầm truyền bệnh từ động vật sang người)	B/Brisbane/60/2008 (Dòng Victoria)	B/Florida/4/2006 (Dòng Yamagata)
Ribavirin	14000	3300	3250
13	24	21	33,5
14	12	>100	18,5
15	21,5	5,95	4,6
16	28,5	14,5	11
17	28**	11	13
18	31	4,35	3,05
19	14,5	6,8	4,55
20	20,5	12,5	14,5

21	17,5	4,05	3,05
*Trung bình của 2 giá trị (VIS + NR)			
**EC50 là 28 bằng VIS, >100 bằng NR			

Ví dụ 84. Tổng hợp thể liên hợp 22

Bước a. Tổng hợp PEG4-azido IVIG

Điều chế dung dịch este PEG4-azidoNHS 0,05M trong DMF/PBS: 6,05 mg este PEG4-azido NHS được hòa tan trong 0,050 mL DMF ở 0°C và được pha loãng đến 0,305 mL bằng cách bổ sung 0,250 mL PBS 1x dung dịch đệm ở 0°C. Dung dịch này được sử dụng để điều chế PEG4-azido IVIG khác với nhiều giá trị DAR khác nhau bằng cách điều chỉnh đương lượng của dung dịch este PBS PEG4-azido NHS này.

Điều chế PEG4-azido IVIG: PBS của este PEG4-azidoNHS 0,05M dung dịch đệm (0,301 mL, 15,0 µmol, 5,5 đương lượng) được bổ sung dung dịch chứa IVIG (Intravenous Immune Globulin, Baxter)) (407 mg trong 9,25 mL PBS pH 7,4, MW~148863 Da, 1,968 µmol) và hỗn hợp được lắc nhẹ trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch được cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (100.000 MWCO) đến thể tích là ~1,5 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được cô đặc lại. Quy trình rửa được thực hiện lặp lại trong tổng ba lần. Chất phản ứng phân tử nhỏ được loại bỏ bằng quy trình rửa. IVIG-PEG4-azit đã cô được pha loãng đến 9,25 mL bằng PBS pH 7,4 1x dung dịch đệm và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của IVIG). Hiệu suất là định lượng sau khi tinh chế.

Bước b. Tổng hợp các thể liên hợp

Điều chế dung dịch chất phản ứng Click: $CuSO_4$ 0,0050M trong dung dịch đệm PBS: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS x1, sau đó lấy 6,00 mL dung dịch $CuSO_4$ 0,0050M và bổ sung 57,7 mg BTTAA (Số CAS 1334179-85-9) và 297,6 mg Na Ascorbat để thu được dung dịch chất phản ứng Click ($CuSO_4$ 0,0050M, BTTAA 0,020M và natri ascorbat 0,25M).

Dung dịch chứa IVIG được chức hóa azido (140 mg, 3,17 mL, 0,936 μmol, IVIG-liên kết cầu nối-1-azit) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (8,4 mg, 0,00618 mmol, 6,6 đương lượng, được mô tả trong Ví dụ 60). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, 1,50 mL dung dịch chất phản ứng Click ở trên chứa (axit L-ascorbic natri, 0,25 M, 74,2 mg, 0,374 mmol, đồng (II) sulfat 0,0050M, 1,2 mg, 0,0075 mmol, và BTTAA 0,020M, 12,9 mg, 0,0300 mmol). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế thể liên hợp trong Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 151873 Da (DAR = 2,7). Thu được 51,0 mg, hiệu suất 36%.

Ví dụ 85. Tổng hợp thể liên hợp 23

Thể liên hợp 23 được điều chế tương tự như thể liên hợp 22, thay thế phân tử nhỏ được chức hóa alkyn thích hợp (Int-23 được mô tả trong Ví dụ 81) trong bước liên hợp Click.

Ví dụ 86. Tổng hợp thể liên hợp 24

Thể liên hợp 24 được điều chế tương tự như thể liên hợp 22, thay thế phân tử nhỏ được chức hóa alkyn thích hợp (được mô tả trong Ví dụ 19) trong bước liên hợp Click.

Ví dụ 87. Hiệu lực của các thể liên hợp 13, 14, và 21 chống lại cúm B ở mô hình chuột gây chết

Các thể liên hợp được đánh giá về virut cúm B gây chết người ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (B/Malaysia/2506/04) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây ra lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 11 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 μl (khoảng 1E4 cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg).

Tất cả các nhóm tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV), 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm, tá dược (PBS), hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc (hIgG1 Fc). Nghiên cứu này đã đánh giá Int-18, Int-7, và Int-23 được liên hợp với các Fc monome giống hệt nhau (các thể liên hợp 13, 14, và 21, lần lượt), được thử nghiệm ở 3,0, 1,0, và 0,3 mg/kg. Chuột được theo dõi trong 2 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng hoặc được phát hiện đang hấp hối được ghi nhận là tỷ lệ tử vong.

Tất cả các con chuột được xử lý bằng tá dược hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc, đạt tỷ lệ tử vong theo ngày 7. Ngược lại, chuột tiếp nhận các thể liên hợp 13, 14, và 21 được bảo vệ hoàn toàn sau khi tiếp nhận một liều IV duy nhất là ở 0,3 mg/kg (Bảng 40). Như mong đợi, các nhóm tiếp nhận các thể liên hợp ở 1,0 hoặc 3,0 mg/kg cũng được bảo vệ hoàn toàn. Hiệu lực của tất cả các thể liên hợp chống lại cúm B được hỗ trợ thêm bởi các phép đo cơ thể hàng ngày (Bảng 41), cho thấy mức giảm tạm thời dưới 5% trong toàn bộ nghiên cứu đối với nhóm được điều trị bằng thể liên hợp bất kỳ. Hoạt tính của các thể liên hợp 13, 14, và 21 có thể tương đương theo liều lượng với hoạt tính của thể liên hợp 6 chống lại dạng phụ cúm A H1N1 và H3N2. Do các thể liên hợp, 6 và 14 có các gốc hướng đích giống hệt nhau (tương ứng với Int-7), một thể liên hợp duy nhất có thể có hoạt tính chống lại các loại cúm mùa chiếm ưu thế (Cúm A (H1N1), Cúm A (H3N2) và Cúm B).

Bảng 40. Dữ liệu tỷ lệ tử vong ở cuối nghiên cứu (Ngày 14). Trung bình của 5 con chuột; giá trị p được tính bằng thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox)

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	% mức sống sót	Mức ý nghĩa đối với tá dược (giá trị p)
Tá dược (PBS)	na	0	na
Một mình Fc	3,0	0	p=1
Thể liên hợp 13	0,3	100	(0,0027)
	1,0	100	(0,0027)
	3,0	100	(0,0027)

Thể liên hợp 14	0,3	100	p=0,0027
	1,0	100	p=0,0027
	3,0	100	p=0,0027
Thể liên hợp 21	0,3	100	(0,0027)
	1,0	100	(0,0027)
	3,0	100	(0,0027)

Bảng 41: Dữ liệu cân nặng của chuột (% BW so với ngày 0). Trung bình của 5 con chuột; *không bao gồm dữ liệu khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau thử thách	Tá dược (PBS)	Một mình Fc	Thể liên hợp 14 (mg/kg)		
		3,0	0,3	1,0	3,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	98,1	98,1	99,3	99,1	96,5
2	99,6	96,7	98,6	98,6	98,3
3	96,4	94,9	96,8	97,0	98,7
4	89,8	87,8	98,4	97,5	97,8
5	83,6	80,8	97,4	97,8	98,0
6	79,0	76,1	96,9	98,3	99,7
7	*	*	99,2	100,5	100,6
8	*	*	100,3	101,9	101,1
9	*	*	102,5	100,4	100,6
10	*	*	100,6	102,0	101,2
11	*	*	100,9	100,9	100,9
12	*	*	101,8	101,7	101,8
13	*	*	101,4	101,7	101,4
14	*	*	102,2	102,6	102,2

Ví dụ 88. Tổng hợp PEG4-azido Fc cho thể liên hợp 25, thể liên hợp 26, thể liên hợp 27, và thể liên hợp 28

Điều chế dung dịch este PEG4-azidoNHS 0,05M trong DMF/PBS x1: 27,40 mg este PEG4-azido NHS được hòa tan trong 0,155 mL DMF ở 0°C và được pha loãng bằng cách bổ sung 1.200 mL PBS 1x dung dịch đệm ở 0°C. Dung dịch này được sử dụng để điều chế PEG4-azido Fc khác với nhiều giá trị DAR khác nhau bằng cách điều chỉnh đương lượng của este PBS PEG4-azido NHS này x1 dung dịch.

Điều chế PEG4-azido Fc (SEQ ID NO: 48): PBS của este PEG4-azidoNHS 0,05M x1 dung dịch đệm (0,0984 mL, 4,92 µmol, 2,5 đương lượng) được bổ sung dung dịch chứa h-IgG1 Fc (SEQ ID NO: 48) (234 mg trong 13,605 mL PBS pH 7,4, MW~57,976 Da, 4,036 µmol) và hỗn hợp được lắc nhẹ trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch được cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm (30.000 MWCO) đến thể tích là ~2 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng 1:7 trong PBS pH 7,4, và được cô đặc lại. Quy trình rửa được thực hiện lặp lại trong tổng ba lần. Chất phản ứng phân tử nhỏ được loại bỏ bằng quy trình rửa. Fc (SEQ ID NO: 48)-PEG4-azit đã cô đặc được pha loãng đến 13,60 mL bằng PBS pH 7,4 1x dung dịch đệm và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của h-IgG1).

Điều chế PEG4-azido Fc (SEQ ID NO: 50) tương tự như PEG4-azido Fc (SEQ ID NO: 48) trên đây.

Ví dụ 89. Tổng hợp thể liên hợp 25

Điều chế dung dịch chất phản ứng Click: $CuSO_4$ 0,0050M trong PBS x1 dung dịch đệm: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS x1, sau đó lấy 10,00 mL dung dịch $CuSO_4$ này và được bổ sung 86,1 mg BTTAA và 495,3 mg Na Ascorbat để thu được dung dịch chất phản ứng Click ($CuSO_4$ 0,0050M, BTTAA 0,020M và natri ascorbat 0,25M). Dung dịch chất phản ứng Click này sẽ được sử dụng cho thể liên hợp 25 và thể liên hợp 26.

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (78,0 mg, 4,535 mL, 1,35 µmol, SEQ ID NO: 48-PEG4-azit) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử

nhỏ được dẫn xuất alkyn (13,2 mg, 8,88 μmol, Int-23). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung với 2,153 mL dung dịch chất phản ứng Click ở trên chứa (axit L-ascorbic natri, 0,25 M, 106,6 mg, 0,538 mmol, đồng (II) sulfat 0,0050M, 1,72 mg, 0,0107 mmol, và BTTAA 0,020M, 18,5 mg, 0,0431 mmol). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ trong 6 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế thể liên hợp trong Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 60973 Da (DAR = 2,1). Thu được 50,3 mg, hiệu suất 64%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 25 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 25 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 90. Tổng hợp thể liên hợp 26

Điều chế thể liên hợp 26 tương tự như thể liên hợp 25 bằng cách sử dụng cùng mẻ PEG4-azido Fc(SEQ ID NO: 48) và phân tử nhỏ được dẫn xuất từ alkyn (Int-7). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 61068 Da (DAR = 2,2). Thu được 49,5 mg, hiệu suất 63%.

Ví dụ 91. Tổng hợp thể liên hợp 27

Điều chế dung dịch chất phản ứng Click: $CuSO_4$ 0,0050M trong PBS x1 dung dịch đệm: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS x1, sau đó lấy 12,00 mL dung dịch $CuSO_4$ này và được bổ sung 103,3 mg BTTAA và 594,3 mg Na Ascorbat để thu được dung dịch chất phản ứng Click ($CuSO_4$ 0,0050M, BTTAA 0,020M và natri ascorbat 0,25M). Dung dịch chất phản ứng Click này sẽ được sử dụng cho thể liên hợp 28.

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (80,0 mg, 4,535 mL, 1,38 μmol, SEQ ID NO: 50-PEG4-azit) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (13,5 mg, 9,10 μmol, Int-23). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung với 2,21 mL dung dịch chất phản ứng Click ở trên chứa (axit L-ascorbic natri, 0,25 M, 109,3. mg, 0,552 mmol, đồng (II) sulfat 0,0050M, 1,76 mg, 0,0110 mmol, và BTTAA 0,020M, 19,0 mg, 0,0441 mmol). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ trong 6 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế thể liên hợp trong Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 61447 Da (DAR = 2,5). Thu được 37,1mg, hiệu suất 46%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 27 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 27 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 92. Tổng hợp thể liên hợp 28

Điều chế thể liên hợp 28 tương tự như thể liên hợp 27 bằng cách sử dụng cùng mẻ PEG4-azido Fc(SEQ ID NO: 50) và phân tử nhỏ được dẫn xuất từ alkyn (Int-7). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 61388 Da (DAR = 2,4). Thu được 44,6 mg, hiệu suất 56%.

Ví dụ 93. Hoạt tính của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 21 chống lại bệnh cúm A đường truyền cao (H5N1, H7N9) trong thử nghiệm tác động gây độc tế bào (CPE)

Thử nghiệm in vitro để xác định hiệu lực của các thể liên hợp theo sáng chế được thực hiện đối với bệnh cúm A BSL-3 (đường truyền cao), và thường tuân theo các quy trình chuẩn. Tóm lại, các nồng độ khác nhau của các thể liên hợp được trộn

với virut (khoảng 250 TCID50) và để ủ ở 35°C trong một giờ. Sau khi ủ, hỗn hợp được bổ sung vào đơn lớp hợp lưu chứa 80-90% tế bào MDCK. Sau khi ủ 90 phút, các tế bào được rửa và các thể liên hợp được dùng lại. Lớp đơn sau đó được phủ carboxymetylxenluloza để giảm thiểu sự lây lan của virut và để ủ trong hai ngày. Sau hai ngày nuôi cấy, các tế bào được rửa bằng PBS và được cố định bằng formalin 10%. Sau khi cố định lớp đơn MDCK được thấm với Triton X-100 và được nhuộm miễn dịch với mAb chuột chống lại nucleoprotein cúm. Các lớp đơn được đọc, và vùng được nhuộm trong mỗi giếng được tính toán để xác định giá trị EC50/100.

Kết quả nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 42 và chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 21 chống lại các chủng có khả năng gây bệnh cao với khả năng gây đại dịch. Điều quan trọng là, cả hai thể liên hợp tạo ra các giá trị EC100 ở mức 15 nM hoặc thấp hơn so với bốn thể phân lập H5N1 và một thể phân lập H7N9. Ngược lại, oseltamivir có EC100 khoảng 15 nM chỉ chống lại một thể phân lập (A/Vietnam/1194/2004) và các giá trị nằm trong khoảng từ 125 đến >1000 nM chống lại các chủng đường truyền cao khác. Những kết quả này cho thấy tiềm năng của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 21 để điều trị các đại dịch do virut cúm độc lực cao gây ra có hiệu quả hơn so với oseltamivir.

Bảng 42: Hoạt tính in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12 chống lại thể phân lập cúm lây nhiễm cao

Chủng cúm lây nhiễm cao	EC100 (nM) (CPE ở tế bào MDCK)			
H5N1	Tá dược	Thể liên hợp 6	Thể liên hợp 21	Oseltamivir
A/Indonesia/5/2005 (nhánh 2.1)	N/A	~15	<15	~200 - 500
A/Vietnam/1194/2004 (nhánh 1)	N/A	~15	<15	~15
A/turkey/Turkey/1/2005 (nhánh 2.2)	N/A	<15	<15	~125 - 250
A/Hong Kong/156/1997 (nhánh 0)	N/A	~15	<15	>1000

H7N9				
A/Anhui/01/2013	N/A	<15	<15	~500 - 1000
H1N1 (positive control)				
A/Netherlands/602/2009	N/A	<15	<15	~1000

Ví dụ 94. Hoạt tính của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 21 chống lại cúm A (H1N1) ở nhiều mức độ lây nhiễm khác nhau (MOI) trong thử nghiệm tác động gây bệnh tế bào (CPE)

Tế bào MDCK được gieo mầm ở 4x104 tế bào/giếng trong môi trường MEM trong đĩa 96 giếng (được điều trị bằng TC) và được ủ ở 37°C, CO_2 5% trong 18-24 giờ. Các chất thử nghiệm (Zanamivir, Oseltamivir, Baloxavir, thể liên hợp 6, và thể liên hợp 21) ở phạm vi liều lượng nằm trong khoảng 1,93 - 10000 nM được ủ với chủng cúm A/WSN/1933 ở mức độ lây nhiễm (MOI) của virut:tế bào nằm trong khoảng 0,001 - 1 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT). Sau 1 giờ, virut đã ủ sơ bộ và chất thử nghiệm được bổ sung vào 90-100% đơn lớp hợp lưu chứa tế bào MDCK và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Sau 1 giờ, môi trường MEM có bổ sung L-glutamin và penixilin/streptomyxin được bổ sung vào các giếng. Các tế bào đã lây nhiễm được ủ ở 37°C, CO_2 5% trong 72 giờ. CPE được xác định sau khi cố định và nhuộm các tế bào bằng màu tím pha lê. EC50 được tính toán bằng phép phân tích hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 6. Kết quả của thử nghiệm CPE được cung cấp trong Bảng 43 chỉ ra rằng thể liên hợp 6 và thể liên hợp 21 vượt trội các tác nhân chăm sóc tiêu chuẩn in vitro, đặc biệt là ở MOI cao.

Bảng 43: Hoạt tính in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12 chống lại cúm A (H1N1) ở nhiều mức độ lây nhiễm khác nhau

EC50 (nM) H1N1 A/WSN/1933 (CPE ở tế bào MDCK)				
	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,1	MOI 1
Zanamivir	137	938	>10000	>10000
Oseltamivir	525	1896	>10000	>10000
Baloxavir	5	4	79	>100

Thể liên hợp 6	9	15	>100	>100
Thể liên hợp 12	0,6	2	7	10

Ví dụ 95. Hiệu lực của thể liên hợp 6 chống lại cúm A (H1N1) trong mô hình chuột bị suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng gây tử vong

Các thể liên hợp được đánh giá về nhiễm trùng cúm A gây tử vong ở chuột đực BALB/c bị suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID) (Stock #001803; Jackson Laboratories, 6-8 tuần tuổi). Virut thử thách (A/Puerto Rico/08/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây ra lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 5 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl (khoảng 1E3 cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin và xylazin (150 và 10 mg/kg, lần lượt).

Tất cả các nhóm tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) của thể liên hợp 6, 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm, tá dược (PBS), hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc (hIgG1 Fc). Nghiên cứu này đã đánh giá 3 nồng độ liều lượng khác nhau của thể liên hợp 6 (0,3, 1,0, hoặc 3,0 mg/kg). Chuột được theo dõi trong 5 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng, hoặc được phát hiện đang hấp hối, được ghi nhận là tỷ lệ tử vong. Cân nặng cũng được ghi lại để theo dõi sức khỏe chung của các con chuột.

Tất cả các con chuột được xử lý bằng tá dược, hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc, đạt tỷ lệ tử vong đến tuần thứ 2. Ngược lại, chuột tiếp nhận thể liên hợp 6 được bảo vệ hoàn toàn sau khi tiếp nhận các liều duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch 1 hoặc 3 mg/kg trong khoảng thời gian nghiên cứu (FIG. 56, Bảng 44). Khi liều dùng của thể liên hợp 6 được hạ xuống còn 0,3 mg/kg, tỷ lệ sống sót giảm xuống còn 20% vào cuối nghiên cứu. Liều lượng 0,3 mg/kg được bảo vệ hoàn toàn trong 3 tuần. Hiệu lực của thể liên hợp 6 trong mô hình tình trạng suy giảm miễn dịch nghiêm trọng này được hỗ trợ thêm bởi dữ liệu cân nặng (FIG. 57, Bảng 45). Các nhóm tiếp nhận thể liên hợp 6 ở các nồng độ liều lượng 1 hoặc 3 mg/kg đã chứng minh không quá mức giảm cân tạm thời của cơ thể dưới 3% trong toàn bộ quá trình nghiên cứu. Hơn nữa, ở cuối nghiên cứu cả hai nhóm liều cho thấy sự tăng cân ròng (lần lượt là 7,5 và 2,2%). Nhóm được

dùng thuốc với nồng độ thấp nhất của thể liên hợp 6 (0,3 mg/kg) có mức giảm cân tạm thời dưới 4% trong 3 tuần đầu tiên của nghiên cứu trước khi biểu hiện dấu hiệu lây nhiễm vào tuần thứ 4, cuối cùng dẫn đến tử vong ở bốn trong số năm con chuột.

Một cách tổng quát, các dữ liệu này chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 6 bằng cách bảo vệ những con chuột bị đe dọa tử vong bằng các liều duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch của thể liên hợp thấp tới 1 mg/kg. Ngoài ra, sự bảo vệ này còn kéo dài trong thời gian dài, kéo dài trong suốt 5 tuần của nghiên cứu. Điều này đã được thực hiện trong mô hình cực đoan của tình trạng suy giảm miễn dịch ở chuột thiếu hụt hoàn toàn các tế bào miễn dịch T & B, vốn rất cần thiết trong việc loại bỏ các lây nhiễm cúm. Dữ liệu này hỗ trợ việc sử dụng thể liên hợp 6 để điều trị cho cả quần thể bệnh nhân có khả năng và thiếu hụt miễn dịch.

Bảng 44: Tỷ lệ tử vong của các nhóm liều nghiên cứu trong mỗi tuần

Chất thử nghiệm	% mức sống sót (Ngày sau khi thử thách virut)				
	7	14	21	28	35
Tá dược	80	0	0	0	0
Chỉ có Fc	80	0	0	0	0
Thể liên hợp 6 (3 mg/kg)	100	100	100	100	100
Thể liên hợp 6 (1 mg/kg)	100	100	100	100	100
Thể liên hợp 6 (0,3 mg/kg)	100	100	100	80	20

Bảng 45: Cân nặng trung bình của nhóm chuột nghiên cứu trong 35 ngày hoặc cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày	Tá dược	Chỉ có Fc	Liều lượng thể liên hợp 6		
			3 mg/kg	1 mg/kg	0,3 mg/kg
0	100	100	100	100	100
1	99,5	99,8	99,6	99,4	98,6
2	98,8	99,2	99,9	99,1	98,9
3	97,7	96,8	101	100,6	97,9

Ngày	Tá dược	Chỉ có Fc	Liều lượng thể liên hợp 6		
4	94,4	95,4	99,4	98,4	98,5
5	93,7	90,7	100,6	97,9	99,3
6	88,7	83,9	101,2	98,7	98,1
7	81,1	77,6	101,8	98	96,9
8			101,3	99,7	98,9
9			102,6	100,7	98,8
10			101,6	99,8	99,4
11			101,6	99,7	100,3
12			101,8	100,2	100,7
13			102,3	101	100,7
14			103,9	100,5	99,9
15			104,3	101,8	102,3
16			104,3	102	101,3
17			104,3	100,6	102
18			105,4	103,9	100,5
21			105,7	105,9	96,8
22			105,5	103,4	93,9
23			105,6	106,9	91
24			108,4	102,9	
25			106,4	102,7	
26			108,4	103,9	
27			108,6	103,5	
28			109,1	104,7	
29			108,96	104,5	
30			109	105,8	
31			108,2	104,9	
35			107,5	102,2	

Ví dụ 96. Mức thanh thải virut phụ thuộc vào liều lượng thể liên hợp 6 ở phổi

Các nghiên cứu về hiệu lực được thực hiện ở chuột BALB/c cái 6-8 tuần (Charles River) được thử thách qua đường mũi với 3x102 PFU/con chuột (mức LD95 gấp 3 lần) của chủng chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)đã được làm thích nghi với chuột. Thể liên hợp 6 hoặc mẫu đối chứng IgG1 Fc của người được dùng dưới dạng một liều tiêm tĩnh mạch (IV) duy nhất 2 giờ sau thử thách ở 0,1 – 3 mg/kg. Oseltamivir được dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày trong 4 ngày bắt đầu 2 giờ sau lây nhiễm ở 5 hoặc 15 mg/kg. Cân nặng (BW) được ghi lại trong 4 ngày. Ở thời điểm 4 ngày sau khi lây nhiễm, chuột được giết bằng CO_2 và cả hai thùy phổi được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất bằng hạt silic oxit 1 mm trong 1 mL PBS bằng cách sử dụng máy ly giải MagNA (Roche). Việc nghiền đồng nhất được thực hiện ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 60 giây và ướp lạnh trên băng trong 5 phút giữa các lần chạy. Sau khi nghiền đồng nhất phổi, các ống được ly tâm trong 10 phút ở 600 x g và dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào ống mới.

Để xác định nồng độ virut ở phổi (được đo bằng đơn vị hình thành mảng bám (PFU)), dịch nổi trên bề mặt của sản phẩm nghiền đồng nhất phổi được pha loãng trong dung dịch đệm lây nhiễm nằm trong khoảng từ 10-1 đến 10-6. 100 µL dung dịch pha loãng virut được bổ sung vào đơn lớp hợp lưu chứa tế bào MDCK trong các đĩa 24 giếng và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc mỗi 15 phút. Sau khi loại bỏ virut, môi trường phủ chất lỏng chứa Avicel được bổ sung vào tế bào MDCK. Các tế bào được ủ ở 37°C, CO_2 5% trong 40 giờ. Sau khi ủ, môi trường được loại bỏ và các tế bào được nhuộm bằng màu tím pha lê để đếm số mảng bám. PFU được tính toán theo trọng lượng của phổi (PFU/g phổi).

Kết quả của nghiên cứu này chứng minh rằng liều của thể liên hợp 6 làm giảm nhanh chóng nồng độ vi-rút theo cấp số nhân tốt hơn Oseltamivir (TAMIFLU®) (FIG. 58, Bảng 46). Quan sát này có ý nghĩa lâm sàng vì các lây nhiễm cúm nghiêm trọng là do virut di chuyển từ lây nhiễm đường hô hấp trên ban đầu đến phổi.

Bảng 46: Nồng độ virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Mức giảm log (PFU/mL)	Mức giảm log (PFU/g)
PBS [0]	0,00	0,00
hIgG1 Fc [3]	-0,04	0,26
Oseltamivir [5]	0,24	0,43

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Mức giảm log (PFU/mL)	Mức giảm log (PFU/g)
Oseltamivir [15]	0,52	0,75
Thể liên hợp 6 [0,1]	0,60	0,79
Thể liên hợp 6 [0,3]	1,33	1,55
Thể liên hợp 6 [1]	2,25	2,34
Thể liên hợp 6 [3]	3,20	3,40

Ví dụ 97. Mức giảm xytokin gây viêm phụ thuộc vào liều lượng thể liên hợp 6 ở phổi

Các nghiên cứu về hiệu lực được thực hiện ở chuột BALB/c cái 6-8 tuần (Charles River) được thử thách qua đường mũi với 3x102 PFU/con chuột (mức LD95 gấp 3 lần) của chủng chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) đã được làm thích nghi với chuột. Thể liên hợp 6 hoặc mẫu đối chứng IgG1 Fc của người được dùng dưới dạng một liều tiêm tĩnh mạch (IV) duy nhất 2 giờ sau thử thách ở 0,1 – 3 mg/kg. Oseltamivir được dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày trong 4 ngày bắt đầu 2 giờ sau lây nhiễm ở 5 hoặc 15 mg/kg. Cân nặng (BW) được ghi lại trong 4 ngày. Ở thời điểm 4 ngày sau khi lây nhiễm, chuột được giết bằng CO_2 và cả hai thùy phổi được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất bằng 1 mm hạt silica trong 1 mL PBS bằng cách sử dụng máy ly giải MagNA (Roche). Việc nghiền đồng nhất được thực hiện ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 60 giây và ướp lạnh trong đó trong 5 phút giữa các lần chạy. Sau khi nghiền đồng nhất phổicác ống được ly tâm trong 10 phút ở 600 x g và dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào ống mới.

Đối với phân tích xytokin, dịch nổi trên bề mặts of sản phẩm nghiền đồng nhất phổi đã được pha loãng theo chuỗi gấp 2 lần trong đĩa 96 giếng. Mức xytokin đối với INF-γ, TNF-α, IL-6, MIP-1α và MCP-1 được xác định bằng ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất (R&D Systems).

Tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong từ bệnh cúm nặng cuối cùng là do sự xâm nhập xytokin gây tiền viêm do virut gây ra ở phổi. Một mối quan tâm tiềm năng của việc sử dụng Fc-thể liên hợp để điều trị bệnh cúm là liệu mảnh Fc có làm trầm trọng thêm tình trạng viêm do xytokin gây ra hay không. Kết quả của mô hình nhiễm trùng gây tử vong H1N1 cho thấy điều ngược lại: việc phụ thuộc vào liều lượng thể liên hợp 6 làm giảm xytokin gây tiền viêm (ví dụ, TNFα và IL-6) trong các mô phổi bị lây nhiễm (FIG. 59, Bảng 47).

Bảng 47: Đáp ứng xytokin vào ngày 4 sau khi lây nhiễm

	Mức thay đổi số lần so với mẫu đối chứng không bị lây nhiễm				
Chất thử nghiệm [mg/kg]	INFy	TNFa	IL-6	MCP-1	MIP-1a
PBS [0]	0,4	2,2	4,6	16,3	16,4
hIgG1 Fc [3]	0,5	2,2	6,2	20,2	16,8
Oseltamivir [5]	0,2	1,7	4,0	11,7	7,5
Oseltamivir [15]	0,2	1,8	3,5	10,5	6,1
Thể liên hợp 6 [0,1]	0,3	1,5	3,0	10,8	7,9
Thể liên hợp 6 [0,3]	0,2	1,2	1,9	6,7	7,4
Thể liên hợp 6 [1]	0,2	1,1	1,9	6,1	3,6
Thể liên hợp 6 [3]	0,8	1,1	1,4	2,8	2,6
Không bị lây nhiễm	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Ví dụ 98. Phân tích mẫu huyết tương thể liên hợp 6 in vivo. So sánh PK ở chuột mắc bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp nặng CD-1 và BALB/c.

Thể liên hợp 6 trong các mẫu huyết tương được định lượng bằng phương pháp ELISA phát hiện bắt giữ neuraminidaza. Tóm lại, các phân tử được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgC-Fc của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL của các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 6. Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

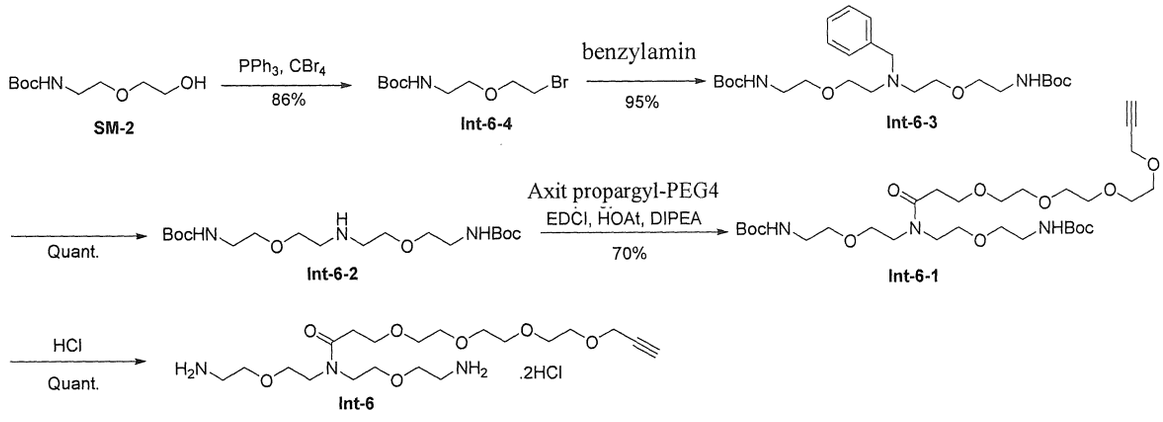
Các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ 0,1U/giếng neuraminidaza từ A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) trong 1X dung dịch đệm phủ KPL (5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Dung dịch pha loãng theo chuỗi chứa mẫu huyết tương được dàn mỏng và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ (chất pha loãng mẫu: BSA 0,5% trong PBS Tween 20 0,025% + nồng độ huyết tương cuối cùng của chuột nguyên thể là 1:2,500). Các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 6 nằm trong khoảng từ 0,230 đến 500 ng/mL, thực hiện chạy lặp lại hai lần trên mỗi đĩa. Sau 2 giờ ủ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS bằng Tween 20 0,05%. Thể liên hợp gắn kết với neuraminidaza trên các đĩa sau đó được dò bằng Fc F(ab')2 kháng IgG của người được liên hợp với HRP (709-036-098, Jackson)

được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được rửa 8 lần trong 300 µL PBS bằng Tween 20 0,05% và được phát triển bằng cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng bằng H_2SO_4 1N H_2SO_4. Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm. Thể liên hợp 6 trong các mẫu huyết tương được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism, phiên bản 6 sau khi phân tích hồi quy phi tuyến tính (Phân tích hình chữ S, 4PL) các đường cong tiêu chuẩn.

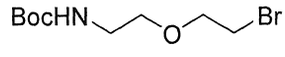
Profin PK, chuột CD-1 so với BALB/c SCID

Thể liên hợp 6 tiêm tĩnh mạch cho chuột SCID và CD-1 (có khả năng miễn dịch) ở 5 mg/kg đã chứng minh các profin PK tương tự (FIG. 60). Các nồng độ là tương đương ở các thời điểm lấy mẫu. Profin PK hai pha bao gồm các pha phân phối 24 giờ, tiếp theo là giai đoạn thải trừ nông. Mức thể liên hợp trong huyết tương vẫn cao (~10 µg/ml) so với nồng độ đỉnh Cmax trong suốt một tuần nghiên cứu.

Ví dụ 99. Tổng hợp liên kết cầu nối trung tâm propargyl diamin



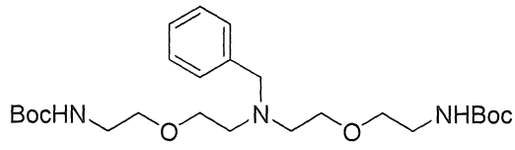
Bước a.



Dung dịch chứa 2-(2-Boc-Aminoetoxy)etanol (16,0 g, 78,0 mmol) và CBr4 (31,0 g, 93,5 mmol) trong DCM (100 mL) ở 0°C được xử lý bằng PPh3 (24,5 g, 93,5 mmol) từ từ hơn 15 phút (tỏa nhiệt). Trong quá trình bổ sung nhiệt độ bên trong được giữ dưới 30°C. Sau khi bổ sung PPh3 phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng thô được cô đặc thành dầu sau đó tinh chế bằng sắc ký pha

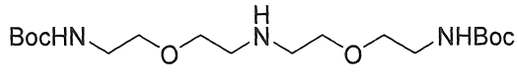
thường, rửa giải với etyl axetat/hexan 10% đến etyl axetat/hexan 80%. Các phân đoạn chứa các giọt dầu ở bên trong của các ống thu gom được gom lại và cô thành dầu không màu. Thu được 18,1g, hiệu suất 86%.

Bước b.



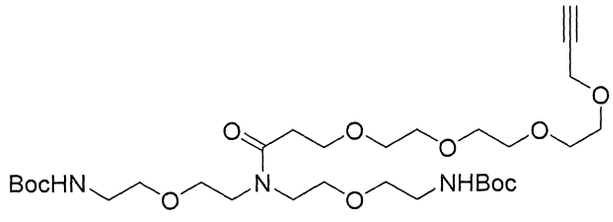
Dung dịch chứa sản phẩm của bước a (10 g, 37,3 mmol), benzylamin (1,60 g, 14,9 mmol), và K_2CO_3 (6,19 g, 44,8 mmol) trong DMF (20 mL) được gia nhiệt trong bể dầu ở 75°C trong 8 giờ. Hỗn hợp được lọc, được cô và tinh chế bằng RPLC (ACN 5%/nước đến ACN 100%). Thu được 6,8 g, hiệu suất 95%.

Bước c.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước b (5,35 g, 8,98 mmol) trong $CHCl_3$/EtOH (1:20, 100 mL) được bổ sung $Pd(OH)_2$/C 20% (1,26 g, 1/80 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm trong điều kiện khí cầu hydro ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp phản ứng được lọc qua tầng xelit. Dung môi được loại bỏ và được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

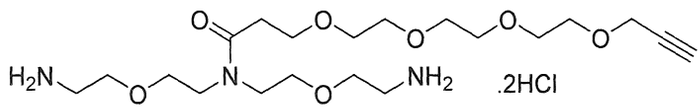
Bước d.



Sản phẩm của bước c được hòa tan lại trong 20 mL DMF/diclometan (1:5). Dung dịch amin tự do này được bổ sung axit propargyl PEG4 (2,36 g, 8,98 mmol), EDCI (2,57 g, 13,5 mmol), HOAt (1,83 g, 13,5 mmol) và bazơ Hunig (3,13 mL, 18,0 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong bốn giờ, sau đó được cô và tinh chế bằng

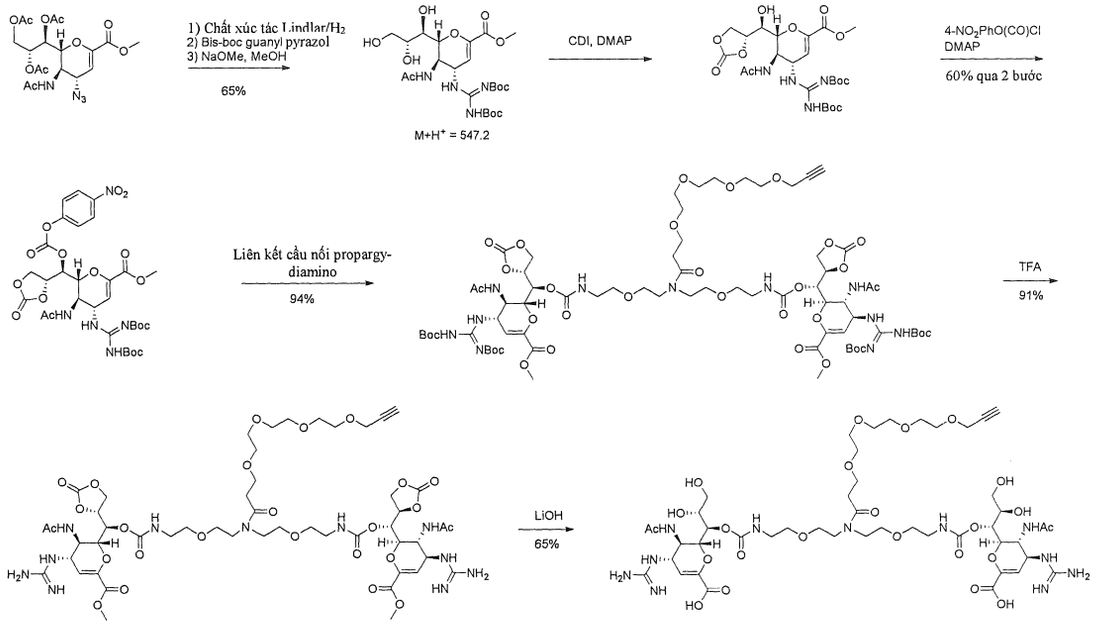
RPLC (ACN 10%/nước đến ACN 60%/nước. Thu được 4,00 g, hiệu suất 70% qua hai bước. Các ion được LCMS phát hiện: [M – Boc + H]+ = 534,2, [M + H]+ = 634,2.

Bước e.

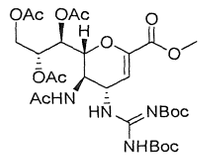


Sản phẩm của bước d (4,00 g, 6,31 mmol) được xử lý bằng HCl 4N trong dioxan (30 mL) trong 2 giờ. HCl dư và dioxan được loại bỏ bằng cách cô quay, và phần còn lại được làm khô tiếp trong điều kiện chân không cao để thu được Int-10 dưới dạng muối 2HCl. Thu được 3,15 g, hiệu suất 99%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 434,2.

Ví dụ 100. Tổng hợp Int-7a (chất đồng phân C7-C7)



Bước a.

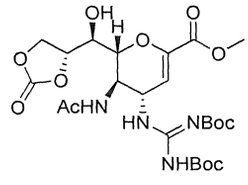


Metyl 5-axetamido-7,8,9-O-triacetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (30 g, 65,7 mmol) được hòa tan vào metanol (100 mL) và kết hợp với chất xúc tác Lindlar (15 g). Hỗn hợp thu được được sục hydro và được khuấy trong 5 giờ, sục hydro qua khoảng không gian chứa hydro cứ mỗi 30 phút. Sau khi hoàn thành phản ứng như được xác định bằng HPLC, chất xúc tác được lọc qua xelit. Sản phẩm lọc được sử dụng trong bước tiếp theo.

Amin thô từ bước trước đó (18,9 g, 43,8 mmol) được xử lý bằng N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (14,3 g, 46,0 mmol), và DIEA (9,9 ml, 57,0 mmol) trong metanol (100 mL). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi tất cả nguyên liệu ban đầu được phản ứng như được xác định bằng LCMS (~30 phút). Dung dịch được cô đặc thành bọt và cất giữ trong điều kiện chân không cao qua đêm sau đó được sử dụng mà không cần tinh chế thêm trong bước tiếp theo.

Tri-axetat thô từ bước trước đó (43,8 mmol) được hòa tan trong 100 ml metanol thô, sau đó được xử lý bằng natri metoxit trong metanol (1,9 mL, dung dịch 25% trong metanol, 8,76 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Tiến trình phản ứng được theo dõi bằng LCMS là hoàn thành sau 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng HCl 1N đến độ pH ~7. Dung dịch thu được được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 10% đến 100% và nước. Chất cải biến TFA không được sử dụng cho quá trình tinh chế này. Thu được 15,6g sản phẩm, hiệu suất 65%.

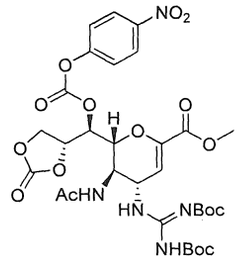
Bước b.



Hỗn hợp chứa sản phẩm của bước a (5,47 g, 10 mmol) và DMAP (1,222 g, 10 mmol) được hòa tan trong THF khan (30 ml). Sau khi làm lạnh trong bể nước đá, dung dịch được xử lý từ từ bằng 1,1'-cacbonyldiimidazol (2,6 g, 16 mmol), sau đó được khuấy trong 30 phút ở 0°C, tiếp theo là gia nhiệt ở 60°C trong 2 giờ. Sau đó, nó được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được chiết bằng nước (50 ml) và EtOAc/hexan (1:1, 100 ml). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước (50 ml x 3), làm khô trên Na_2SO_4 và cô

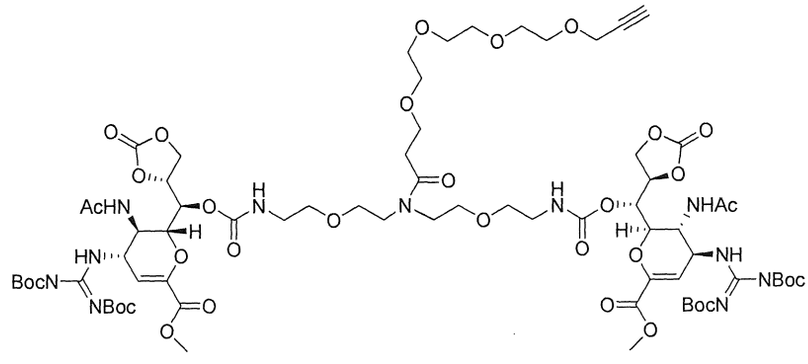
bằng cách cô quay. Sản phẩm bọt màu trắng được làm khô tiếp trong điều kiện chân không cao và được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 573,2.

Bước c.



Bình phản ứng chứa sản phẩm của bước b được sục chân không bằng nitơ và hòa tan trong DCM khan (50 ml), sau đó làm lạnh trong bể nước đá. Dung dịch đã làm lạnh được bổ sung DMAP (4,89 g, 40 mmol), tiếp theo là 4-nitrophenylcloformat (6,05 g, 30 mmol) được bổ sung thành các phần hơn 20 phút. Dung dịch được khuấy ở 0°C sau đó được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. LCMS cho thấy nguyên liệu ban đầu 1 giờ để DMAP bổ sung (1,22g, 10 mmol) và 4-nitrophenylcloformat (1 g, 5 mmol) được bổ sung. Phản ứng được tiếp tục trong 4 giờ, sau đó được tinh chế bằng hai cột silica gel (220 g, thấm ướt sơ bộ bằng EtOAc 20% và hexan) và được rửa giải với EtOAc 20% đến 80% và hexan. Thu được 4,42 g, hiệu suất 59,9% cho hai bước. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 738,2.

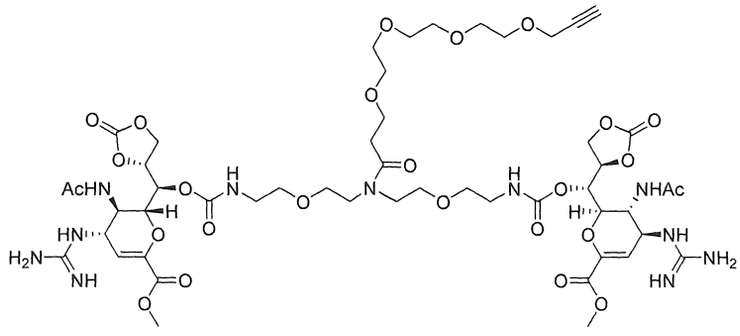
Bước d.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước c (3,2 g. 4,34 mmol) trong DCM khan (3 ml) được bổ sung thành các phần hơn 30 phút hỗn hợp chứa liên kết cầu nối trung tâm propargyl diamin (1,26 g, 2,5 mmol, được mô tả trong Ví dụ 99) và DIPEA (1,68 g, 13

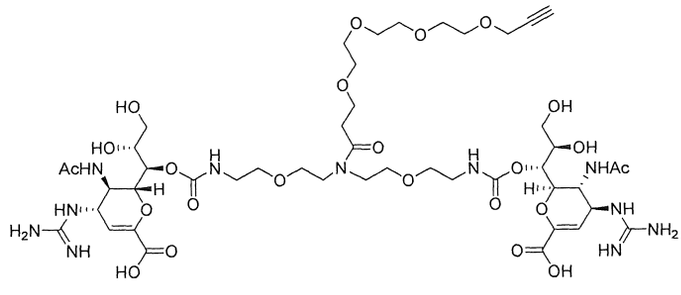
mmol) trong DMF khan (5 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó, nó được cô và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 30% đến 90% và nước, không có chất cải biến TFA). Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 815,8, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 765,8, [(M - 2Boc + 2H)/2]+ = 716. Thu được 3,33 g, hiệu suất 94,2%.

Bước e.



Sản phẩm của bước d (3,33 g, 2,04 mmol) được hòa tan trong DCM (5 ml) và TFA (5 ml) sau đó được khuấy ở 35°C trong ~6 giờ. Phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành dung dịch được cô đặc và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5 đến 30% và nước, không có TFA). Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 615,8, [(M + 3H)/3]+ = 411. Thu được 2,29 g, hiệu suất 91,3%.

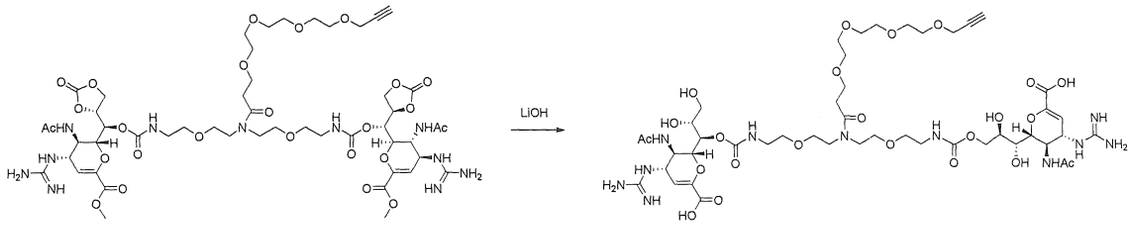
Bước f.



Sản phẩm của bước e (61,5 mg, 0,05 mmol) được hòa tan trong MeOH/nước (1:1, 0,6 ml). Sau khi dung dịch được làm nguội đến -6°C (bể muối/đá lạnh), 1,0 M LiOH (0,3 ml, 0,3 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút. Sau đó, nó được làm lạnh nhanh đến pH ~7,0 bằng HCl 4N trong dung

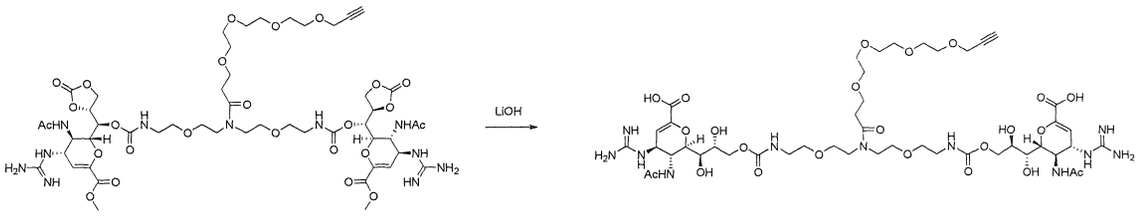
dịch dioxan (75 µl) và tinh chế trực tiếp bằng HPLC điều chế (Isco ACCQ điều chế, Luna 5µm C18(2) cột 100 Å LC 100mm x 30mm; građien: axetonitril 0%/nước trong 2 phút, sau đó axetonitril 0% đến 15%/nước hơn 12 phút, sau đó isocratic ở axetonitril 15% trong 10 phút, bằng cách sử dụng TFA 0,1%). Thu được 45 mg, hiệu suất 65,3%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 575,8, [(M + 3H)/3]+ = 384,2. Thời gian lưu giữ phân tích: 6,013 phút. Điều kiện: Cột Phenomenex Gemini HPLC, 3µm WX-C18 110 Å, 100mm x 3mm, rửa giải qua 25 phút với građien axetonitril 5-95% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1%.

Ví dụ 101. Tổng hợp Int-7b (chất đồng phân C7-C9)



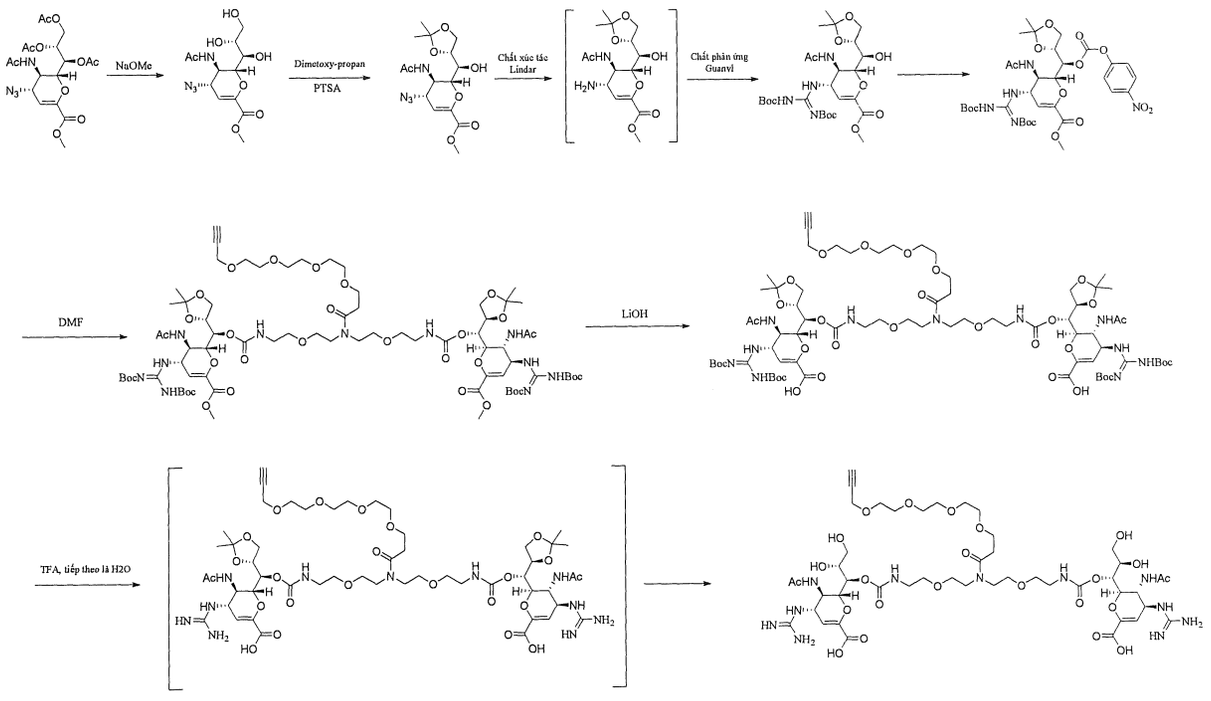
Dị dime C7-C9 (Int-7b) được điều chế tương tự như Int-7a (chất đồng phân C7-C7, Ví dụ 100), với ngoại trừ phản ứng này được thực hiện ở 0°C và được theo dõi bằng HPLC (thời gian lưu giữ: 6,112 phút. Điều kiện: xem Ví dụ 100, tổng hợp Int-7a và dừng khi chất đồng phân C7-C9 chiếm ưu thế (~3 giờ). Chất đồng phân này được phân tách bằng cách sử dụng cùng điều kiện như được sử dụng để phân tách Int-7a. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 575,8, [(M + 3H)/3]+ = 384,2.

Ví dụ 102. Tổng hợp Int-7c (chất đồng phân C9-C9)

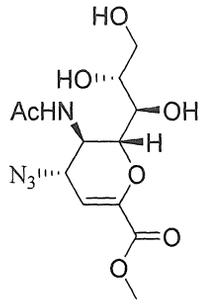


Int-7c (chất đồng phân C9-C9) được điều chế tương tự như Int-7a (chất đồng phân C7-C7, Ví dụ 100), với ngoại trừ phản ứng này được thực hiện ở 0°C và được theo dõi bằng HPLC (thời gian lưu giữ: 6,232 phút. Điều kiện: xem Ví dụ 100, tổng hợp Int-7a và dừng khi chất đồng phân C9-C9 chiếm ưu thế (~6 giờ). Chất đồng phân này được phân tách bằng cách sử dụng cùng điều kiện như được sử dụng để phân tách Int-7a. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 575,8, [(M + 3H)/3]+ = 384,2.

Ví dụ 103. Tổng hợp Int-7 (con đường axetonit)

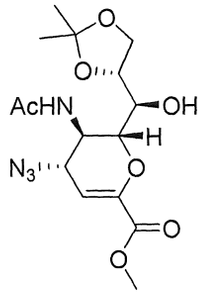


Bước a.



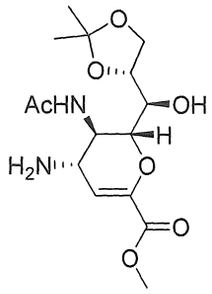
Metyl 5-axetamido-7,8,9-O-triacetyl-2,6-anhydro-4-azido-3,4,5-trideoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enonat (10,0 g, 22 mmol) được hòa tan trong 60 ml metanol thô, sau đó được xử lý bằng 20 ml natri metoxit trong metanol (0,5 M trong metanol, 10 mmol) trong khi làm lạnh trong bể nước đá. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS, là hoàn thành sau 2 giờ. Độ pH của dung dịch phản ứng sau đó được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Amberlite IRN-77. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ nhựa và được bay hơi đến khô trong điều kiện chân không. Dầu thu được được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =331,1.

Bước b.



Dung dịch chứa các sản phẩm từ bước trước đó trong 70 ml axeton được bổ sung 30 ml 2,2-dimetoxypropan và axit p-toluensulfonic 1 hydrat (400 mg, 2,0 mmol), dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Vào cuối thời gian này, natri bicacbonat (170 mg, 2,0 mmol) được bổ sung, và hỗn hợp được cô đặc đến khô. Phần cặn thu được được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =371,2.

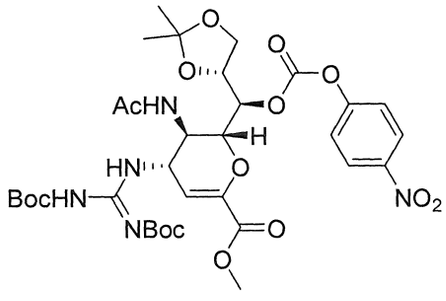
Bước c.



Dung dịch chứa nguyên liệu từ bước trước đó trong 60 ml metanol được bổ sung 5,0 g chất xúc tác Lindlar. Hỗn hợp thu được được sục hydro cứ mỗi 30 phút và được khuấy trong 5 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng như được xác định bằng HPLC, chất xúc tác được lọc ra qua xelit. Sản phẩm lọc được cô đặc và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Sản phẩm thô từ bước trước trong 60 ml THF được xử lý bằng N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (9,3 g, 30,0 mmol), và DIEA (9,9 ml, 57,0 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi tất cả nguyên liệu ban đầu được phản ứng như được xác định bằng LCMS (4 giờ). Dung dịch được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký nhanh được rửa giải với etyl axetat 20% đến 80%/diclometan. Thu được 8,8 g, hiệu suất 59,0% trong bốn bước. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H 587,3.

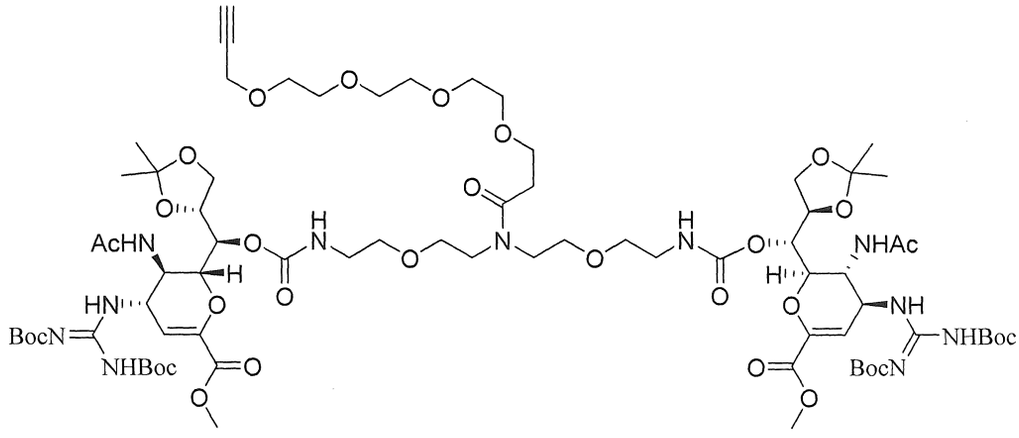
Bước d.



Bình phản ứng chứa sản phẩm từ bước trước đó (6,5 g, 11 mmol) được sục chân không bằng Nitơ và hòa tan trong diclometan khan (100 ml). Sau khi dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá, DMAP (4,89 g, 40 mmol) được bổ sung và được khuấy để hòa tan, sau đó 4-nitrophenylcloformat (5,58 g, 28 mmol) được bổ sung thành các phần, trong khi khuấy ở 0°C đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. LCMS cho thấy nguyên liệu ban đầu 1 giờ để DMAP bổ sung (1,22 g, 10 mmol) và 4-nitrophenylcloformat (1,0 g, 5 mmol) được bổ sung. Phản ứng được tiếp tục thêm

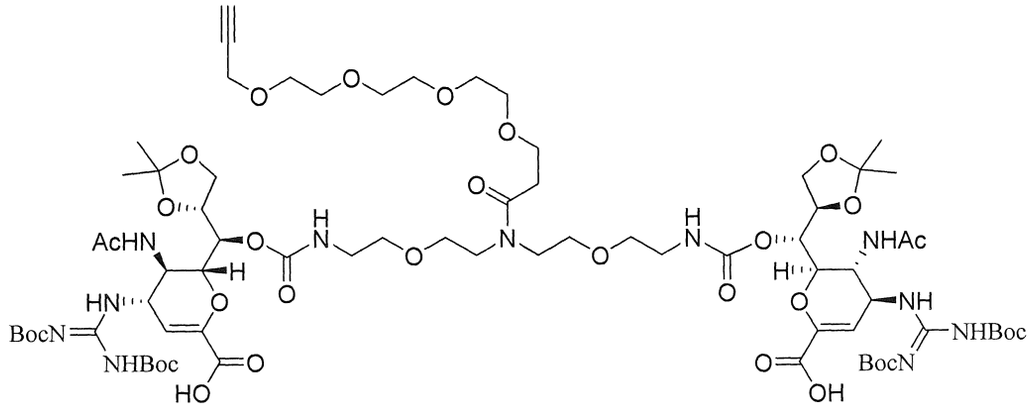
trong 4 giờ, sau đó được cô và tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với etyl axetat 20% đến 80%/diclometan. Thu được 5,1 g, hiệu suất 59,9%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 752,2.

Bước e.



Dung dịch chứa nitrophenyl cacbonat từ bước trước đó (1,8 g, 2,3 mmol) trong diclometan khan (20 ml) được bổ sung hỗn hợp chứa liên kết cầu nối trung tâm (0,51 g, 1,0 mmol, được bổ sung thành các phần hơn 30 phút) và DIPEA (1,4 ml, 10 mmol) trong DMF khan (20 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được cô và tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với metanol 0% đến 10%/diclometan. Thu được 1,35 g, hiệu suất 80%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 830,4, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 780,4, [(M - 2Boc + 2H)/2]+ = 730,4.

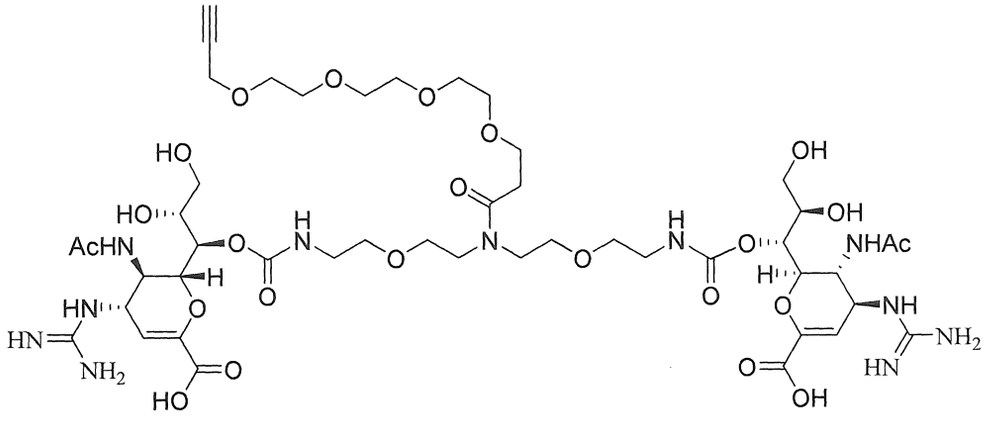
Bước f.



Sản phẩm từ bước trước đó (200 mg, 0,2 mmol) được hòa tan vào 2 ml MeOH và 2 ml THF, sau đó được xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (24 mg, 1 mmol)

hòa tan trong 2 ml nước. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng mà tại thời điểm đó HPLC cho thấy phản ứng hoàn thành. Độ pH của dung dịch phản ứng được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Amberlite IRN-77 được lọc để loại bỏ nhựa. Sản phẩm thô được bay hơi đến khô trong điều kiện chân không và được sử dụng trong bước tiếp theo có tinh chế. (Các) ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 815,4, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 765,4, [(M - 2Boc + 2H)/2]+ = 715,4.

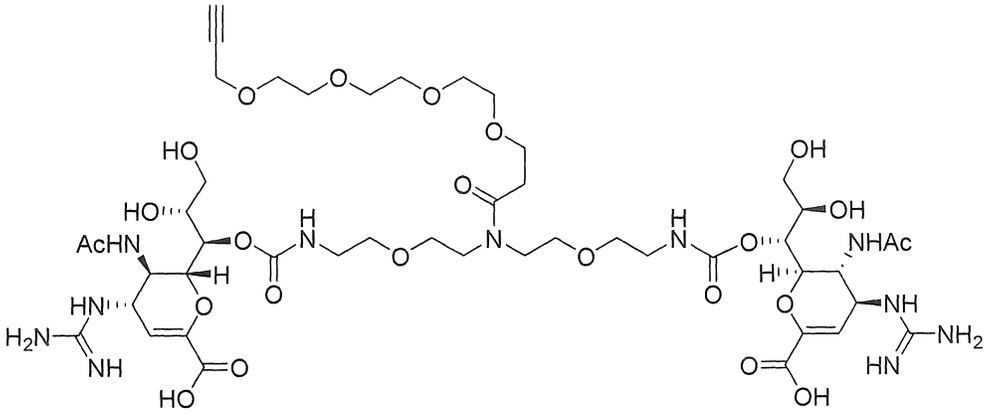
Bước g.



Sản phẩm từ bước g (400 mg, 0,25 mmol) được hòa tan vào 5 ml diclometan và 5 ml TFA, và hỗn hợp phản ứng thu được dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi hoàn thành phản ứng (6h), dung dịch được cất đến khô và sau đó hòa tan trong 4 ml nước và 4 ml axetonitril. Dung dịch thu được được khuấy thêm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng mà tại đó LCMS cho thấy sự khử bảo vệ các nhóm bảo vệ axetonit hoàn thành. Hỗn hợp này được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® được rửa giải với axetonitril 5% đến 40%/nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 270 mg, hiệu suất 68,0%. (Các) ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 575,8, [(M + 3H)/3]+ = 384,2.

Ví dụ 104. Kết quả NMR đối với Int-7a, Int-7b, và Int-7c

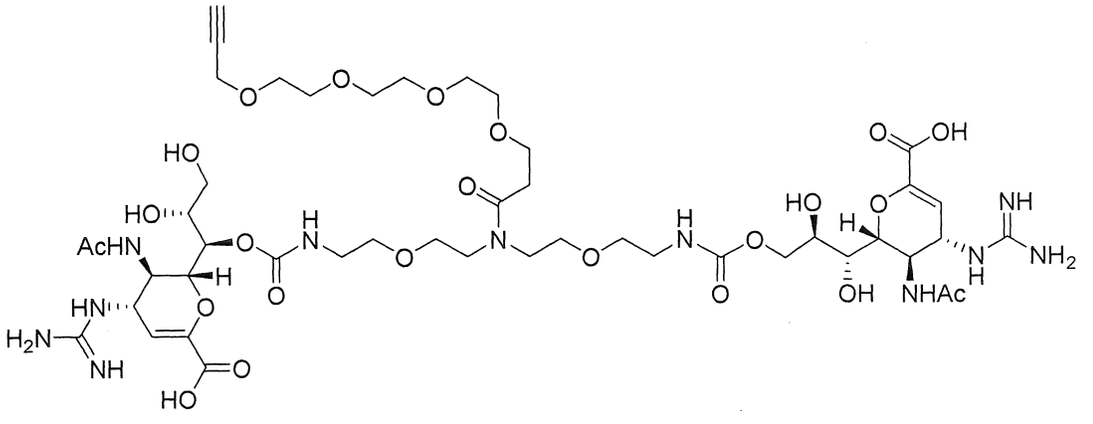
NMR của Int-7a



^{1}H NMR (500 MHz, Metanol-d4) δ 5,91-5,89 (m, 2H), 5,00-4,96 (m, 2H), 4,58-4,53 (m, 2H),4,42-4,37(m, 2H), 4,20 – 4,17 (m, 6H), 4,02-3,97 (m, 2H), 3,78 – 3,49 (m, 28H), 3,29-3,18 (m, 4H), 2,86 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 2,85-2,72 (m, 2H), 1,96 (s, 3H), 1,95 (s, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 171,73, 170,80, 170,29, 161,95, 156,06, 155,08, 154,99, 144,07, 143,93, 116,41, 114,10, 106,03, 105,86, 77,71, 74,46, 73,22, 68,62, 68,54, 68,50, 68,38, 68,12, 68,00, 67,94, 67,67, 67,64, 67,53, 67,20, 66,96, 65,44, 61,53, 56,17, 49,74, 49,64, 47,37, 45,17, 39,16, 39,06, 31,73, 19,96, 19,92.

NMR của Int-7b

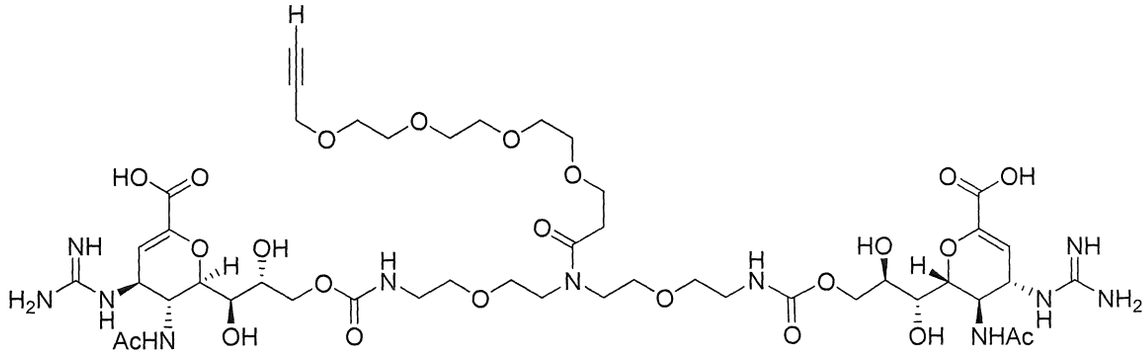


^{1}H NMR (500 MHz, Metanol-d4) δ 5,91-5,87 (m, 2H), 5,04-4,95 (m, 1H), 4,58-4,48 (m, 2H), 4,45-4,37 (m, 3H), 4,20 – 4,10 (m, 5H), 4,08 – 3,98 (m, 2H), 3,79-3,44 (m, 29H), 3,29 – 3,18 (m, 4H), 2,88-2,70 (m, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,96-1,94 (m, 3H).

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ: 8,28 (d, J = 8,4 Hz, 2H, -NH), 7,98 (d, J = 11,5 Hz, 2H, -NH), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 2H, -NH), 7,60 (t, J = 8,5 Hz, 2H, -NH), 7,20 (bs, 2H, -NH), 7,06 (bs, 2H, -NH), 5,69 (bs, 1H), 5,67 (d, J=2,4 Hz, 1H), 4,83 (dd, J = 9,2, 2,2 Hz, 1H), 4,45 (dt, J = 9, 2,5 Hz, 1H), 4,37 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 4,33-4,24 (m, 2H), 4,13 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 4,05-4,32 (m, 41H), 3,23 (m, 1H), 3,15-3,09 (m, 2H), 3,06-3,02 (m, 2H), 2,59 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 1,91 (s, 3H), 1,78 (s, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ:173,19, 172,98, 172,25, 171,75, 164,26, 163,82, 157,88, 157,55, 156,51, 146,09, 107,21, 106,93, 106,59, 79,22, 76,19, 75,92, 74,72, 74,68, 70,12, 70,08, 70,03, 69,99, 69,92, 69,88, 69,66, 69,48, 69,12, 69,01, 68,94, 68,73, 68,69, 68,50, 68,19, 67,08, 66,93, 66,79, 63,04, 57,68, 51,24, 51,15, 50,13, 48,87, 48,72, 46,72, 46,58, 46,23, 40,64, 40,41, 33,21, 21,49, 21,45, 21,40.

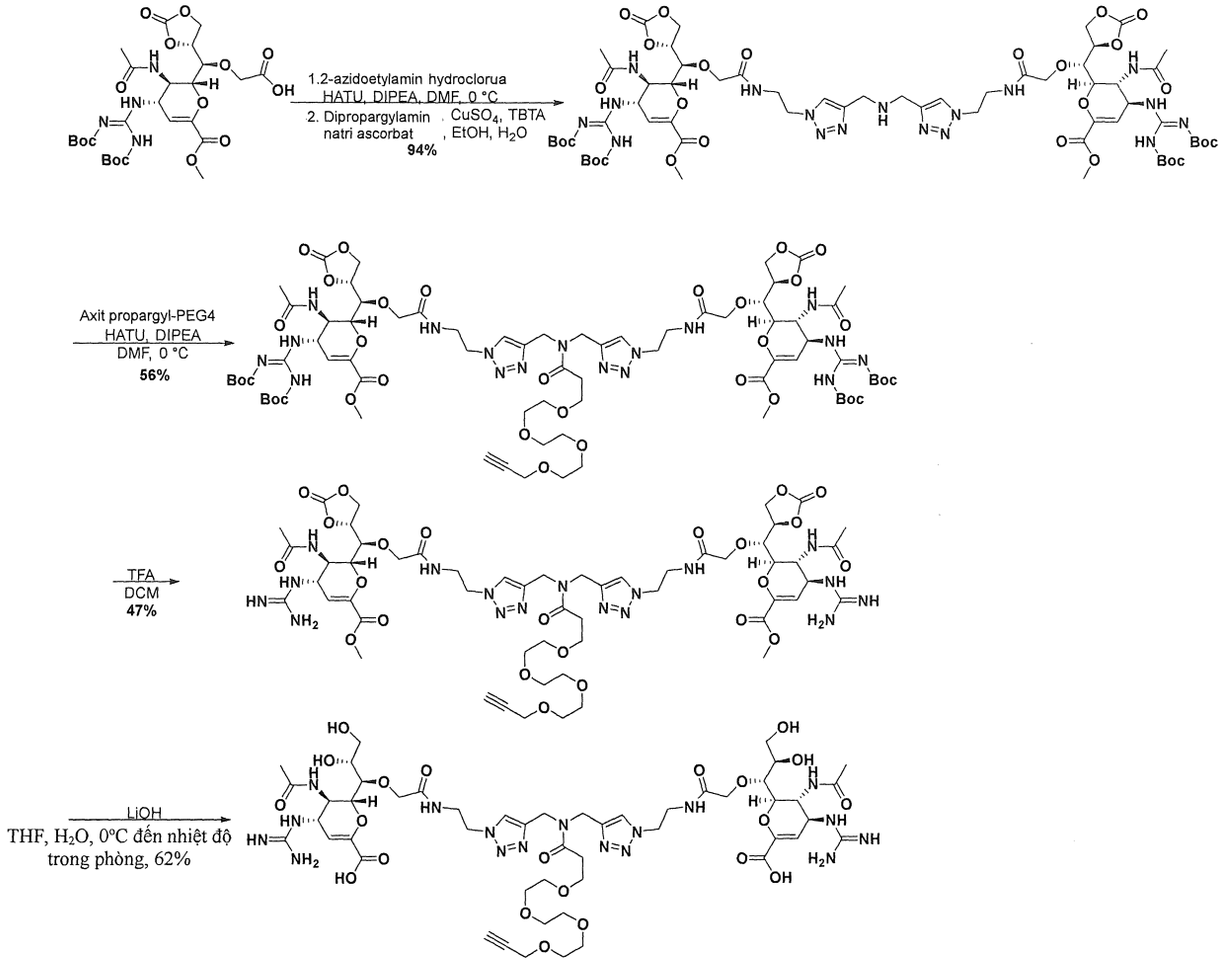
NMR của Int-7c



^{1}H NMR (500MHz, Metanol-d4) δ: 5,88 (d, J = 2,6 Hz, 2H), 4,50 (dt, J = 8,5, 2,7 Hz, 2H), 4,43 (ddd, J = 9,7, 3,9, 1,5 Hz, 2H), 4,39 (dd, J = 11,5, 2,4 Hz, 2H), 4,25 – 4,16 (m, 2H), 4,19 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 4,13 (dt, J = 11,5, 5,9 Hz, 2H), 4,05 (m, 2H), 3,77 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,72 – 3,55 (m, 22H), 3,51 (m, 4H), 3,35 – 3,23 (m, 4H), 2,86 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,74 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,02 (s, 6H).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ:173,03, 163,76, 157,89, 157,54, 145,60, 107,21, 79,28, 76,29, 74,70, 70,11, 70,07, 70,03, 69,92, 69,70, 69,47, 68,96, 68,89, 68,72, 68,54, 68,19, 67,05, 66,75, 57,69, 50,09, 48,69, 48,08, 46,10, 40,44, 40,38, 33,23, 21,42.

Ví dụ 105. Tổng hợp Int-60



Bước a.

Dung dịch khuấy ở 0°C chứa axit ete-zanamivir được điều chế trước đó (1,00 g, 1,586 mmol, Ví dụ 31), 2-azidoetylamin hydroclorua (213 mg, 1,744 mmol) và DIPEA (1,105 mL, 6,343 mmol) trong DMF (8,0 mL), được bổ sung HATU (615 mg, 1,618 mmol). Nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được đưa vào etyl axetat, được rửa bằng dung dịch nước axit

sulfuric 1 M (1 x 50 mL), sau đó dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (3 x 20 mL), và nước muối (1 x 50 mL). Các lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, lọc, và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Theo cách này, 816 mg azit trung gian mong muốn thu được với độ tinh khiết cao và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm bất kỳ. (Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 699,2). Dung dịch khuấy chứa nguyên liệu thô đã mô tả (816 mg, 1,168 mmol), dipropargylamin (54 mg, 0,584 mmol), tris((1-benzyl-4-triazolyl)metyl)amin (31 mg, 0,058 mmol), và natri ascorbat (58 mg, 0,292 mmol) trong etanol (10 mL) và nước (5 mL), được bổ sung đồng sulfat (10 mg, 0,061 mmol). Khi hoàn thành, chất tẩy tạp đồng SiliaMetS TAAcONa (300 mg, mức tải 0,45 mmol/g) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp được lọc với sự hỗ trợ của diclometan. Sản phẩm lọc được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Lớp nước được rửa bổ sung bằng diclometan (3 lần). Các chất hữu cơ gom lại được làm khô bằng magie sulfat, được lọc và cô. Phần cặn được tinh chế bằng cột silic oxit bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH®y được rửa giải với hexan 0% đến 100% và etyl axetat, tiếp theo là diclometan 0% đến 30%. Thu được 817 mg, hiệu suất 94%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 745,8, [(M + 3H)/3]+ = 497,5.

Bước b.

Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước a (817 mg, 0,548 mmol), axit propargyl-PEG4 (185 mg, 0,712 mmol) và DIPEA (286 µL, 1,644 mmol) trong DMF (7,0 mL), được bổ sung HATU (212 mg, 0,544 mmol). Nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 90% và nước). Thu được 520 mg, hiệu suất 56%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 866,8, [(M + 3H)/3]+ = 578,4.

Bước c.

Dung dịch khuấy chứa hợp chất của bước b (520 mg, 0,300 mmol) trong 2-metyl-2-buten (0,25 mL), diclometan (4,0 mL) và TFA (2,0 mL) được khuấy cho đến

khi dừng thoát khí. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 30% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 221 mg, hiệu suất 47%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 666,8, [(M + 3H)/3]+ = 444,8.

Bước d.

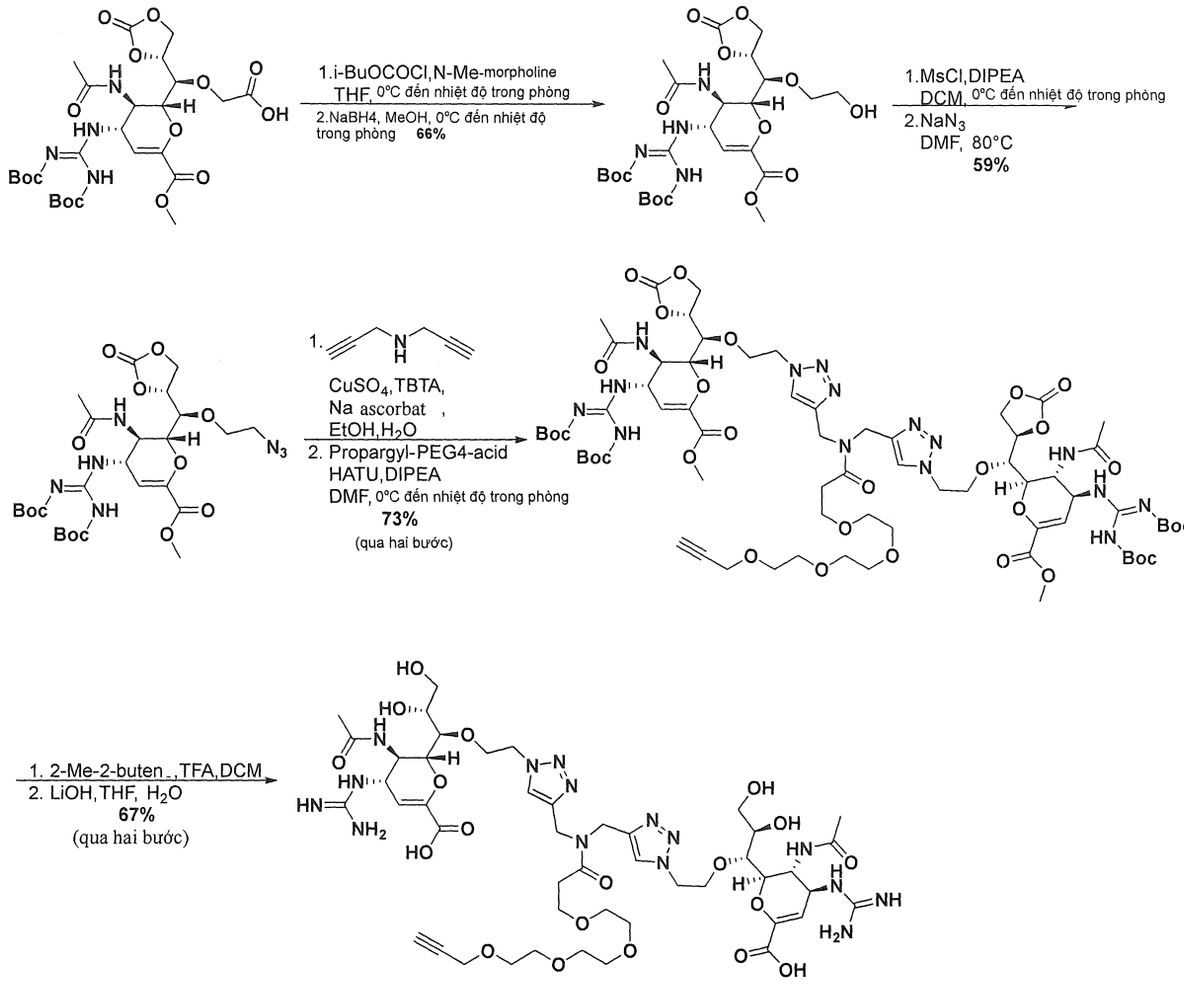
Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước c (221 mg, 0,142 mmol) trong nước (3,0 mL) được bổ sung lithi hydroxit (20 mg, 0,850 mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng axit axetic (120 µL), và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 20% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 130 mg, hiệu suất 62%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 626,8, [(M + 3H)/3]+ = 418,2.

Ví dụ 106. Tổng hợp thể liên hợp 29

Dung dịch chứa Fc aglycosyl hóa được chức hóa azido (SEQ ID NO: 35) trong PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (100 mg, 10 mL, 1,874 µmol) được bổ sung vào ống ly tâm chứa PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (10,50 mL) của phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (17 mg, 0,0112 mmol; Ví dụ 105, Int-60), đồng sulfat (4 mg, 0,0225 mmol), tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (39 mg, 0,0900 mmol), và natri ascorbat (7,4 mg, 0,375 mmol). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 56938 Da (DAR = 2,3). Thu được 49,9 mg, hiệu suất 49%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 29 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 29 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 107. Tổng hợp Int-65



Bước a.

Dung dịch khuấy ở 0°C chứa axit ete-zanamivir được điều chế trước đó (2,00 g, 3,172 mmol, Ví dụ 31) và 4-metylmorpholin (0,628 mL, 5,709 mmol) trong tetrahydrofuran (30 mL) được bổ sung isobutyl cloformat (0,617 mL, 4,7574 mmol). Sau 10 phút, nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy tiếp tục trong 20 phút. Nhiệt độ được giảm trở lại đến 0°C, và natri bohydrua (360 mg, 9,515 mmol) được bổ sung trong một phần, tiếp theo là bổ sung từng giọt (10 mL) hơn 5 phút. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng axit axetic (2,860 mL, 50 mmol), và sau 5 phút nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh, trong khi tiếp tục khuấy cho đến khi dừng thoát khí. Tất cả các chất dễ bay hơi được

bay hơi và phần cặn được tạo huyền phù trong diclometan và lọc. Sản phẩm lọc được cô đặc và phần cặn được tinh chế bằng cột silic oxit bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH®y được rửa giải với hexan 20% đến 100% và etyl axetat, bằng cách sử dụng metanol 3% làm chất cải biến. Thu được 1,302 g, hiệu suất 66%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + H)]+ = 617,2.

Bước b.

Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước a (1,25 g, 2,027 mmol) và DIPEA (1,095 mL, 6,284 mmol) trong diclometan (15 mL), được bổ sung metansulfonyl clorua (0,314 mmol, 4,054 mmol). Khi hoàn thành, phản ứng được xử lý bằng nước (15 mL). Các lớp được tách, và lớp diclometan được làm khô bằng nước muối, sau đó magie sulfat, và lọc. Dung dịch được cô đặc và phần cặn được hòa tan trong DMF (10mL), và natri azit (264 mg, 4,054 mmol) được bổ sung, trong khi nhiệt độ được tăng lên đến 50°C. Quan sát được phản ứng hoàn thành sau 18 giờ, và tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng cột silic oxit bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH®y được rửa giải với hexan 20% đến 100% và etyl axetat, bằng cách sử dụng metanol 3% làm chất cải biến. Thu được 767 mg, hiệu suất 59%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + H)]+ = 642,2.

Bước c.

Dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước b (496 mg, 0,773 mmol), dipropargylamin (36 mg, 0,386 mmol), tris((1-benzyl-4-triazolyl)metyl)amin (41 mg, 0,077 mmol), và natri ascorbat (115 mg, 0,580 mmol) trong etanol (16 mL) và nước (8 mL), được bổ sung đồng sulfat (13 mg, 0,081 mmol). Khi hoàn thành, chất tẩy tạp đồng SiliaMetS TAAcONa (600 mg, mức tải 0,45 mmol/g) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp được lọc với sự hỗ trợ của diclometan. Sản phẩm lọc được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Lớp nước được rửa bổ sung bằng diclometan (3 lần). Các chất hữu cơ gom lại được làm khô bằng magie sulfat, lọc và tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng kỹ thuật chân không. Dung dịch khuấy ở 0°C chứa phần cặn, axit propargyl-PEG4 (151 mg, 0,580 mmol)) và DIPEA (337 µL,

1,933 mmol) trong DMF (10,0 mL), được bổ sung HATU (220 mg, 0,580 mmol). Nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 90% và nước). Thu được 457 mg, hiệu suất 73%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 809,8, [(M + 2H - Boc)/2]+ = 759,8.

Bước d.

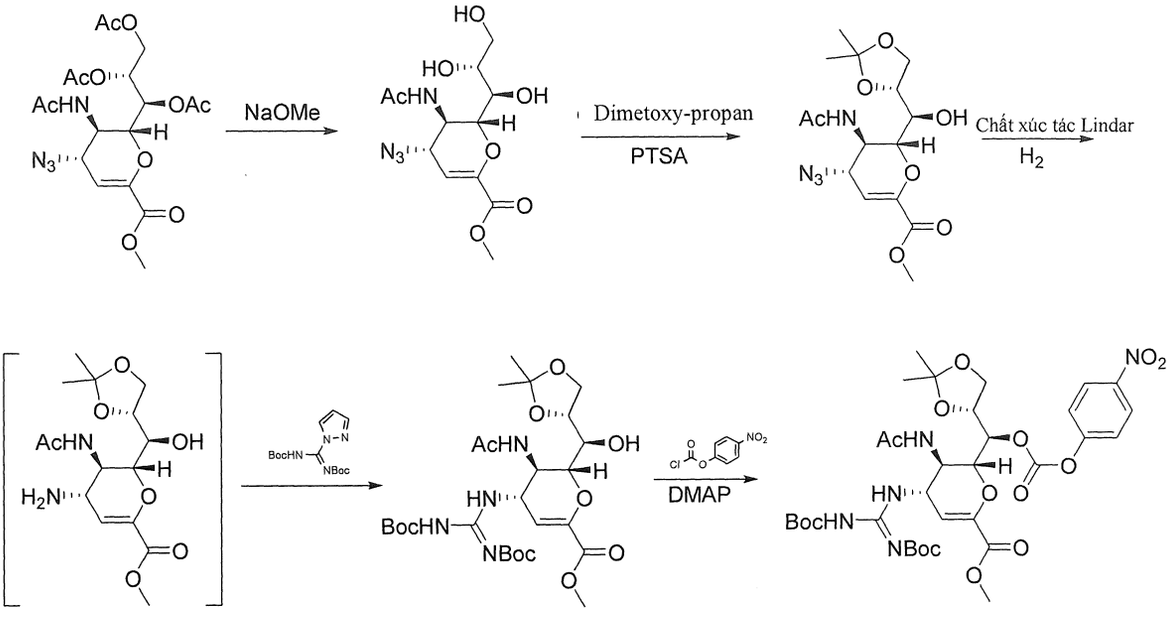
Dung dịch khuấy chứa hợp chất của bước c (451 mg, 0,279 mmol) trong 2-metyl-2-buten (0,25 mL), diclometan (4,0 mL) và TFA (2,0 mL) được khuấy cho đến khi dừng thoát khí. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 609,8, [(M + 3H)/3]+ = 407,0. Dung dịch khuấy ở 0°C chứa phần cặn trong tetrahydrofuran (6 mL) và nước (6 mL), được bổ sung lithi hydroxit (240 mg, 10,03 mmol). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng axit axetic (0,638 mL, 11,14 mmol), và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng kỹ thuật chân không. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 90% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 209 mg, hiệu suất 67%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 569,8, [(M + 2H - Boc)/2]+ = 380,3.

Ví dụ 108. Tổng hợp thể liên hợp 30

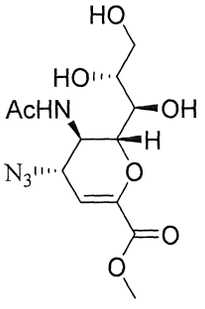
Dung dịch chứa Fc aglycosyl hóa được chức hóa azido (Ví dụ 7, SEQ ID NO: 35) trong PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (50 mg, 5 mL, 1,874 μmol) được bổ sung vào ống ly tâm chứa PBS pH 7,4 x 1 dung dịch đệm (9,50 mL) của phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (8,7 mg, 0,0064 mmol, Int-65), đồng sulfat (2 mg, 0,013 mmol), tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)-amin (22 mg, 0,0508 mmol), và natri ascorbat (25 mg, 0,127 mmol). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem Ví dụ 10). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 61548 Da (DAR = 2,4). Thu được 32,33 mg, hiệu suất 67%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 30 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp 30 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 109: Tổng hợp sản phẩm trung gian p-nitrophenyl cacbonat zanamivir



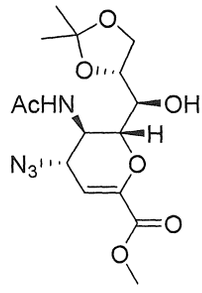
Bước a.



Sản phẩm trung gian triaxetoxy-azido Zanamivir (10,0 g, 22 mmol) được hòa tan trong 60 ml metanol thô, sau đó được xử lý bằng 20 ml natri metoxit trong metanol

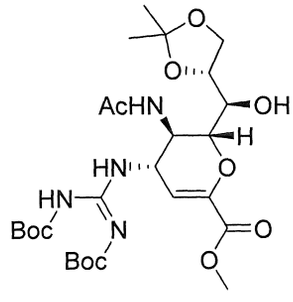
(0,5 M trong metanol, 10 mmol) trong khi làm lạnh trong bể nước đá. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS, là hoàn thành sau 2 giờ. Độ pH của dung dịch phản ứng sau đó được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Amberlite IRN-77. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ nhựa và được bay hơi đến khô trong điều kiện chân không. Dầu thu được được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =331,1.

Bước b.



Dung dịch chứa các sản phẩm từ bước trước đó trong 70 ml axeton được bổ sung 30 ml 2,2-dimetoxypropan và axit p-toluensulfonic 1 hydrat (400 mg, 2,0 mmol), dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Vào cuối thời gian này, natri bicacbonat (170 mg, 2,0 mmol) được bổ sung, và hỗn hợp được cô đặc đến khô. Phần cặn thu được được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H =371,2.

Các bước c & d.

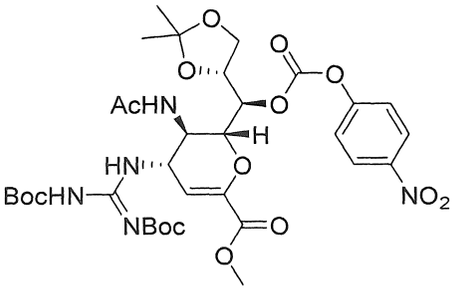


Dung dịch chứa nguyên liệu từ bước trước đó trong 60 ml metanol được bổ sung 5,0 g chất xúc tác Lindlar. Hỗn hợp thu được được sục hydro cứ mỗi 30 phút và được khuấy trong 5 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng như được xác định bằng HPLC,

chất xúc tác được lọc ra qua xelit. Sản phẩm lọc được cô đặc và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

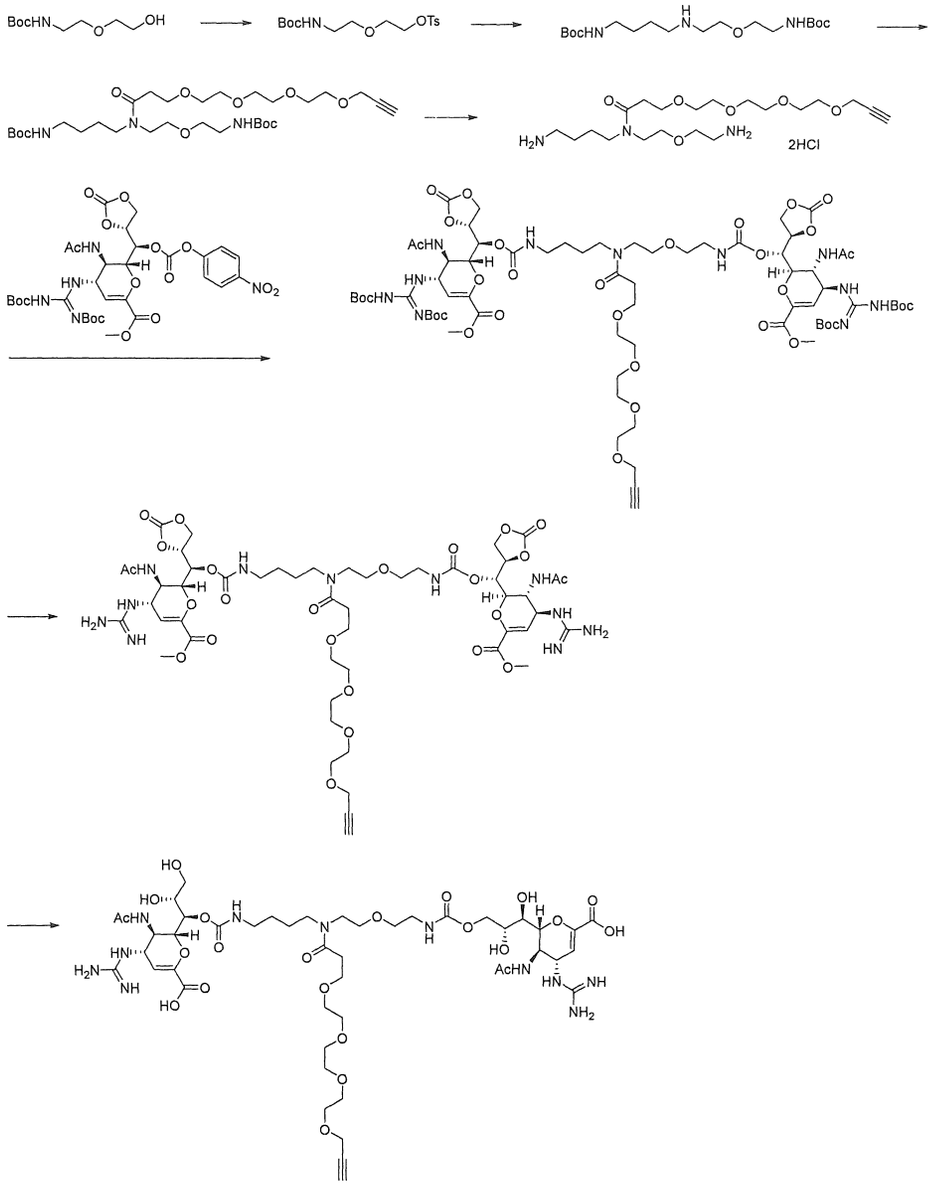
Sản phẩm thô từ bước trước trong 60 ml THF được xử lý bằng N,N'-bis-boc-1-guanylpyrazol (9,3 g, 30,0 mmol), và DIEA (9,9 ml, 57,0 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi tất cả nguyên liệu ban đầu được phản ứng như được xác định bằng LCMS (4 giờ). Dung dịch được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký nhanh được rửa giải với etyl axetat 20% đến 80%/diclometan. Thu được 8,8 g, hiệu suất 59,0% trong bốn bước. (Các) ion được LCMS phát hiện: M+H 587,3.

Bước e.

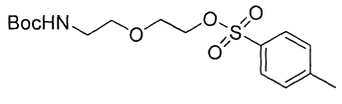


Bình phản ứng chứa sản phẩm từ bước trước đó (6,5 g, 11 mmol) được sục chân không bằng Nitơ và hòa tan trong diclometan khan (100 ml). Sau khi dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá, DMAP (4,89 g, 40 mmol) được bổ sung và được khuấy để hòa tan, sau đó 4-nitrophenylcloformat (5,58 g, 28 mmol) được bổ sung thành các phần, trong khi khuấy ở 0°C đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. LCMS cho thấy nguyên liệu ban đầu 1 giờ để DMAP bổ sung (1,22 g, 10 mmol) và 4-nitrophenylcloformat (1,0 g, 5 mmol) được bổ sung. Phản ứng được tiếp tục thêm trong 4 giờ, sau đó được cô và tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với etyl axetat 20% đến 80%/diclometan. Thu được 5,1 g, hiệu suất 59,9%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 752,2.

Ví dụ 110. Tổng hợp Int-71

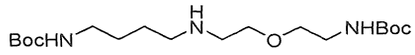


Bước a.



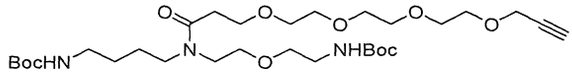
Dung dịch chứa 2-(2-Boc-aminoetoxy) etanol (6,15 g, 30 mmol) trong DCM khan (60 ml) được bổ sung DIPEA (7,8 g, 60 mmol) và DMAP (366,6 mg, 3 mmol). p-toluensulfonyl clorua (6,86 g, 36 mmol) sau đó được bổ sung thành từng phần hơn 30 phút. Sau khi hỗn hợp thu được được khuấy trong 3 ngày, nó được cô đặc bằng cách cô quay và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 20% đến 70%/nước). Thu được 3,71 g, hiệu suất 34,4%. Ion được LCMS phát hiện: [M -Boc + H]+ = 260.

Bước b.



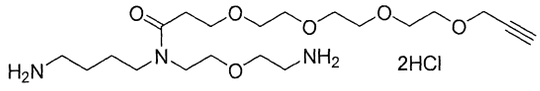
Dung dịch chứa sản phẩm của bước a (2,1 g, 5,83 mmol) trong THF khan (10 ml) được bổ sung natri cacbonat (1,24 g, 11,7 mmol) và N-Boc-1,4-diaminobutan (1,32 g, 7 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 60°C trong 1 ngày. Muối sau đó được lọc ra, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cách cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 50% và nước). Thu được 1,94 g, hiệu suất 88,6%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 376,0.

Bước c.



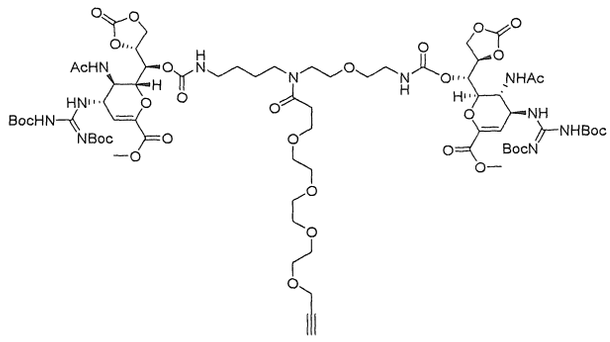
Dung dịch chứa axit propargyl PEG-4 (781 mg, 3 mmol) và HATU (1,14 g, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml) được bổ sung DIPEA (390 mg, 3 mmol), tiếp theo là bổ sung dung dịch sản phẩm của bước b (940 mg, 2,5 mmol) và DIPEA (390 mg, 3 mmol) trong DMF khan (3 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 5% đến 80% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 960,2 mg, hiệu suất 65,3%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 618,3, [M - Boc + H]+ = 518,3.

Bước d.



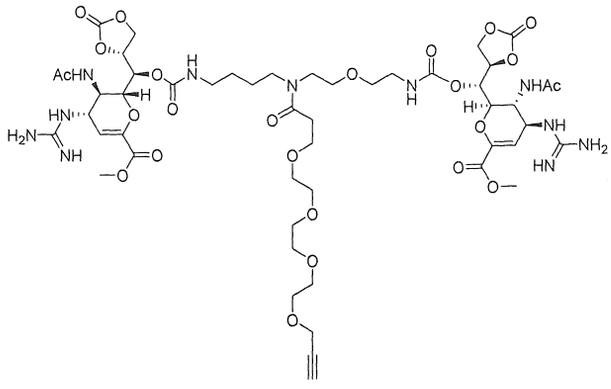
Sản phẩm của bước c (960,2 mg, 1,63 mmol) được hòa tan trong THF khan (6 ml). Dung dịch HCl 4N trong dioxan (4 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Sau đó, nó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được chiết bằng nước (3 x 3 ml) và etyl axetat (10 ml). Lớp nước kết hợp được đông khô. Thu được 760 mg, hiệu suất 95,1%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 418,0.

Bước e.



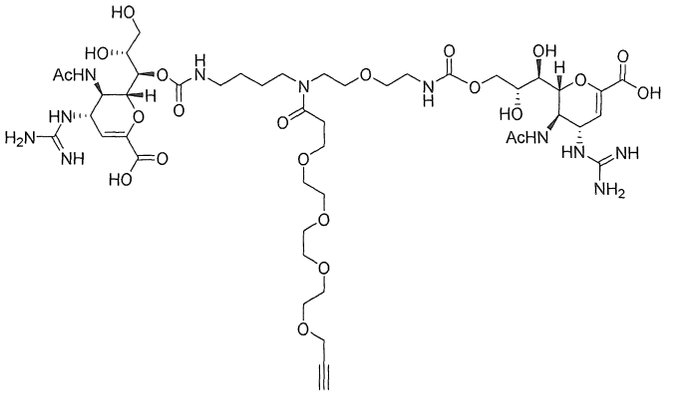
Hỗn hợp chứa sản phẩm của bước d (556,2 mg, 1,13 mmol) và DIPEA (741 mg, 5,7 mmol) trong DMF khan (3 ml) được bổ sung thành các phần p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (1,67 g, 2,26 mmol, được mô tả trong Ví dụ 109) hơn 20 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 30% đến 90%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,35 g, hiệu suất 74%. Ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 807,9.

Bước f.



Sản phẩm của bước e (1,35 g, 0,836 mmol) được hòa tan trong TFA (5 ml). Phản ứng được gia nhiệt ở 30°C trong 1 giờ, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 0% đến 35%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,00 g, hiệu suất 82,9%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 607,8.

Bước g.

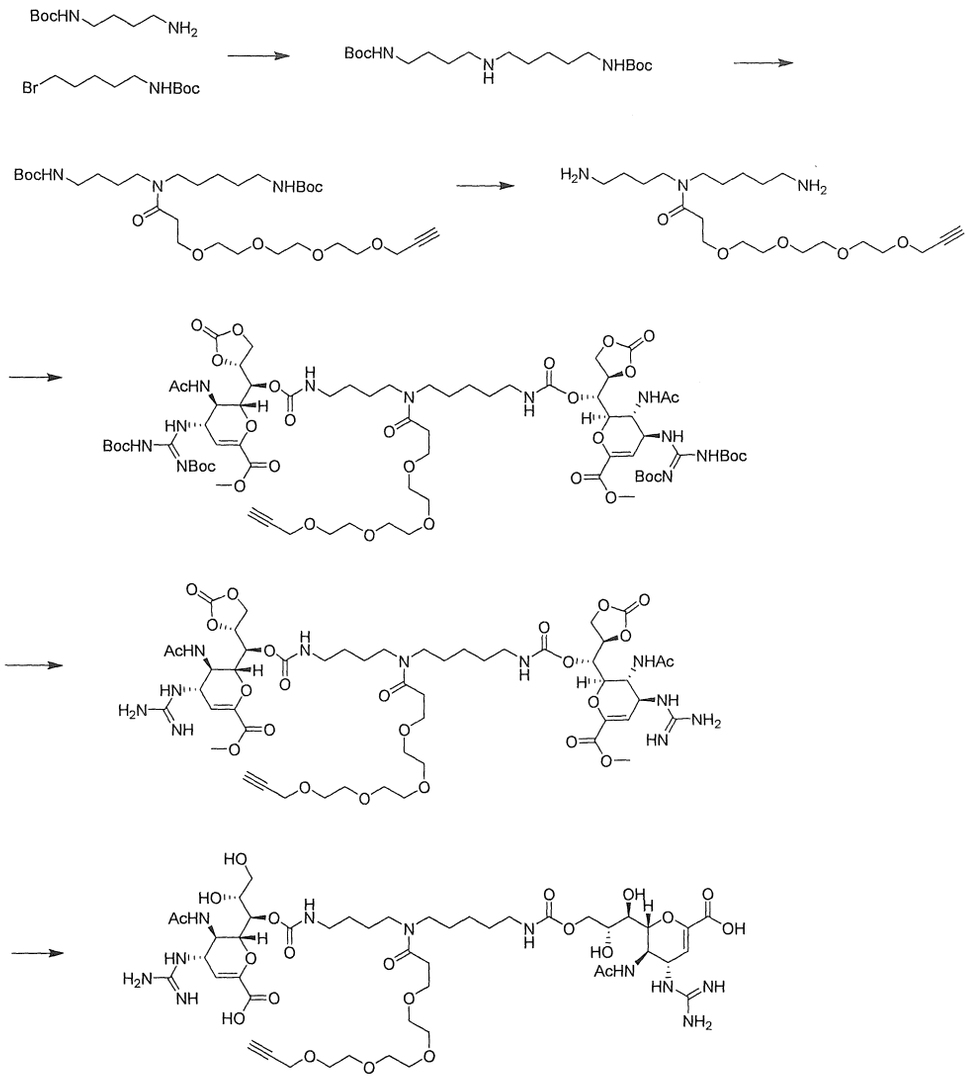


Sản phẩm của bước f (1,00 g, 0,693 mmol) được hòa tan trong MeOH (12 ml), sau đó làm lạnh trong bể nước đá. Sau đó, nó được xử lý bằng dung dịch chứa LiOH monohydrat (286 mg, 6,6 mmol) trong nước (9 ml). Hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm và sau đó được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (2 ml). Sau khi các dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách cô quay, phần cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế (Isco ACCQ điều chế, Luna 5µm C18(2) cột 100 Å LC 100mm x 30mm; građien: axetonitril 0%/nước trong 2 phút, sau đó axetonitril 0% đến 15%/nước hơn 12 phút, sau đó isocratic ở axetonitril 15% trong 10 phút, bằng cách sử dụng TFA 0,1%). Thu được 275,9 mg, hiệu suất 29,2%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 567,8, [(M + 3H)/3]+ = 378,9.

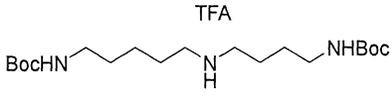
Ví dụ 111. Tổng hợp thể liên hợp 31

Ống ly tâm vô trùng dung tích 15 ml được nạp natri ascorbat (68,1 mg, 0,344 mmol), THPTA (14,9 mg, 0,0344 mmol), phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (17,5 mg, 0,00953 mmol, được mô tả trong Ví dụ 110) và PBS đệm độ pH 7,4 (1 ml). Sau khi khuấy bằng máy xoáy để hòa tan mọi thứ, Peg 4 azido Fc (50 mg, 0.0008588 mmol, được mô tả trong Ví dụ 7 SEQ ID No. 18) được bổ sung tiếp theo là dung dịch chứa $CuSO_4$ (2,05 mg, 0,0129 mmol) trong PBS (0,5 ml). Hỗn hợp được quay nhẹ trong 20 giờ sau đó tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein-A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63586 Da (DAR = 3,8). Thu được 32,8 mg, hiệu suất 66%.

Ví dụ 112. Tổng hợp Int-72

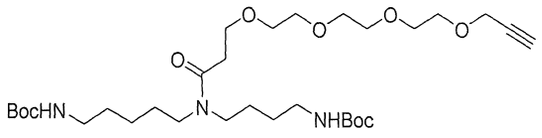


Bước a.



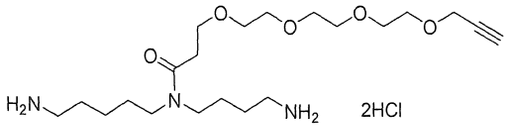
Dung dịch chứa N-Boc-1,4-diaminobutan (1,56 g, 8,28 mmol) trong DMF khan (7 ml) được bổ sung natri cacbonat (742 mg, 7 mmol) và 5-(Boc-amino)-1-pentylbromua (1,73 g, 6,5 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 50°C trong 24 giờ. Muối sau đó được lọc ra, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cách cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5% đến 50%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 2 g, hiệu suất 63,2%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 374,4.

Bước b.



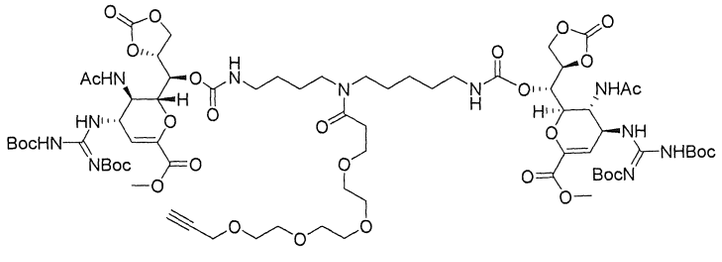
Dung dịch chứa axit propargyl PEG-4 (1,3 g, 5 mmol) và HATU (2,1 g, 5,5 mmol) trong DMF khan (6 ml) được bổ sung DIPEA (1,3 g, 10 mmol). Sau 5 phút, hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào sản phẩm của bước a (2 g, 4,1 mmol) và được khuấy trong 1 giờ. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 5% đến 80%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 2,34 g, hiệu suất 95%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 616,4, [M – Boc + H]+ = 516,4.

Bước c.



Sản phẩm của bước b (2,34 g, 3,8 mmol) được hòa tan trong THF khan (12 ml). dung dịch HCl 4N trong dioxan (10 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Sau đó, nó được cô bằng cách cô quay. Phần cặn được hòa tan lại trong axetonitril/nước (1:1, ~16 ml), và dung dịch được đông khô. Sản phẩm thô được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Thu được 1,91 g, hiệu suất định lượng. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 416,4.

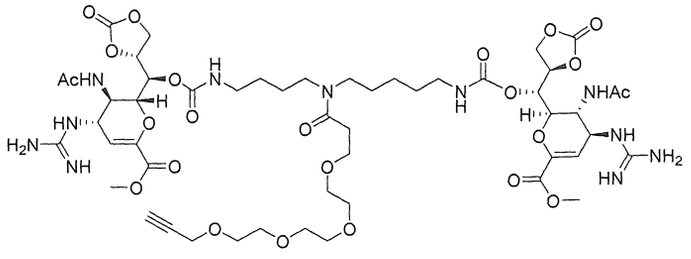
Bước d.



Dung dịch chứa p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (2,25 g, 3,05 mmol, được mô tả trong Ví dụ 109) trong DCM khan (3 ml) được bổ sung thành các phần hỗn hợp chứa sản phẩm của bước c (610 mg, 1,249 mmol) và DIPEA (1,05 g, 8,1 mmol) trong DMF khan (4 ml) hơn 20 phút. Sau khi khuấy trong 1 giờ, hỗn hợp phản

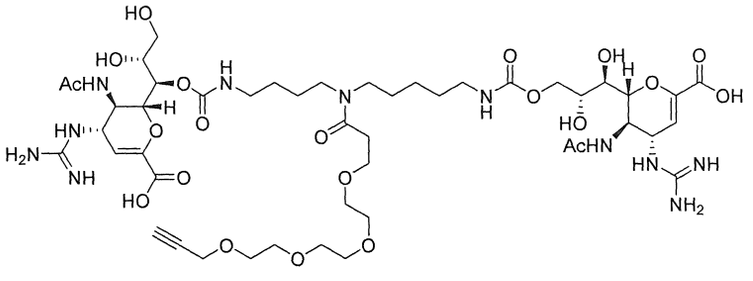
ứng được cô đặc và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 30% đến 80%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,73 g, hiệu suất 85,9%. Ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 806,8, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 756,8.

Bước e.



Sản phẩm của bước d (1,73 g, 1,073 mmol) được hòa tan trong TFA (5 ml). Sau khi dung dịch được gia nhiệt ở 30°C trong 3 giờ, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 0% đến 35%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 1,176 g, hiệu suất 76,1%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 606,8, [(M + 3H)/3]+ = 405.

Bước f.



Sản phẩm của bước e (1,176 g, 0,817 mmol) được hòa tan trong MeOH (12 ml), và dung dịch được làm lạnh trong bể nước đá. Nó được xử lý từng giọt bằng dung dịch chứa LiOH monohydrat (344,4 mg, 8,2 mmol) trong nước (9 ml). Hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm và sau đó được axit hóa bằng dung dịch HCl 4N trong dioxan (2 ml). Sau khi các dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách cô quay, phần cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế (Isco ACCQ điều chế, Luna 5µm C18(2) cột 100 Å LC 100mm x 30mm; građien: axetonitril 0%/nước trong 2 phút, sau đó axetonitril 0% đến 15%/nước hơn 12 phút, sau đó isocratic ở axetonitril 15% trong 10 phút, bằng cách sử

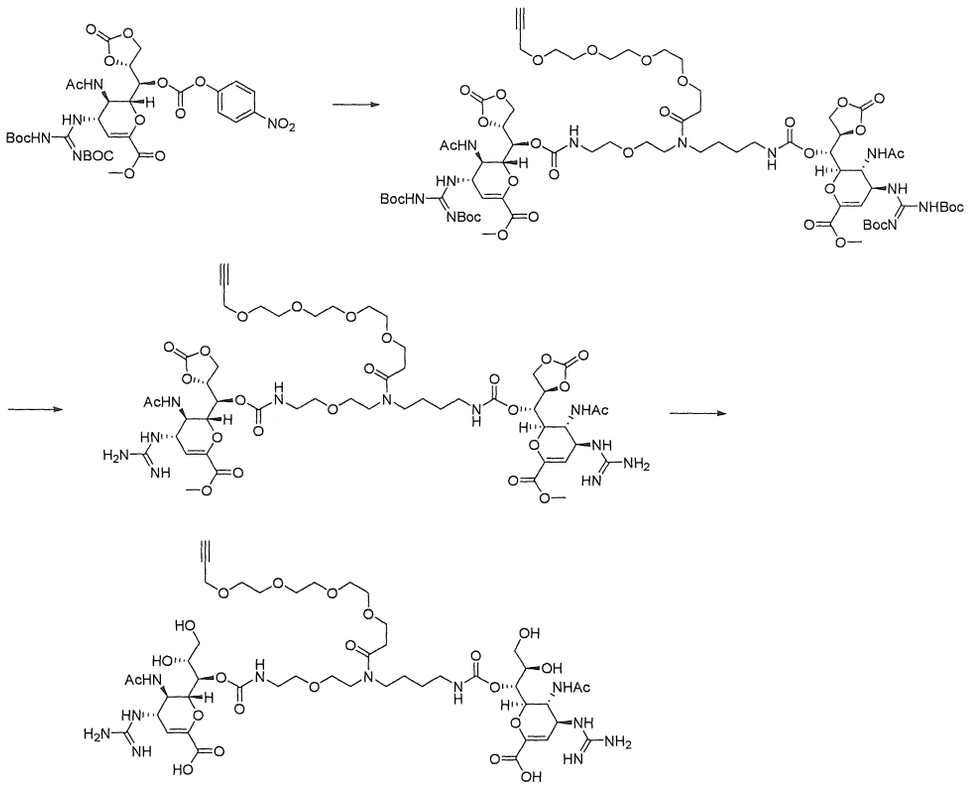
dụng TFA 0,1%). Thu được 108 mg, hiệu suất 9,7%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 566,8, [(M + 3H)/3]+ = 378,2.

Ví dụ 113. Tổng hợp thể liên hợp 32

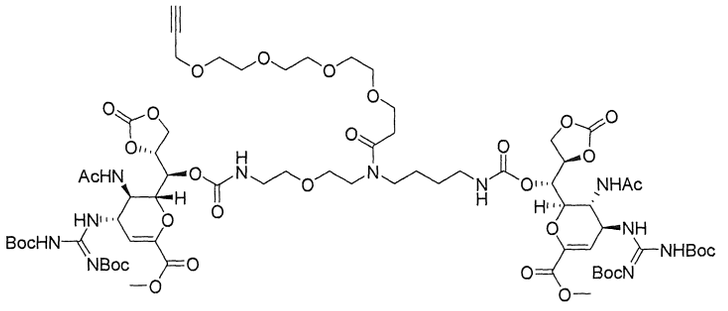
Ống ly tâm vô trùng dung tích 15 ml được nạp natri ascorbat (68,1 mg, 0,344 mmol), THPTA (14,9 mg, 0,0344 mmol), sản phẩm từ Ví dụ 112, Int-72 (17,5 mg, 0,00953 mmol) và PBS pH 7,4 (1 ml). Sau khi khuấy bằng máy xoáy để hòa tan mọi thứ, azido Fc (50 mg, 0.0008588 mmol, được mô tả trong Ví dụ 7 với SEQ ID NO: 4) được bổ sung, tiếp theo là dung dịch chứa $CuSO_4$ (2,05 mg, 0,0129 mmol) trong PBS (0,5 ml). Hỗn hợp được quay trong 20 giờ. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63588. Da (DAR = 3,8). Thu được 30,9 mg, hiệu suất 62%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 32 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 32 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C). Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 114. Tổng hợp Int-73

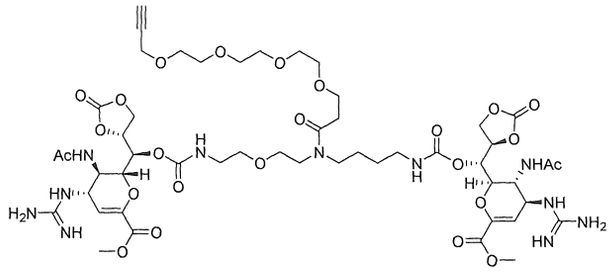


Bước a.



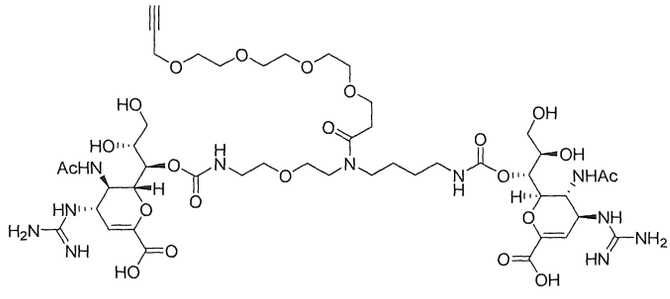
Dung dịch chứa p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (698,4 mg, 0,95 mmol, được mô tả trong Ví dụ 109) trong DCM khan (2 ml) được bổ sung thành các phần hơn 10 phút hỗn hợp chứa liên kết cầu nối trung tâm propargyl diamin (209 mg, 0,426 mmol, được mô tả trong Ví dụ 110) và DIPEA (330,8 mg, 2,56 mmol) trong DMF khan (2 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, nó được cô và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 30% đến 85%/nước, không có chất cải biến TFA). Thu được 531 mg, hiệu suất 69,2%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 807,8, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 757,8.

Bước b.



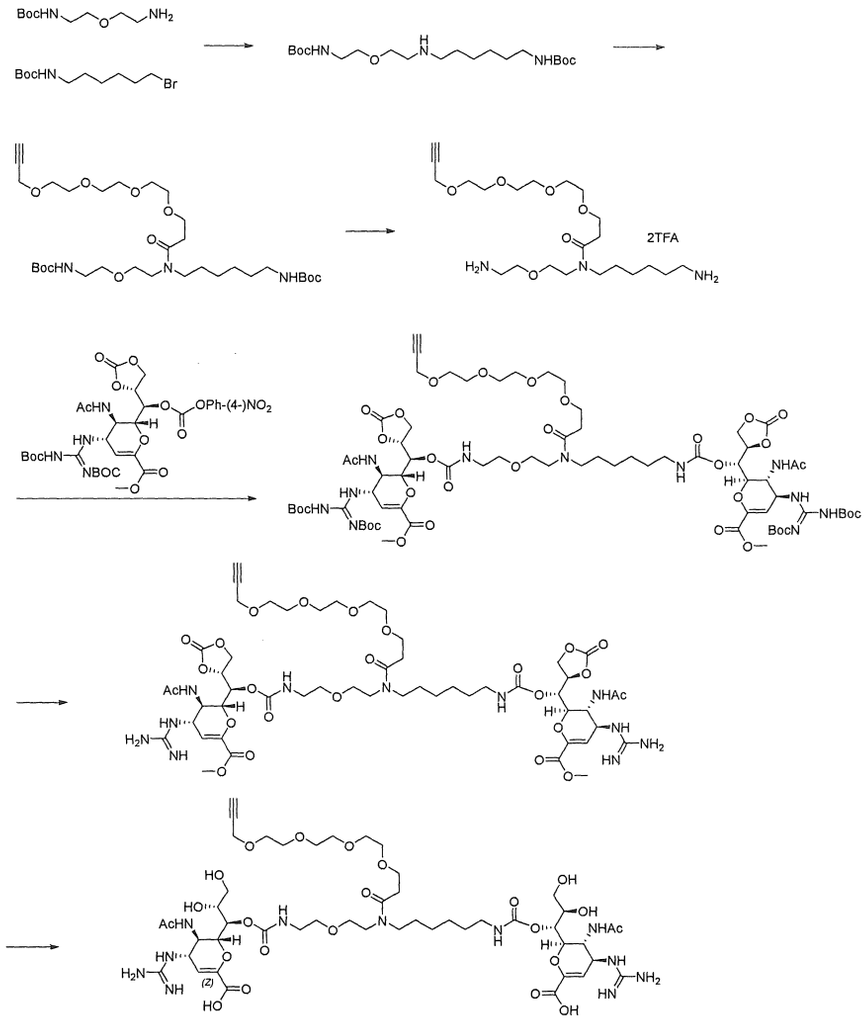
Sản phẩm của bước b (531 mg, 0,329 mmol) được hòa tan trong DCM (1,5 ml) và TFA (1,5 ml), sau đó được khuấy ở 35°C trong 3 giờ. Nó được cô đặc và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5% đến 30%/nước, không có chất cải biến TFA). Thu được 387 mg, hiệu suất 97,1%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 607,6, [(M + 3H)/3]+ = 405,4.

Bước c.

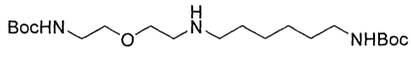


Sản phẩm của bước b (121,4 mg, 0,1 mmol) được hòa tan trong dung dịch NaCl 1,0 M (3 ml) và axetonitril (1 ml). Sau khi dung dịch được làm nguội đến -8°C (bể muối/đá lạnh), NaOH 1,0 M (0,4 ml, 0,4 mmol) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở -14°C đến -8°C trong 6 giờ. Sau đó, nó được trung hòa bằng HCl 4N trong dung dịch dioxan (100 µl) và tinh chế trực tiếp bằng HPLC điều chế (Isco ACCQ điều chế, Luna 5 µm C18(2) cột 100 Å LC 100 mm x 30 mm; građien: axetonitril 0%/nước trong 2 phút, sau đó axetonitril 0% đến 17,8%/nước hơn 12 phút, sau đó isocratic ở axetonitril 17,8% trong 10 phút, bằng cách sử dụng TFA 0,1%). Thu được 85,5 mg, hiệu suất 62,8%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 567,8, [(M + 3H)/3]+ = 378,9.

Ví dụ 115. Tổng hợp Int-74

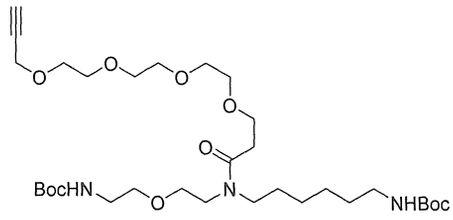


Bước a.



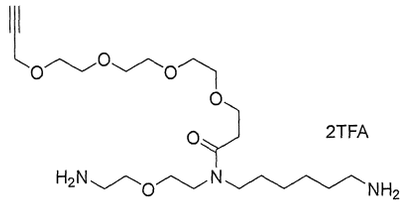
Dung dịch chứa N-Boc-2-(2-amino-ethoxy)etylamin (1,2 g, 5 mmol) trong DMF khan (5 ml) được bổ sung natri cacbonat (691 mg, 5 mmol) và N-Boc-6-bromo-hexylamin (1,4 g, 5 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 70°C trong 24 giờ. Muối sau đó được lọc ra, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cách cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5% đến 50%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 444 mg, hiệu suất 22%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 404,3.

Bước b.



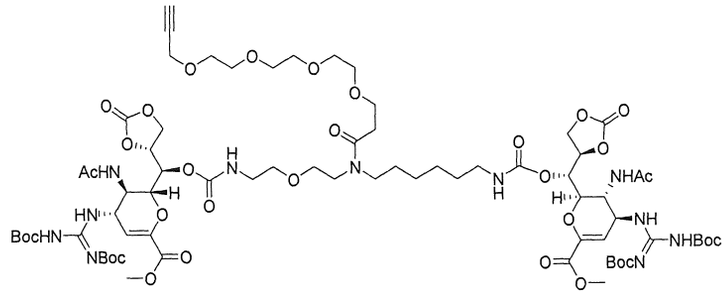
Dung dịch chứa axit propargyl PEG-4 (342,6 mg, 1,32 mmol) và HATU (601,5 mg, 1,58 mmol) trong DMF khan (2 ml) được bổ sung DIPEA (258 mg, 2 mmol). Sau 5 phút, hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào sản phẩm của bước a (444,3 mg, 0,858 mmol) và được khuấy trong 1 giờ. Sau đó, nó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 5% đến 80%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 297,1 mg, hiệu suất 53,6%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 646,2, [M – Boc + H]+ = 546,2.

Bước c.



Sản phẩm của bước b (297,1 mg, 0,46 mmol) được hòa tan trong THF khan (2 ml). dung dịch HCl 4N trong dioxan (4 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Sau đó, nó được cô bằng cách cô quay và tinh chế bằng HPLC điều chế (axetonitril 5% đến 50%/nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 239,6 mg, hiệu suất 77,3%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 446,2.

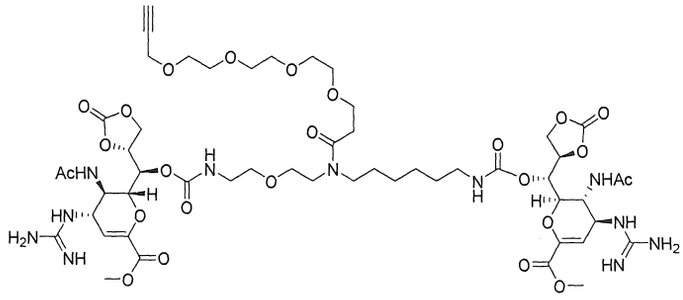
Bước d.



Dung dịch chứa p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (523,8 mg, 0,71 mmol, được mô tả trong Ví dụ 109) trong DCM khan (2 ml) được bổ sung thành các phần

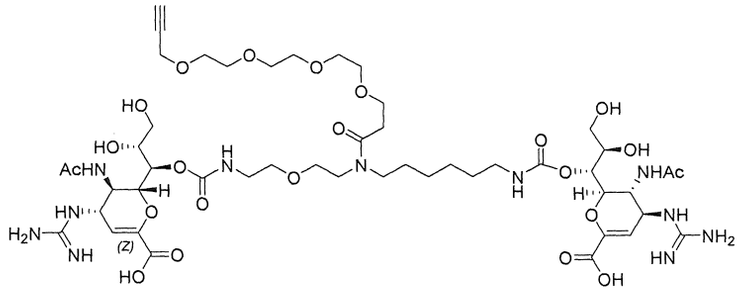
hơn 10 phút hỗn hợp chứa sản phẩm của bước c (239,6 mg, 0,356 mmol) và DIPEA (245,5 mg, 1,9 mmol) trong DMF khan (2 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, nó được cô và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 30% đến 85%/nước, không có chất cải biến TFA). Thu được 553 mg, hiệu suất 96,5%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 821,8, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 771,8.

Bước e.



Sản phẩm của bước d (553 mg, 0,343 mmol) được hòa tan trong DCM (1,5 ml) và TFA (1,5 ml), sau đó được khuấy ở 35°C trong 3 giờ. Nó được cô đặc và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5% đến 30%/nước, không có chất cải biến TFA). Thu được 424,6 mg, hiệu suất 99,6%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 621,6, [(M + 3H)/3]+ = 415,0.

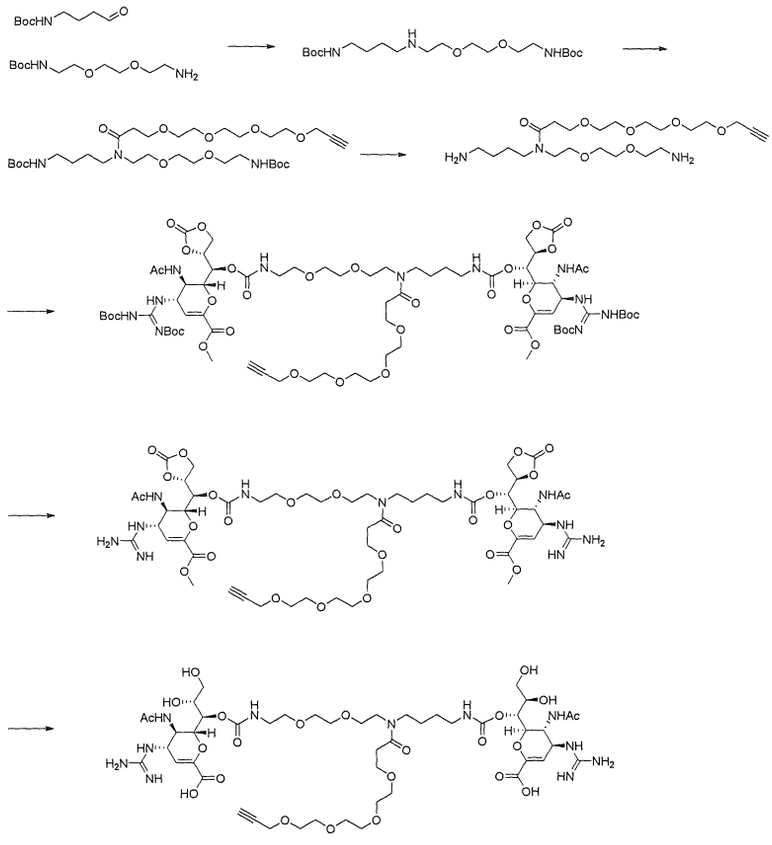
Bước f.



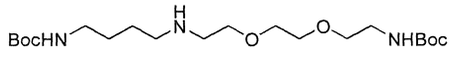
Sản phẩm của bước e (424,6 mg, 0342 mmol) được hòa tan trong dung dịch NaCl 1,0 M (4 ml) và axetonitril (4 ml). Sau khi dung dịch được làm nguội đến -11°C (bể muối/đá lạnh), 1,0 M NaOH (1,53 ml, 1,53 mmol) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở -14°C đến -8°C trong 6 giờ. Sau đó, nó được làm lạnh nhanh bằng 4N HCl trong dung dịch dioxan (375 µl) và tinh chế trực tiếp bằng HPLC điều chế (Isco ACCQ điều chế, Luna 5µm C18(2) cột 100 Å LC 100mm x 30mm;

građien: axetonitril 0%/nước trong 2 phút, sau đó axetonitril 0% đến 20,9%/nước hơn 13,6 phút, sau đó isocratic ở axetonitril 20,9% trong 10 phút, bằng cách sử dụng TFA 0,1%). Thu được 439 mg, hiệu suất 92,3%. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 581,8, [(M + 3H)/3]+ = 388,2.

Ví dụ 116. Tổng hợp Int-75



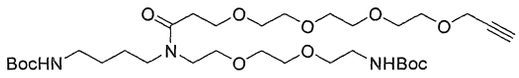
Bước a.



Hỗn hợp chứa tert-butyl (4-oxobutyl) carbamat (850 mg, 4,54 mg) và tert-butyl N-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]etyl} carbamat (1,99 g, 8 mmol) được hòa tan trong DCM (30 ml) và làm khô trên Na_2SO_4. Sau khi lọc và cô đặc, phần cặn được hòa tan lại trong DCM khan (20 ml). Axit axetic (641 mg, 11 mmol) được bổ sung, tiếp theo là natri triaxetoxybohydrua (3,4 g, 16 mmol) thành các phần hơn 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm, sau đó được làm lạnh nhanh bằng AcOH (3 ml) và MeOH

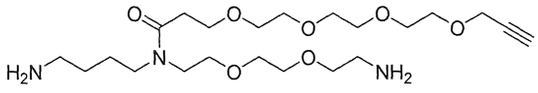
(10 ml). Hỗn hợp được lọc, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cách cô quay và tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5% đến 45% và nước). Thu được 618 mg, hiệu suất 32,5%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 420,4.

Bước b.



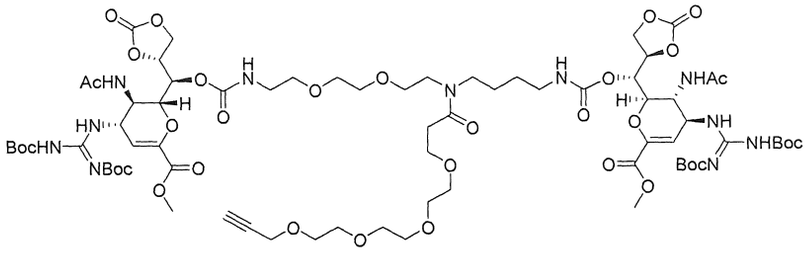
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước b của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 662,4 , [M – Boc + H]+ = 562,4.

Bước c.



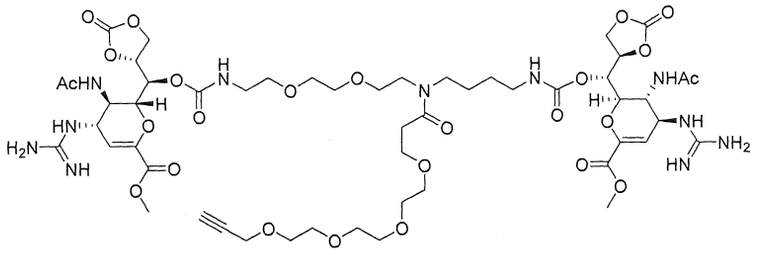
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước c của Ví dụ 115. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 462,4.

Bước d.



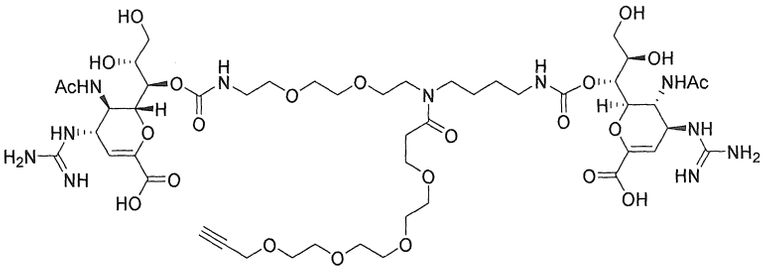
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước d của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 829,8, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 779,8.

Bước e.



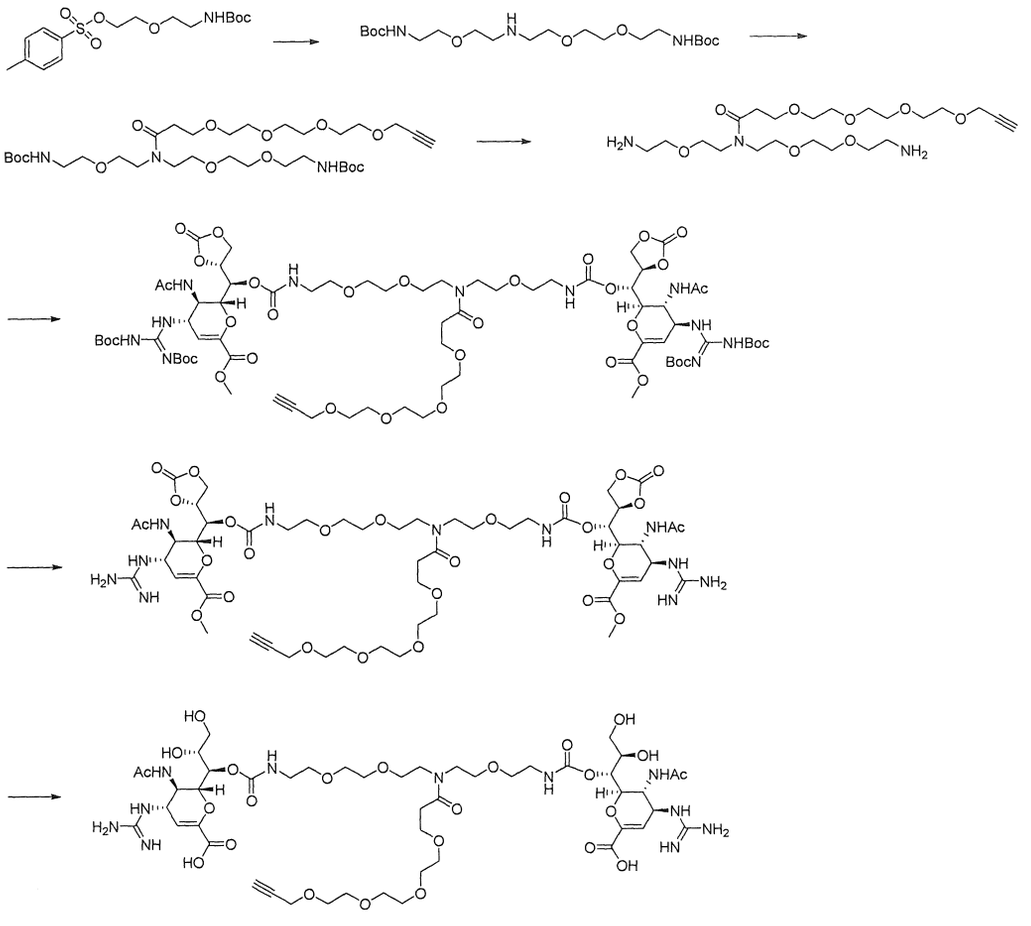
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước e của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 629,8, [(M + 3H)/3]+ = 420,2.

Bước f.

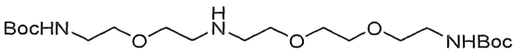


Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước f của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 598,8, [(M + 3H)/3]+ = 393,6.

Ví dụ 117. Tổng hợp Int-76

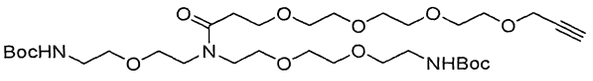


Bước a.



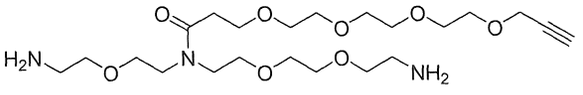
Dung dịch chứa N-Boc-peg-1 tosylat (1,54 g, 4,28 mmol, được mô tả trong Ví dụ 110) trong THF khan (8 ml) được bổ sung tert-butyl N-2{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]etyl} carbamat (1,59 g, 6,42 mmol) và natri cacbonat (453,7 mg, 4,28 mmol). Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở 50°C trong 24 giờ. Chất rắn được lọc và được rửa bằng axetonitril. Sản phẩm lọc được cô đặc và tinh chế bằng RPLC (100 g, axetonitril 5 đến 90% và nước). Thu được 1,15 g, hiệu suất 61,7%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 436,4.

Bước b.



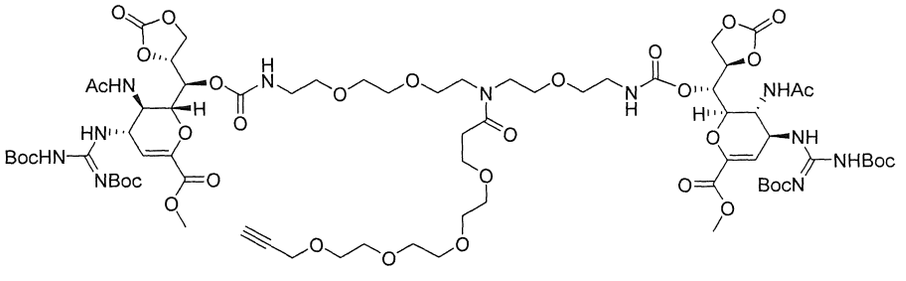
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm từ bước b của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 678,2, [M – Boc + H]+ = 578,2.

Bước c.



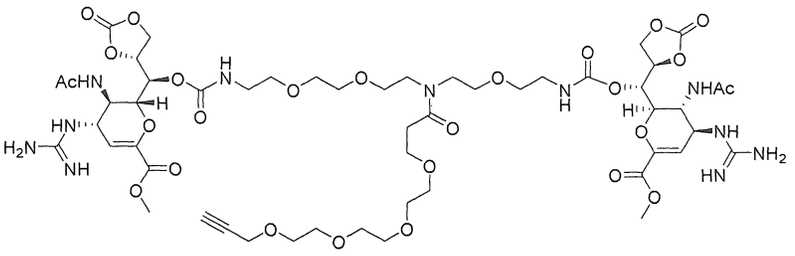
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm của bước c của Ví dụ 115. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 478,2.

Bước d.



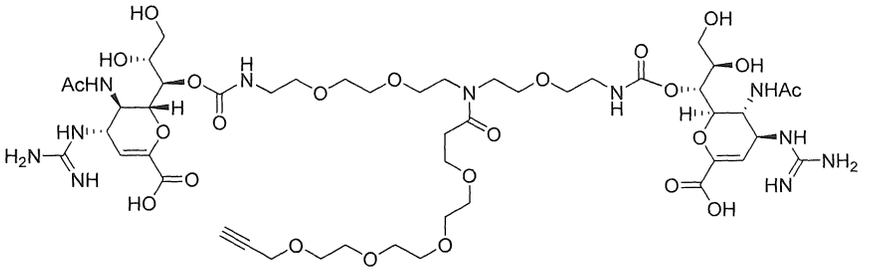
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm từ bước d của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 837,6, [(M - Boc + 2H)/2]+ = 767,8.

Bước e.



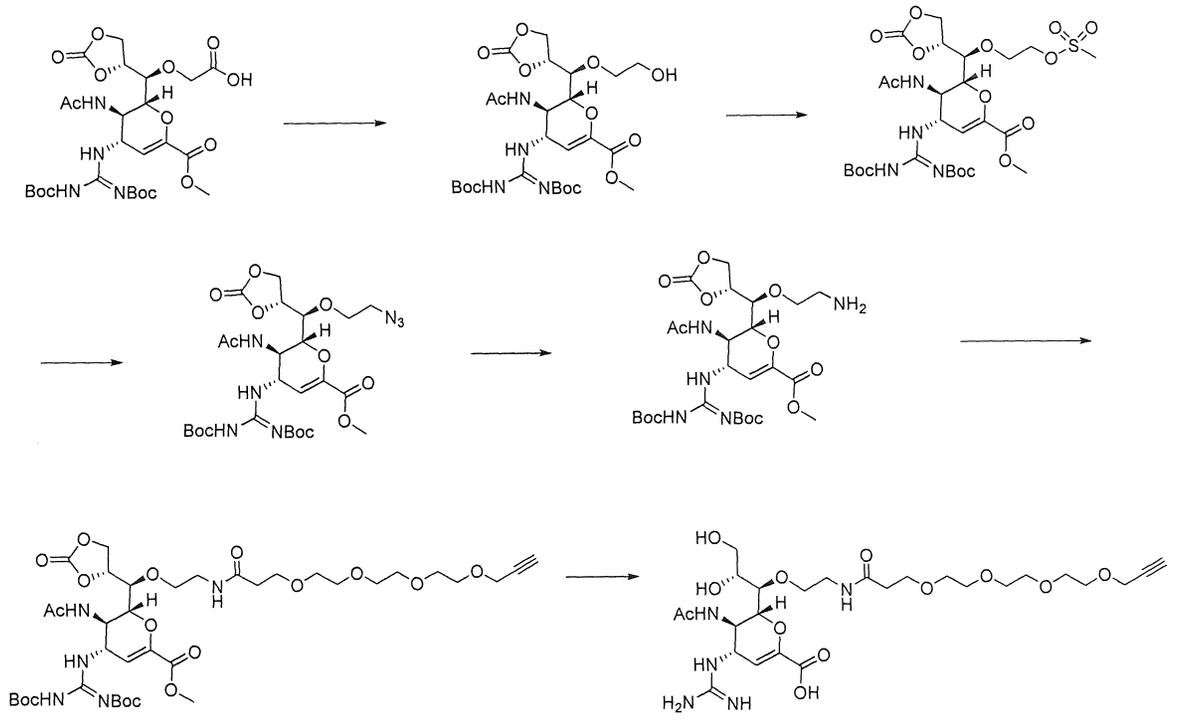
Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm từ bước e của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 637,5, [(M + 3H)/3]+ = 425,6.

Bước f.

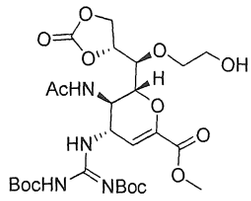


Hợp chất này được điều chế tương tự như sản phẩm từ bước f của Ví dụ 115. Các ion được LCMS phát hiện: [(M + 2H)/2]+ = 597,8, [(M + 3H)/3]+ = 399,0.

Ví dụ 118 Tổng hợp Int-67

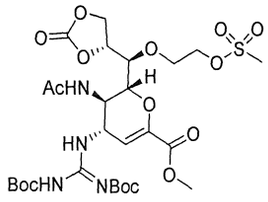


Bước a.



Nguyên liệu ban đầu axit ete zanamivir được điều chế trước đó (0,90 g, 1,43 mmol, được mô tả trong Ví dụ 22) và N-metyl morpholin (0,23 mL, 2,14 mmol) được hòa tan trong THF (35 mL) và làm lạnh đến 0°C (bể nước đá lạnh) trong điều kiện khí quyển nitơ. Isobutyl cloformat (0,24 mL, 1,85 mmol, trong 2 mL DCM) được bổ sung từng giọt, bằng ống tiêm trong khoảng thời gian hơn 5 phút. Hỗn hợp được khuấy ở 0°C trong 30 phút sau đó 15 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh, và sau đó làm lạnh đến 0°C, tại đó natri bohydrua (540 mg, 14,3 mmol, hòa tan trong 5 mL metanol) được bổ sung, từng giọt hơn 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút mà tại điểm đó tất cả nguyên liệu ban đầu đã được tiêu thụ (bằng LC/MS). Một vài giọt (~1 mL) axit axetic băng được bổ sung vào hỗn hợp có tính axit (pH~5). Hỗn hợp được pha loãng bằng etyl axetat và nước và được chiết vào etyl axetat (3x). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, và phần chiết hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, và cô trên thiết bị cô quay. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký silica gel, được làm khô trên xelit đầu tiên, và sau đó được rửa giải với metanol 0%-10% trong DCM hơn 30 phút. Thu được 0,66 g, hiệu suất 75%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 617,2.

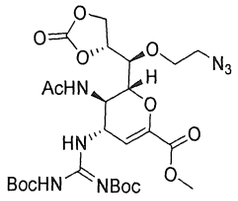
Bước b.



Hỗn hợp khuấy chứa sản phẩm từ bước trước đó (0,66 g, 1,10 mmol), trong 20 mL DCM, được bổ sung trietylamin (0,30 mL, 1,3 mmol). Hỗn hợp được làm lạnh đến 0°C (bể nước đá lạnh) trong điều kiện khí quyển nitơ sau đó được xử lý bằng mesyl clorua (0,15 g, 1,3 mmol), từng giọt hơn 5 phút bằng ống tiêm. Bể đá lạnh được loại

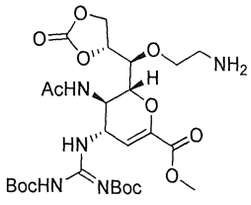
bỏ và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh nhanh bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa, sau đó được chiết vào DCM (3x). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô trên thiết bị cô quay. Thu được 0,74g, hiệu suất 99%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 695,2. Sản phẩm trung gian được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Bước c.



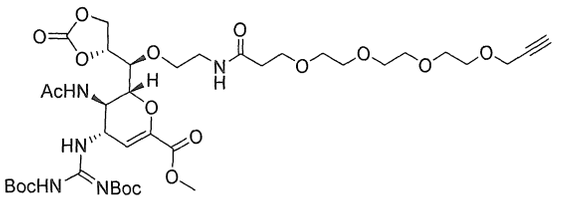
Mesylat từ bước trước đó (0,74 g, 1,1 mmol) được khuấy trong DMF (5mL) ở 80°C với 3 đương lượng natri azit (0,21 g, 3,3 mmol) trong 5 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng nước, được chiết vào DCM (3x). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô đặc. Thu được 0,67 g, hiệu suất 95%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 642,4. Azit được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Bước d.



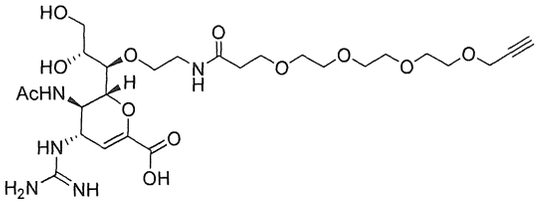
Azit từ bước trước đó (0,67 g, 1,04 mmol) được khuấy trong metanol (20 mL) với sự có mặt của chất xúc tác Lindlar (300 mg) trong điều kiện 1 atm khí hydro trong 12 giờ. Hỗn hợp được lọc qua xelit và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu trong. Amin được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Thu được 0,37 g, hiệu suất 54%, 3 bước. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 616,2.

Bước e.



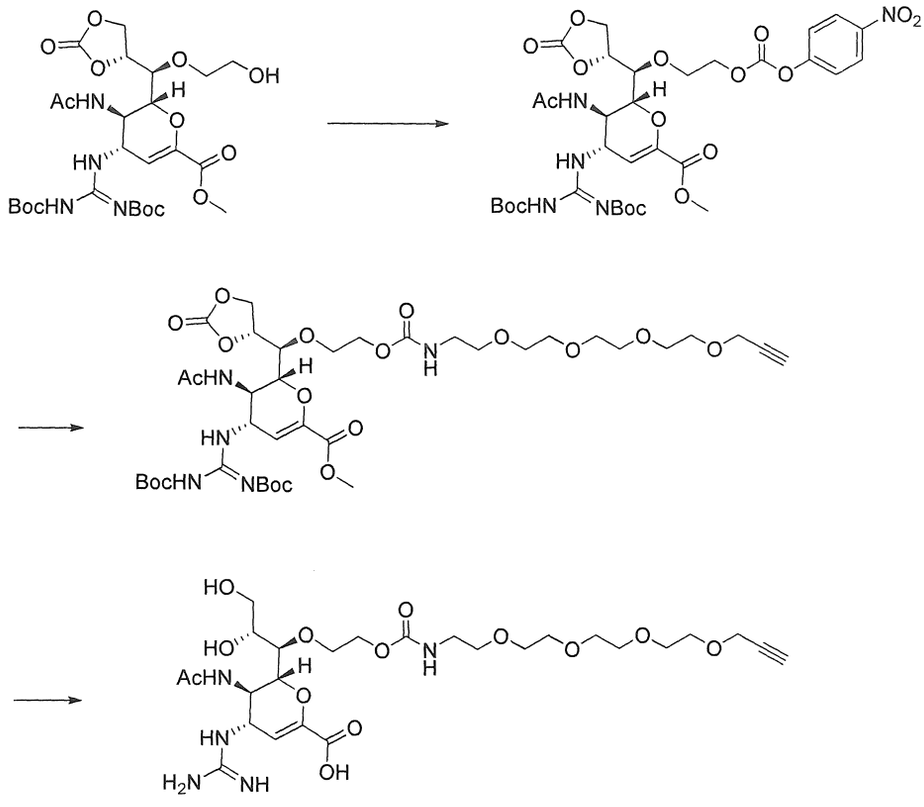
EDC (150 mg, 0,78 mmol) được bổ sung dung dịch khuấy chứa amin từ bước trước đó (370 mg, 0,60 mmol), axit propargyl-peg4-carboxylic (188 mg, 0,72 mmol) và trietylamin (0,100 mL, 0,72 mmoL), hòa tan trong DMF (4mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 10%-95%/nước, không có chất cải biến, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô và đưa trực tiếp vào bước tiếp theo. Thu được 490 mg, hiệu suất 80%. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 858,2.

Bước f.

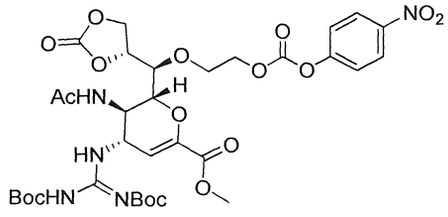


Sản phẩm từ bước trước đó (490 mg, 0,57 mmol) được khuấy trong TFA (4 mL) trong 45 phút sau đó được cô và được đồng sôi với metanol (3x) trên thiết bị cô quay. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 658,2. Phần cặn được khuấy trong metanol/nước với tỷ lệ 1/1 chứa LiOH (43 mg, 1,8 mmol) trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng một vài giọt axit axetic băng và thể tích được giảm một nửa trên thiết bị cô quay. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 0%-75%/nước, TFA 0,1%, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục. Thu được 105 mg, hiệu suất 29%, 3 bước. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 618,2.

Ví dụ 119. Tổng hợp Int-68



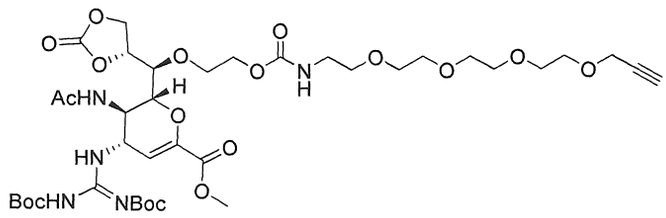
Bước a.



p-Nitrophenyl cloformat (0,23 g, 1,14 mmol) được bổ sung hỗn hợp khuấy chứa rượu bậc một (0,47 g, 0,76 mmol được mô tả trong Ví dụ 118) và trietylamin (0,21 mL, 1,52 mmol) hòa tan trong DCM (15 mL, khan). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ sau đó trimetylamin bổ sung (0,21 mL) và p-nitrophenyl cloformat (230mg) được bổ sung, và tiếp tục khuấy một giờ nữa, tại thời điểm đó hỗn hợp được pha loãng bằng nước, và được chiết vào DCM (3x). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối và làm khô trên natri sulfat. Dung môi được loại bỏ bằng cách cô quay. Phần cặn thô được hòa tan trong DCM (3 mL), được tải lên xelit và tinh chế bằng sắc ký silica gel (etyl axetat 0% đến 70%/hexan, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn

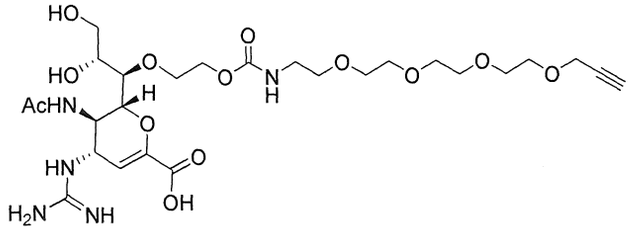
màu trắng. Thu được 525 mg, hiệu suất 88%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 782,2.

Bước b.



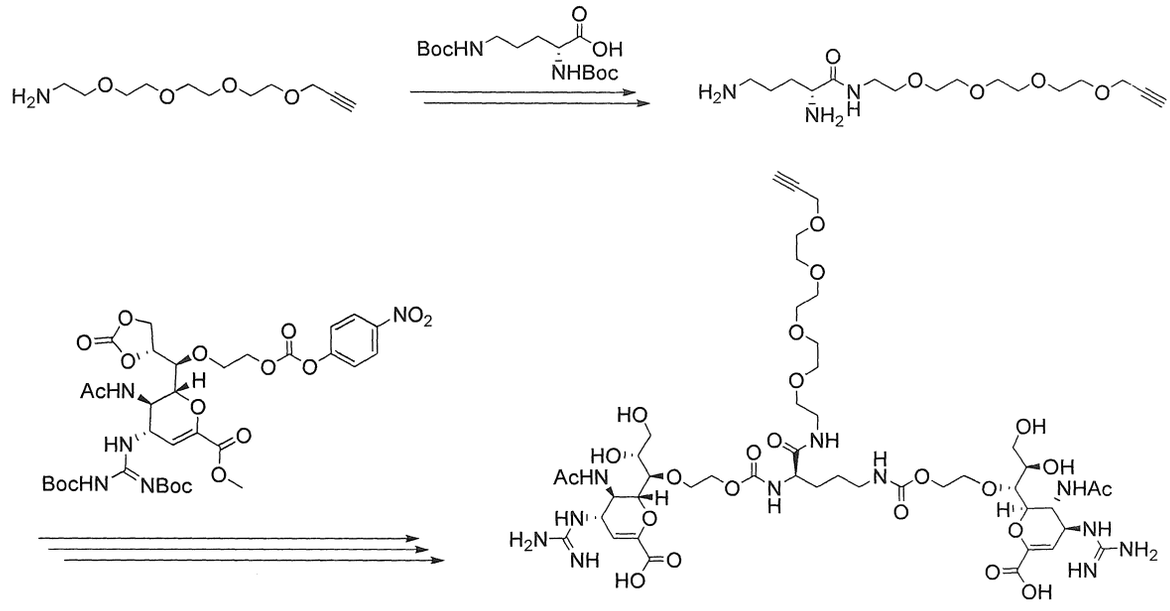
Trietylamin (0,14 mL, 0,97 mmol) được bổ sung dung dịch khuấy chứa propargyl-peg4-amin (181 mg, 0,78 mmol) trong 1 mL axetonitril. Hỗn hợp trietylamin/ propargyl-peg4-amin được bổ sung vào sản phẩm từ bước trước đó (510 mg, 0,65 mmol, trong 2 mL axetonitril) và được khuấy trong 1 giờ mà tại điểm đó tất cả nguyên liệu ban đầus đã được tiêu thụ. Dung môi được loại bỏ trên thiết bị cô quay. Phần cặn thô được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 20-95%/nước, gradien 30 phút, không có chất cải biến). Thu được 475 mg, hiệu suất 83%. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 874,2.

Bước c.

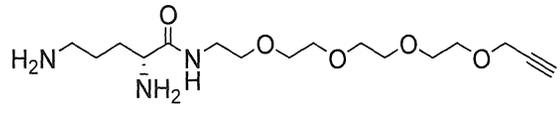


Sản phẩm từ bước trước đó (475 mg, 0,54 mmol), được khuấy trong TFA (5 mL) trong 2 giờ và sau đó được cô và được đồng sôi với metanol (3x) trên thiết bị cô quay. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 674,2. Phần cặn được khuấy hỗn hợp với tỷ lệ 1:1 của metanol/nước chứa LiOH (49 mg, 1,6 mmol) trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng axit axetic băng và sau đó được cô bằng cách cô quay. Sản phẩm được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 0%-75%/nước, TFA 0,1%, gradien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô. Thu được 204 mg, hiệu suất 59%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 634,2.

Ví dụ 120 Tổng hợp Int-77



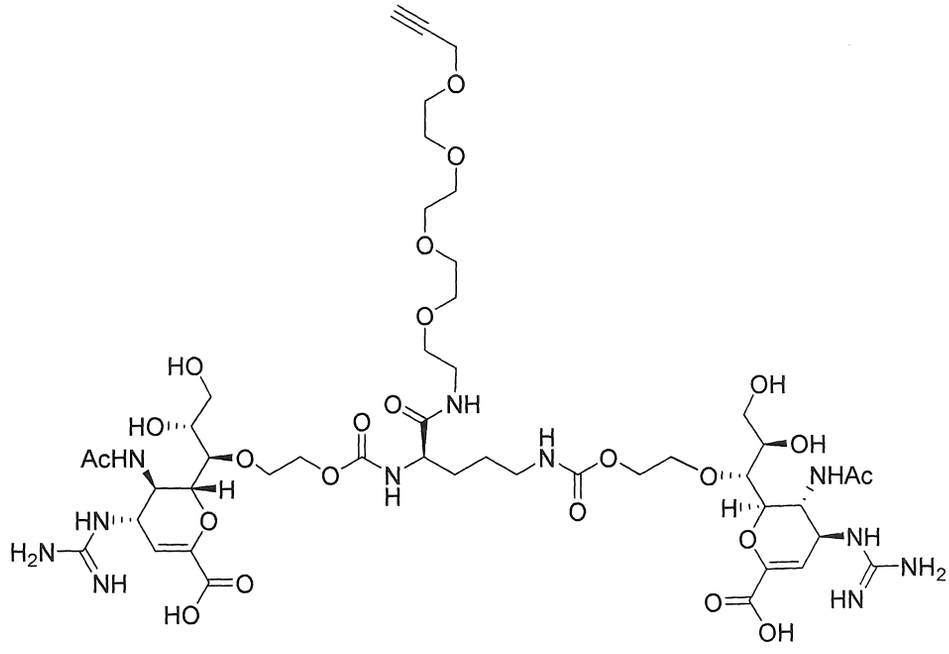
Bước a.



HATU (0,44 g, 1,16 mmol, trong 1,5 mL DMF) được bổ sung từng giọt Dung dịch khuấy chứa propargyl-peg4-amin (0,24 g, 1,05 mmol), bis-Boc-D-ornithin (0,35 g, 1,05 mmol) , và trietylamin (0,59 mL, 4,21 mmol) trong DMF (2 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, sau đó được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 5%-90%/nước, TFA 0,1%, gradien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng dầu trong nhớt. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [M+H]+ = 546,2.

Sản phẩm trung gian được bảo vệ Boc được khuấy trong HCl 4N trong dioxan (10 mL) trong 45 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung môi được loại bỏ bằng cách cô quay, sau đó phần cặn thu được được hòa tan trong nước khử ion (DI) (20 mL), đông lạnh, và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng dầu trong. Thu được 310 mg, hiệu suất 70%, 2 bước. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 346,2.

Bước b.

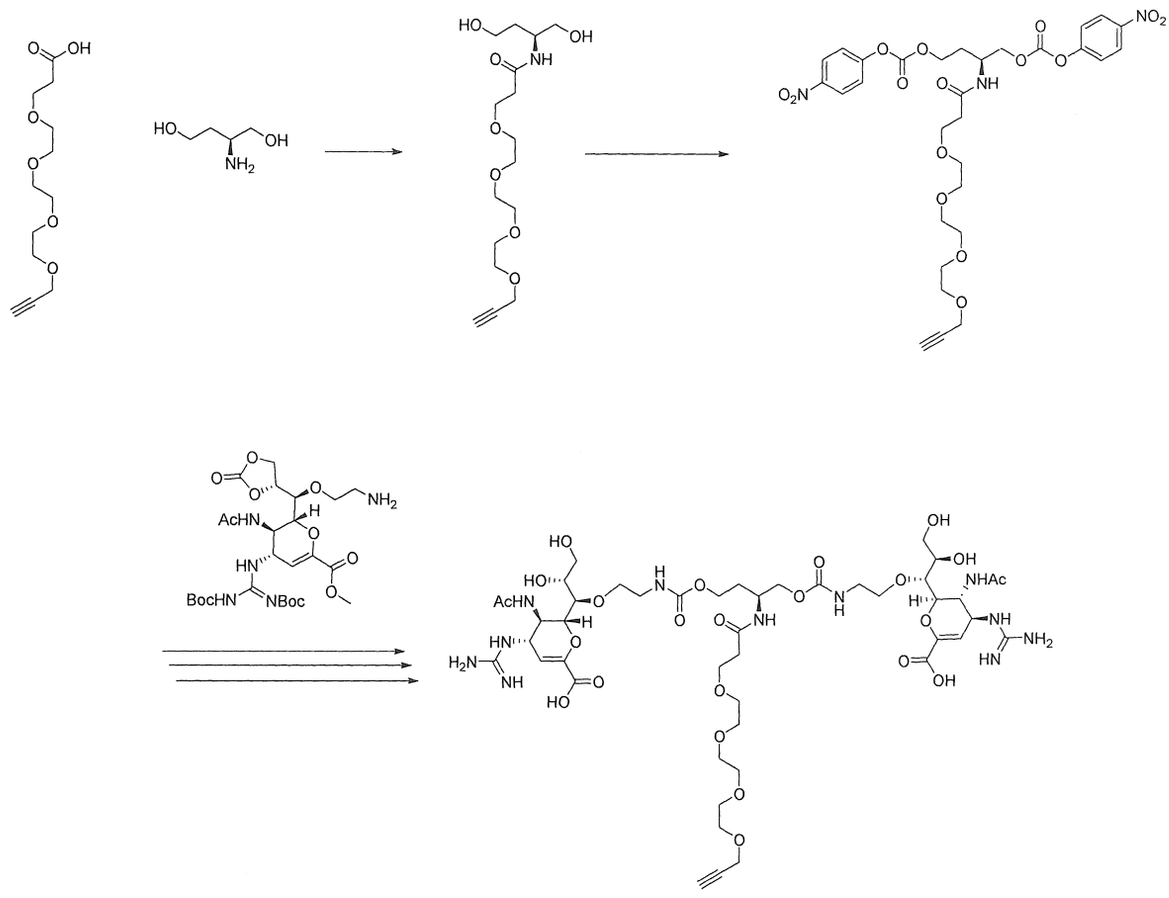


Sản phẩm từ bước trước đó (96 mg, 0,28 mmol) và trietylamin (0,15 mL, 1,11 mmol) trong axetonitril (2 mL) được bổ sung dung dịch khuấy chứa p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (435 mg, 0,56 mmol, được mô tả trong Ví dụ 118, trong 6 mL axetonitril), và được khuấy trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, sau đó 2 giờ ở 80°C. Dung môi được loại bỏ và phần cặn thô được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 10-95%/nước, không có chất cải biến, građien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và cô trên thiết bị cô quay. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [(M+2H)/2]+ = 815,8.

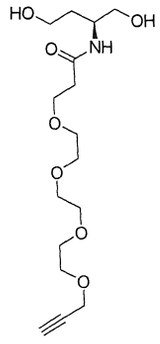
Sản phẩm trung gian này được khuấy trong TFA (5 mL) trong 45 phút sau đó được cô và làm khô trong điều kiện chân không cao. Ion được phát hiện bằng LC/MS[(M+2H)/2]+ = 615,8.

Muối TFA này được khuấy trong MeOH/nước DI (1/1) (5 mL) chứa LiOH (27 mg, 1,11 mmol) trong 30 phút ở 0°C. Hỗn hợp được axit hóa (~pH~5) bằng axit axetic băng. Metanol được loại bỏ bằng cách cô quay và phần cặn thu được được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 5%-70%/nước, TFA 0,1%, građien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô. Thu được 35 mg, hiệu suất 11%, 3 bước. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [(M+2H)/2]+ = 575,8.

Ví dụ 121. Tổng hợp Int-78



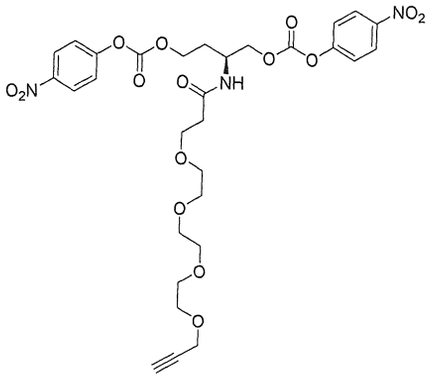
Bước a.



Axit propargyl-PEG4 (640 mg, 2,46 mmol), muối diol-HCl (350 mg, 2,46 mmol), EDC (471 mg, 2,46 mmol), HOBt (377 mg, 2,46 mmol), và trietylamin (249 mg, 2,46 mmol) được khuấy trong DMF (3 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh

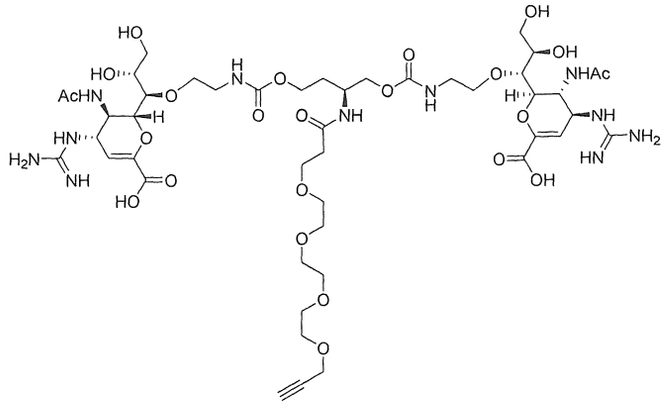
trong 4 giờ. Hỗn hợp được tinh chế trực tiếp bằng RPLC (axetonitril 0%-80%/nước, không có chất cải biến, građien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và cô để thu được sản phẩm dưới dạng dầu trong. Thu được 580 mg, hiệu suất 68%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 348,4.

Bước b.



p-Nitro-phenyl cloformat (1,23g, 1,25 mmol) được bổ sung dung dịch khuấy chứa sản phẩm từ bước trước đó (530 mg, 6,10 mmol) và trietylamin (925 mg, 9,15 mmol) trong DCM (25 mL), sau đó làm lạnh đến 0°C trong điều kiện khí quyển nitơ. Hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở 0°C và sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước DI và được chiết vào DCM (3 x 20 mL). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối và làm khô trên natri sulfat. Phần cặn thô được tinh chế bằng sắc ký silica gel (etyl axetat 10%-100%/hexan, građien 25 phút) để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn màu trắng. Thu được, 250 mg, hiệu suất 24%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 678,2.

Bước c.

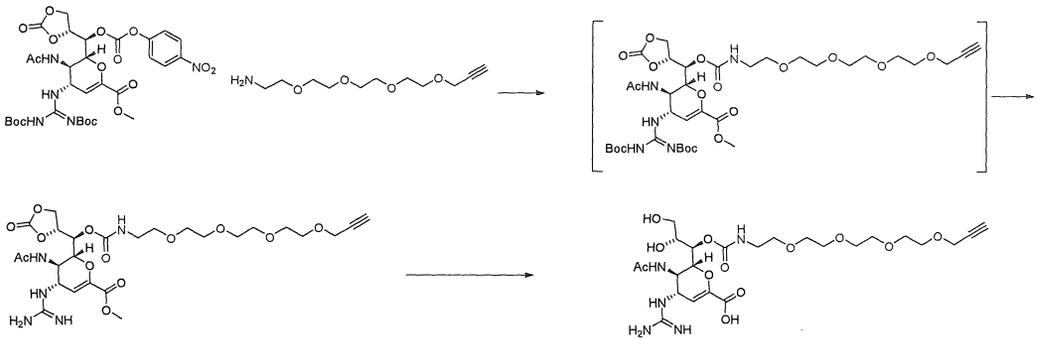


Zanamivir được chức hóa amin (505 mg, 0,82 mmol, được mô tả trong Ví dụ 118) và trietylamin (0,15 mL, 1,11 mmol) trong axetonitril (2 mL) được bổ sung dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước trước đó (220 mg, 0,37 mmol) trong axetonitril (10 mL), và được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trên thiết bị cô quay. Phần cặn thu được được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 15%-95%/nước, không có chất cải biến, gradien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và cô trên thiết bị cô quay. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [(M+2H)/2]+ = 815,2.

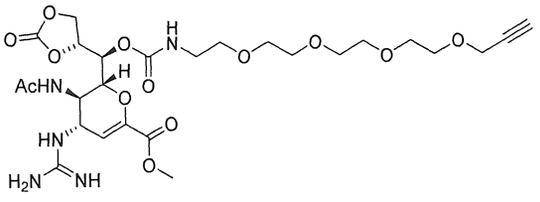
Sản phẩm trung gian này được khuấy trong TFA (5 mL) trong 45 phút sau đó được cô và làm khô trong điều kiện chân không cao. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [(M+2H)/2]+ = 615,2.

Muối TFA thu được được khuấy trong MeOH/nước DI (1/1) (5 mL) chứa LiOH (71 mg, 2,98 mmol) trong 30 phút ở 0°C. Hỗn hợp được axit hóa (~pH~5) bằng axit axetic băng. Metanol được loại bỏ bằng thiết bị cô quay và tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 5%-70%/nước, TFA 0,1%, gradien 35 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô. Thu được 125 mg, hiệu suất 29% cho 3 bước. Ion được phát hiện bằng LC/MS: [(M+2H)/2]+ = 575,8.

Ví dụ 122. Tổng hợp Int-4a



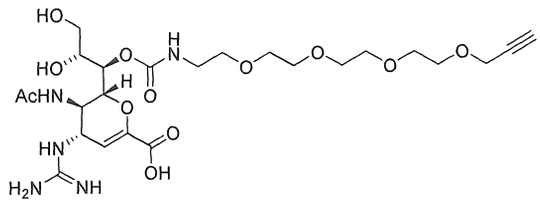
Bước a.



Propargyl-Peg 4-amin (165 mg, 0,71 mmol) được bổ sung dung dịch khuấy chứa p-nitrophenyl cacbonat của zanamivir (350 mg, 0,47 mmol, được mô tả trong Ví dụ 109) trong axetonitril (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, sau đó dung môi được loại bỏ bằng thiết bị cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 10%-95%/nước, không có chất cải biến, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được sản phẩm trung gian được bảo vệ Boc dưới dạng chất rắn màu trắng. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 830,2.

Sản phẩm trung gian này được khuấy trong TFA (5 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Dung môi được loại bỏ bằng thiết bị cô quay và phần cặn được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 10%-95%/nước, TFA 0,1%, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn màu trắng. Thu được 155 mg, hiệu suất 52%, 2 bước. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 630,2.

Bước b.

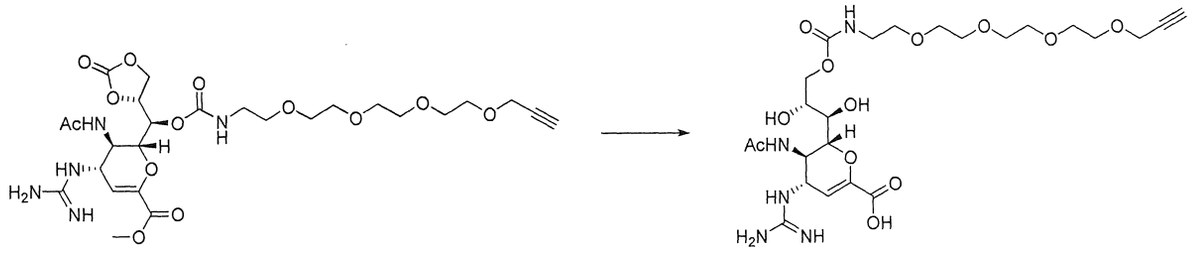


Sản phẩm từ bước trước đó (140 mg, 0,22 mmol) được khuấy trong hỗn hợp với tỷ lệ 1:3 của metanol:nước (8 mL) chứa LiOH (21 mg, 0,89 mmol) ở 0°C trong 20 phút. Hỗn hợp được axit hóa bằng một vài giọt axit axetic băng và cô trên thiết bị cô quay. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 5%-95%/nước, TFA 0,1%, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn màu trắng. Thu được 60 mg, hiệu suất 45%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 590,2.

^{1}H NMR (500 MHz, Metanol-d4) δ 5,86 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,99 (dd, J = 9,0, 2,7 Hz, 1H), 4,55 (dd, J = 9,7, 2,7 Hz, 1H), 4,38 (dd, J = 8,6, 2,6 Hz, 1H), 4,24 – 4,14 (m, 1H), 4,19 (d, J=2,6 Hz, 2H), 4,02-3,98 (m, 1H), 3,74 – 3,59 (m, 13H), 3,54 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,52-3,48 (m, 1H), 3,29-3,22 (m, 2H), 2,84 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 1,96 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 172,33, 163,68, 157,54, 156,58, 106,80, 79,23, 75,91, 74,56, 70,18, 70,13, 69,96, 69,87, 69,59, 69,51, 69,14, 68,74, 62,98, 57,67, 51,11, 40,54, 21,37.

Ví dụ 123. Tổng hợp Int-4b



Sản phẩm trung gian được chức hóa Peg (100 mg, 0,13 mmol, được mô tả trong Ví dụ 122) được khuấy trong hỗn hợp với tỷ lệ 1:3 của metanol:nước (5 mL) chứa LiOH (12 mg, 0,52 mmol) ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 giờ. Hỗn hợp

được axit hóa bằng axit axetic băng và cô bằng thiết bị cô quay. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng RPLC (axetonitril 5-95% trong nước DI, TFA 0,1%, građien 30 phút). Các phân đoạn tinh khiết được gom lại và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn màu trắng. Thu được 21 mg, hiệu suất 31%. Ion được LCMS phát hiện: [M+H]+ = 590,2.

^{1}H NMR (Metanol-d4) δ: 5,86 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,48 (dd, J = 8,6, 2,7 Hz, 1H), 4,42 (dd, J = 9,6, 1,4 Hz, 1H), 4,38 (d, J=12 Hz, 1H), 4,22 – 4,19 (m, 1H), 4,19 (d, J =2,4 Hz, 2H), 4,16-4,12 (dd, J = 11,5, 6 Hz, 1H), 4,09 – 4,02 (m, 1H), 3,75 – 3,58 (m, 13H), 3,55 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 3,33-3,29 (m, 2H), 2,84 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,02 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 172,94, 163,82, 157,90, 157,53, 106,80, 79,23, 76,18, 74,55, 70,19, 70,13, 69,96, 69,90, 69,61, 68,96, 68,74, 68,17, 66,69, 57,67, 50,11, 40,43, 21,33.

Ví dụ 124. Quy trình chung để tổng hợp azido Fc

Điều chế dung dịch este PEG4-azido NHS (0,050 M) trong DMF/PBS: 16,75 mg este PEG4-azido NHS được hòa tan trong 0,100 mL DMF ở 0°C và được pha loãng đến 0,837 mL bằng cách bổ sung PBS 1x dung dịch đệm ở 0°C. Dung dịch này được sử dụng để điều chế PEG4-azido Fc khác với nhiều giá trị DAR khác nhau bằng cách điều chỉnh đương lượng của dung dịch este PBS PEG4-azido NHS này.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp bất kỳ được mô tả ở đây có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của Fc bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C và/hoặc trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột (ví dụ, trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 48-53). Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột của Fc của thể liên hợp được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự thiếu hụt Lys447 (ví dụ, thiếu hụt gốc lisin đầu tận cùng C) và trình tự tín hiệu IgG đầu tận cùng N của chuột. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Xử lý sơ bộ h-lgG1 Fc, SEQ ID NO: 48 (107,2 mg trong 8.800 mL PBS pH 7,4, MW~57891 Da, 1,852 μmol): dung dịch Fc được chuyển vào bốn thiết bị cô ly tâm (30.000 MWCO, 15 mL) và được pha loãng đến 15 mL bằng PBS x1 dung dịch đệm và cô đến thể tích là ~1,5 mL. Phần cặn được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được cô đặc lại. Quy trình rửa được thực hiện lặp lại trong tổng cộng bốn lần, tiếp theo là pha loãng đến 8,80 mL.

Điều chế PEG4-azido Fc: 0,050M PBS của este PEG4-azidoNHS dung dịch đệm (0,593 mL, 29,6 μmol, 16 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch nêu trên chứa h-IgG1 Fc (SEQ ID NO: 48) và hỗn hợp được lắc quay trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch được cô đặc bằng cách sử dụng bốn thiết bị cô ly tâm (30.000 MWCO, 15 mL) đến thể tích là ~1,5 mL. Hỗn hợp thô được pha loãng với tỷ lệ 1:10 trong PBS pH 7,4, và được cô đặc lại. Quy trình rửa được thực hiện lặp lại trong tổng ba lần. Fc-PEG4-azit đã cô đặc được pha loãng đến 8,80 mL bằng dung dịch đệm PBS pH 7,4 và sẵn sàng để liên hợp Click. Nguyên liệu đã tinh chế được định lượng bằng cách sử dụng máy quang phổ UV khả kiến NANODROP™ (sử dụng hệ số tắt được tính toán dựa trên trình tự axit amin của h-IgG1). Hiệu suất là định lượng sau khi tinh chế.

Ví dụ 125. Tổng hợp thể liên hợp 34

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (40 mg, 2,5 mL, 0,69 μmol, được mô tả trong quy trình điều chế chung azido Fc, Ví dụ 124, SEQ ID NO. 18) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (6,0 mg, 8,23 μmol, Int-67, Ví dụ 118). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung dung dịch chứa muối natri của axit L-ascorbic (54 mg, 0,27 mmol), đồng (II) sulfat (0,88 mg, 5,5 μmol), và BTTA (9,4 mg, 22 μmol) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4 (1,09 mL). Hỗn hợp thu được được quay nhẹ qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 64,678 Da (DAR = 7,2). Thu được 24 mg, hiệu suất 54%.

Ví dụ 126. Tổng hợp thể liên hợp 35

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (40 mg, 2,5 mL, 0,69 µmol, được mô tả trong quy trình điều chế chung azido Fc, Ví dụ 124, SEQ ID NO. 18) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (6,1 mg, 8,23 µmol, Int-68 Ví dụ 119). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung vào dung dịch chứa muối natri của axit L-ascorbic (54 mg, 0,27 mmol), đồng (II) sulfat (0,88 mg, 5,5 µmol), và BTTA (9,4 mg, 22 µmol) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4 (1,09 mL). Dung dịch thu được được quay nhẹ qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 64,830 Da (DAR = 7,3). Thu được 23 mg, hiệu suất 52%.

Ví dụ 127. Tổng hợp thể liên hợp 36

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (50 mg, 2,5 mL, 0,86 µmol, được mô tả trong quy trình điều chế chung azido Fc, Ví dụ 124, SEQ ID NO. 18) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (7,1 mg, 5,2 µmol, Int-77, Ví dụ 120). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung dung dịch chứa muối natri của axit L-ascorbic (68 mg, 0,34 mmol), đồng (II) sulfat (1,1 mg, 6,9 µmol), và BTTA (12 mg, 27 µmol) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4 (1,37 mL). Hỗn hợp thu được được quay nhẹ qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63,300 Da (DAR = 3,6). Thu được 37 mg, hiệu suất 73%.

Ví dụ 128. Tổng hợp thể liên hợp 37

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (70 mg, 2,5 mL, 1,2 µmol, được mô tả trong quy trình điều chế chung azido Fc, Ví dụ 124, SEQ ID NO. 18) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (13,3 mg, 9,6 µmol, Int 78, Ví dụ 121). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung dung dịch chứa muối natri của axit L-ascorbic (96 mg, 0,48 mmol), đồng (II) sulfat (1,6 mg, 10 µmol), và BTTA (17 mg, 38 µmol) trong dung dịch đệm PBS pH

7,4 (1,92 mL). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Sau đó, nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63,574 Da (DAR = 3,6). Thu được 42 mg, hiệu suất 61%.

Ví dụ 129. Tổng hợp thể liên hợp 33

Điều chế dung dịch chất phản ứng Click: $CuSO_4$ 0,0050M trong PBS dung dịch đệm: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS, sau đó lấy 5,00 mL dung dịch $CuSO_4$ này và được bổ sung 43,1 mg BTTAA (CAS# 1334179-85-9) và 247,5 mg natri ascorbat để thu được dung dịch chất phản ứng Click ($CuSO_4$ 0,0050M, BTTAA 0,020M và natri ascorbat 0,25M).

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (104,9 mg, 8,60 mL, 18,1μmol; Ví dụ 124, SEQ ID NO: 73 trong ống ly tâm dung tích 15 mL được bổ sung vào phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (29,7 mg, 19,9 μmol, được mô tả trong Ví dụ 100, 2,5 đương lượng cho mỗi azido trên Fc). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch chất phản ứng Click (4,34 mL) chứa (axit L-ascorbic natri, 0,25 M, 1086 μmol, đồng (II) sulfat 0,0050M, 21,7 μmol, và BTTAA 0,020M, 86,9 μmol). Hỗn hợp thu được được quay nhẹ trong 6 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 64550 Da (DAR = 4,6). Thu được 90,7 mg với độ tinh khiết 98%. Thể liên hợp thu được được thể hiện trên FIG. 61.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho thể liên hợp 33 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 33 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 130. Hiệu lực của thể liên hợp 33 đối với Influenza B/Brisbane/60/2008 ở mô hình chuột gây chết

Các chất thử nghiệm được đánh giá về virus cúm B gây chết ở chuột cái BALB/c (Jackson Laboratories, 6-8 tuần tuổi). Virut thử thách (B/Brisbane/60/2008) là thể phân lập được làm được làm thích nghi với chuột có khả năng lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 50 µl (khoảng 1E5 virut cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng isoflurane.

Tất cả các nhóm tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) thể liên hợp 33 (Ví dụ 129), tá dược (PBS), hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc (hIgG1 Fc) hai giờ sau khi thử thách virut. Một nhóm bổ sung được điều trị qua đường miệng bằng oseltamivir (20 mg/kg, hai lần mỗi ngày, trong 5 ngày) bắt đầu 8 giờ sau khi thử thách virut.

Nghiên cứu đánh giá 7 nồng độ liều khác nhau của thể liên hợp 33 (10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, và 0,01 mg/kg). Chuột được theo dõi trong 2 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng, hoặc được phát hiện đang hấp hối, được ghi nhận là chết. Cân nặng cũng được ghi lại để theo dõi sức khỏe chung của các con chuột.

Tất cả các con chuột được xử lý bằng tá dược, hoặc mẫu đối chứng chỉ dùng Fc, đạt đến tỷ lệ chết vào Ngày 8 như dự kiến. Ngược lại, tất cả các con chuột tiếp nhận thể liên hợp 33 được bảo vệ hoàn toàn sau khi tiếp nhận các liều duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch từ 10 xuống đến 0,3 mg/kg trong khoảng thời gian nghiên cứu (Bảng 48). Ngược lại, nhóm được xử lý bằng oseltamivir chỉ dẫn đến 40% mức sống sót mặc dù liều tích lũy mà những con chuột này nhận được là 200 mg/kg trong suốt quá trình thí nghiệm. Hiệu lực của thể liên hợp 33 được hỗ trợ thêm bằng các phép đo cân nặng hàng ngày (Bảng 49; dữ liệu chỉ thể hiện cho đến khi cái chết đầu tiên trong một nhóm). Chuột được xử lý bằng thể liên hợp 33 ở 0,3 mg/kg chỉ chứng minh được sự mất cân nặng tạm thời đạt mức tối đa là 7% trong một ngày. Nghiên cứu này chứng minh một cách tổng thể hiệu lực của thể liên hợp 33 như được đo bằng hai thông số cho thấy khả năng nhiễm cúm B (mức sống sót và cân nặng) đối với chủng cúm thuộc dòng Yamagata.

Bảng 48: % mức sống sót

Ngày sau khi lây nhiễm	PBS	Fc	Thể liên hợp 33				Oseltamivir
		(10 mg/kg)	(10 đến 0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)	(0,01 mg/kg)	
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	60	100	100	100	100	100	100
5	40	40	100	100	60	80	40
6	0	0	100	60	60	40	0
7	0	0	100	60	60	0	0
8	0	0	100	60	60	0	0
9	0	0	100	60	60	0	0
10	0	0	100	60	60	0	0
11	0	0	100	60	60	0	0
12	0	0	100	60	60	0	0
13	0	0	100	60	60	0	0
14	0	0	100	60	60	0	0

Bảng 49: Cân nặng (gm)

Ngày sau khi lây nhiễm	PBS	Fc	Thể liên hợp 33							Oseltamivir
		(10 mg/kg)	(10 mg/kg)	(3 mg/kg)	(1 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)	(0,01 mg/kg)	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99	101	103	98	98	98	98	99	98	98
2	95	97	100	99	97	101	97	97	97	97
3	87	90	101	98	96	97	93	95	92	89
4	82	84	104	99	99	97	93	93	88	85
5	78	79	102	99	99	97	92		84	79
6			98	96	98	93			79	
7			102	98	100	96				
8			101	98	98	97				
9			104	101	102	101				

10			103	100	101	101				
11			104	102	101	101				
12			104	101	102	102				
13			103	102	102	102				
14			103	102	102	101				

Ví dụ 131. Xác định đặc điểm của các chất đồng phân vùng

Các sản phẩm trung gian monome và dime có thể được tạo ra dưới dạng chất đồng phân vùng cụ thể hoặc hỗn hợp chứa các chất đồng phân vùng. Các Ví dụ 100-102 thể hiện phương pháp điều chế các chất đồng phân vùng Int-7 (C7-C7, Ví dụ 100; C7-C9, Ví dụ 101; C9-C9, Ví dụ 102; C7-C7 được tối ưu hóa, Ví dụ 103). Các phương pháp được mô tả trong đó có thể được sử dụng để tách các hỗn hợp của các chất đồng phân vùng của sản phẩm trung gian bất kỳ được mô tả ở đây. Bảng 50 cung cấp đặc điểm của lượng theo tỷ lệ phần trăm tương đối (%) của monome được liên kết C7 và C9 và các dime được liên kết C7-C7, C7-C9, và C9-C9 trong các quy trình tổng hợp sản phẩm trung gian tiền liên hợp được mô tả trước đó.

Bảng 50: Phân tích chất đồng phân vùng

Int	Ví dụ	Monome (M) hoặc Dime (D)	% C7	% C7-C9	% C9
Int-2	Ví dụ 6	D	95	5	
Int-3	Ví dụ 11	D	70	30	
Int-4	Ví dụ 13	M	58		42
Int-4a	Ví dụ 122	M			97
Int-7	Ví dụ 19	D	3	2	95
Int-7a	Ví dụ 100	D	100		
Int-7b	Ví dụ 101	D	5	95	
Int-7c	Ví dụ 102	D			100
Int-25	N/A	D		5	95
Int-26	N/A	D	25	50	25
Int-27	N/A	D	29	35	36
Int-28	N/A	D	5	28	67
Int-31	N/A	D	90		
Int-34	N/A	D	12	6	82
Int-37	N/A	M			95
Int-71	Ví dụ 110	D	3	97	
Int-72	Ví dụ 112	D		100	

Ví dụ 132. Hiệu lực của thể liên hợp 33 tiêm dưới da chống lại chủng cúm A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ở mô hình chuột gây chết

Thể liên hợp 33 được đánh giá đối với lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây chết ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột và có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 6 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg). Tỷ lệ tử vong và cân nặng được ghi lại hàng ngày và con chuột bất kỳ giảm 20% cân nặng đều được coi là chết.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một lần điều trị dưới da (SC) duy nhất của thể liên hợp 33, mẫu đối chứng hIgG1 Fc, hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 51.

Bảng 51: Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu cúm A/PR/8/34 (H1N1)

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Lượng liều (ml/kg)	# chuột
1	Tá dược	SC, T+2 giờ	na	10	5
2	hIgG1 Fc	SC, T+2 giờ	1	10	5
3	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	1	10	5
4	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,3	10	5
5	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,1	10	5
6	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,03	10	5

Như mong đợi, chuột tiếp nhận tá dược hoặc mẫu đối chứng hIgG1 Fc đã chết vì lây nhiễm vào Ngày 6-7 (Bảng 52). Tuy nhiên, chuột được xử lý bằng thể liên hợp 33 được bảo vệ hoàn toàn ở mức liều 1, 0,3 và 0,1 mg/kg. Tỷ lệ tử vong với thể liên hợp 33 chỉ được nhìn thấy ở nồng độ liều thấp nhất là 0,03 mg/kg.

Bảng 52: Tỷ lệ sống sót theo ngày nghiên cứu (n=5)

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược	hIgG1 Fc	Thể liên hợp 33			
		(1,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
0	100	100	100	100	100	100

1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100
6	40	60	100	100	100	100
7	0	0	100	100	100	60
8	0	0	100	100	100	0
9	0	0	100	100	100	0
10	0	0	100	100	100	0
11	0	0	100	100	100	0
12	0	0	100	100	100	0
13	0	0	100	100	100	0
14	0	0	100	100	100	0

Hiệu lực của thể liên hợp 33 được hỗ trợ thêm bằng các phép đo cân nặng hàng ngày. Như mong đợi, chuột được xử lý bằng tá dược hoặc hIgG1 Fc đã chứng minh sự giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt quá 20%, tại thời điểm đó chúng đã được ghi điểm là tử vong (Bảng 53).

Ngược lại với chuột đối chứng, các nhóm này tiếp nhận thể liên hợp 33 ở 1, 0,3, và 0,1 mg/kg duy trì cân nặng khỏe mạnh trong suốt quá trình nghiên cứu và không bao giờ cho thấy tình trạng giảm cân tạm thời dưới 8% (nhóm liều 0,1 mk/kg, Ngày 8; Bảng 53). Bằng cả hai phép đo mức sống sót và cân nặng của thể liên hợp 33 đã chứng minh khả năng bảo vệ mạnh trước thử thách gây tử vong của chủng chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 chỉ với một liều tiêm dưới da thấp tới 0,1 mg/kg.

Bảng 53: Dữ liệu cân nặng (gm)

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược	hIgG1 Fc	Thể liên hợp 33			
		(1,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
0	100	100	100	100	100	100
1	98,1	97,6	98	98,6	98,7	98,5
2	100,9	99	100,3	101,3	101,6	99,9
3	94,1	92,6	98,4	100,5	96,5	93,9
4	86	85,7	102,6	99,2	93,5	88,6
5	79,8	79,1	98,2	97,7	94,9	86,5
6	75,3	75,2	102,2	102,3	99,4	84,6
7			103,5	102,9	95,2	78,4

8			101,8	103,2	92,4	
9			101,2	102,9	95,4	
10			101,3	102,5	98,8	
11			102,8	102,6	98,7	
12			102,4	100,7	98,6	
13			102,2	101,1	98,3	
14			100,2	102	99,6	

Ví dụ 133. Hiệu lực của thể liên hợp 33 đối với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), nồng độ PFU phổi và mức xytokin

Các nghiên cứu về hiệu lực cho thể liên hợp 33 được thực hiện trong 6-8 tuần, chuột cái BALB/c (Charles River) được thử thách bằng đường mũi với 3E2 PFU/chuột (gấp 3 lần LD95) của virut cúm A/PR/8/1934 (H1N1) thích nghi ở chuột. Thể liên hợp 33 hoặc mẫu đối chứng IgG1 Fc của người được dùng dưới dạng liều tiêm dưới da (SC) duy nhất 2 giờ sau khi thử thách ở liều 0,1 – 3 mg/kg. Oseltamivir được dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày trong 4 ngày, bắt đầu 2 giờ sau khi lây nhiễm với liều 5 hoặc 50 mg/kg. Baloxavir được tạo lại huyền phù trong metylxenluloza 0,5% và dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày trong 4 ngày bắt đầu 2 giờ sau khi lây nhiễm với liều 30 mg/kg (Bảng 54). Cân nặng (BW) được ghi lại trong 4 ngày (FIGS. 62A-62B). Ở thời điểm 4 ngày sau khi lây nhiễm, chuột bị giết bằng CO_2 và cả hai thùy phổi được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất với hạt silic oxit 1 mm trong 1 mL PBS bằng cách sử dụng máy ly giải MagNA (Roche). Việc nghiền đồng nhất được thực hiện ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 60 giây và ướp lạnh trong đá trong 5 phút giữa các lần chạy. Sau khi nghiền đồng nhất phổi, các ống được ly tâm trong 10 phút ở 600 x g và dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào ống mới.

Bảng 54: Thiết kế nghiên cứu

Chất thử nghiệm (DAR)	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng [mg/kg]
PBS	IV, T+2 giờ	N/A
hIgG1 Fc	IV, T+2 giờ	3
Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	5
Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	50
Baloxavir	SC, hai lần mỗi ngày x 4	30
Thể liên hợp 33 (4,7)	SC, T+2 giờ	0,1
Thể liên hợp 33 (4,7)	SC, T+2 giờ	0,3
Thể liên hợp 33 (4,7)	SC, T+2 giờ	1
Thể liên hợp 33 (4,7)	SC, T+2 giờ	3
không bị lây nhiễm	N/A	N/A

Để xác định PFU, dịch nổi trên bề mặt của dịch đồng nhất phổi được pha loãng trong dung dịch đệm lây nhiễm từ 10-1 đến 10-6. 100 µL dung dịch pha loãng virus được bổ sung vào lớp đơn hợp lưu chứa tế bào MDCK trong các đĩa 24 giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc mỗi 15 phút. Sau khi loại bỏ virut, môi trường phủ chất lỏng chứa Avicel được bổ sung vào tế bào MDCK. Các tế bào được ủ ở 37°C, CO_2 5% trong 40 giờ. Sau khi ủ, môi trường được loại bỏ và tế bào được nhuộm bằng tinh thể tím để đếm mảng bám và đơn vị hình thành mảng bám (PFU) được tính theo trọng lượng của phổi (PFU/g phổi). Đối với phân tích xytokin, dịch nổi trên bề mặt của của dịch đồng nhất phổi được pha loãng theo chuỗi 2 lần trong đĩa 96 giếng. Mức xytokin đối với INF-γ, TNF-α, IL-6, MIP-1α và MCP-1 được xác định bằng ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất (R&D Systems). Sau khi thử thách gây tử vong với bệnh cúm ở mô hình chuột, nồng độ PFU phổi (FIGS. 63A-63B) và mức xytokin của phổi được xác định vào ngày 4 sau khi lây nhiễm (Bảng 55, và Bảng 56, lần lượt). Thể liên hợp 33 đã chứng minh sự giảm logarit phụ thuộc vào liều lượng trong nồng độ virut dẫn đến giá trị 0,7 ở 0,1 mg/kg, 1,88 ở 0,3 mg/kg, 3 ở 1 mg/kg và 3,8 ở 3 mg/kg. Oseltamivir ở 5 mg/kg và 50 mg/kg có tác dụng vừa phải nhất đến nồng độ virut dẫn đến giảm lần lượt 0,86 và 2 logarit. Baloxavir làm giảm nồng độ virut xuống dưới giới hạn phát hiện, 1e2 PFU/mL, nhờ đó làm giảm nồng độ virut > 5,99 log so với mẫu đối chứng dùng PBS.

Không có sự khác biệt có ý nghĩa sinh học được quan sát giữa các mẫu đối chứng âm tính, PBS và hIgG1 Fc như mong đợi.

Thể liên hợp 33 giảm nồng độ virut trong sự phụ thuộc vào liều lượng vào ngày 4 sau khi lây nhiễm được thử thách với cúm A ở mô hình chuột (Bảng 55, FIG. 64A-64B). Tương tự, thể liên hợp 33 đã chứng minh sự giảm gấp đôi phụ thuộc vào liều lượng ở mức xytokin đối với TNF-α, IL-6, INF-γ, MCP-1, và MIP-1α (FIG. 65A-65E, lần lượt) so với mẫu đối chứng không bị lây nhiễm vào ngày 4 sau khi lây nhiễm được thử thách với cúm A ở mô hình chuột (Bảng 56).

Bảng 55: Nồng độ PFU

Chất thử nghiệm [mg/kg]	PFU/g	Mức giảm logarit
PBS [0]PBS	3,26E+07	0,0
hIgG1 Fc [3]	1,74E+07	0,364

Chất thử nghiệm [mg/kg]	PFU/g	Mức giảm logarit
Oseltamivir [5]	4,78E+06	0,86
Oseltamivir [50]	3,81E+05	2
Baloxavir [30]	<1,00E+02*	>5,99*
Thể liên hợp 33 [0,1]	6,85E+06	0,715
Thể liên hợp 33 [0,3]	5,31E+05	1,88
Thể liên hợp 33 [1]	3,69E+04	2,99
Thể liên hợp 33 [3]	5,84E+03	3,77

* Baloxavir làm giảm nồng độ virut xuống dưới giới hạn phát hiện.

Bảng 56: Mức xytokin của phổi

Chất thử nghiệm [mg/kg]	INF-γ	TNF-α	IL-6	MCP-1	MIP-1α
PBS [0]	1,6	1,4	4,2	38,6	18,1
hIgG1 Fc [3]	1,7	1,2	3,3	36,3	15,9
Oseltamivir [5]	1,0	0,8	1,8	24,0	6,3
Oseltamivir [50]	0,8	0,8	1,4	16,2	4,0
Baloxavir [30]	1,2	1,0	1,0	1,0	0,8
Thể liên hợp 33 [0,1]	1,1	0,7	0,8	19,1	5,6
Thể liên hợp 33 [0,3]	1,1	0,9	0,8	9,6	3,9
Thể liên hợp 33 [1]	0,9	0,7	1,1	5,7	1,7
Thể liên hợp 33 [3]	0,8	0,7	1,1	1,8	1,0
Không bị lây nhiễm	1	1	1	1	1

Nồng độ cao nhất được thử nghiệm của thể liên hợp 33 ở mức 3 mg/kg không cho thấy giảm cân trong suốt quá trình lây nhiễm tương tự như mẫu đối chứng chuột không bị lây nhiễm (Bảng 57).

Bảng 57: Dữ liệu cân nặng (% mức giảm)

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4
PBS [0]	0	-3,5	-2,86	-10,96	-17,32
hIgG1 Fc [3]	0	-2,6	-1,3	-9,58	-15,6
Oseltamivir [5]	0	-2,86	-2,42	-8,16	-13,88
Oseltamivir [50]	0	-3,78	-2,12	-3,22	-5,74
Baloxavir [30]	0	-2,38	-2,82	-2,6	-0,18
Thể liên hợp 33 [0,1]	0	-3,24	-2,32	-10,12	-11,46
Thể liên hợp 33 [0,3]	0	-2,16	1,34	-3,4	-4,36
Thể liên hợp 33 [1]	0	-1,5	-0,9	-1,98	-0,9
Thể liên hợp 33 [3]	0	-1,7	-1,6	-1,9	0,52
Không bị lây nhiễm	0	1,02	-0,14	-0,16	2,8

Ví dụ 134. Hiệu lực của thể liên hợp 33 chống lại cúm A (H1N1) in a lethal Severe Combined Immunodeficiency (SCID) mouse model.

Các chất thử nghiệm được đánh giá về lây nhiễm cúm A gây tử vong ở chuột scid cái BALB/c (Jackson Laboratories, 6-8 tuần tuổi). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây ra lây nhiễm gây chết ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 11 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl (khoảng 1E3 virut cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg).

Các nhóm tiếp nhận một lần điều trị SC duy nhất bằng tá dược (PBS), mẫu đối chứng hIgG1 Fc, hoặc thể liên hợp 33 (3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 mg/kg) hai giờ sau khi thử thách virut. Một nhánh riêng biệt của nghiên cứu bao gồm 3 nhóm chuột được xử lý bằng baloxavir marboxil (DC Chemicals, Thượng Hải, Trung Quốc) dùng qua đường miệng, hai lần mỗi ngày, trong 1 ngày; cũng bắt đầu 2 giờ sau khi thử thách virut.

Chuột được theo dõi trong 2 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng hoặc được phát hiện đang hấp hối được ghi nhận là tử vong.

Vào cuối nghiên cứu (Ngày 14) chuột tiếp nhận thể liên hợp 33 được bảo vệ hoàn toàn ở tất cả các nồng độ liều từ 3 đến 0,1 mg/kg (Bảng 58). Thể liên hợp 33 chỉ không bảo vệ được đối với thử thách virut gây chết ở nồng độ thử nghiệm thấp nhất là 0,03 mg/kg. Như mong đợi, các nhóm tiếp nhận tá dược hoặc hIgG1 Fc không được bảo vệ. Chuột được xử lý bằng baloxavir cũng được bảo vệ, nhưng ở liều tích lũy cao hơn đáng kể là 60 và 20 mg/kg, ở liều tổng cộng là 6 mg/kg chỉ có 40% số chuột sống sót đến Ngày 14.

Bảng 58: % mức sống sót vào Ngày 14.

Tá dược	hIgG1 Fc	Baloxavir			Thể liên hợp 33				
(PBS)	(3,0 mg/kg)	(30 mg/kg)	(10 mg/kg)	(3,0 mg/kg)	(3,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
0	0	100	100	40	100	100	100	100	0

Hiệu lực của thể liên hợp 33 trong mô hình tình trạng suy giảm miễn dịch nghiêm trọng này cũng đã được chứng minh dựa trên cân nặng (Bảng 59). Nồng độ

thấp nhất của thể liên hợp cung cấp sự bảo vệ đầy đủ dựa trên kết quả đọc tỷ lệ tử vong là 0,1 mg/kg. Ở mức liều này, mức giảm cân trung bình lớn nhất đối với nhóm là tạm thời, và dẫn đến ít hơn 5% mức giảm (xảy ra vào Ngày 2). Hơn nữa, sự khác biệt về cân nặng giữa các nhóm ở mức liều 1 và 3 mg/kg cho thấy sự khác biệt ít hơn 2% vào Ngày 14 so với chuột không bị lây nhiễm.

Tổng hợp dữ liệu này chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 33 bằng cách bảo vệ các con chuột bị thử thách gây tử vong với các liều SC duy nhất của thể liên hợp thấp tới 0,1 mg/kg. Điều này đã được thực hiện trong một vài mô hình suy giảm miễn dịch nghiêm trọng với các con chuột hoàn toàn thiếu hụt các tế bào miễn dịch T & B, vốn rất cần thiết để loại bỏ các lây nhiễm cúm. Dữ liệu này hỗ trợ việc sử dụng thể liên hợp 33 để điều trị cho các quần thể bệnh nhân suy giảm miễn dịch.

Bảng 59: % Cân nặng trung bình theo ngày. (mg/kg). Dữ liệu chỉ thể hiện cho đến khi xuất hiện ca tử vong đầu tiên trong nhóm.

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược	hIgG1 Fc	Baloxavir			Thể liên hợp 33					Không bị lây nhiễm
	(PBS)	(3 mg/kg)	(30 mg/kg)	(10 mg/kg)	(3 mg/kg)	(3 mg/kg)	(1 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)	
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	99,0	98,9	91,5	97,3	99,0	99,6	98,8	97,6	99,7	99,5
2	99,0	100,8	99,1	97,3	100,1	100,1	99,9	100,7	95,8	98,6	99,8
3	94,0	93,0	97,0	96,4	97,4	100,0	98,9	97,6	97,0	96,7	98,8
4	93,0	89,7	99,1	95,9	99,0	101,0	99,8	99,2	97,8	94,4	99,9
5	87,0	84,4	99,1	97,5	96,6	99,0	98,6	96,3	97,4	93,0	100,9
6	82,0	80,1	97,9	97,9	97,0	100,6	99,7	99,9	98,7	91,6	100,2
7	78,0		98,6	97,0	97,2	101,9	99,6	99,6	98,1	87,0	101,0
8			98,6	96,4	95,4	100,9	98,2	99,2	98,3	82,2	100,4
9			99,6	95,1	93,1	100,6	98,4	100,0	97,0		100,7
10			96,0	95,9	90,5	98,8	98,8	98,5	95,8		100,2
11			97,3	97,3		99,0	99,3	98,3	96,0		99,7
12			98,7	95,8		99,1	99,4	98,1	96,3		100,4
13			98,6	96,8		98,4	99,0	97,9	97,3		99,7
14			97,9	95,9		99,3	99,3	98,1	97,8		100,5

51349

660/1174

Ví dụ 135. Hiệu lực của thể liên hợp 33 tiêm dưới da chống lại bệnh cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm ở mô hình chuột gây chết.

Thể liên hợp 33 được đánh giá về khả năng chống lại lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột BALB/c cái (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/California/07/2009 (H1N1) pdm) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 6 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hàng ngày và các con chuột bất kỳ giảm 20% cân nặng được coi là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một lần điều trị dưới da duy nhất (SC) của thể liên hợp 33, mẫu đối chứng hIgG1 Fc, hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu và mức liều lượng được tóm tắt trong Bảng 60.

Bảng 60: Thiết kế nghiên cứu đối với nghiên cứu chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Thể tích liều (ml/kg)	# chuột
1	Tá dược	SC, T+2 giờ	na	10	5
2	hIgG1 Fc	SC, T+2 giờ	1	10	5
3	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	1	10	5
4	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,3	10	5
5	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,1	10	5
6	Thể liên hợp 33	SC, T+2 giờ	0,03	10	5

Như mong đợi, chuột tiếp nhận tá dược hoặc mẫu đối chứng hIgG1 Fc đã bị lây nhiễm vào Ngày 6-7 (Bảng 61). Tuy nhiên, chuột được xử lý bằng thể liên hợp 33 được bảo vệ hoàn toàn ở mức 1 mg/kg và gần như vậy ở mức 0,3 (80% mức sống sót). Tỷ lệ tử vong đáng kể với thể liên hợp 33 chỉ được thấy ở nồng độ liều thấp hơn là 0,1 và 0,03 mg/kg.

Bảng 61: Tỷ lệ sống sót theo ngày (mg/kg)

Ngày	Tá dược	hIgG1 Fc	Thể liên hợp 33			
		(1,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	40	20	100	100	60	80
6	0	20	100	80	20	20
7	0	0	100	80	0	0
8	0	0	100	80	0	0
9	0	0	100	80	0	0
10	0	0	100	80	0	0
11	0	0	100	80	0	0
12	0	0	100	80	0	0
13	0	0	100	80	0	0
14	0	0	100	80	0	0

Hiệu lực của thể liên hợp 33 được hỗ trợ thêm bằng các phép đo cân nặng hàng ngày. Như mong đợi, chuột được xử lý bằng tá dược hoặc hIgG1 Fc đã chứng minh sự giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt quá 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi điểm là tử vong (Bảng 62).

Ngược lại với chuột đối chứng, chuột tiếp nhận thể liên hợp 33 ở mức 1 mg/kg chỉ chứng minh được sự sụt giảm tạm thời về cân nặng khoảng 10%, đạt đỉnh vào Ngày 3 (Bảng 62). Bằng cả hai phép đo mức sống sót và cân nặng của thể liên hợp 33 đã chứng minh khả năng bảo vệ mạnh khỏi thử thách gây chết của chủng Cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm với một liều SC duy nhất 1 mg/kg. Hoạt tính chống lại chủng đại dịch có liên quan về mặt lâm sàng được sử dụng trong nghiên cứu này hỗ trợ cho việc sử dụng thể liên hợp 33 trong điều trị các lây nhiễm cúm nghiêm trọng.

Bảng 62: % cân nặng trung bình theo ngày. (mg/kg). Dữ liệu chỉ thể hiện cho đến khi ca tử vong đầu tiên trong nhóm.

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược	hIgG1 Fc	Thể liên hợp 33			
		(1,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
0	100	100	100	100	100	100
1	99,5	97,9	96,8	96,7	98	98,7

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược	hIgG1 Fc	Thể liên hợp 33			
		(1,0 mg/kg)	(1,0 mg/kg)	(0,3 mg/kg)	(0,1 mg/kg)	(0,03 mg/kg)
2	97,1	97,2	99,5	99,2	98	98,4
3	86,5	86,0	89,7	89,6	87,6	88,8
4	80,3	80,3	91,6	88,5	81,3	81,9
5	76,2	76,6	92,9	91,0	76,8	77,9
6			94,7	90,5		
7			94,2			
8			95,4			
9			98,0			
10			96,8			
11			98,8			
12			97,7			
13			100,1			
14			100,5			

Ví dụ 136. Hiệu lực của thể liên hợp 33 tiêm tĩnh mạch (IV) được dùng chống lại chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) ở mô hình chuột gây chết trong phương pháp điều trị trì hoãn.

Thể liên hợp 33 được đánh giá chống lại lây nhiễm cúm A (H1N1) gây tử vong ở chuột BALB/c cái (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Ở ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp chứa ketamin/xylazin (lần lượt 150 và 10 mg/kg). Tỷ lệ tử vong và cân nặng được ghi lại hàng ngày và con chuột bất kỳ giảm 20% cân nặng được coi là tử vong.

Thiết kế nghiên cứu được trình bày chi tiết trong Bảng 63 và bao gồm nhiều nhánh. Nhánh đối chứng bao gồm các nhóm chỉ dùng tá dược (PBS) và hIgG1 Fc, dùng 24 giờ sau khi thử thách virut (nhóm không bị lây nhiễm cũng là một phần của nhánh này). Nhánh thứ hai bao gồm oseltamivir được dùng liều gấp 4 lần liều dùng ở người, với thời gian bắt đầu điều trị bị trì hoãn trong 24, 48 hoặc 72 giờ. 3 nhánh cuối cùng bao gồm thể liên hợp 33 được dùng dưới dạng các liều duy nhất bằng cách tiêm tĩnh mạch 10, 3, hoặc 1 mg/kg; mỗi loại được dùng theo cùng phác đồ như nhóm oseltamivir ở trên.

Như mong đợi, tá dược và hIgG1 Fc không có tác dụng bảo vệ khi dùng liều 24 giờ sau khi thử thách virut và dẫn đến tỷ lệ tử vong hoàn toàn theo ngày 7. Trong tay các tác giả sáng chế, oseltamivir, ngay cả ở liều gấp 4 lần liều dùng ở người (liều tích lũy 200 mg/kg) chỉ có hiệu quả một phần khi dùng thuốc chậm 24 giờ. (Bảng 64; 40% mức sống sót). Tuy nhiên, thể liên hợp 33 có tác dụng bảo vệ hoàn toàn ở mọi nồng độ (10, 3 và 1 mg/kg) theo cùng một phác đồ liều dùng 24 giờ.

Khi liều dùng bị trì hoãn hoàn toàn 48 giờ sau khi thử thách virut bằng oseltamivir không còn hiệu quả nữa (0% mức sống sót) trong khi thể liên hợp 33 có hiệu quả bảo vệ 80% ở liều 10 và 3 mg/kg. Khi dùng liều bị trì hoãn cho đến khi 72 giờ, chỉ có liều 10 mg/kg của thể liên hợp 33 đã chứng minh được sự bảo vệ một phần (40%). Hiệu lực của thể liên hợp 33 cũng rõ ràng dựa trên các phép đo cân nặng hàng ngày (Bảng 65). Điều này đặc biệt quan trọng trong nhóm T+24 giờ, nơi có ít hơn 3% mức giảm quan sát được đối với nhóm thể liên hợp 33 bất kỳ, là tạm thời và đã xảy ra vào Ngày 1. Trong nghiên cứu này, thể liên hợp 33 có hiệu quả hơn oseltamivir, loại thuốc điều trị bệnh cúm đã được chấp thuận.

Bảng 63: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng thứ nhất (giờ)	Liều lượng (mg/kg)	Thể tích liều (ml/kg)	N (balb/c)
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/con chuột	PBS	IV, một lần duy nhất	T+24	---	5	5
2		hIgG1 Fc	IV, một lần duy nhất	T+24	10	5	5
3		Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	T+24	20	10	5
4				T+48			
5				T+72			
6		Thể liên hợp 33	IV, một lần duy nhất	T+24	10	5	5
7				T+48			
8				T+72			
9		Thể liên hợp 33	IV, một lần duy nhất	T+24	3	5	5
10				T+48			
11				T+72			

12		Thể liên hợp 33	IV, một lần duy nhất	T+24	1	5	5
13				T+48			
14				T+72			
15	Mẫu BW đối chứng không bị lây nhiễm						

Bảng 64: % mức sống sót theo ngày. Chất thử nghiệm/liều lượng/thời gian ban đầu điều trị

Day post infection	Vehicle	hIgG1 Fc	Oseltamivir			Conjugate 33			Conjugate 33			Conjugate 33			Uninfected
	na	10 mpk	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	10 mpk, single	10 mpk, single	10 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	na
	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	na
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	100
6	60	100	100	100	100	100	100	60	100	100	80	100	80	80	100
7	0	0	100	100	20	100	100	40	100	80	0	100	60	40	100
8	0	0	100	100	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
9	0	0	60	60	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
10	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
11	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
12	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
13	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
14	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100

Bảng 65: Dữ liệu cân nặng (gm). mpk = mg/kg. Dữ liệu chỉ thể hiện cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm. Chất thử nghiệm/Liều lượng/thời gian ban đầu điều trị

Day post infection	Vehicle	hIgG1 Fc	Oseltamivir			Conjugate 33			Conjugate 33			Conjugate 33			Uninfected
	na	10 mpk	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	10 mpk, single	10 mpk, single	10 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	na
	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	na
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99.3	98.8	96.4	97.5	98.2	97.6	97.7	98.5	97.1	98.3	98.7	98.3	99.4	99.4	99.5
2	103.9	101	100.7	101.2	102.6	102.1	101.7	100.1	102	102.5	99.4	104.2	102	101.4	101.7
3	96.9	97.4	95.5	97.5	95.6	102.3	96.2	95.1	100.6	95.9	97.6	102.3	96.9	98.6	105.8
4	88.7	90.1	92.6	89.7	87.7	102.3	88.4	88.8	100	87.8	88.6	100	89.2	89.7	105
5	81.7	83.9	92.2	88.6	81.6	101.5	88.1	82.7	99	85.3	81.7	101.2	83.7	83.2	105.5
6	77.3	79.3	91.8	86	78.6	102.6	91.1	80.4	101.4	87.1	77.5	103.3		78.7	104.9
7			87.8	81		101.9	91.1		102.3	86.1		102.1			103.5
8			83.5	75.8		101.5	91.3		101.1			103.2			102.9
9			81.1			102.2			102.1			104.1			102.9
10						102.5			101.6			105			103.3
11						102.4			102.1			103.9			104.3
12						100.9			101.6			103.4			102.5
13						101			101.8			103.5			102.5
14						102.2			103.6			104			103.1

51349

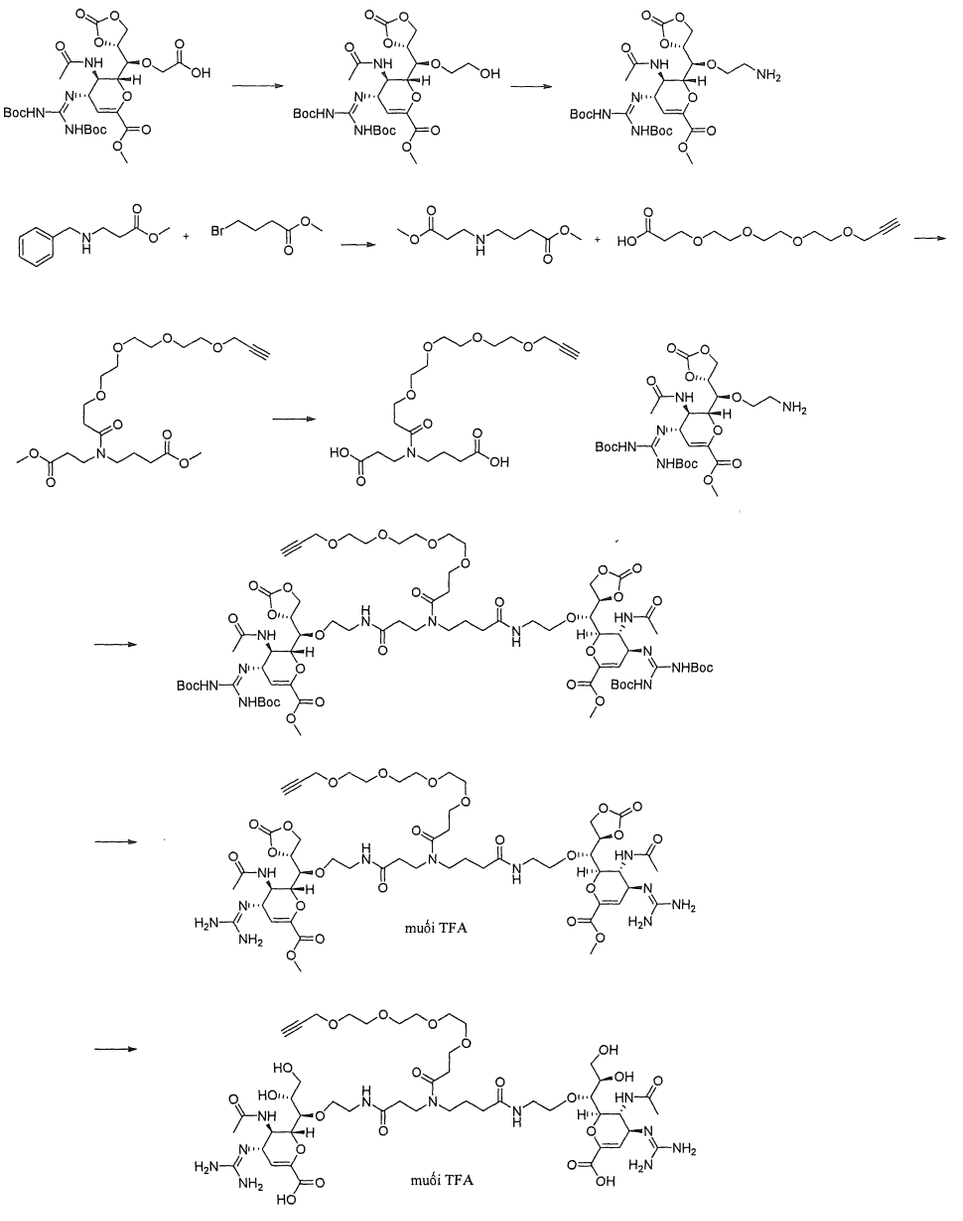
Ví dụ 137. Tổng hợp thể liên hợp 38 (Int-73), thể liên hợp 39 (Int-74), thể liên hợp 40 (Int-75), và thể liên hợp 41 (Int-76)

Ống ly tâm vô trùng dung tích 15 ml được nạp natri ascorbat (68,3 mg, 0,345 mmol), BTTAA (11,9 mg, 0,0276 mmol), sản phẩm từ các Ví dụ 114 (Int-73), 115 (Int-74), 116 (Int-75), hoặc 117 (Int-76) (0,00953 mmol) và PBS pH 7,4 (1 ml).

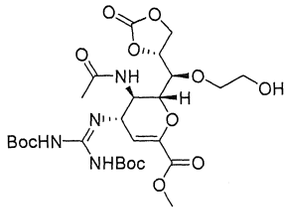
Chất phản ứng được xoáy cho đến khi đồng nhất sau đó được trộn với azido Fc (50 mg, 0.0008624mmol, được mô tả trong Ví dụ 124, SEQ ID NO: 73) tiếp theo là dung dịch chứa $CuSO_4$ (1,1 mg, 0,0069 mmol) trong nước (0,5 ml). Hỗn hợp được quay trong 12 giờ sau đó tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ. Các thể liên hợp được xác định đặc điểm bằng phân tích Maldi TOF (DAR thường = 4,5). Hiệu suất thường là 50%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc cho các thể liên hợp 38-41 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lisin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lisin đầu tận cùng C của Fc của các thể liên hợp 38-41 được phân cắt bằng protein, dẫn đến Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 138. Tổng hợp Int-79



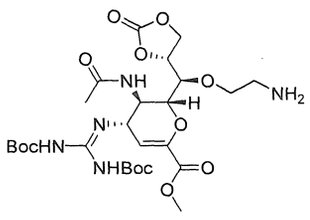
Bước a.



Zanamivir-ete-axit (0,90 g, 1,43 mmol, Ví dụ 31) và N-metyl morpholin (0,23 mL, 2,14 mmol) được hòa tan trong THF (35 mL) và làm lạnh đến 0°C (bể nước đá lạnh) trong điều kiện khí quyển nitơ. Isobutyl cloformat (0,24 mL, 1,85 mmol, trong 2 mL DCM) được bổ sung từng giọt, bằng ống tiêm trong khoảng thời gian hơn 5 phút. Hỗn hợp được khuấy ở 0°C trong 30 phút sau đó 15 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh,

và sau đó làm lạnh đến 0°C. Natri bohydrua (540 mg, 14,3 mmol, hòa tan trong 5 mL metanol) được bổ sung, từng giọt hơn 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút mà tại điểm đó tất cả nguyên liệu ban đầu đã được tiêu thụ (bằng LC/MS). Một vài giọt (~1 mL) axit axetic băng được bổ sung vào hỗn hợp có tính axit (pH~5). Pha loãng bằng etyl axetat và nước và chiết vào etyl axetat (3x). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, và phần chiết hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, và cô trên thiết bị cô quay. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký silica gel (được tải lên xelit đầu tiên) (metanol 0-10% trong DCM, 30 phút). Thu được 0,66 g, hiệu suất 75%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 617,2.

Bước b.



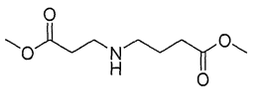
Hỗn hợp khuấy chứa rượu (0,66, 1,1 mol, trong 20 mL CH2Cl2), được bổ sung trietylamin (0,30 mL, 1,3 mmol). Hỗn hợp được làm lạnh đến 0°C (bể nước đá lạnh) trong điều kiện 1 atm nitơ và mesyl clorua (150 mg, 1,3 mmol) được bổ sung, từng giọt hơn 5 phút bằng ống tiêm. Bể đá lạnh được loại bỏ và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 45 phút. Hỗn hợp được pha loãng bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa, được chiết vào DCM (3x). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô trên thiết bị cô quay. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 695,2. Sản phẩm trung gian được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Zanamivir mesylat được khuấy trong DMF ở 80°C với 3 đương lượng natri azit trong 5 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng nước, được chiết vào DCM (3x). Phần chiết hữu cơ gom lại được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô đặc. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 695,2. Azit được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Zanamivir azit (670 mg, 1,04 mmol) được khuấy trong metanol (20 mL) với sự có mặt của chất xúc tác Lindlar (300 mg) trong điều kiện 1 atm khí hydro trong 12 giờ. Hỗn hợp được lọc qua xelit và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu trong.

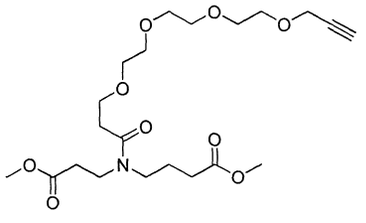
Amin được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Thu được 0,37 g, hiệu suất 54%, 3 bước. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 616,2.

Bước c.



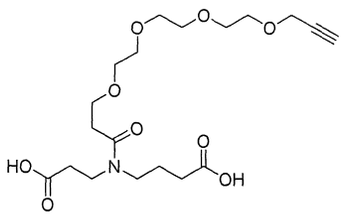
Metyl 3-(benzylamino)propanoat (1 g, 5,2 mmol), metyl 4-bromobutanoat (1,2 g, 6,2 mmol), và diisopropyletylamin (1,34 mL, 7,8 mmol) được khuấy trong DMF (5 mL) ở 65°C trong 4 giờ. Phần lớn dung môi được loại bỏ bằng thiết bị cô quay và nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký silica gel (Isco, metanol 0 đến 9% trong DCM, građien 30 phút) để thu được sản phẩm trung gian được bảo vệ benzyl dưới dạng dầu trong. Sản phẩm trung gian được bảo vệ benzyl được khuấy trong metanol (20 mL) trong điều kiện 1 atm khí hydro với sự có mặt của paladi hydroxit 20% trên cacbon (300 mg) trong 12 giờ. Hỗn hợp được lọc qua xelit và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng dầu trong. Thu được 0,72 g, hiệu suất 69%. Ion được LCMS phát hiện: [M + H]+ = 204,2.

Bước d.



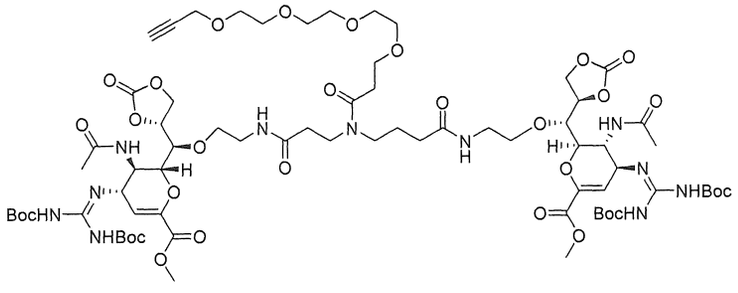
Sản phẩm của bước c (0,70 g, 2,16 mmol), axit propargyl PEG-4 (0,63 mg, 2,38 mmol) HATU (1,26 g, 3,24 mmol) trong DMF (2 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng sau khi bổ sung DIEA (1,15 mL, 6,49 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ sau đó tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (Isco, axetonitril 5 đến 50% và nước với TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 840 mg, hiệu suất 87%. Ion được LCMS phát hiện [M+H]+ = 446,2.

Bước e.



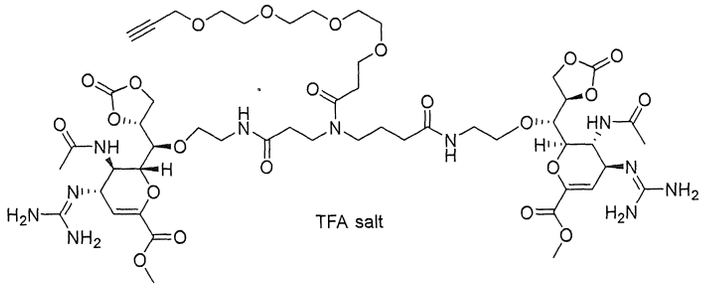
Dung dịch chứa sản phẩm của bước d (840 mg, 1,85 mmol) và LiOH (113,1 mg, 4,72 mmol) trong H2O:MeOH (1:2, 9 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó phản ứng được axit hóa với TFA. Dung dịch thu được được cô đặc sau đó tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (Isco, axetonitril 0% đến 20% và nước). Thu được 454,5 mg, hiệu suất 59%. Ion được LCMS phát hiện [M+H]+ = 418,2.

Bước f.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước b (334,7 mg, 0,52 mmol), sản phẩm của bước e (102 mg, 0,24 mmol) và HATU (273,25 mg, 0,704 mmol) trong DMF khan (3 mL) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung DIEA (217 mg, 16,4 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ sau đó được tinh chế bằng RPLC (metanol 20% đến 100% và nước mà không có chất cải biến). Thu được 206,5 mg, hiệu suất 55%. Ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 806,8.

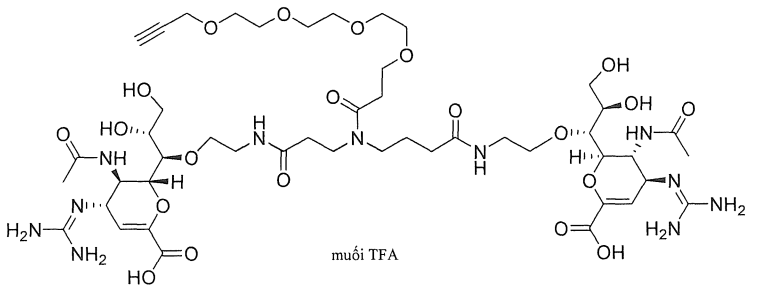
Bước g.



Sản phẩm của bước f (206,5 mg, 0,128 mmol) và TFA (3 mL) trong CH2Cl2 (5 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được cô trong điều kiện áp suất

giảm. Phần cặn thu được được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 0% đến 30% và nước với TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 144,5 mg, hiệu suất 69%. Ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 606,8.

Bước h.

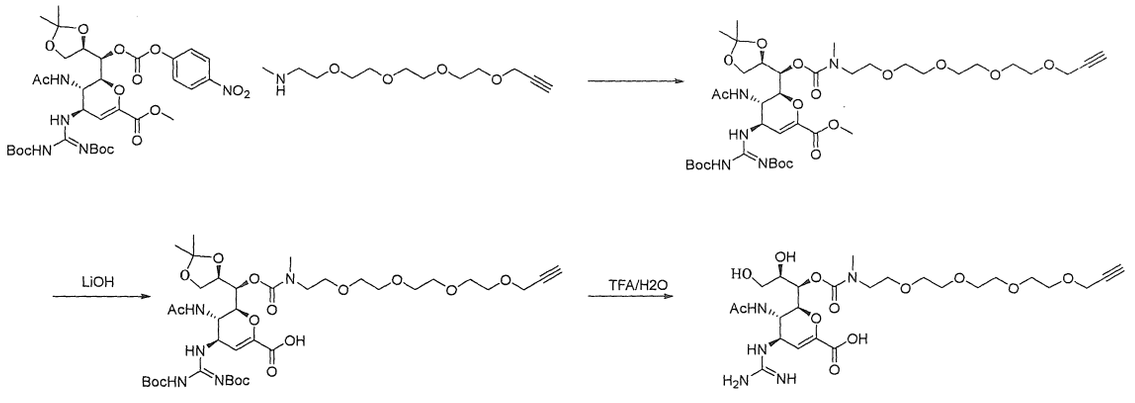


Dung dịch chứa sản phẩm của bước g (144,5 mg, 0,119 mmol) trong MeOH (9 mL) và nước (3 mL) được bổ sung LiOH (18 mg, 0,75 mmol). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó được axit hóa với TFA và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC bán điều chế (axetonitril 0% đến 25% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 45 mg, hiệu suất 28%. Các ion được LCMS phát hiện [(M+2H)/2]+ = 566,8.

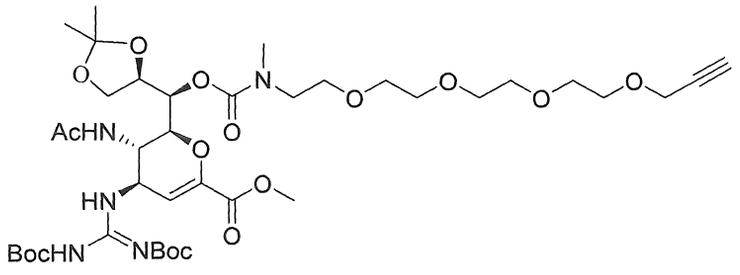
Ví dụ 139. Tổng hợp thể liên hợp 42

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (50 mg, 5,4 mL, 0,859 µmol, Ví dụ 124, SEQ ID NO: 18) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 10 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (7,87 mg, 0,057 mmol, Ví dụ 138). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung vào 3 mL dung dịch trộn sơ bộ chứa axit L-ascorbic natri (0,68 mg, 0,34 mmol, 0,25 M), đồng (II) sulfat (1,1 mg, 0,0069 mmol, 0,005 M) và BTTAA (11,8 mg, 0,027 mmol, 0,02 M) trong dung dịch đệm PBS pH 7,4. Dung dịch thu được được quay nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem quy trình tinh chế chung thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63623 Da (DAR 3,8). Thu được 36,01 mg, hiệu suất 72%.

Ví dụ 140. Tổng hợp Int-80

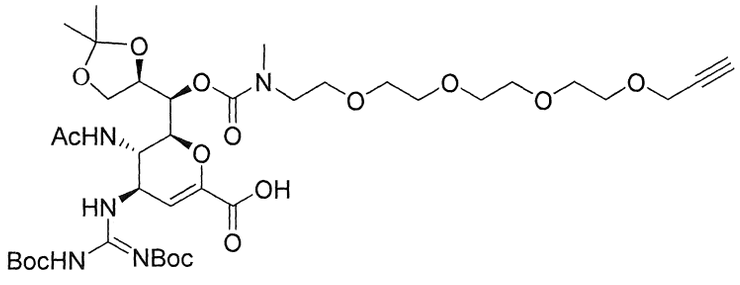


Bước a.



Dung dịch chứa p-nitrophenyl cacbonat của Zanamivir (0,3 g, 0,4 mmol, Ví dụ 103) trong diclometan khan (5 ml) được bổ sung propargyl-PEG4-metylamin (0,11 g, 0,44 mmol) và DIPEA (0,14 ml, 1,0 mmol) trong DMF khan (5 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được cô và tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với metanol/diclometan 0% đến 10%. Thu được 0,28 g, hiệu suất 81%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $(M + H)^+ = 858,4$, $(M - Boc)+H^+ = 758,4$.

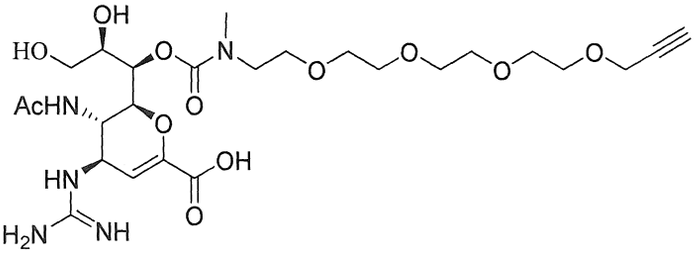
Bước b.



Sản phẩm của bước trước đó (280 mg, 0,2 mmol) được hòa tan vào 2 ml MeOH và 2 ml THF, sau khi xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (24 mg, 1 mmol) được hòa tan trong 2 ml nước. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ trong

phòng, tại thời điểm đó HPLC cho thấy phản ứng hoàn thành. Độ pH của phản ứng được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Hổ phách IRN-77, sau đó được lọc để loại bỏ nhựa. Sản phẩm lọc thô được để bay hơi đến khô trong điều kiện chân không và được sử dụng trong bước tiếp theo có tinh chế, và hiệu suất là định lượng. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $(M + H)^+ = 844,4$, $(M - Boc + H)^+ = 744,4$.

Bước c.



Sản phẩm của bước b được hòa tan vào 2 ml diclometan và 2 ml TFA, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi hoàn thành phản ứng (6 giờ), dung dịch được cất phần nhẹ đến khô và sau đó được hòa tan trong 2 ml nước và 2 ml axetonitril. Dung dịch thu được được khuấy thêm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LCMS cho thấy sự khử bảo vệ các nhóm bảo vệ axetonit hoàn thành. Hỗn hợp này được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với axetonitril 5% đến 40%/nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 180 mg, hiệu suất 78,0%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $(M + H)^+ = 604,2$.

Ví dụ 141. Dữ liệu độ ổn định đối với Int-80 so với Int-4

Int-80 (Ví dụ 140) và Int-4 (Ví dụ 13) được hòa tan thành 10 mg/mL trong nước khử ion và sau đó được pha loãng với tỷ lệ 1:10 thành 1X PBS đến thể tích cuối cùng là 1 mg/mL. Các mẫu được ủ ở 37°C hoặc 60°C trong 1 tuần. Một lượng nhỏ 25 µL được pha loãng vào 75 µL nước để phân tích HPLC. Bằng cách sử dụng Waters Acquity H-Class UPLC với cột Phenomenex Biozen PS-C18 (150x2,1mm, 1,6um) građien của axit formic 0,1% trong nước với axit formic 0,1% trong axetonitril được chạy như sau: B 5% trong 0-1 phút, B 5-20% từ 1-20 phút. Phát hiện ở 240 nm bằng

cách sử dụng máy dò mảng điốt. Int-80 có độ suy giảm dưới 1% hơn một tuần ở 60°C, trong khi Int-4 cho thấy độ suy giảm 15% trong cùng khoảng thời gian (Fig. 66)

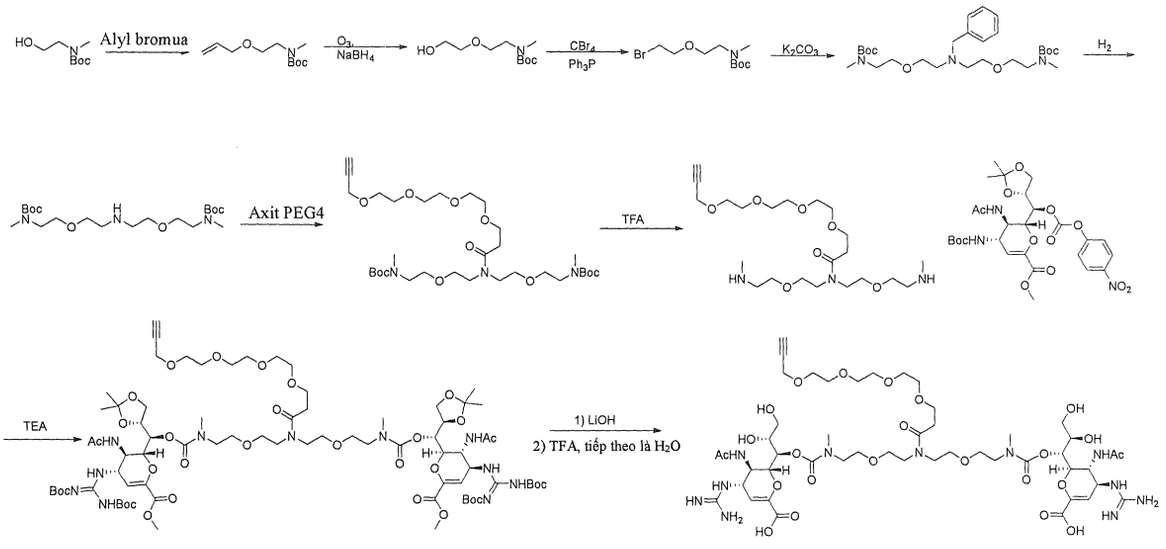
Ví dụ 142. Tổng hợp thể liên hợp 43

Điều chế dung dịch thuốc thử Click: 0,0050M $CuSO_4$ trong PBS x1 dung dịch đệm: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS x1, sau đó lấy 10,00 mL dung dịch $CuSO_4$ này và bổ sung 86,1 mg BTTAA và 495,3 mg Na Ascorbat để thu được dung dịch thuốc thử Click (0,0050M $CuSO_4$, 0,020M BTTAA và 0,25M natri ascorbat).

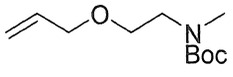
Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (78,0 mg, 4,535 mL, 1,35 µmol, Ví dụ 124, SEQ ID NO: 73) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 15 mL chứa phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (13,2 mg, 8,88 µmol, Int-80, Ví dụ 140). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được bổ sung với 2,153 mL dung dịch thuốc thử Click nêu trên chứa (Natri của axit L-ascorbic, 0,25 M, 106,6 mg, 0,538 mmol, đồng (II) sulfat 0,0050M, 1,72 mg, 0,0107 mmol, và BTTAA 0,020M, 18,5 mg, 0,0431 mmol). Hỗn hợp thu được được quay nhẹ trong 6 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (Xem giao thức tinh chế thể liên hợp). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 64,012 Da (DAR = 7,0). Thu được 50,3 mg, hiệu suất 62%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 43 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 43 được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 143. Tổng hợp Int-81

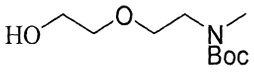


Bước a.



Dung dịch khuấy kỹ chứa N-Boc-N-Me-glyxinol (3,5 g, 20 mmol) trong DMSO (20 mL) được làm lạnh bằng bể nước đá được bổ sung alyl bromua (3,6 g, 30,0 mmol), tiếp theo là bột KOH được nghiền mịn (3,5 g, 30,0 mmol) hơn 15 phút. Dung dịch thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được chia phần giữa dung dịch nước HOAc 5% (50 mL) và etyl axetat (200 ml). Lớp hữu cơ được tách, được rửa bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc, sau đó được tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với etyl axetat/hexan 10% đến 80%. Thu được 4,1g sản phẩm, hiệu suất 95%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =216,3.

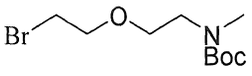
Bước b.



Ozon được sục qua dung dịch chứa hợp chất từ bước a (8,0 g, 37 mmol) trong MeOH (50 mL) và DCM (50 ml) ở -78°C cho đến khi xuất hiện màu xanh lam nhạt. Ozon không phản ứng được loại bỏ bằng cách sục oxy trong 10 phút trước khi bổ sung $NaBH_4$ (1,6 g, 40 mmol) trong phần nhỏ hơn 10 phút. Sau khi tất cả $NaBH_4$ được bổ sung, hỗn hợp được làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được chia phần giữa etyl axetat (100 ml) và nước muối (50 ml). Lớp hữu cơ được tách, được

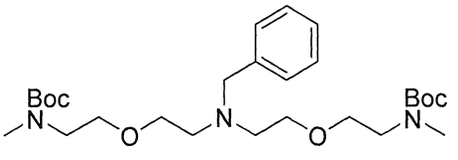
rửa bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, được lọc, cô đặc thành dầu, và sau đó được tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với etyl axetat/ diclometan 10% đến 80%. Thu được 5,0 g sản phẩm, hiệu suất 62%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =220,2.

Bước c.



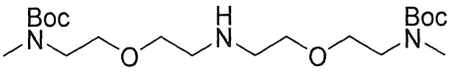
Dung dịch chứa sản phẩm (4,4 g, 20 mmol) từ bước trước đó và CBr_4 (10,0 g, 30,0 mmol) trong DCM (50 mL) ở 0°C được bổ sung PPh_3 (8,0 g, 30 mmol) chậm hơn 15 phút (tỏa nhiệt). Trong quá trình bổ sung, nhiệt độ bên trong được giữ dưới 30°C. Sau khi bổ sung PPh_3, hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng thô được cô đặc thành dầu sau đó được tinh chế bằng sắc ký lỏng pha thường, rửa giải với etyl axetat/hexan 10% đến etyl axetat/hexan 80%. Các phân đoạn chứa các giọt dầu ở bên trong của ống thu thập được kết hợp và cô thành dầu không màu. Thu được 4,0 g, hiệu suất 70,5. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =282,1.

Bước d.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước c (4 g, 14 mmol), benzylamin (0,60 g, 5,7 mmol), và K_2CO_3 (2,35 g, 17 mmol) trong DMF (20 mL) được gia nhiệt trong bể dầu ở 75°C trong 8 giờ. Hỗn hợp được lọc, được cô đặc, và tinh chế bằng RPLC (ACN 5%/nước đến ACN 100%). Thu được 2,1 g, hiệu suất 72,7%.

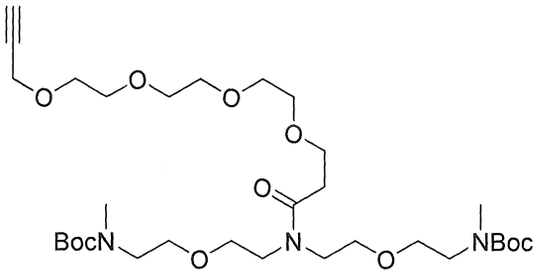
Bước e.



Dung dịch chứa sản phẩm của bước d (1,3 g, 2,0 mmol) được hòa tan trong $CHCl_3$/EtOH (1:20, 20 mL) được bổ sung $Pd(OH)_2$/C 20% (0,50 g). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm trong điều kiện hydro từ khí cầu ở nhiệt độ môi trường xung

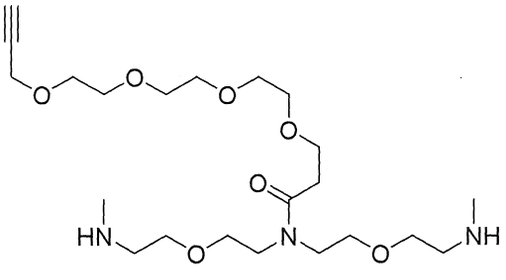
quanh. Hỗn hợp phản ứng được lọc qua tầng Xelit, sau đó được cô đặc bằng máy cô quay và thực hiện bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước f.



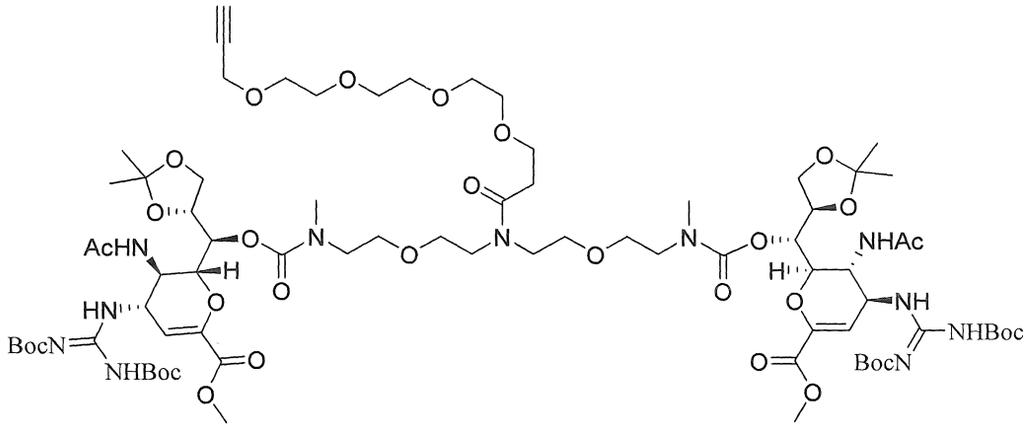
Sản phẩm của bước e được hòa tan trong 10 mL DMF, sau khi xử lý bằng axit propargyl PEG4 (0,52 g, 2,0 mmol), EDCI (0,6 g, 3,0 mmol), HOAt (0,45 g, 3 mol) và bazơ Hunig (0,7 mL, 5,0 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong bốn giờ, sau đó được cô và tinh chế bằng RPLC (ACN 10%/nước đến ACN 60%/nước). Thu được 0,43 g, hiệu suất 65% trong hai bước. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[M - Boc + H]^+ = 562,4$, $[M + H]^+ = 662,4$.

Bước g.



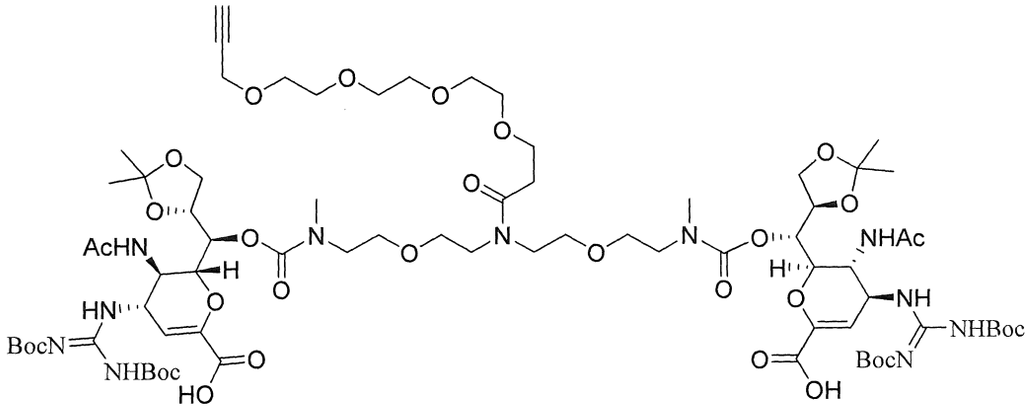
Sản phẩm của bước d (70 mg, 0,1 mmol) được xử lý bằng TFA (2 mL) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. TFA được loại bỏ bằng cách cô quay, và dầu còn lại được làm khô tiếp trong điều kiện chân không cao trong 12 giờ để thu được sản phẩm mong muốn dưới dạng muối bis-TFA. Hiệu suất là định lượng. Ion được phát hiện bởi LCMS: $[M + H]^+ = 462,4$.

Bước h.



Dung dịch chứa nitrophenyl cacbonat được mô tả trong Ví dụ 109 (0,72 g, 0,95 mmol) trong DMF khan (5 ml) được bổ sung hỗn hợp của diamin của bước g (0,3 g, 0,43 mmol, bổ sung thành các phần hơn 30 phút) và DIPEA (0,28 ml, 2 mmol) trong DMF khan (20 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được cô và tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với metanol/diclometan 0% đến 10%. Thu được 0,63 g, hiệu suất 86%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+ = 844,4$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 794,4$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 744,4$.

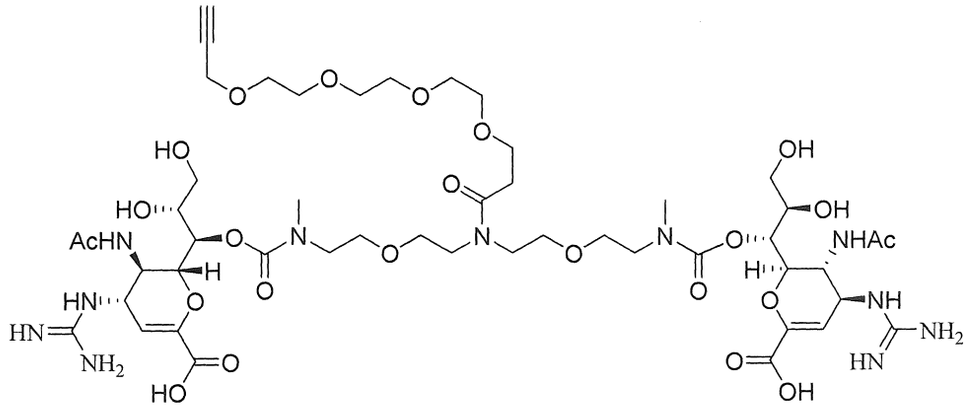
Bước i.



Sản phẩm của bước trước đó (600 mg, 0,35 mmol) được hòa tan vào 5 ml MeOH và 5 ml THF, sau khi xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (48 mg, 2 mmol) được hòa tan trong 2 ml nước. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó HPLC cho thấy phản ứng hoàn thành. Độ pH của dung dịch phản ứng được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Hổ phách IRN-77, sau đó được lọc để loại bỏ nhựa. Sản phẩm thô được để

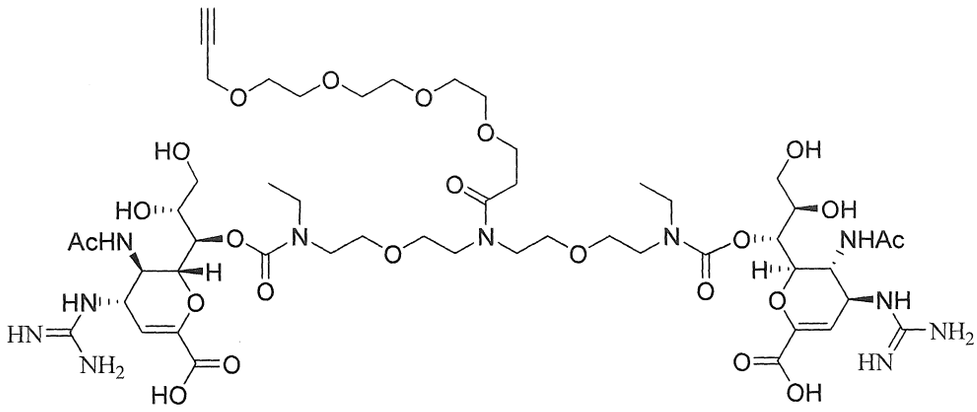
bay hơi đến khô bằng cách cô quay và được sử dụng trong bước tiếp theo có tinh chế. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+$ = 829,9, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 779,4, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+$ = 729,4.

Bước j.



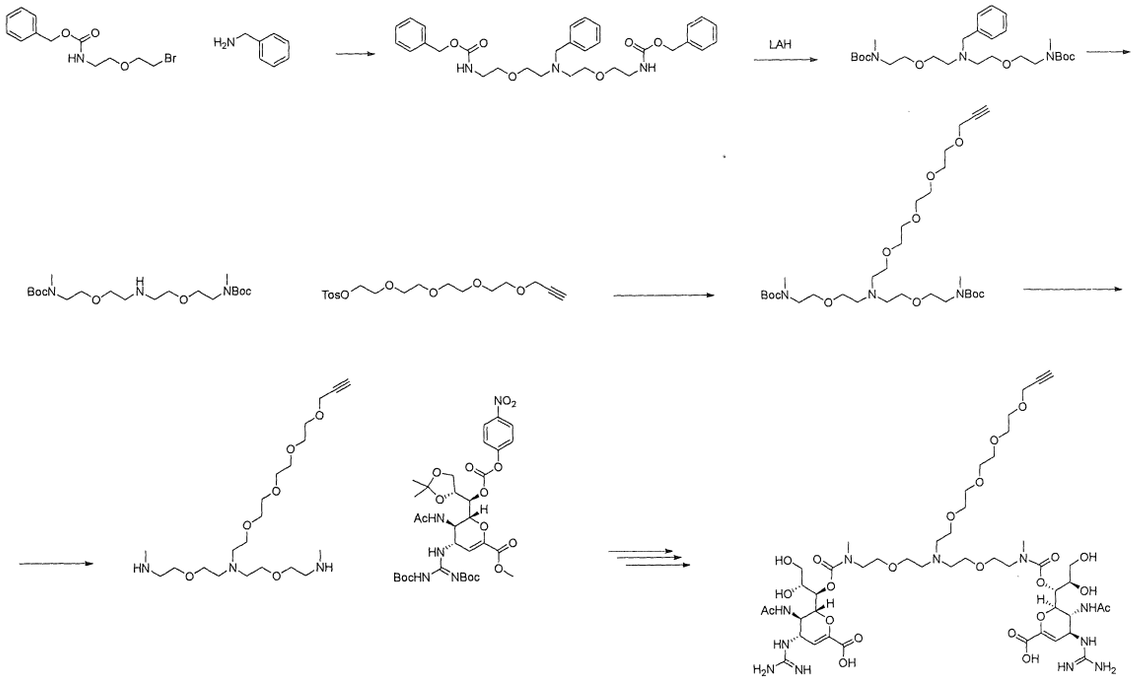
Sản phẩm của bước i được hòa tan vào 5 ml diclometan và 5 ml TFA, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi hoàn thành phản ứng (6 giờ), dung dịch được cất phần nhẹ đến khô và sau đó được hòa tan trong 4 ml nước và 4 ml metanol. Dung dịch thu được được khuấy thêm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng tại đó LCMS cho thấy sự khử bảo vệ các nhóm bảo vệ axetonit hoàn thành. Hỗn hợp này được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco CombiFlash rửa giải với axetonitril 5% đến 40%/nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được 380 mg, hiệu suất 71,0%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+$ = 589,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 392,5.

Ví dụ 144. Tổng hợp Int-82

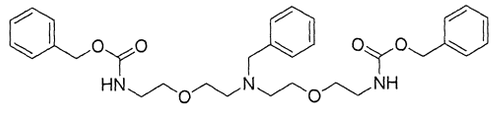


Hợp chất nêu ở đề mục được điều chế tương tự với Ví dụ 143, Int-81, trong đó N-Boc-N-Me-glyxinol được thay thế bằng N-Boc-N-etyl-glyxinol trong bước a. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: [M/2]+1 = 603,8, [M/3]+1 = 402,9.

Ví dụ 145. Tổng hợp Int-83

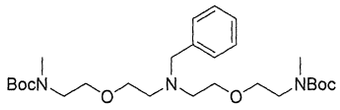


Bước a.



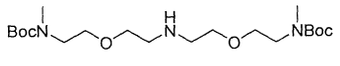
CBZ-được bảo vệ-amino-peg1-bromua (7,6 g, 25,2 mmol), benzylamin (1,1 g, 10,1mmol), và kali cacbonat (2,8 g, 2,8 mmol) được khuấy trong DMF (10 mL) ở 60°C trong 12 giờ. Dung dịch được cô đặc trên máy cô quay và được tinh chế bằng sắc ký silica gel (metanol 0-10% trong DCM, građien 30 phút) để thu được sản phẩm dưới dạng dầu nhớt trong. Thu được 3,2 gam, hiệu suất 57%. Ion được phát hiện bởi LC/MS [M+H]+ =550,2.

Bước b.



Sản phẩm của bước a (1,9 g, 3,5 mmol) được hòa tan trong THF (20 mL) và được làm lạnh đến 0°C bằng bể đá lạnh/nước trong điều kiện khí quyển nitơ. LAH (6,9 ml, 13,8 mmol, 2M trong THF) được bổ sung nhỏ giọt bằng ống tiêm trong khoảng thời gian hơn 10 phút. Hỗn hợp được khuấy ở hồi lưu trong 2 giờ sau đó được làm lạnh đến 0°C bằng bể đá lạnh/nước. 1 mL nước được bổ sung nhỏ giọt, tiếp theo là bổ sung nhỏ giọt 1 mL dung dịch nước NaOH (15% theo trọng lượng). 3 mL nước được bổ sung và hỗn hợp được khuấy trong 15 phút tại thời điểm đó 2g magie sulfat được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy trong 10 phút, sau đó được lọc qua xelit, được rửa bằng 2 phần THF 10 ml bổ sung và sản phẩm lọc kết hợp được cô đặc bằng máy cô quay. Phần cặn được hấp thụ vào axetonitril (20 mL), trietylamin (1,4g, 13,8 mmol) và boc anhydrua (3,0 g, 13,8 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy trong 45 phút, được cô đặc và tinh chế bằng HPLC pha đảo (axetonitril 5-95%/nước khử ion, chất cải biến TFA 0,1%, građien 30 phút). Thu được 1,4 g, hiệu suất 79%. Ion được phát hiện bởi LC/MS [M+H]+ = 510,2.

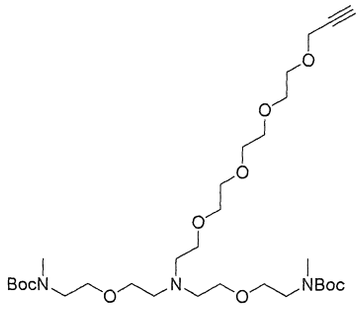
Bước c.



Sản phẩm của bước b. (1 g, 1,9 mmol) của ví dụ này được khuấy trong metanol (25 mL) với sự có mặt của paladi hydroxit (200 mg) trong điều kiện khí quyển hydro trong 2 giờ. Hỗn hợp được lọc qua xelit và được cô để thu được sản phẩm dưới dạng

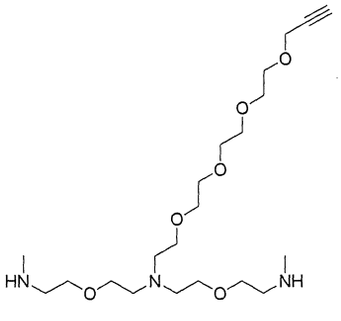
dầu trong được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Thu được 0,73 g, hiệu suất 89%. Ion được phát hiện bởi LC/MS [M+H]+ = 420,4.

Bước d.



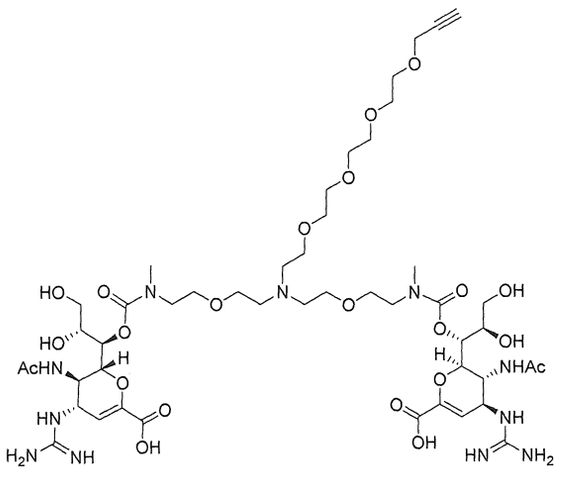
Sản phẩm của bước c (0,73 g, 1,7 mmol), propargyl-peg4-tosylat (0,91 g, 2,4 mmol), và diisopropyletylamin (0,76 g, 5,9 mmol) được khuấy trong DMF (5mL) ở 85°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô đặc trên máy cô quay, sau đó được tinh chế bằng HPLC pha đảo (axetonitril 5-95%/nước khử ion, chất cải biến TFA 0,1%, građien 30 phút) để thu được sản phẩm dưới dạng dầu nhớt trong. Thu được 0,89 g, hiệu suất 82%. Ion được phát hiện bởi LC/MS [M+H]+= 634,4.

Bước e.



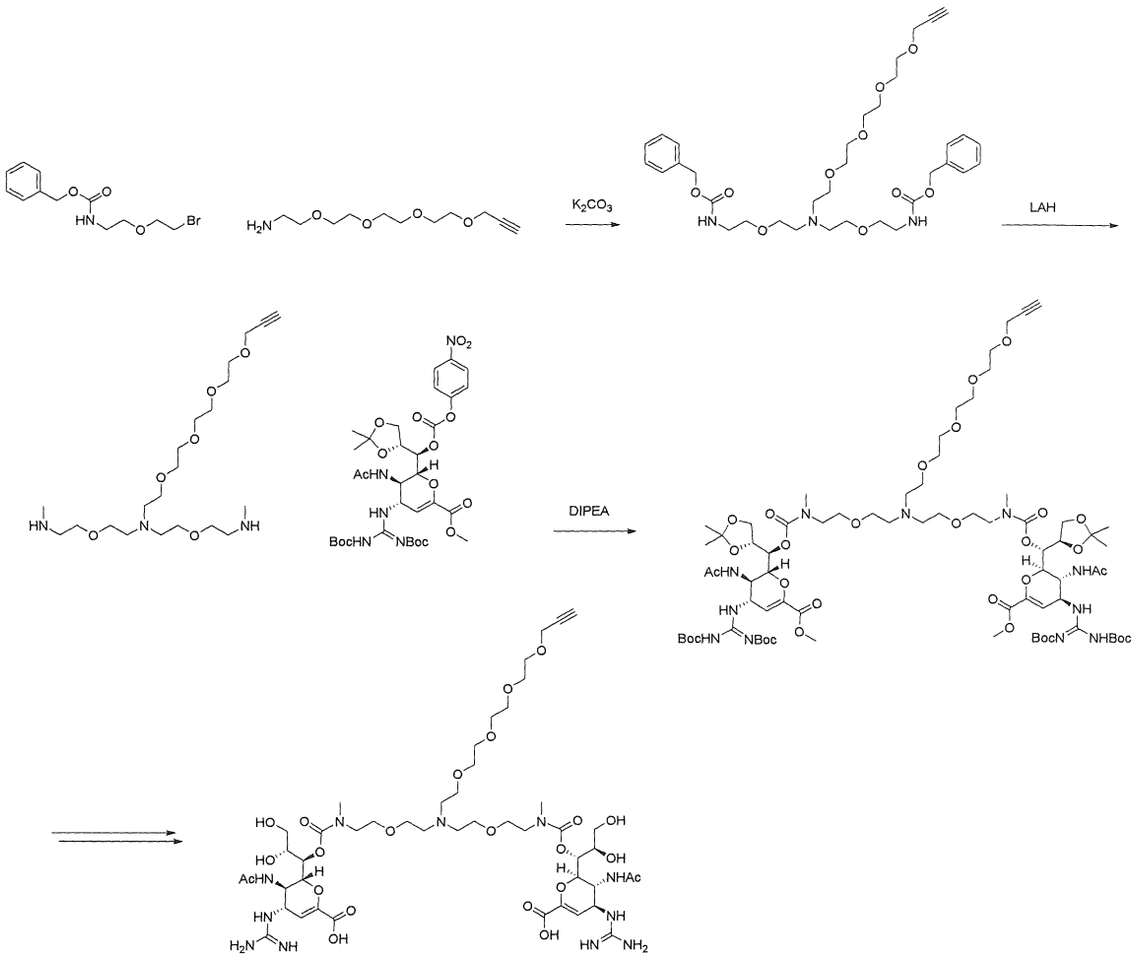
Sản phẩm của bước d. (0,89 g, 1,4 mml) được khuấy trong HCl 4N (trong dioxan) trong 45 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp được cô đặc trên máy cô quay và được đồng sôi (3x) bằng benzen. Phần cặn thu được được hấp thụ vào nước khử ion (15 mL) được đông lạnh và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng dầu trong, muối bis-HCl. Thu được 0,65 g, hiệu suất 91%. Ion được phát hiện bởi LC/MS [M+H}+ = 434,4.

Bước f.



Bốn bước còn lại trong quy trình tổng hợp hợp chất này tương tự với các bước được sử dụng trong quy trình tổng hợp Ví dụ 143, Int-81. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: (M+2H)/2 =575,8

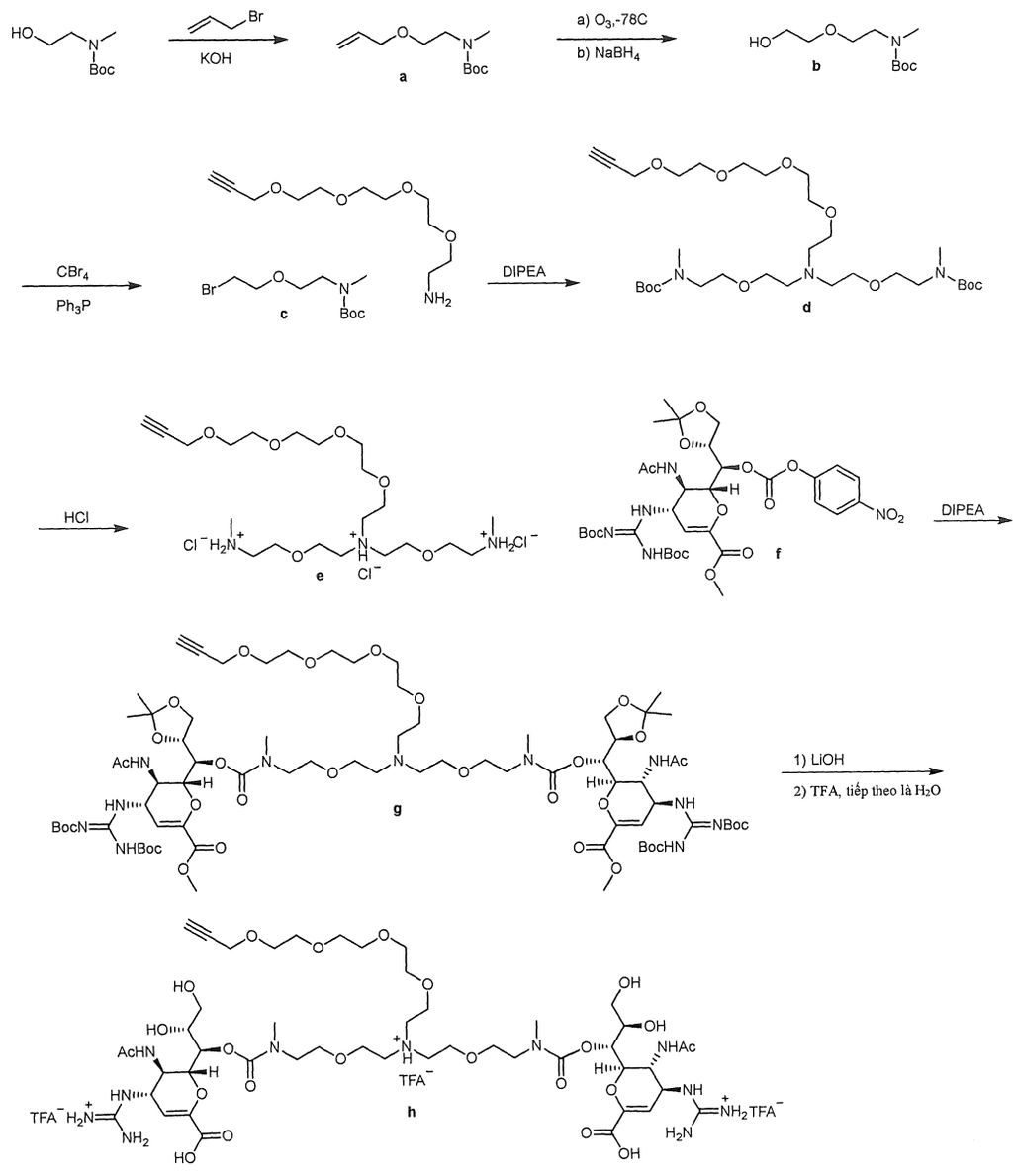
Ví dụ 146a. Phương pháp tổng hợp thay thế I của Int-83



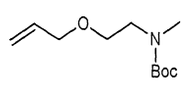
Sản phẩm được mô tả trong Ví dụ 145, Int-83, có thể được điều chế theo cách khác bằng cách sử dụng sơ đồ phản ứng nêu trên bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong sáng chế.

Ví dụ 146b. Phương pháp tổng hợp thay thế II của Int-83

Sản phẩm được mô tả trong Ví dụ 145, Int-83, có thể được điều chế theo cách khác bằng cách sử dụng sơ đồ phản ứng, dưới đây, bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong sáng chế.

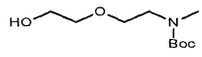


Tổng hợp a.



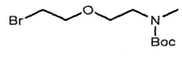
Dung dịch khuấy kỹ chứa N-Boc-N-Me-glyxinol (3,5 g, 20 mmol) trong DMSO (20 mL) được làm lạnh bằng bể nước đá được bổ sung alyl bromua (3,6 g, 30,0 mmol), tiếp theo là bột KOH được nghiền mịn (3,5 g, 30,0 mmol) hơn 15 phút. Dung dịch thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được chia phần giữa dung dịch nước HOAc 5% (50mL) và etyl axetat (200ml). Lớp hữu cơ được tách, được rửa bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, lọc và cô đặc, sau đó được tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với etyl axetat/hexan 10% đến 80%. Thu được sản phẩm 4,1g, hiệu suất 95%. Ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =216,3.

Tổng hợp b.



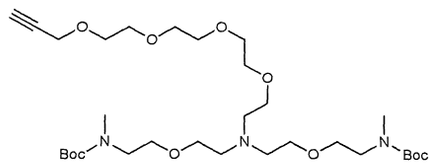
Ozon được sục qua dung dịch chứa a (8,0 g, 37 mmol) trong MeOH (50 mL) và DCM (50 ml) ở -78°C cho đến khi xuất hiện màu xanh lam nhạt. Ozon không phản ứng được loại bỏ bằng cách sục oxy trong 10 phút trước khi bổ sung $NaBH_4$ (1,6 g, 40 mmol) trong phần nhỏs hơn 10 phút. Sau khi tất cả $NaBH_4$ được bổ sung, hỗn hợp được làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được chia phần giữa etyl axetat (100 ml) và nước muối (50 ml). Lớp hữu cơ được tách, được rửa bằng nước muối, làm khô bằng natri sulfat, được lọc, cô đặc thành dầu, và sau đó được tinh chế bằng sắc ký nhanh rửa giải với 10% đến 80% etyl axetat/diclometan. Thu được sản phẩm 5,0 g, hiệu suất 62%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =220,2.

Tổng hợp c.



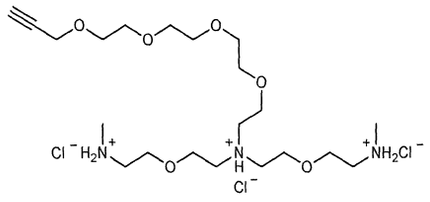
Dung dịch chứa b (4,4 g, 20 mmol) và CBr_4 (10,0 g, 30,0 mmol) trong DCM (50 mL) được làm lạnh trong bể đá lạnh, được bổ sung PPh_3 (8,0 g, 30 mmol) chậm hơn 15 phút (tỏa nhiệt). Trong quá trình bổ sung, nhiệt độ bên trong được giữ dưới 30°C. Sau khi bổ sung PPh_3, hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng thô được cô đặc thành dầu, sau đó được tinh chế bằng sắc ký lỏng pha thường, rửa giải với etyl axetat/hexan 10% đến etyl axetat/hexan 80%. Các phân đoạn chứa các giọt dầu ở bên trong của ống thu thập được kiểm tra bằng LCMS, sau đó được kết hợp và cô thành dầu không màu. Thu được 4,0 g, hiệu suất 70,5%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: M+H =282,1.

Tổng hợp d.



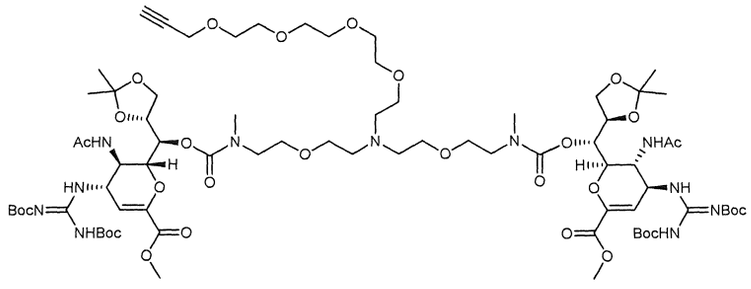
Dung dịch chứa c (4,4 g, 15,5 mmol), propargyl-PEG4-amin (1,5 g, 6,4 mmol), và DIPEA (3,3 g, 25,8 mmol) trong DMF (20 mL) được gia nhiệt trong bể dầu ở 75°C trong 18 giờ. Hỗn hợp được lọc, được cô đặc, và tinh chế bằng RPLC (ACN 5%/nước đến ACN 100%). Thu được 3,85 g, hiệu suất 92%. LC/MS: [M+H] = 634,2.

Tổng hợp e.



Sản phẩm d (3,85, 6,1 mmol) được xử lý bằng HCl (4 N trong dioxan, 15 mL) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ bằng cách cô quay, và dầu còn lại được hòa tan trong nước khử ion (20 mL) được đông lạnh, và đông khô để thu được sản phẩm dưới dạng dầu màu vàng nhạt. Hiệu suất là định lượng. Ion được phát hiện bởi LCMS: $[M + H]^+ = 434,2$.

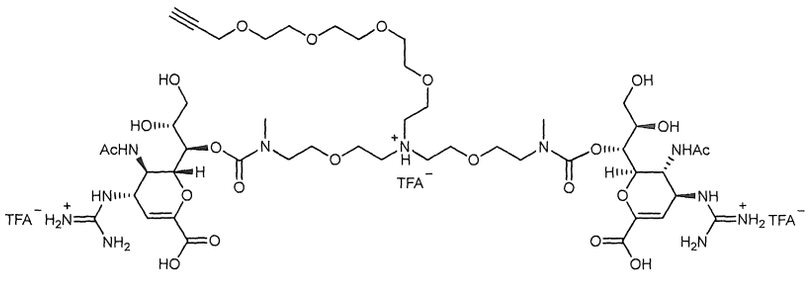
Tổng hợp f.



Dung dịch chứa f (0,68 g, 1,34 mmol) và DIPEA (0,87g, 6,7 mmol) được hòa tan trong DMF khan (5 ml) được bổ sung f (2,1 g, 2,8 mmol) thành các phần hơn 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, sau đó được cô

và tinh chế bằng sắc ký nhanh, rửa giải với metanol/diclometan 0% đến 10%. Thu được 1,45 g, hiệu suất 67%. Ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+ = 829,8$.

Tổng hợp g.



Sản phẩm f (1,45 g, 0,87 mmol) được hòa tan vào 3 ml MeOH sau khi xử lý bằng dung dịch chứa lithi hydroxit (90 mg, 3,8 mmol) được hòa tan trong nước khử ion (6 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LCMS đã cho thấy phản ứng hoàn thành. Độ pH của dung dịch phản ứng được điều chỉnh đến giá trị từ 5 đến 6 bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion Hổ phách IRN-77, sau đó được lọc để loại bỏ nhựa. Sản phẩm lọc được cô đặc đến khô bằng cách cô quay và được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+ = 815,9$.

Sản phẩm thủy phân được hòa tan trong diclometan (5 mL) và TFA (10 mL), và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Tiến trình của phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi loại bỏ Boc hoàn thành (~4 giờ), dung dịch được cô đặc đến khô bằng máy cô quay, và sau đó được hòa tan trong 8 ml nước. Dung dịch thu được được khuấy thêm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LCMS đã cho thấy việc loại bỏ các nhóm bảo vệ axetonit hoàn thành. Hỗn hợp này được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký lỏng pha đảo (RPLC) bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với axetonitril 5% đến 40%/nước với TFA 0,1% làm chất cải biến. Thu được trong ba bước 780 mg, hiệu suất 65,0%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + 2H)/2]^+ = 575,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 384,8$.

Ví dụ 147. Thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi để chọn lọc các virut cúm kháng thuốc

Đánh giá tiềm năng phát triển các chủng virut đột biến kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc với các chất ức chế virut, các nghiên cứu cấy chuyển theo chuỗi được thực

hiện với thể liên hợp 6 và 33, so với các chất so sánh oseltamivir và baloxavir. Các nghiên cứu cấy chuyển theo chuỗi được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào A549 hoặc MDCK. Việc cấy chuyển được thực hiện như sau: 150.000 tế bào A549 hoặc MDCK được gieo mầm trong mỗi giếng (12 giếng) trong 500 µl DMEM FBS 10%, PS 1%, NaPyr 1% và HEPES 1% và được ủ trong khoảng 24 giờ. Khi các tế bào đã đạt đến độ hợp lưu khoảng 80%, chúng được rửa một lần bằng PBS và được ủ trong 2 giờ với sự có mặt của các hợp chất hoặc một mình PBS trong các điều kiện nuôi cấy bình thường. Nồng độ của chất thử nghiệm được tối ưu hóa theo yêu cầu để ức chế virut tối đa, trong khi vẫn duy trì đủ mức sản xuất virut cho các lần cấy chuyển tiếp theo. Nồng độ của chất thử nghiệm được sử dụng trong các thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi được thể hiện trên các FIG. 67 và 68. Các tế bào sau đó được lây nhiễm ở MOI là 0,01 hoặc 0,05 (MDCK và các tế bào A549, tương ứng; 150 µl được pha loãng trong dung dịch đệm lây nhiễm) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong dung dịch đệm chứa PBS, albumin bò 35% và Ca^{2+}/Mg^{2+}, tiếp theo là loại bỏ chất cấy và rửa tế bào một lần bằng DMEM 1% PS, NaPyr 1% và HEPES 1% (không có FBS). Các tế bào sau đó được ủ trong 24 giờ với sự có mặt của chất thử nghiệm được pha loãng trong DMEM 1% PS, NaPyr 1%, HEPES 1% và 1 µg/ml trypsin được xử lý bằng TPCK. Sau khi ủ, dịch nổi bề mặt virut được thu thập, và tế bào và các mảnh vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm (5 phút, 4°C, 1.400xg). Dịch nổi bề mặt sau đó được sử dụng để:

i Định lượng hiệu giá virut bằng thử nghiệm mảng bám

ii Tiến hành thử nghiệm ngưng kết hồng cầu để xác định liệu virut có thoát khỏi sự ức chế của hợp chất

iii Gây nhiễm lại tế bào A549 hoặc MDCK mới được gieo mầm với sự có mặt của hợp chất.

Quy trình được thực hiện lặp lại trong 10 lần cấy chuyển, hoặc cho đến khi tính kháng quan sát được đối với các mẫu đối chứng được dùng oseltamivir và baloxavir. Khi hiệu giá được tăng với sự có mặt của thuốc được phát hiện đối với hai lần cấy chuyển liên tiếp, virut có thể được tinh chế mảng bám. Sau khi tinh chế mảng bám, tất cả 8 mảnh của bộ gen được giải trình tự và so sánh với viut đối chứng được điều trị bằng PBS để phát hiện các đột biến đã thoát ra. Tóm tắt về hai thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi khác nhau được thể hiện trên các FIG. 67 và 68. Trong thí nghiệm được tổng hợp trên FIG. 67, thể liên hợp 6 được so sánh với oseltamivir và baloxavir bằng

cách sử dụng các tế bào A549 được lây nhiễm với A/California/04/09/ H1N1 pdm. Thể liên hợp 6, baloxavir và oseltamivir được sử dụng ở lần lượt 0,5 nM, 0,5 nM và 200 nM. Đã quan sát được hiệu giá kháng thể không tăng đối với thể liên hợp 6 trong suốt thời gian 11 lần cấy chuyển (cho thấy không có sự xuất hiện của các đột biến kháng thuốc), trong khi hiệu giá baloxavir và oseltamivir tăng đến mức tương tự với mức quan sát được trong mẫu đối chứng dùng PBS sau lần lượt các lần cấy chuyển 5 và 11. Trong thí nghiệm được tổng hợp trên FIG. 68, các thể liên hợp 6 và 33 được so sánh với oseltamivir và baloxavir bằng cách sử dụng các tế bào MDCK được lây nhiễm với A/WSN/1933 H1N1. Thể liên hợp 6, thể liên hợp 33, baloxavir và oseltamivir được sử dụng lần lượt ở 4 nM, 2 nM, 4 nM, và 50 nM. Quan sát được hiệu giá kháng thể không tăng đối với thể liên hợp 6 hoặc 33 trong suốt thời gian 10 lần cấy chuyển (cho thấy không có sự xuất hiện của các đột biến kháng thuốc), trong khi hiệu giá baloxavir và oseltamivir tăng đến mức tương tự với mức quan sát được trong mẫu đối chứng dùng PBS sau lần lượt các lần cấy chuyển 5 và 10.

Ví dụ 148. Tổng hợp thể liên hợp 6a

Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự với thể liên hợp 6 (Ví dụ 20) bằng cách sử dụng Int-7a (Ví dụ 100). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 62063. Da (DAR = 2,7). Thu được 175,4 mg, hiệu suất 50%.

Ví dụ 149. Tổng hợp thể liên hợp 6b

Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự với thể liên hợp 6 (Ví dụ 20) bằng cách sử dụng Int-7b (Ví dụ 101). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 62063. Da (DAR = 2,8). Thu được 175,4 mg, hiệu suất 50%.

Ví dụ 150. Tổng hợp thể liên hợp 6c

Thể liên hợp nêu ở đề mục được điều chế tương tự với thể liên hợp 6 (Ví dụ 20) bằng cách sử dụng Int-7c (Ví dụ 102). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 62782. Da (DAR = 3,2). Thu được 175,4 mg, hiệu suất 50%.

Ví dụ 151. Tổng hợp thể liên hợp 44

Thể liên hợp này được điều chế tương tự với Ví dụ 80 (Thể liên hợp 20) bằng PEG4-azido-Fc (SEQ ID NO: 73, được điều chế như trong Ví dụ 124) và Int-22 (Ví dụ 79). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 62,882 Da (DAR = 5,6).

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 44 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 44 được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 152. Thử nghiệm độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể

Thể liên hợp 6 và thể liên hợp 33 được thử nghiệm về độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). Đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc cúm B ở MOI bằng 0,001 – 10, và được ủ trong 18-24 giờ ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCC được xác định với dòng tế bào báo cáo thương mại (PROMEGA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 nM vào các giếng thích hợp và được ủ trong 15 phút ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCC được định lượng bằng cách đọc độ phát quang. Thể liên hợp 6 được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI (FIG. 69), và mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng ở MOI bằng 1 (FIG. 70). Thể liên hợp 33 được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) các FIG. 71A-71C, và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, FIG. 72), cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 33. Thể liên hợp 33 cũng cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI bằng 1 (FIG. 73A) và MOI bằng 10 (FIG. 73B). Kháng thể đơn dòng, Gedivumab (Genentech) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính để so sánh gắn kết thụ thể của kháng thể có chiều dài đầy đủ với gắn kết thụ thể của thể liên hợp Fc. Gedivumab cũng cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI khi được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1, FIG. 74), và mức tăng

ADCC phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI bằng 1 (FIG. 75A) và MOI bằng 10 (FIG. 75B).

Ví dụ 153. Thử nghiệm quá trình thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể

Thể liên hợp 6 và thể liên hợp 33 được thử nghiệm về quá trình thực bào tế bào. Đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc cúm B ở MOI bằng 0,001 – 10, và được ủ trong 18-24 giờ ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCP được xác định với dòng tế bào báo cáo thương mại (PROMEGA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 nM vào các giếng thích hợp và được ủ trong 15 phút ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCP được định lượng bằng cách đọc độ phát quang. Thể liên hợp 6 được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI (FIG. 76), và mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng ở MOI bằng 1 (FIG. 77A) và MOI bằng 10 (FIG. 77B). Thể liên hợp 33 được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) (lần lượt các FIG. 78A-78C), và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, FIG. 79), cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 33. Thể liên hợp 33 cũng cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI bằng 1 (FIG. 80A) và MOI bằng 10 (FIG. 80B). Gedivumab (Genentech) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính để so sánh gắn kết thụ thể của kháng thể có chiều dài đầy đủ với gắn kết kháng thể của thể liên hợp Fc. Gedivumab cũng cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI khi được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1, FIG. 81), và mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở MOI bằng 1 (FIG. 82A) và MOI bằng 10 (FIG. 82B).

Ví dụ 154. Ức chế neuraminidaza với virut cúm A sống hoặc sản phẩm ly giải của các đột biến kháng neuraminidaza

Ức chế neuraminidaza (NAI). Chất thử nghiệm được ủ với neuraminidaza (Sino Biological) hoặc với virut sống trong 20 phút ở 37°C, CO_2 5%. Cơ chất axit 2′-(4-Metylumbeliferyl)-α-D-N axetylneuraminic được bổ sung vào các giếng thích hợp và được ủ trong 1 giờ ở 37°C, CO_2 5%. NAI được xác định bằng cách đọc huỳnh quang ở

bước sóng kích thích 355 nm/phát xạ 460 nm. Mức ức chế neuraminidaza được xác định đối với các đột biến kháng neuraminidaza và đối với virut cúm sống (Bảng 66, Bảng 67, Bảng 68, và Bảng 69).

Bảng 66: Ức chế neuraminidaza với sản phẩm ly giải của các đột biến kháng neuraminidaza

					H1N1 dạng dại	H1N1 H275Y	H3N2 dạng dại	H3N2 E119V	H3N2 R292K	H5N1 dạng dại	H7N9 dạng dại
	TM	DAR	Liên kết cầu nối trung tâm	Fc	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	3,80	743,90	2,18	455,70	8015,00	15,44	2,95
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	2,15	1,93	4,27	112,60	116,50	2,05	11,11
Int-7a	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	22,58	9,42	21,11	679,40	993,60	17,06	49,04
Int-7b	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	34,82	13,84	32,07	1079,00	1584,00	29,56	87,54
Int-7b	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	2002,00	872,40	2914,00	>10.000	>10.000	2706,00	3325,00
Thể liên hợp 6a	Int-7a	2,7	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 18	0,37	0,43	4,14	4,66	4,85	0,59	1,18
Thể liên hợp 6b	Int-7b	2,8	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 18	0,24	0,30	2,05	3,67	7,41	0,54	0,98
Thể liên hợp 6c	Int-7c	3,2	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 18	0,98	0,66	35,60	4423,00	1451,00	1,25	10,41
Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 73	1,39	2,61	13,09	13,21	17,69	3,51	5,66

51349

695/1174

Bảng 67: Ức chế neuraminidaza với virut cúm A sống

					A/PR/8/1934 (H1N1)	A/Ca/7/2009 (H1N1)	A/HK/1/1968 (H3N2)	B/Brisbane 60/2008 (Victoria)	B/Florida/4/2006 (Yamagata)
	TM	DAR	Liên kết cầu nối trung tâm	Fc	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]	IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	3,76	0,88	0,16	36,61	24,65
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,35	0,28	0,43	6,74	3,60
Int-7a	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	0,45	2,10	3,62	13,54	25,54
Int-7b	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	0,98	3,78	5,57	16,03	17,26
Int-7c	N/A	N/A	15 nguyên tử	N/A	150,90	399,40	467,50	1942,00	5512,00
Thể liên hợp 6a	Int-7a	2,7	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 18	0,22	0,56	0,41	2,24	4,65
Thể liên hợp 6b	Int-7b	2,8	15 nguyên tử	SEQ ID NO:	0,14	0,25	0,30	1,39	2,30

51349

696/1174

				18					
Thể liên hợp 6c	Int-7c	3,2	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 18	0,29	0,35	0,60	99,08	44,37
Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	15 nguyên tử	SEQ ID NO: 73	1,12	2,05	1,71	7,75	16,47

51349

697/1174

Bảng. 68: Ức chế neuraminidaza với thể đột biến H3N2 dạng dại, E119V hoặc chủng cúm sống A/Ca/07/2009

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	H3N2 dạng dại IC_{50} [nM]	H3N2 E119V IC_{50} [nM]	A/Ca/07/2009pdm IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	2,873	150,1	0,7411
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	6,302	35,68	0,8452
Int-3	N/A	N/A	N/A	27 nguyên tử	31,25	108,3	1,172
Int-4a	N/A	N/A	N/A	N/A	32,94	147,1	7,102
Int-7a	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	33,62	185,9	3,825
Int-7c	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	4428	13972	470,5
Int-22	N/A	N/A	N/A	N/A	13,25	23,23	1,295
Int-73	N/A	N/A	N/A	14 nguyên tử	33,63	174,3	4,605
Int-74	N/A	N/A	N/A	16 nguyên tử	32,89	157,9	1,551
Int-75	N/A	N/A	N/A	17 nguyên tử	34,51	164	1,759
Int-76	N/A	N/A	N/A	18 nguyên tử	32,95	166,4	2,07
Int-80	N/A	N/A	N/A	N/A	80,97	628,9	21,89
Int-91	N/A	N/A	N/A	N/A	95,7	529	46
Thể liên hợp 6	Int-7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 nguyên tử	206,5	3610	1,366
Thể liên hợp 33	Int-7a	6,1	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	3,051	2,913	0,2656
Thể liên hợp 33	Int-7a	6,8	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	6,197	86,06	0,1007
Thể liên hợp 43	Int-80	7,0	SEQ ID NO: 73	N/A	11,28	11,64	1,231
Thể liên hợp 44	Int-22	5,6	SEQ ID NO: 73	N/A	6,815	5,816	0,7677

Bảng 69: Thử nghiệm ức chế neuraminidaza [nM] với đáp ứng chất ly giải NA

Chất thử nghiệm	TM	DAR	Liên kết cầu nối trung tâm	Chất ly giải IAV H1N1 NA		
				0,1 U/mL	1 U/mL	10 U/mL
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	2,162	19,45	729,9
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	0,6719	7,765	76,53
Int-7	N/A	N/A	15 nguyên tử	1958	12987	>10.000
Int-23	N/A	N/A	14 nguyên tử	0,2684	2,625	27,78
Thể liên hợp 6	Int-7	3,3	15 nguyên tử	16,28	13214	>10.000
Thể liên hợp 21	Int-7	2,2	14 nguyên tử	0,5004	2,65	9,101

Ví dụ 155. Thử nghiệm hiệu quả tế bào học

Để đo khả năng của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 33 trong việc bảo vệ động vật có vú tránh khỏi lây nhiễm và phá hủy bởi virut cúm, các thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên hiệu quả tế bào học (CPE) được thực hiện như được đề cập trong Ví dụ 25, với các thay đổi nhỏ. Tóm lại, đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc B ở MOI thích hợp thay đổi trong khoảng 0,001 – 1. Chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ dao động trong khoảng 0,1 – 10.000 nM và được ủ trong 3 ngày đối với cúm A hoặc 5 ngày đối với cúm B ở 37°C, CO_2 5%. CPE được xác định bằng cách nhuộm màu tím pha lê bằng cách đọc độ hấp thụ ở 595 nm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 70, Bảng 71, Bảng 72, và Bảng 73, dưới đây.

Bảng 70: CPE với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1)

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	MOI 0,01	MOI 0,1	MOI 1
					EC_{50} [nM]		
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	3005	>10.000	>10.000
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,4466	5,126	7,993
Thể liên hợp 6	Int-7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 nguyên tử	0,3561	35,52	1802

Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	0,2669	2,458	77,97

Bảng 71: CPE với chủng cúm A/Ca/07/2009 (H1N1)pdm

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	MOI 0,01	MOI 0,1	MOI 1
					EC_{50} [nM]		
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	288,2	>10.000	>10.000
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	1,439	3,186	11,3
Thể liên hợp 6	Int-7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 nguyên tử	18,13	513,4	>1,000
Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	1,845	39,66	>1,000

Bảng 72: CPE với chủng cúm A/WSN/1933 (t = -1 h)

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,1	MOI 1	MOI 10
					EC_{50} [nM]				
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	3911	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	1,261	3,64	8,306	8,266	17,1
Int-7a	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	8,704	13,22	2758	>10.000	>10.000
Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	3,097	2,754	8,147	868,1	>10.000

Bảng 73. CPE với cúm B (t = -1 h)

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	B/Brisbane	B/Florida	B/Malaysia
					EC_{50} [nM]		
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	969,1	>10.000	5694
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	240,4	30,57	2294
Int-7a	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	<1,93	<1,93	0,8237
Thể liên hợp 33	Int-7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	3,699	0,1946	10,48

Ví dụ 156. Tổng hợp thể liên hợp 45

Thể liên hợp 45 được điều chế tương tự với thể liên hợp 33 (Ví dụ 129) bằng cách sử dụng PEG4-azido-Fc (hoặc SEQ ID NO: 72 (Thể liên hợp 45a) hoặc SEQ ID NO: 73 (Thể liên hợp 45b), được điều chế như trong Ví dụ 124) và Int-83 (Ví dụ 145). Phân tích Maldi TOF thể liên hợp đã điều chế tinh chế 45b thu được khối lượng trung bình là 62,927 Da (DAR = 4,2). Thể liên hợp đã điều chế 45a có cá DAR khác nhau cũng được mô tả ở đây (Ví dụ 199). Khi thuật ngữ thể liên hợp 45 được sử dụng, không nên coi nó chỉ giới hạn ở DAR cụ thể bất kỳ. Thể liên hợp thu được được thể hiện trên FIG. 102.

Thuật ngữ thể liên hợp 45, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là bao hàm cả thể liên hợp 45a và thể liên hợp 45b. Người nộp đơn lưu ý rằng SEQ ID NO: 72 (Thể liên hợp 45a) và SEQ ID NO: 73 (Thể liên hợp 45b) chỉ khác nhau ở lần lượt kiểu gen Fc, G1m(f) và G1m(fa). Các kiểu gen khác nhau được mong đợi sẽ có đặc tính giống với các đặc tính được mô tả ở đây.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 45a bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 45a được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72. Tương tự như vậy, cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 45b bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, trong khi Fc thu được có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 157. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với cúm A (H1N1) trong mô hình chuột mắc bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID) gây tử vong.

Chất thử nghiệm được đánh giá về bệnh cúm A gây tử vong ở chuột cái BALB/c scid (Jackson Laboratories, 6-8 tuần tuổi). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl (khoảng 1E3 virut cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg).

Các nhóm tiếp nhận phương pháp điều trị SC đơn lẻ bằng tá dược (PBS), mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1, hoặc thể liên hợp 45b hai giờ sau khi thử thách virut. Một nhánh riêng biệt của nghiên cứu gồm 3 nhóm chuột được điều trị bằng baloxavir marboxil (DC Chemicals, Thượng Hải, Trung Quốc) qua đường miệng, hai lần mỗi ngày, trong 1 ngày; cũng bắt đầu 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 74. Chuột được theo dõi trong 4 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng, hoặc được phát hiện trong tình trạng hấp hối, được ghi nhận là tử vong.

Bảng 74: Thiết kế nghiên cứu của nghiên cứu SCID

Nhóm	Chủng cúm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	N (balb/c)
1	A/PR/8/34 2E2 PFU/chuột nhắt	PBS	SC, T+2 giờ	---	10	5
2		hIgG1	SC, T+2 giờ	3	10	5
3		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 1 ngày	10	10	5
4		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 1 ngày	3	10	5
5		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	10	10	5
6			SC, T+2 giờ	3	10	5
7			SC, T+2 giờ	1	10	5

8			SC, T+2 giờ	0,3	10	5
9			SC, T+2 giờ	0,1	10	5
10	Mẫu đối chứng BW không bị lây nhiễm					5

Ở cuối nghiên cứu (Ngày 28) các con chuột tiếp nhận thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở tất cả các nồng độ liều nằm trong khoảng 10 và 0,3 mg/kg (Bảng 75). Thể liên hợp 45b chỉ không bảo vệ được với thử thách virut gây tử vong ở nồng độ được thử nghiệm thấp nhất là 0,1 mg/kg. Như mong đợi, các nhóm tiếp nhận tá dược hoặc Fc hIgG1 không được bảo vệ. Chuột được điều trị bằng baloxavir cũng được bảo vệ, nhưng ở liều dùng tích lũy cao hơn đáng kể là 20 mg/kg (mức sống sót 80%), ở tổng liều dùng là 6 mg/kg chỉ có 60% con chuột sống sót đến Ngày 28.

Bảng 75: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	Baloxavir (20)	Baloxavir (6)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)					Đối chứng
					10	3	1	0,3	0,1	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	80	80	100	100	100	100	100	100	60	100
7	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
9	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
10	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
11	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
12	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
13	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
14	0	0	100	80	100	100	100	100	100	100
15	0	0	100	80	100	100	100	100	100	100
16	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
17	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
18	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
19	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
20	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
21	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
22	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
23	0	0	100	60	100	100	100	100	80	100
24	0	0	80	60	100	100	100	100	40	100
25	0	0	80	60	100	100	100	100	20	100
26	0	0	80	60	100	100	100	100	20	100
27	0	0	80	60	100	100	100	100	0	100
28	0	0	80	60	100	100	100	100	0	100

Đối chứng = Không bị lây nhiễm

Hiệu lực của thể liên hợp 45b ở mô hình thiếu hụt miễn dịch nghiêm trọng này cũng rõ ràng dựa vào cân nặng (Bảng 76). Nồng độ thấp nhất của thể liên hợp cung

cấp mức bảo vệ hoàn toàn dựa trên kết quả đọc về mức tử vong là 0,3 mg/kg. Ở mức liều dùng này, mức giảm cân mạnh trung bình lớn nhất đối với các nhóm là tạm thời, và dẫn đến mức giảm thấp hơn 3% (xảy ra vào ngày 4). Hơn nữa, sự khác biệt về cân nặng đối với tất cả các nhóm được bảo vệ hoàn toàn là không đáng kể so với các con chuột không bị lây nhiễm.

Bảng 76: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	Baloxavir (20)	Baloxavir (6)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)					Đối chứng
					10	3	1	0,3	0,1	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,2	97,6	93,8	96,9	95,8	97,4	98	99	98	101,8
2	101,3	98,7	98,3	98,1	96,7	99,5	96,3	98,3	102,6	100,8
3	95,4	94,9	100,3	98,3	100,6	97,9	100,9	99,6	101	101
4	92,3	90,1	103,3	100,8	100,8	101,3	102,4	97,5	99,2	104,6
5	86,5	84,9	103,2	100,5	102,2	102	102,7	99,8	99,2	103,3
6	78,8	78	100,6	99,7	101,5	101,5	101,4	102	99,2	103,3
7			103,6	100	103,5	101,8	100,5	100,7	101,6	103,7
8			104,2	100,2	103,7	103,1	100,4	103,3	102,7	101,7
9			101,4	97,3	103,6	101,5	100,5	103,1	102,9	102,1
10			100,9	96	102,8	100,8	101,8	104,2	102,7	101,7
11			102,3	98,3	104,2	103,7	102,4	104,5	103,3	103,8
12			103	95,3	105,4	105,9	103	105,4	103,8	103,9
13			103,5	93,4	103,6	105,1	104,1	105,2	104	103,9
14			102,3	91,8	103,3	103,6	103,2	104,8	102,6	103,1
15			102,2		104,2	105,8	102,5	104,8	104,7	103,1
16			102,3		102	101,9	104	104,6	100,1	102,1
17			103,3		102	103,3	104,4	103,8	101,4	102,8
18			103,3		106,4	105,3	105,8	105,1	100,4	104,1
19			105,4		106,6	103,6	106,5	105,6	96,7	103,5
20			105,9		105,1	102,1	105,5	106,3	92,9	103,8
21			106,6		108,6	102,8	106,5	107,6	90,6	106
22			103,8		109,1	103,1	105,7	107,3	86,7	102,1
23			102,1		106,3	101,8	105,5	105,3		99,3
24			100		107,9	104	106	104,8		103,7
25					108,6	105,3	104,9	106,1		104,8

26					110	107,3	107,9	105,4		105,2
27					109	106,8	106	102,1		104
28					108,2	106,2	106,7	101,2		104,4

Đối chứng = Không bị lây nhiễm

Nhìn chung, các dữ liệu này chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 45b bằng cách bảo vệ các những con chuột được thử thách gây tử vong bằng liều dùng thể liên hợp SC đơn thấp tới 0,3 mg/kg. Điều này đã được thực hiện trong mô hình suy giảm miễn dịch nghiêm trọng với các con chuột hoàn toàn không có tế bào miễn dịch T & B, vốn rất cần thiết để loại bỏ các bệnh lây nhiễm cúm. Các dữ liệu này hỗ trợ việc sử dụng thể liên hợp 45b để điều trị cho những quần thể bệnh nhân suy giảm miễn dịch.

Ví dụ 158. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được tiêm dưới da với chủng cúm A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ở mô hình chuột gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một phương pháp điều trị dưới da (SC) duy nhất bằng thể liên hợp 45b (1, 0,3, 0,1, 0,03, hoặc 0,01 mg/kg), mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1, hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu được tổng kết trong Bảng 77.

Bảng 77: Thiết kế nghiên cứu đối với nghiên cứu chủng cúm A/PR/8/34 (H1N1)

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	Số con chuột
1	Tá dược	SC, T+2 giờ	na	10	5

2	Fc hIgG1	SC, T+2 giờ	1	10	5
3	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	1	10	5
4		SC, T+2 giờ	0,3	10	5
5		SC, T+2 giờ	0,1	10	5
6		SC, T+2 giờ	0,03	10	5
7		SC, T+2 giờ	0,01	10	5

Như mong đợi, các con chuột tiếp nhận tá dược hoặc mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1 đã tử vong vì lây nhiễm vào ngày 6 (Bảng 78). Tuy nhiên, chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở các mức liều dùng 1, 0,3, và 0,1 mg/kg. Mức tử vong với thể liên hợp 45b chỉ được quan sát ở nồng độ liều thấp nhất là 0,03 và 0,01 mg/kg.

Bảng 78: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

			Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	60	40	100	100	100	100	100
6	0	0	100	100	100	100	60
7	0	0	100	100	100	80	0
8	0	0	100	100	100	0	0
9	0	0	100	100	100	0	0
10	0	0	100	100	100	0	0
11	0	0	100	100	100	0	0
12	0	0	100	100	100	0	0
13	0	0	100	100	100	0	0
14	0	0	100	100	100	0	0

Hiệu lực của thể liên hợp 45b được hỗ trợ tiếp bởi các phép đo cân nặng hằng ngày. Như mong đợi, chuột được điều trị bằng tá dược hoặc Fc hIgG1 đã chứng minh mức giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi nhận là tử vong (Bảng 78).

Ngược lại với chuột đối chứng, các nhóm tiếp nhận thể liên hợp 45b ở liều lượng 1, 0,3, và 0,1 mg/kg duy trì cân nặng khỏe mạnh trong suốt quá trình nghiên cứu và không chứng minh được mức giảm cân mạnh tạm thời thấp hơn 7% (nhóm dùng liều dùng 0,1 mk/kg, Ngày 7; Bảng 79). Bằng cả phép đo mức sống sót và cân nặng. Thể liên hợp 45b đã chứng minh mức bảo vệ mạnh với thử thách gây tử vong của chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 với một liều dùng SC duy nhất thấp tới 0,1 mg/kg.

Bảng 79: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

			Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	97,0	98,0	97,7	96,7	98,2	98,8	96,2
2	98,6	99,9	100,8	101,9	101,0	100,5	100,4
3	90,7	92,4	98,8	98,9	96,7	93,3	92,0
4	82,1	83,4	97,7	97,5	95,1	87,5	84,7
5	76,2	76,9	98,4	96,3	94,7	87,6	79,3
6			102,1	102,4	99,7	84,1	76,8
7			101,8	103,1	93,8	78,8	
8			100,1	102,3	98,3		
9			103,4	103,7	104,3		
10			103,9	104,6	102,2		
11			101,8	102,5	101,7		
12			100,9	101,0	102,3		
13			106,0	104,8	105,6		
14			106,6	104,0	105,0		

Ví dụ 159. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được tiêm dưới da với chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm ở mô hình chuột gây tử vong.

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/California/07/2009 (H1N1) pdm) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 5 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một phương pháp điều trị dưới da (SC) duy nhất bằng thể liên hợp 45b hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu và mức liều dùng được tóm tắt trong Bảng 80.

Bảng 80: Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	số con chuột
1	Tá dược	SC, T+2 giờ	na	10	5
2	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	3	10	5
3	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	1	10	5
4	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,3	10	5
5	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,1	10	5

Như mong đợi, các con chuột tiếp nhận tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 7 (Bảng 81). Tuy nhiên, chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở các nồng độ thấp tới 0,3 mg/kg, và một phần như vậy ở liều lượng 0,1 mg/kg (60% mức sống sót). Đạt được mức bảo vệ hoàn toàn với chủng gây đại dịch độc lực

cao với một liều dùng duy nhất thấp hơn 1 mg/kg chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 45b với chủng cúm A liên quan về mặt lâm sàng.

Bảng 81: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
		3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	80	100	100	100	80
6	40	100	100	100	80
7	0	100	100	100	60
8	0	100	100	100	60
9	0	100	100	100	60
10	0	100	100	100	60
11	0	100	100	100	60
12	0	100	100	100	60
13	0	100	100	100	60
14	0	100	100	100	60

Hiệu lực của thể liên hợp 45b được hỗ trợ tiếp bởi các phép đo cân nặng hằng ngày. Như mong đợi, chuột được điều trị bằng tá dược đã chứng minh mức giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi nhận là tử vong (Bảng 82).

Ngược lại với chuột đối chứng, các con chuột tiếp nhận thể liên hợp 45b ở liều lượng 3, 1, hoặc 0,3 mg/kg chỉ chứng minh được mức giảm cân mạnh tạm thời khoảng 10%, đạt đỉnh vào ngày 3-5 (Bảng 82). Vào cuối nghiên cứu (Ngày 14) các con chuột này đã phục hồi phần lớn (hoặc vượt quá) trọng lượng ban đầu của chúng. Bằng cả phép đo mức sống sót và cân nặng thể liên hợp 45b đã chứng minh mức bảo vệ mạnh với thử thách gây tử vong của chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm với một liều dùng SC duy nhất 0,3 mg/kg. Hoạt tính với chủng gây đại dịch liên quan về mặt

lâm sàng được sử dụng trong nghiên cứu này hỗ trợ tính hữu ích của thể liên hợp 45b trong điều trị các lây nhiễm cúm nghiêm trọng.

Bảng 82: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
		3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	96,9	95,9	97,1	96,3	96,1
2	99,8	98,2	99,2	100,3	101,5
3	90	94,2	91,1	91,7	90,1
4	81	91,2	89,7	88,1	83,2
5	77,8	94,2	93,2	90,4	82,1
6		97,8	97,4	92,1	
7		97,6	96,3	90,3	
8		98,6	96,4	91,4	
9		101,3	98,9	94	
10		99,3	98,9	92,8	
11		100,4	101,7	95,3	
12		99,5	100,8	96,7	
13		100,1	100,9	97,3	
14		103,3	103,3	99,9	

Ví dụ 160. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được tiêm dưới da với chủng cúm A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) ở mô hình chuột gây tử vong.

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm chủng cúm IAV H3N2 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Hong Kong/1/1968) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một phương pháp điều trị dưới da (SC) duy nhất bằng thể liên hợp 45b hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut. Thiết kế nghiên cứu được tổng kết trong Bảng 83.

Bảng 83: Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu chủng cúm A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	Số con chuột
1	Tá dược	SC, T+2 giờ	na	10	5
2	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	1	10	5
3	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,3	10	5

Như mong đợi, các con chuột tiếp nhận tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 7 (Bảng 84). Tuy nhiên, chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở các mức liều dùng 1 và 0,3 mg/kg. Trong nghiên cứu này thể liên hợp 45b không được dùng liều dùng thấp hơn 0,3 mg/kg.

Bảng 84: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)	
		1	0,3
0	100	100	100
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	40	100	100
6	20	100	100

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)	
7	0	100	100
8	0	100	100
9	0	100	100
10	0	100	100
11	0	100	100
12	0	100	100
13	0	100	100
14	0	100	100

Hiệu lực của thể liên hợp 45b được hỗ trợ tiếp bởi các phép đo cân nặng hằng ngày. Như mong đợi, chuột được điều trị bằng tá dược đã chứng minh mức giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi nhận là tử vong (Bảng 85).

Ngược lại với chuột đối chứng, các nhóm tiếp nhận thể liên hợp 45b ở liều lượng 1 và 0,3 mg/kg duy trì cân nặng gần như khỏe mạnh trong suốt quá trình nghiên cứu và không chứng minh được mức giảm cân mạnh tạm thời thấp hơn 11% trước khi lấy lại gần như cân nặng ban đầu của chúng vào cuối nghiên cứu (Bảng 85). Bằng cả phép đo mức sống sót và cân nặng thể liên hợp 45b đã chứng minh mức bảo vệ mạnh với thử thách gây tử vong của cúm A (H3N2) với một liều dùng SC duy nhất thấp tới 0,3 mg/kg.

Bảng 85: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)	
		1	0,3
0	100	100	100
1	99,2	96	98,1
2	94,1	94,2	94,4
3	89,5	91	89,1

4	88,6	94,1	90,5
5	84,1	93,1	89,1
6		96,3	90,6
7		95	90,2
8		97,3	92,8
9		96,7	93,2
10		97,8	94,6
11		99,9	97,5
12		98,3	97,4
13		98,9	99,5
14		98,6	100,2

Ví dụ 161. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với cúm B (Victoria dòng) ở mô hình chuột gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về lây nhiễm bệnh cúm từ chủng cúm B gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (B/Malaysia/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 6 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl (khoảng 1E4 cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg).

Tất cả các nhóm tiếp nhận phương pháp điều trị SC duy nhất, 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm, tá dược (PBS), hoặc nhóm đối chứng chỉ dùng Fc (Fc hIgG1). Nghiên cứu đã đánh giá các nồng độ của thể liên hợp 45b ở liều lượng 1, 0,3, 0,1, và 0,03 mg/kg. Chuột được theo dõi trong 2 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng, hoặc được phát hiện trong tình trạng hấp hối, được ghi nhận là tử vong.

Tất cả các con chuột được điều trị bằng tá dược hoặc nhóm đối chứng chỉ dùng Fc, đạt mức tử vong vào ngày 7. Ngược lại, các con chuột tiếp nhận liều lượng 1, 0,3, hoặc 0,1 mg/kg của thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn sau khi tiếp nhận một liều dùng SC duy nhất (Bảng 86). Hiệu lực của thể liên hợp 45b với cúm B được hỗ trợ

tiếp bởi các phép đo cân nặng (Bảng 87), cho thấy mức giảm tạm thời thấp hơn 5% ở 0,3 mg/kg.

Bảng 86: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
			1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100
6	100	80	100	100	100	100
7	0	0	100	100	100	20
8	0	0	100	100	100	0
9	0	0	100	100	100	0
10	0	0	100	100	100	0
11	0	0	100	100	100	0
12	0	0	100	100	100	0
13	0	0	100	100	100	0
14	0	0	100	100	100	0

Bảng 87: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
			1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100
1	98,1	97	98,1	98,2	97,8	98,7
2	98,7	99,7	101,7	100,6	101,5	102,7
3	97,8	97,7	102,1	98,4	101,6	101,3
4	88	87,7	99,8	96,9	96,8	92

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
5	78,3	80,6	99,6	95,4	94,5	83,8
6	77,9	77,6	102,5	100,1	90,7	80
7			103,5	100,7	86,1	75,3
8			103	100,3	86,3	
9			103,2	101,1	91,5	
10			102,8	101	94	
11			101,2	99,7	94,1	
12			101,9	99,9	96,1	
13			102,9	101,6	97,6	
14			102,5	99,9	98,6	

Ví dụ 162. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với cúm B (Yamagata dòng) ở mô hình chuột gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về lây nhiễm bệnh cúm từ chủng cúm B gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (B/Florida/4/2006) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl (khoảng 3E4 cho mỗi con chuột), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg).

Tất cả các nhóm tiếp nhận phương pháp điều trị SC duy nhất, 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm, tá dược (PBS), hoặc nhóm đối chứng chỉ dùng Fc (Fc hIgG1). Nghiên cứu đã đánh giá các nồng độ của thể liên hợp 45b từ 3 đến 0,03 mg/kg. Chuột được theo dõi trong 2 tuần và các con chuột giảm hơn 20% cân nặng, hoặc được phát hiện trong tình trạng hấp hối, được ghi nhận là tử vong.

Tất cả các con chuột được điều trị bằng tá dược đạt mức tử vong vào ngày 8, trong khi mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1 có mức tử vong 80%. Ngược lại, các con chuột tiếp nhận thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn sau khi tiếp nhận một liều dùng SC duy nhất ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm (Bảng 88).

Bảng 88: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
			3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100
7	40	60	100	100	100	100	100
8	0	40	100	100	100	100	100
9	0	20	100	100	100	100	100
10	0	20	100	100	100	100	100
11	0	20	100	100	100	100	100
12	0	20	100	100	100	100	100
13	0	20	100	100	100	100	100
14	0	20	100	100	100	100	100

Hiệu lực của thể liên hợp 45b với cúm B (Yamagata) được hỗ trợ tiếp bởi các phép đo cân nặng (Bảng 89), cho thấy mức giảm tạm thời thấp hơn 4% ở 0,03 mg/kg, nồng độ được thử nghiệm thấp nhất.

Bảng 89: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
			3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	98,7	100,5	97,8	99,2	99,1	98,7	96,8
2	99,6	99,8	99,1	98,4	98,9	99,4	98,6
3	98,7	99,3	100,8	101,2	101,2	103,8	100,9
4	89,8	91	100,4	99,3	98,3	98,5	97,3

5	84,6	87,6	99,2	97,5	98	98,2	96,2
6	80,2	86,6	103,4	100,7	100,9	101,8	100,4
7	75,5	79,9	101,3	102,3	100,8	101,4	96,9
8			102,7	103	103	102,7	99,2
9			100,2	101,9	101,7	100	99
10			102,6	102,8	101,7	101,3	100,7
11			103	105,1	104,1	102,3	101,9
12			101	103,2	101,8	100,2	100,1
13			103,3	104,9	103,9	103,7	104,2
14			101,8	104,6	103,1	101,6	102,1

Ví dụ 163. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với cúm H1N1, H3N2, và B (Victoria) ở mô hình ngăn ngừa chuột 28 ngày

Thể liên hợp 45b được đánh giá về thử thách gây tử vong bởi các phân nhóm cúm mùa (H1N1, H3N2, và B (dòng Victoria)) ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Thí nghiệm bao gồm 13 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột, ngoại trừ nhóm 6 (Tá dược, thử thách với A/HK/1/68), gồm 4 con chuột. Vào ngày 0, chuột được tiêm dưới da (SC) thể liên hợp 45b ở liều lượng 3, 1, hoặc 0,3 mg/kg trong một liều duy nhất. Chuột đối chứng cũng được điều trị bằng cùng con đường với tá dược (PBS) hoặc chỉ có Fc hIgG1. Hai mươi tám ngày sau khi dùng chất thử nghiệm, chuột được thử thách trong mũi ở mức LD95 gấp 3 lần của một trong số các phân nhóm cúm mùa sau:

A/California/07/2009 (H1N1)
A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)
B/Malaysia/8/1934 (B; dòng Victoria)

Đối với thử thách virut chuột được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg), và virut được đưa vào với thể tích là 30 µl. Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Đối với nhánh nghiên cứu H1N1, tất cả các con chuột chỉ được điều trị bằng tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 7. Nhóm đối chứng chỉ dùng Fc cũng không được bảo vệ, chỉ có 20% mức sống sót ở cuối nghiên cứu (Ngày 42, 14 ngày sau khi thử thách virut). Tuy nhiên, thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn trong một tháng với thể phân lập gây đại dịch này sau một liều dùng SC duy nhất ở 1 mg/kg (P=0,0020; Bảng 90). Ngay cả ở nồng độ thử nghiệm thấp nhất (0,3 mg/kg) 80% chuột đã sống sót đến cuối nghiên cứu. Các phép đo tỷ lệ phần trăm cân nặng (BW) hằng ngày hỗ trợ tiếp hiệu quả của thể liên hợp 45b trong mô hình này (Bảng 91), ở 1 mg/kg chuột có mức giảm tạm thời là 12,1% là mức điển hình đối với chủng gây đại dịch cao này, mà phần lớn đã phục hồi vào cuối nghiên cứu (96,5% giá trị ban đầu).

Bảng 90: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót đối với H1N1

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (3)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
			3	1	0,3
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	40	100	100	100
6	20	40	100	100	80
7	0	20	100	100	80
8	0	20	100	100	80
9	0	20	100	100	80
10	0	20	100	100	80
11	0	20	100	100	80
12	0	20	100	100	80
13	0	20	100	100	80
14	0	20	100	100	80

Bảng 91: Tỷ lệ phần trăm cân nặng đối với H1N1*

Ngày		Tá dược	Fc hIgG1 (3)	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
				3	1	0,3
0		100	100	100	100	100
1		100,2	93,6	99,6	93	97
2		97,1	93	99,5	93	97,7
3		89,1	87	92,7	88,1	90,9
4		82,3	80,6	89,8	89,1	89,4
5		77,7	77,4	89	88	87,2
6				88,9	87,9	87
7				90,9	90,7	
8				92,1	90,5	
9				92,9	90,4	
10				96	92,2	
11				95,1	94,5	
12				94,7	94,3	
13				96,2	96,2	
14				97	96,5	

*Lưu ý rằng BW chỉ được đưa ra cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Đối với nhánh nghiên cứu H3N2 (A/Hong Kong/1/1968), tất cả các con chuột chỉ được điều trị bằng tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 8. Ngược lại với nhóm chỉ được điều trị bằng tá dược, tất cả nồng độ thể liên hợp 45b bảo vệ hoàn toàn, ngay cả ở mức liều dùng là 0,3 mg/kg (P=0,0007; Bảng 92). Như nhìn thấy với nhánh nghiên cứu H1N1, các phép đo BW hằng ngày hỗ trợ tiếp hiệu quả của thể liên hợp 45b với phân nhóm H3N2 (Bảng 93), ở 0,3 mg/kg chuột có mức giảm tạm thời thấp hơn 11%, với BW phần lớn đã phục hồi vào cuối nghiên cứu (98,4% giá trị ban đầu).

Bảng 92: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót đối với H3N2

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	75	100	100	100
8	0	100	100	100
9	0	100	100	100
10	0	100	100	100
11	0	100	100	100
12	0	100	100	100
13	0	100	100	100
14	0	100	100	100

Bảng 93: Tỷ lệ phần trăm cân nặng đối với H3N2

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	98,4	99,2	99,1	100
2	93,7	98,5	97,7	99,1
3	88,2	96,7	94,6	95,3
4	88,5	97,3	93,4	95,6
5	86,2	95,8	94	92,6
6	81,4	96,8	94,6	89,3

7	77	99,8	97,1	89,6
8		100,3	97,8	91,5
9		98,2	96,9	91,7
10		101,3	101,2	96,8
11		100,5	100,8	97,9
12		98,6	99,7	96,5
13		99,3	98,3	97
14		99,7	100,1	98,4

Nhánh nghiên cứu cuối cùng đã xác định hiệu quả của thể liên hợp 45b với dòng Victoria của chủng cúm B. Điển hình cho những gì đã thấy ở các nhánh khác của nghiên cứu này, chuột chỉ được điều trị bằng tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 7. Tương tự như kết quả với phân nhóm H1N1, một liều dùng SC duy nhất là 1 mg/kg đã bảo vệ hoàn toàn khỏi thử thách gây tử vong bởi cúm B (Bảng 94; P=0,0031) một tháng sau khi dùng thể liên hợp 45b. Ở nồng độ thử nghiệm thấp nhất (0,1 mg/kg), 60% chuột đã sống sót. Như trong nhánh nghiên cứu kia, dữ liệu BW hỗ trợ hiệu lực của thể liên hợp 45b. Đối với chủng B/Malaysia, các con chuột được điều trị ở 1 mg/kg cho thấy mức giảm BW tạm thời thấp hơn 6% đã được phục hồi vào cuối nghiên cứu (Bảng 95; 100,2%).

Bảng 94: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót đối với cúm B

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	60	100	100	100
7	0	100	100	100

8	0	100	100	40
9	0	100	100	40
10	0	100	100	40
11	0	100	100	40
12	0	100	100	40
13	0	100	100	40
14	0	100	100	40

Bảng 95: Tỷ lệ phần trăm cân nặng với cúm B

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg)		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	97,3	98,7	97,2	98,6
2	97,1	98,8	98,9	99,2
3	96,4	99,2	98,6	98,6
4	88,5	99,6	98,3	96,8
5	80,8	96,2	95,8	90
6	77	96,5	94,5	86,2
7		97,8	95,5	82,8
8		100,5	97	81,6
9		100,1	97,3	
10		102,3	99,7	
11		102,3	100,3	
12		100,7	98,7	
13		98,7	98,3	
14		101,6	100,2	

Ví dụ 164. Thử nghiệm giảm mảng bám *in vitro*

Các thử nghiệm khử mảng bám được thực hiện ở các tế bào thận Madin Darby Canine (MDCK) được gieo mầm trong các đĩa 24 giếng. 500.000 tế bào MDCK được

gieo mầm trong 0,5 mL môi trường (DMEM) chứa FBS 10% và được ủ trong khoảng 24 giờ. Các dung dịch pha loãng của chất thử nghiệm và virut được sử dụng, H1N1 dạng dại (A/California/12/2012) và H275Y (A/Texas/23/2012), H3N2 dạng dại (A/Washington/12/2007) và E119V (A/Texas/12/2007), và B (B/Malaysia/2506/2004), được thực hiện trong dung dịch đệm chứa PBS, albumin bò 35% và Ca^{2+}/Mg^{2+}. Các chất so sánh thể liên hợp 45b và baloxavir, zanamivir oseltamivir được ủ sơ bộ với virut trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi bổ sung chúng vào các đơn lớp của các tế bào MDCK sau khi loại bỏ môi trường và một lần rửa bằng PBS. MOI cho mỗi tổ hợp thuốc-virut được chọn lọc để hướng đích 30 mảng bám trong giếng đối chứng dùng PBS. Sự hấp thụ được thực hiện trong 1 giờ, hỗn hợp virut-chất thử nghiệm được loại bỏ, và các tế bào đã lây nhiễm được ủ trong 48 giờ với sự có mặt của chất thử nghiệm được pha loãng trong hỗn hợp của Avicel 1,25%, DMEM, DEAE-dextran 0,01% và 2 µg/mL TPCK trypsin. Sau 48 giờ, hỗn hợp Avicel sau đó được loại bỏ và các tế bào được cố định với paraformaldehyt và được nhuộm với màu tím pha lê 1% để đếm mảng bám. Tất cả các thuốc được thử nghiệm ở sáu nồng độ, nằm trong khoảng từ 0,3 đến 100 nM. Giá trị EC_{50} (nM) được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 96.

Bảng 96: Tóm tắt thử nghiệm khử mảng bám của thể liên hợp 45b giá trị EC_{50} đối với chủng cúm dạng dại và thể đột biến NA

Phân tử	EC_{50} (nM)				
	A/CA/12/2012 (H1N1)	A/TX/23/2012 (H1N1) H275Y	A/WA/12/2007 (H3N2)	A/TX/12/2007 (H3N2) E119V	B/Malaysia/2506/2004
Thể liên hợp 45b	1	1,2	≤0,3	1,2	4,1
baloxavir	4	1,6	4,8	3,2	8,4
zanamivir	35	93,8	>100	74	17,3
oseltamivir	>100	>100	29,6	>100	22,1

Thể liên hợp 45b đã chứng minh hoạt tính mạnh của nó trong các thử nghiệm khử mảng bám với tất cả các chủng H1N1, H3N2 và B được thử nghiệm, tạo ra các giá trị EC_{50} thấp hơn so với các giá trị đối với tất cả ba tác nhân so sánh (Bảng 96). Ngoài

ra, hoạt tính của thể liên hợp 45b bị ảnh hưởng tối thiểu bởi sự có mặt của các đột biến NA gây kháng oseltamivir E119V và H275Y

Ví dụ 165. Thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi để chọn lọc các virut cúm kháng thuốc

Để đánh giá tiềm năng phát triển các chủng virut đột biến kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc với chất ức chế virut, các nghiên cứu cấy chuyển theo chuỗi được thực hiện với các chất so sánh thể liên hợp 45b, so với oseltamivir và baloxavir. Các nghiên cứu cấy chuyển theo chuỗi được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào MDCK. Việc cấy chuyển được thực hiện như sau: 500.000 tế bào MDCK được gieo mầm trong mỗi giếng (24 giếng) trong 500 µl DMEM FBS 10%, PS 1%, NaPyr 1% và HEPES 1% và được ủ trong khoảng 24 giờ. Khi các tế bào đã đạt đến độ hợp lưu khoảng 80%, chúng được rửa một lần bằng PBS và được ủ trong 2 giờ với sự có mặt của các hợp chất hoặc một mình PBS trong các điều kiện nuôi cấy bình thường. Chọn lọc các nồng độ tác nhân được tối ưu hóa theo yêu cầu để ức chế virut tối đa, trong khi vẫn duy trì đủ mức sản xuất virut cho các lần cấy chuyển tiếp theo. Nồng độ của thể liên hợp 45b, baloxavir, và oseltamivir được sử dụng trong các thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi lần lượt là 4 nM, 4 nM và 200 nM. Các tế bào được lây nhiễm ở MOI là 0,01 với A/California/07/2009 H1N1 pdm trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong dung dịch đệm chứa PBS, albumin bò 35% và Ca^{2+}/Mg^{2+}, tiếp theo là loại bỏ chất cấy và rửa tế bào một lần bằng DMEM 1% PS, NaPyr 1% và HEPES 1% (không có FBS). Các tế bào sau đó được ủ trong 24 giờ với sự có mặt của các tác nhân chọn lọc được pha loãng trong DMEM 1% PS, NaPyr 1%, HEPES 1% và 2 µg/ml trypsin được xử lý bằng TPCK. Sau khi ủ, dịch nổi bề mặt virut được thu thập, và tế bào và các mảnh vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm (5 phút, 4°C, 1.400xg). Dịch nổi bề mặt sau đó được sử dụng để:

i Định lượng hiệu giá virut bằng thử nghiệm mảng bám ii Tiến hành thử nghiệm ngưng kết hồng cầu để xác định liệu virut có thoát khỏi sự ức chế của hợp chất

iii Gây nhiễm lại các tế bào MDCK mới được gieo mầm với sự có mặt của hợp chất

Quy trình được thực hiện lặp lại trong 10 lần cấy chuyển. Khi hiệu giá được tăng với sự có mặt của thuốc được phát hiện virut có thể được tinh chế mảng bám. Sau khi tinh chế mảng bám, tất cả 8 mảnh của bộ gen được giải trình tự và so sánh với viut

đối chứng được điều trị bằng PBS để phát hiện các đột biến đã thoát ra. Tóm tắt về cấy chuyển theo chuỗi được thể hiện trên FIG. 83. Đã quan sát được hiệu giá kháng thể không tăng đối với thể liên hợp 45b trong suốt thời gian 10 lần cấy chuyển (cho thấy không có sự xuất hiện của các đột biến kháng thuốc), trong khi hiệu giá baloxavir và oseltamivir tăng đến mức tương tự với mức quan sát được trong mẫu đối chứng dùng PBS sau lần lượt các lần cấy chuyển 6 và 8.

Ví dụ 166. Thử nghiệm hiệu quả tế bào học

Để đo khả năng của thể liên hợp 45b trong việc bảo vệ động vật có vú tránh khỏi lây nhiễm và phá hủy bởi virut cúm, các thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên hiệu quả tế bào học (CPE) được thực hiện như được đề cập trong Ví dụ 25, với các thay đổi nhỏ. Tóm lại, đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc B ở MOI thích hợp thay đổi trong khoảng 0,001 – 1. Chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ dao động trong khoảng 0,1 – 10.000 nM và được ủ trong 3 ngày đối với cúm A hoặc 5 ngày đối với cúm B ở 37°C, CO_2 5%. CPE được xác định bằng cách nhuộm màu tím pha lê bằng cách đọc độ hấp thụ ở 595 nm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 97 và Bảng 98 dưới đây.

Bảng 97: CPE của thể liên hợp 45b với cúm A H1N1 ở MOI 0,01 hoặc MOI 0,001 (CPE [nM])

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/WSN/1933	A/CA/07/2009pdm	A/CA/12/2012 H275	Thể đột biến A/Texas/23/2012 H275Y
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	>10.000	34,2	107,6	>10.000
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	33,16	54,59	327,7
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	3,676	2,964	0,7043	2,101
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	11,35	2,216	3,718	3,318

Bảng 98: CPE của thể liên hợp 45b với cúm A H3N2 ở MOI 0,01 hoặc MOI 0,001 (CPE [nM])

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/HK/1/1968	A/Wisconsin/04/2018	Thể đột biến A/Bethesda/956/2006 R292K	A/Washington/12/2007	Thể đột biến A/Texas/12/2007 E119V
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,7444	151,1	>10.000	1,908	351,4
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	<0,3	308	9591	1,968	2,096
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	<0,3	8,99	54,01	0,04449	0,6594
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	2,596	4,916	17,15	0,5252	5,602

Ví dụ 167. Ức chế neuraminidaza với virut cúm A sống hoặc sản phẩm ly giải của các đột biến kháng neuraminidaza

Ức chế neuraminidaza (NAI). Chất thử nghiệm được ủ với neuraminidaza (Sino Biological) hoặc với virut sống trong 20 phút ở 37°C, CO_2 5%. Cơ chất axit 2'-(4-Metylumbeliferyl)-α-D-N axetylneuraminic được bổ sung vào các giếng thích hợp và được ủ trong 1 giờ ở 37°C, CO_2 5%. NAI được xác định bằng cách đọc huỳnh quang ở bước sóng kích thích 355 nm/phát xạ 460 nm. Mức ức chế neuraminidaza được xác định đối với các đột biến kháng neuraminidaza và đối với virut cúm sống (Bảng 99, Bảng 100, Bảng 101, Bảng 102, và Bảng 103).

Bảng 99: NAI với virut cúm A (H1N1) sống

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/Ca/07/2009 (H1N1)pdm IC_{50} [nM]	A/PR/8/1934 (H1N1) IC_{50} [nM]	A/California/12/2012 (H1N1)pdm09 IC_{50} [nM]	A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,9103	2,427	1,28	367,9
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,5634	0,6041	0,8891	0,8505
Int-83	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	28,59	4,231	45,08	26,47
Thể liên	Int-83	4,8	SEQ ID	15 nguyên	0,8124	0,07184	2,527	1,471

hợp 45b			NO: 73	tử				

* Tất cả các virut sống được thử nghiệm ở 1e6 PFU.

Bảng 100: NAI với virut cúm A (H3N2) sống

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/Wash/1/2007 (H3N2) IC_{50} [nM]	A/Texas/12/2007 (H3N2) E119V IC_{50} [nM]	A/Texas/71/2017 (H3N2) IC_{50} [nM]	A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K* IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,2086	114,2	0,9502	4667
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	4,845	3,085	2,321	31,59
Int-83	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	99,05	50,22	301,1	1147
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	0,0233	2,79	11,3	23,55

* Tất cả các virut sống được thử nghiệm ở 1e6 PFU (ngoại trừ R292K được thử nghiệm ở 1e5 PFU)

Bảng 101: NAI với virut cúm A (H1N1)pdm09 sống

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/Illinois/08/2018 (H1N1)pdm09 I38 WT IC_{50} [nM]	A/Illinois/37/2018 (H1N1)pdm09 I38L IC_{50} [nM]	A/Illinois/08/2018 (H1N1)pdm09 I38T IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,43	0,71	0,58
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,37	0,47	0,50
Int-83	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	5,90	6,16	4,81
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	0,04	0,10	0,01

* Tất cả các virut sống được thử nghiệm ở 1e7 PFU.

Bảng 102: NAI với virut cúm A (H3N2) sống

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	A/Louisiana/50/2017 (H3N2) I38 WT IC_{50} [nM]	A/Louisiana/49/2017 (H3N2) I38M IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,26	0,19
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	0,48	0,37
Int-83	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	47,72	26,09
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	4,58	5,13

* Tất cả các virut sống được thử nghiệm ở 1e7 PFU.

Bảng 103: NAI với virut cúm B

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	B/Florida/4/2006 (Yamagata) IC_{50} [nM]	B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) IC_{50} [nM]	B/Colorado/6/2017 (Victoria) IC_{50} [nM]
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	14,37	32,02	35,03
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	4,755	4,147	5,112
Int-83	N/A	N/A	N/A	15 nguyên tử	275,3	273,1	124,8
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	2,888	1,514	19,83

* Tất cả các virut sống được thử nghiệm ở 1e6 PFU.

Ví dụ 168. Thử nghiệm thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể

Thể liên hợp 45b được thử nghiệm về thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP). Đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc

cúm B ở MOI bằng 0,001 – 10, và được ủ trong 18-24 giờ ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCP được xác định với dòng tế bào báo cáo thương mại (PROMEGA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 nM vào các giếng thích hợp và được ủ trong 15 phút ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCP được định lượng bằng cách đọc độ phát quang. Thể liên hợp 45b và Fc một mình (SEQ ID NO: 73, được điều chế tương tự với Ví dụ 124) được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) (lần lượt các Bảng 104-106), và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Bảng 107), cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 45b. Thể liên hợp 45b cũng cho thấy mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) ở MOI bằng 10 (lần lượt các Bảng 108-110), và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Bảng 111).

Bảng 104: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A

MOI của chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1)	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	1	1
0,1	1,13	1,8
0,3	1,21	9,95
1	0,96	13,77
3	1,1	14,94
10	1,05	13,76

Bảng 105: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A

MOI của chủng cúm A/CA/7/2009 (H1N1)pdm	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]

0	0,98	1,02
0,1	1,14	6,33
0,3	1,03	22,16
1	0,99	18,27
3	0,93	19,61
10	1,05	21,11

Bảng 106: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A

MOI của chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2)	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	1,02	0,98
0,1	1,07	1,48
0,3	1,05	2,63
1	1,18	2,74
3	1,01	4,3
10	1,06	4,39

Bảng 107: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm B

MOI của chủng cúm B/Malaysia/2506/2004	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	1,07	0,93
0,1	0,98	1,67
0,3	0,99	6,93
1	1,14	25,86
3	1,11	34,29
10	1	30,38

Bảng 108: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45b
0	0,96	1,04
100	1,22	3,44
300	1,56	7
1000	1,91	17,04
3000	2,22	28,54
10000	3,08	44,93

Bảng 109: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/CA/7/2009 (H1N1)pdm [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45b
0	0,98	1,02
100	1,64	2,32
300	1,74	5,41
1000	2,15	10,04
3000	2,13	24,28
10000	2,24	33,87

Bảng 110: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45b
0	1,01	0,99
100	1,03	1,81
300	1,48	3,33
1000	2,29	6,09

3000	2,87	9,01
10000	2,11	9,96

Bảng 111: Mức tăng ADCP phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 ở MOI 10

Chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b
0	1,15	0,85
100	1,3	6,67
300	2,09	26,21
1000	2,32	61,43
3000	3,26	96,95
10000	3,91	104,49

Ví dụ 169. Thử nghiệm độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể

Thể liên hợp 45b được thử nghiệm về độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). Đơn lớp của các tế bào MDCK được lây nhiễm với các chủng cúm A hoặc cúm B ở MOI bằng 0,001 – 10, và được ủ trong 18-24 giờ ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCC được xác định với dòng tế bào báo cáo thương mại (PROMEGA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 nM vào các giếng thích hợp và được ủ trong 15 phút ở 37°C, trong CO_2 5%. ADCC được định lượng bằng cách đọc độ phát quang. Thể liên hợp 45b và Fc một mình (SEQ ID NO: 73, được điều chế tương tự với Ví dụ 124) được thử nghiệm với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) (lần lượt các Bảng 112-114), và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Bảng 115), cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 45b. Thể liên hợp 45b cũng cho thấy mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1), chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1), và chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) ở MOI bằng 10 (lần lượt các Bảng 116-118), và chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Bảng 119).

Bảng 112: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A

Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	0,97	1,03
0,1	1,22	1,54
0,3	1,27	2,27
1	1,47	4,03
3	1,92	6,14
10	2,34	11,46

Bảng 113: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI bởi thể liên hợp 45b với cúm A

Chủng cúm A/CA/7/2009 (H1N1)pdm MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	1,02	0,98
0,1	1,23	1,48
0,3	1,4	2,21
1	1,62	3,74
3	1,74	6,08
10	2,14	9,59

Bảng 114: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A

Chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	0,99	1,01
0,1	1,31	1,46
0,3	1,66	2,17
1	2,48	3,4
3	1,43	2,74

Chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
10	0,89	2,34

Bảng 115: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào MOI (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm B

Chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45b [1 μM]
0	0,97	1,03
0,1	1,27	3,6
0,3	1,64	9,38
1	2,36	22,09
3	2,65	26,21
10	2,87	34,46

Bảng 116: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45b
0	0,93	1,07
100	1,12	1,78
300	1,25	3,8
1000	1,4	5,16
3000	1,19	7,09
10000	1,03	5,68

Bảng 117: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/CA/7/2009 (H1N1)pdm [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45b

0	0,91	1,09
100	1,16	3,44
300	1,02	5,53
1000	1,21	6,18
3000	1,17	6,05
10000	1,15	5,48

Bảng 118: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với cúm A ở MOI 10

Chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2) [nM]	Fc một mình	Thể liên hợp 45
0	0,97	1,03
100	1,11	1,42
300	1,15	2,24
1000	1,11	2,93
3000	1,11	3,08
10000	1,09	2,67

Bảng 119: Mức tăng ADCC phụ thuộc vào liều lượng (số lần gây cảm ứng) bởi thể liên hợp 45b với chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 ở MOI 10

Chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 MOI	Fc một mình	Thể liên hợp 45
0	0,96	1,04
100	1,18	4,16
300	1,11	5,34
1000	1,18	15,21
3000	1,04	14,84
10000	1,02	12,11

Ví dụ 170. Hiệu quả của thể liên hợp 45b ở mô hình cúm gây tử vong chuột: Nghiên cứu #58

Thể liên hợp 45b được đánh giá chống lại chủng cúm A/PR/8/1934 (3E2 PFU) gây tử vong ở chuột cái BALB/c (6-8 tuần tuổi, n=5/nhóm). Thiết kế nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 120. Các con chuột được điều trị bằng chất thử nghiệm ở t=+2 giờ (SC) sau khi lây nhiễm với một liều dùng duy nhất đối với thể liên hợp 45b hoặc hai lần mỗi ngày trong 4 ngày đối với tác nhân đối chứng. Tất cả các con chuột được theo dõi về cân nặng hằng ngày. Chuột được giết vào ngày 4 sau khi lây nhiễm và cả hai thùy phổi được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất để xác định tải lượng virut và đáp ứng miễn dịch. Dữ liệu được thể hiện trong các bảng 121-123.

Bảng 120: Nghiên cứu hiệu quả của thiết kế #58

Nhóm	Chất thử nghiệm (DAR)	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng [mg/kg]	Liều dùng/ngày [mg/kg]
1	PBS	SC, T+2 giờ	N/A	N/A
2	Fc hIgG1	SC, T+2 giờ	3	3
3	Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	5	10
4	Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	50	100
5	Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	15	30
6	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	0,1	0,1
7	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	0,3	0,3
8	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	1	1
9	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	3	3

Nhóm	Chất thử nghiệm (DAR)	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng [mg/kg]	Liều dùng/ngày [mg/kg]
10	Không bị lây nhiễm	N/A	N/A	N/A

Bảng 121: Tải lượng virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm theo PFU/g

Nhóm	Chất thử nghiệm [mg/kg]	PFU/g	Mức giảm log PFU/g
1	PBS [0]	1,92E+07	0,00
2	Fc hIgG1 [3]	5,12E+07	-0,43
3	Oseltamivir [5]	2,86E+06	0,83
4	Oseltamivir [50]	2,66E+06	0,86
5	Baloxavir [15]	BLD (<10)	N/A (>6)
6	Thể liên hợp 45b [0,1]	1,50E+06	1,11
7	Thể liên hợp 45b [0,3]	1,26E+05	2,18
8	Thể liên hợp 45b [1]	1,32E+04	3,16
9	Thể liên hợp 45b [3]	5,00E+03	3,58
10	Không bị lây nhiễm	BLD	N/A

Bảng 122: Mức xytokin vào ngày 4 sau khi lây nhiễm

Chất thử nghiệm [mg/kg]	TNF-α [pg/mL]	IL-6 [pg/mL]	MCP-1 [pg/mL]	MIP-1α [pg/mL]	KC [pg/mL]
PBS [0]	1077,2	1446,6	21219,9	3750,8	8090,4
Fc hIgG1 [3]	958,6	1129,5	20534,7	3545,1	7730,8
Oseltamivir [5]	861,6	714,2	5301,6	1439,8	3466,4
Oseltamivir [50]	501,7	467,1	4572,8	948,2	2705,5
Baloxavir [15]	522,5	308,7	338,7	185,6	392,0
Thể liên hợp 45b	515,3	470,5	6807,3	1506,5	2954,1

Chất thử nghiệm [mg/kg]	TNF-α [pg/mL]	IL-6 [pg/mL]	MCP-1 [pg/mL]	MIP-1α [pg/mL]	KC [pg/mL]
[0,1]					
Thể liên hợp 45b [0,3]	521,7	424,9	2957,5	820,1	1788,5
Thể liên hợp 45b [1]	460,0	329,8	2005,2	451,7	1262,8
Thể liên hợp 45b [3]	464,8	309,2	739,4	246,4	678,8
Không bị lây nhiễm	488,0	312,6	423,9	177,8	444,6

Bảng 123: Mức xytokin vào ngày 4 sau khi lây nhiễm tính theo số lần tăng so với mẫu đối chứng không bị lây nhiễm

Chất thử nghiệm [mg/kg]	TNF-α	IL-6	MCP-1	MIP-1α	KC
PBS [0]	2,21	4,63	50,06	21,10	18,20
Fc hIgG1 [3]	1,96	3,61	48,44	19,94	17,39
Oseltamivir [5]	1,77	2,28	12,51	8,10	7,80
Oseltamivir [50]	1,03	1,49	10,79	5,33	6,09
Baloxavir [15]	1,07	0,99	0,80	1,04	0,88
Thể liên hợp 45b [0,1]	1,06	1,51	16,06	8,48	6,65
Thể liên hợp 45b [0,3]	1,07	1,36	6,98	4,61	4,02
Thể liên hợp 45b [1]	0,94	1,05	4,73	2,54	2,84
Thể liên hợp 45b [3]	0,95	0,99	1,74	1,39	1,53
Không bị lây nhiễm	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Ví dụ 171. Hiệu quả của thể liên hợp 45b ở mô hình cúm gây tử vong chuột: Nghiên cứu #55

Thể liên hợp 45b được đánh giá chống lại chủng cúm A/CA/07/2009 (3E4 PFU) gây tử vong ở chuột cái BALB/c (6-8 tuần tuổi, n=5/nhóm). Thiết kế nghiên cứu

được thể hiện trong Bảng 124. Các con chuột được điều trị bằng chất thử nghiệm ở t=+2 giờ (SC) sau khi lây nhiễm với một liều dùng duy nhất đối với thể liên hợp 45b hoặc hai lần mỗi ngày trong 4 ngày đối với tác nhân đối chứng. Tất cả các con chuột được theo dõi về cân nặng hằng ngày. Chuột được giết vào ngày 4 sau khi lây nhiễm và cả hai thùy phổi được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất để xác định tải lượng virut và đáp ứng miễn dịch. Dữ liệu được thể hiện trong các bảng 125 và 126A-126B.

Bảng 124: Nghiên cứu hiệu quả #58: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chất thử nghiệm (DAR)	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng [mg/kg]	Liều dùng/ngày [mg/kg]
1	PBS	SC, T+2 giờ	N/A	N/A
2	Fc hIgG1	SC, T+2 giờ	30	30
3	Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	5	10
4	Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 4	15	30
4	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	0,3	0,3
6	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	1	1
7	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	3	3
8	Thể liên hợp 45b (4,8)	SC, T+2 giờ	30	30
9	Không bị lây nhiễm	N/A	N/A	N/A

Bảng 125: Tải lượng virut vào ngày 4 sau khi lây nhiễm theo PFU/g

Nhóm	Chất thử nghiệm [mg/kg]	PFU/g	Mức giảm log PFU/g
1	PBS [0]	1,71E+07	0,00
2	Fc hIgG1 [30]	1,08E+07	0,20
3	Oseltamivir [5]	2,05E+07	-0,08
4	Baloxavir [15]	1,51E+02	5,06
5	Thể liên hợp 45b [0,1]	8,81E+06	0,29
6	Thể liên hợp 45b [0,3]	4,25E+06	0,60
7	Thể liên hợp 45b [1]	1,24E+05	2,14
8	Thể liên hợp 45b [3]	3,72E+03	3,66
9	không bị lây nhiễm	0,00	0,00

Bảng 126A: Mức xytokin vào ngày 4 sau khi lây nhiễm

Chất thử nghiệm [mg/kg]	TNF-α [pg/mL]	IL-6 [pg/mL]	MCP-1 [pg/mL]	MIP-1α [pg/mL]	KC [pg/mL]
PBS [0]	1409,1	728,1	10139,0	2439,6	2542,4
Fc hIgG1 [30]	1489,6	709,6	9414,3	2245,0	2212,8
Oseltamivir [5]	1260,1	714,2	8891,9	1454,1	2327,7
Baloxavir [15]	586,5	238,5	378,5	175,0	247,7
Thể liên hợp 45b [0,3]	1211,4	426,2	4059,8	886,7	1530,2
Thể liên hợp 45b [1]	1069,7	378,9	3874,0	765,3	1759,6
Thể liên hợp 45b [3]	1069,6	427,6	2457,6	720,0	1478,5
Thể liên hợp 45b [30]	662,5	284,2	1185,6	406,4	1069,3
Không bị lây nhiễm	523,1	227,3	247,5	179,6	293,1

Bảng 126B: Mức xytokin vào ngày 4 sau khi lây nhiễm tính theo số lần tăng so với mẫu đối chứng không bị lây nhiễm

Chất thử nghiệm [mg/kg]	INF-γ	TNF-α	IL-6	MCP-1	MIP-1α	KC
PBS [0]	3,39	2,69	3,20	40,96	13,59	8,67
Fc hIgG1 [3]	3,06	2,85	3,12	38,03	12,50	7,55
Oseltamivir [5]	2,44	2,41	2,59	35,92	8,10	7,94
Baloxavir [15]	0,94	1,12	1,05	1,53	0,97	0,85
Thể liên hợp 45b [0,3]	1,98	2,32	1,87	16,40	4,94	5,22
Thể liên hợp 45b [1]	1,87	2,04	1,67	15,65	4,26	6,00
Thể liên hợp 45b [3]	1,85	2,04	1,88	9,93	4,01	5,04
Thể liên hợp 45b [30]	1,18	1,27	1,25	4,79	2,26	3,65
Không bị lây nhiễm	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Ví dụ 172. Fc chéo loài *in vitro* gắn kết thụ thể của thể liên hợp 45b

Gắn kết của thể liên hợp 45b với các thụ thể Fc gamma từ nhiều loài được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA được mô tả dưới đây. Các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp được phủ qua đêm ở 4°C với 1 µg (100 µL/giếng) thể liên hợp 45b trong dung dịch đệm cacbonat. Kháng thể IgG1 Fc của người không được liên hợp và kháng thể đối chứng isotyp cũng được phủ qua đêm trong cùng các điều kiện. Ngày tiếp theo, các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng 1X PBS pH 7,4 có bổ sung Tween 20 0,05% (PBST), sau đó được phong bế bằng 200 µL/giếng chứa BSA 1% trong PBST trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên máy lắc đĩa quỹ đạo. Các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST, sau đó được ủ với các chất pha loãng theo chuỗi gấp đôi 2 lần chứa thụ thể Fc gamma gắn nhãn His tái tổ hợp (0,5 – 1,000 ng; 100 µL/giếng) trong chất pha loãng (BSA 0,5% trong PBS Tween 20 0,025%) trong 2 giờ ở nhiệt độ

trong phòng kết hợp lắc. FcγR1/CD64 của người và khỉ cynomolgus được sàng lọc ở nồng độ bắt đầu là 25 ng/100 µL/giếng. Các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST, sau đó được ủ với 100 µL/giếng chứa kháng thể HRP kháng His của chuột (mã số MAB050H, R&D Systems) được pha loãng với tỷ lệ 1:1.000 trong chất pha loãng trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc. Các đĩa được rửa 8 lần với 300 µL/giếng PBST, với ủ 1 phút giữa các lần rửa, và được phát triển với 100 µL/giếng chất phản ứng cơ chất TMB trong 5-10 phút. Phản ứng được dừng với 100 µL/giếng H_2SO_4 1N và độ hấp thụ đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ EnSpire (PerkinElmer). Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) được tính toán với GraphPad Prism phiên bản 8 bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (hình chữ S, 4PL) của các đường cong gắn kết. Gắn kết của thể liên hợp 45b với các thụ thể FcRn từ nhiều loài được thực hiện về cơ bản như được mô tả đối với ELISA gắn kết Fc gamma với cải biến sau. Các bước phong bế, các thử nghiệm gắn kết sau được thực hiện hai lần giống nhau ở pH 5,8, độ pH tối ưu cho gắn kết FcRn, và độ pH 7,4.

Thể liên hợp 45b gắn kết với các thụ thể Fc gamma từ chuột nhắt, người, chuột cống và khỉ cynomolgus với độ bám tương hợp với IgG1 Fc của người (Bảng 127). Thể liên hợp 45b gắn kết các thụ thể Fc gamma hoạt hóa miễn dịch với độ bám cao hơn so với các thụ thể Fc gamma ức chế miễn dịch. Ở độ pH 5,8, thể liên hợp 45b gắn kết các thụ thể FcRn từ tất cả các loài với độ bám tương đương với IgG1 Fc của người. Như mong đợi, gắn kết thể liên hợp 45b FcRn được giảm ở pH 7,4 (Bảng 127).

Bảng 127: Gắn kết thụ thể Fc giữa các loài đối với thể liên hợp 45b

			EC_{50} [nM]		
Loài	Thụ thể Fc	Dấu hiệu/chức năng	Thể liên hợp 45	Fc hIgG1	hIgG1
Chuột nhắt	FcγR1/CD64	Hoạt hóa	12	9	3
	FcγR2B/CD32b	Ức chế	228	135	153
	FcγR3/CD16	Hoạt hóa	>455	>455	>455
	FcγR4/CD16-2	Hoạt hóa	3	0,5	6E-07
	FcRn pH 5,8	IgG, tái tuần hoàn	6	6	5

		albumin			
	FcRn pH 7,4	IgG, tái tuần hoàn albumin	80	14	40
Người	FcγR1/CD64	Hoạt hóa	12	12	7
	FcγR2A/CD32a (R167)	Ức chế	334	193	144
	FcγR3A/CD16a	Hoạt hóa	20	9	2
	FcγR3B/CD16b	Hoạt hóa	>455	>455	>455
	FcRn pH 5,8	IgG, tái tuần hoàn albumin	49	49	44
	FcRn pH 7,4	IgG, tái tuần hoàn albumin	>455	>455	>455
Chuột cống	FcγR1/CD64	Hoạt hóa	7	3	2
	FcγR2A/CD32a	Ức chế	>455	>455	1
	FcγR2B/CD32b	Ức chế	561	49	208
	FcγR3A/CD16a	Hoạt hóa	6	3	0,008
	FcRn pH 5,8	IgG, tái tuần hoàn albumin	25	15	13
	FcRn pH 7,4	IgG, tái tuần hoàn albumin	104	>230	>230
Khỉ Cynomolgus	FcγR1/CD64	Hoạt hóa	24	18	0,37
	FcγR2A/CD32a	Ức chế	1995	688	693
	FγR2B/CD32b	Ức chế	11	6	1
	FcγR3/CD16	Hoạt hóa	>320	>320	>320
	FcRn pH 5,8	IgG, tái tuần hoàn albumin	31	17	28
	FcRn pH 7,4	IgG, tái tuần hoàn albumin	88	32	78

Ví dụ 173. So sánh đường dùng IV, SC và IM thể liên hợp 45b trong nghiên cứu PK ở chuột 7 ngày

Nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực CD-1 6 tuần tuổi. Chuột được tiêm IV, SC và IM với 5 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều dùng 5 ml/kg). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp, các con chuột không bị lấy máu đến chết (sau hốc mắt, má hoặc qua tĩnh mạch đuôi) và máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian. Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA dạng bánh kẹp (sandwich ELISA) như sau: các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL đường cong tiêu chuẩn thể liên hợp 45b (hoặc Fc hIgG1). Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp trên đây. Các đường cong so sánh thể liên hợp 45b được thể hiện trên FIG. 84, và các đường cong so sánh Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 73) được thể hiện trên FIG. 85. Mức phơi nhiễm với thể liên hợp 45b trong huyết tương đối với SC và IM là tương đương và tính sinh khả dụng thu được từ đường dùng SC hoặc IM là khoảng 77% so với đường dùng IV (các Bảng 128-130). Nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương là tương đương đối với tất cả các đường dùng ở khoảng 24 giờ sau khi tiêm.

Bảng 128: Đường dùng IV 5 mg/kg PK ở chuột nhắt

Chuột nhắt			Thời gian (giờ)																	
			0,0833	1	3	5	24	48	72	96	168									
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Chuột nhắt	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	C0 (ug/mL)	Cmax (ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_obs (giờ*ug/mL)	Chu kỳ bán rã (giờ)	Cl_obs (mL/phút/kg)	Vss_obs (mL/kg)	Vz_obs (mL/kg)
5	IV	Giá trị trung bình	35,8	30,1	20,8	23	11,1	11,3	6,9	8,08	5,21	0,0833	36,4	35,8	1600	2560	128	0,0325	336	361

Bảng 129: Đường dùng IM 5 mg/kg PK ở chuột nhắt

			Thời gian (giờ)												
			0,25	1	3	5	24	48	72	96	168				
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Chuột nhắt	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	Cmax (ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_obs (giờ*ug/mL)
5	IM	Giá trị trung bình	0,195	1,44	3,69	3,83	8,52	10,9	7,94	7,35	5,56	48	10,9	1240	2720

51349

Bảng 130: Đường dùng SC 5 mg/kg PK ở chuột nhắt

			Thời gian (giờ)											
			0,25	1	3	5	24	48	72	96	168			
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Chuột nhắt	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	Cmax (ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_pred (giờ*ug/mL)
5	SC	Giá trị trung bình	0,148	0,387	3,23	2,55	8,89	9,29	9,13	7,49	5,46	48	9,29	1220	2280

51349

747/1174

Ví dụ 174. Nghiên cứu PK ở chuột trong 7 ngày so sánh tính tuyến tính của liều lượng thể liên hợp 45b

Nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực CD-1 6 tuần tuổi. Chuột được tiêm SC với 1, 3, 10, 30, hoặc 100 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều dùng 5 ml/kg). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp, các con chuột không bị lấy máu đến chết (sau hốc mắt, má, hoặc theo tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập vào ống K_2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian. Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA dạng bánh kẹp (sandwich ELISA) như sau: các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b (hoặc Fc hIgG1). Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp trên đây. Các đường cong so sánh thể liên hợp 45b được phát hiện bởi NA và việc bắt giữ Fc được thể hiện trên các FIG. 86 và 87, tương ứng. Ở chuột nhắt, việc dùng SC tỷ lệ liều dùng tuyến tính hợp lý nằm trong khoảng từ 1 đến 100 mg/kg thể liên hợp 45b được quan sát (Bảng 131).

Bảng 131: Liều PK ở chuột nhắt tỷ lệ thuận từ 1-100 mg/kg

			Thời gian (giờ)														
			0,25	0,5	1	2	4	24	96	120	168						
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Chuột nhắt	Nồng độ (ug/mL)									D	Đường dùng	Liều dùng (mg)	Tmax (giờ)	Cmax (giờ*ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_pred (giờ*ug/mL)
1	SC	1	0,83	Thiếu	5,9	0,764	9,39	4,11	1,1	2,13	0,317	1	SC	1	4	9,39	436	465
3	SC	3	0,355	0,0874	1,02	0,52	5,16	11,4	9,84	8,32	6,84	3	SC	3	24	11,4	1520	2900
10	SC	10	1,01	0,879	1,81	4,65	15,5	41,3	18,4	26,7	15	10	SC	10	24	41,3	4280	6650
30	SC	30	0,179	0,616	5,71	7,6	56	125	75	83,7	49,7	30	SC	30	24	125	14200	22300
100	SC	100	22,4	72,3	313	446	733	657	183	246	160	100	SC	100	4	733	60700	75300

51349

Ví dụ 175. Nghiên cứu PK ở chuột cống 14 ngày sau khi dùng IV hoặc SC thể liên hợp 45b

Các nghiên cứu PK ở chuột cống được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Seventh Wave (Maryland Heights, MO) bằng cách sử dụng chuột Sprague Dawley đực 46-49 ngày tuổi. Các con chuột cống được tiêm IV qua tĩnh mạch đuôi với 5 mg/kg thể liên hợp 45b hoặc SC với 5 hoặc 50 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều dùng 5 ml/kg) (các FIG. 88-89). Các con chuột cống được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp các con chuột không bị lấy máu đến chết (sau hốc mắt, má, hoặc theo tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian (Bảng 132). Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA dạng bánh kẹp (sandwich ELISA) như sau: các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP (các Bảng 133-134). HIgG1 được bắt giữ bằng cách sử dụng kháng thể kháng Fc hIgG1. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp trên đây. Các đường cong so sánh thể liên hợp 45b được thể hiện trên FIG. 88 chứng minh tỷ lệ liều dùng tuyến tính. Các mức thể liên hợp 45b trong huyết tương đối với việc dùng tích tụ IV và SC ở 24 giờ sau khi tiêm (FIG. 89). Dữ liệu được thể hiện trong các bảng 135 và 136.

Bảng 132: Thiết kế nghiên cứu PK ở chuột cống

		Thời điểm thu thập huyết tương								
	Liều dùng/ Đường dùng liều	10 phút IV; 30 phút SC	1 giờ	4 giờ	8 giờ	24 giờ	72 giờ	120 giờ	168 giờ	336 giờ
Nhóm 1 *(n=3)*	5 mpk IV	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Nhóm 2 *(n=3)*	5 mpk SC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nhóm 3 *(n=3)*	50 mpk SC	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Bảng 133: Bắt giữ H1N1 (A/CA/04/2009) NA

	5 mpk IV						5 mpk SC						50 mpk SC					
	g1,1		g1,2		g1,3		g2,1		g2,2		g2,3		g3,1		g3,2		g3,3	
Thời gian (giờ)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
10m/ 30m	139,0184	116,434	128,9835	126,3728	99,90003	96,30608	0,336397	0,352108	0,26567	0,24961	0,259523	0,205043	1,111022	1,021191	2,951729	3,184274	3,78442	3,30374
1	103,0288	107,5882	108,6186	112,708	80,42177	83,55724	0,601405	0,600861	0,50378	0,53983	0,680512	0,48924		2,858977	6,907325	4,617704	7,575	8,21763
4	67,18744	70,49817	65,26259	59,96993	52,09719	60,13481	3,331236	3,577401	3,291326	3,31843	3,942251	3,945549	19,50094	17,82466	17,83342	19,84081	27,2367	27,0064
8	49,96849	56,19489	56,94676	57,68125	48,90448	55,23444	9,120017	8,164349	6,224308	6,16066	7,856424	7,047854	43,56345	44,30664	55,25942	53,41513	58,2069	56,4707
24	33,99514	33,83988	34,76042	33,60106	33,04519	32,52448	24,64741	22,57097	19,34957	21,3297	20,90625	23,61215	156,8759	159,158	210,1323	209,9947	208,024	181,09
72	24,03197	23,99513	26,1422	25,50985	23,92523	24,53129	26,81972	23,95593	19,1652	23,1289	18,91189	16,60657	142,6993	137,0533	152,6497	155,1297	149,881	142,385
120	17,28743	17,88652	18,16672	17,61109	17,14011	16,81636	18,13665	18,07425	15,58847	19,193	16,70847	16,4339	117,7776	112,064	136,8244	141,3221	137,704	132,748
168	16,37894	14,18949	15,0406	14,28349	12,29568	13,27299	16,36903	16,31503	13,37669	14,9629	12,9219	12,3945	100,8302	116,8275	99,00073	118,0093	97,4236	96,2287

	5 mpk IV						5 mpk SC						50 mpk SC					
	g1,1		g1,2		g1,3		g2,1		g2,2		g2,3		g3,1		g3,2		g3,3	
Thời gian (giờ)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
336	8,706758	9,475766	8,069783	8,240227	7,314977	7,120923	8,57262	8,694249	6,866837	7,0874	7,635397	7,876635	53,87703	51,16129	57,02179	55,22173	54,121	59,193

Bảng 134: Bắt giữ hIgG Fc

	5 mpk IV						5 mpk SC						50 mpk SC					
	g1,1		g1,2		g1,3		g2,1		g2,2		g2,3		g3,1		g3,2		g3,3	
Thời gian (giờ)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
10m/ 30m	131,8211	132,2644	138,5205	124,2897	92,28536	93,95777	0,301641	0,272994	0,3302	0,58892	0,071346	0,209457	0,85958	2,600291	2,362582	2,417453	3,26701	3,24606
1	105,1676	118,2516	111,4847	110,7111	83,06342	83,13157	0,492532	0,510306	0,372862	0,35967	0,267192	0,28284	2,328096	2,360296	3,618227	3,5931	7,33632	7,4207
4	61,3296	59,41234	59,52775	47,35522	53,9032	61,12485	3,615572	3,792592	3,297844	3,46322	4,157923	4,501974	20,52563	19,67262	19,46794	19,46851	28,6829	31,5564
8		50,28953	48,15108	52,90292	48,1017	48,46983	8,261891	9,08554	6,598579	5,92739	8,778635	7,990053	45,29742	44,30181	54,38999	63,46517	61,1055	70,8567
24	29,91591	30,67022	30,25926	31,29131	28,39885	29,88579	23,96117	19,31521	16,86928	17,6982	17,00515	18,2297	155,7401	138,399	200,935	236,9577	239,536	249,133
72	19,38442	21,26014	20,06189	20,38354	17,46987	18,56471	19,96086	21,67188	15,66477	16,3864	19,15136	19,56853	152,6623	171,8249	181,134	173,9026	186,293	194,744

120	12,13442	13,49033	12,39415	11,80685	13,47915	12,68468	14,71684	15,61295	11,56458	11,8629	14,66388	14,79211	113,865	103,0581	131,7811	129,7576	153,859	149,209
168	14,61786	14,48309	13,2966	13,12374	12,4622	13,06133	13,73621	9,73	11,21421	12,2178	14,54814	12,79694	94,56107	112,0218	105,5593	101,004	104,147	113,431
336	8,33093	8,680053	7,88281	7,805351	6,912784	6,784823	7,736292	7,661658	6,466908	6,00365	7,32696	6,554063	49,96583	43,11898	58,15043	57,84531	54,516	49,5564

Bảng 135: Đường dùng IV 5 mg/kg PK ở chuột cống

Chuột cống	Thời gian (giờ)																
	0,167	1	4	8	24	72	120	168	336								
Liều dùng (mg/kg)	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	C0 (ug/mL)	Cmax (ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_obs (giờ*ug/mL)	Chu kỳ bán rã (giờ)	Cl_obs (mL/phút/kg)	Vss_obs (mL/kg)	Vz_obs (mL/kg)
5	118	99,3	62,5	54,2	33,6	24,7	17,5	14,2	8,15	0,167	122	118	6340	8690	199	0,00959	144	166

Bảng 136: Đường dùng SC 5 mg/kg và 50 mg/kg PK ở chuột cống

Chuột cống			Thời gian (giờ)												
			0,5	1	4	8	24	72	120	168	336				
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Động vật	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	Cmax (ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)	AUCINF_obs (giờ*ug/mL)
5	SC	Giá trị trung bình	0,278	0,569	3,57	7,43	22,1	21,4	17,4	14,4	7,79	24	22,1	4860	6970
50	SC	Giá trị trung bình	2,56	6,04	21,5	51,9	188	147	130	105	55,1	24	188	35800	49800

51349

Ví dụ 176. Nghiên cứu PK ở động vật linh trưởng không phải là người 14 ngày sau khi dùng SC thể liên hợp 45b

Các nghiên cứu PK ở động vật linh trưởng không phải là người (NHP) được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Charles River bằng cách sử dụng khỉ Cynomolgus đực và cái 4,5-8 tuổi với cân nặng nằm trong khoảng từ 2,5-6,5 kg. NHP được tiêm SC với 5 hoặc 20 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều dùng 5 ml/kg) vào ngày 1 và 8. Các động vật linh trưởng được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp các con chuột không bị lấy máu đến chết (qua tĩnh mạch đùi hoặc tĩnh mạch đầu) với máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian (Bảng 137). Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA dạng bánh kẹp (sandwich ELISA) như sau: các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP (FIG. 90-91). Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp trên đây. Các đường cong so sánh thể liên hợp 45b được thể hiện trên FIG. 92. Đáp ứng liều dùng là tuyến tính nằm trong khoảng 5 và 20 mg/kg SC. Mức tích lũy thể liên hợp 45b được quan sát sau khi dùng lần thứ hai thể liên hợp 45b vào ngày 8.

Bảng 137: Mức tiếp xúc PK cao ở khỉ sau liều dùng hàng tuần thứ hai

				Thời gian (giờ)											
				0,0833	1	2	4	8	24	72	120	168			
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Nhóm	Động vật	Nồng độ (ug/mL)									Tmax (giờ)	Cmax (giờ*ug/mL)	AUClast (giờ*ug/mL)
5	SC	D1	Giá trị trung bình	blq	1,05	3,62	9,91	17,9	22,2	26,1	23,8	20	72	26,1	3800
		D8	Giá trị trung bình	24,3	19,4	25,7	31	61	47,3	54,1	42,8	33,3	8	61	7740
20	SC	D1	Giá trị trung bình	blq	10,9	6,77	28,8	61,9	101	107	71,6	85,1	72	107	14600
		D8	Giá trị trung bình	63,4	59,5	70,4	107	150	197	167	139	99,1	24	197	25400

51349

Ví dụ 177. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với thể phân lập kháng oseltamivir ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Perth/261/2009) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột mang đột biến H275Y dẫn đến có tính kháng với chất ức chế neuraminidaza oseltamivir.

Thí nghiệm bao gồm 9 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với A/Perth/261/2009 (H1N1) ở 2x LD90 bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 50 µl, cho chuột nhắt được gây mê nhẹ bằng isoflurane. Các nhóm 1-8 tiếp nhận việc điều trị duy nhất bằng SC, 2 giờ sau khi thử thách. Ngoài nhóm chỉ dùng tá dược (PBS), IgG1 của người (Fc một mình) được bao gồm dưới dạng mẫu đối chứng âm tính bổ sung. Nhóm 9 tiếp nhận Oseltamivir phosphat bằng cách phân phối qua đường miệng, bắt đầu 8 giờ sau khi lây nhiễm hai lần mỗi ngày trong 5 ngày (Bảng 138). Tất cả các con chuột được theo dõi về mức sống sót (Bảng 139) và mức giảm cân mạnh (Bảng 140) trong 14 ngày sau khi thử thách.

Chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b cho thấy 100% mức sống sót với thử thách bởi chủng cúm (A/Perth/261/2009) với các liều duy nhất ở 10, 3, 1, và 0,3 mg/kg. Hơn nữa, mặc dù kích thước nhóm nhỏ (n=5) các kết quả này có ý nghĩa về mặt thống kê so với nhóm đối chứng dùng tá dược (Bảng 139).

Không có con chuột nhắt nào sống sót vào cuối nghiên cứu nếu được dùng liều với tá dược (PBS), và chỉ có 20% con sống sót
nếu chỉ được điều trị bằng Fc hIgG1. Nhóm dùng oseltamivir không có con nào sống sót mặc dù việc điều trị với liều dùng được thể hiện là có tác dụng bảo vệ với các thể phân lập nhạy với oseltamivir trước đó (20 mg/kg, hai lần mỗi ngày x 5 ngày). Các kết quả này xác nhận rằng virut thử thách kháng với oseltamivir, và nhạy với thể liên hợp 45b.

Hiệu lực của thể liên hợp 45b với chủng cúm chứa đột biến H275Y được hỗ trợ tiếp bởi dữ liệu cân nặng (Bảng 140). Các nhóm tiếp nhận một liều dùng duy nhất của thể liên hợp 45b ở các nồng độ 1 mg/kg hoặc cao hơn đã chứng minh cho thấy 3%, hoặc thấp hơn, mức giảm cân mạnh tạm thời được phục hồi vào cuối nghiên cứu.

Bảng 138: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm n=5	Thử thách Ngày 0	Hợp chất	Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng/phác đồ điều trị
1	Virut cúm A (H1N1) A/Perth/261/2009 dùng trong mũi	Tá dược (PBS)	N/A	SC, một lần mỗi ngày, 2 giờ sau khi thử thách
2		Fc một mình	10	
3		Thể liên hợp 45b	10	
4		Thể liên hợp 45b	3	
5		Thể liên hợp 45b	1	
6		Thể liên hợp 45b	0,3	
7		Thể liên hợp 45b	0,1	
8		Thể liên hợp 45b	0,03	
9		Oseltamivir (Tamiflu™)	20	PO, hai lần mỗi ngày, 8 giờ sau khi thử thách trong 5 ngày

Bảng 139: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)					
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (10)	oseltamivir (200)	10	3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	80	80	100	100	100	100	100	80

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)					
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (10)	oseltamivir (200)	10	3	1	0,3	0,1	0,03
5	100	60	60	100	100	100	100	80	40
6	80	60	0	100	100	100	100	0	0
7	0	40	0	100	100	100	100	0	0
8	0	20	0	100	100	100	100	0	0
9	0	20	0	100	100	100	100	0	0
10	0	20	0	100	100	100	100	0	0
11	0	20	0	100	100	100	100	0	0
12	0	20	0	100	100	100	100	0	0
13	0	20	0	100	100	100	100	0	0
14	0	20	0	100	100	100	100	0	0
Mức ý nghĩa so với tá dược	na	0,665	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	ns	ns

Bảng 140: Tỷ lệ phần trăm cân nặng (gam)

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (10)	oseltamivir (200)	10	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101	101	102	99	97	98	96	97
2	98	100	99	101	99	102	99	98
3	91	93	89	101	95	97	94	89
4	89	88	84	101	95	97	95	84

5	89	89	82	104	100	101	98	83
6	79	85	74	100	94	97	93	74
7	78	83		105	100	102	97	
8		84		105	100	103	98	
9		85		101	98	101	96	
10		90		103	98	101	98	
11		92		102	98	101	97	
12		99		105	103	103	102	
13		101		106	103	103	102	
14		98		104	101	101	101	

Ví dụ 178. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với thể phân lập kháng oseltamivir thứ hai ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong

Trong nghiên cứu tương tự với nghiên cứu được thể hiện trong Ví dụ 177, thể liên hợp 45b được thử nghiệm về hoạt tính với thể phân lập cúm A (H1N1) thứ hai mang đột biến H275Y mang lại tính kháng với oseltamivir. Đối với nghiên cứu này đột biến được thực hiện ở A/Texas/23/2012. Như trước đây, chuột BALB/c (Charles River; 6-8 tuần) được sử dụng và được thử thách trong mũi với 2X LD95 (5E4 pfu/chuột nhắt). Oseltamivir được dùng liều qua đường miệng ở 20 mg/kg, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày bắt đầu 2 giờ sau khi thử thách virut. Tất cả các chất thử nghiệm khác được tiêm dưới da, như được liệt kê trong Bảng 141. Các con chuột được theo dõi trong 14 ngày, và cân nặng (BW) được ghi lại hằng ngày. Nếu chuột giảm 20% cân nặng thì nó được ghi nhận là tử vong.

Bảng 141: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/ Phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	N (balb/c)
1	A/Texas/23/2012 pdm (H275Y) (H1N1) 5E4 PFU/chuột	PBS	SC, T+2 giờ	---	5
2		hIgG1	SC, T+2 giờ	3	5
3		Oseltamivir	PO, hai lần mỗi ngày x 5 (T+2 giờ)	20	5

4	nhắt	Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	3	5
5		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	1	5
6		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,3	5
7		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,1	5

Tương tự với thử nghiệm trước đó, cả nhóm đối chứng dùng tá dược lẫn nhóm đối chứng chỉ dùng Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 73) không thu được mức bảo vệ khỏi thử thách gây tử vong (lần lượt mức sống sót là 20 và 0%; Bảng 142). Ngược lại, các nhóm được điều trị bằng thể liên hợp 45b ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3 đến 3,0 mg/kg được bảo vệ hoàn toàn khỏi thử thách gây tử vong. Hơn nữa, thể liên hợp 45b ở liều lượng 0,1 mg/kg đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ một phần, với 60% mức sống sót trong suốt 14 ngày của nghiên cứu. Tuy nhiên, tổng liều 200 mg của oseltamivir đã không bảo vệ được chuột khỏi thử thách virut như mong đợi. Dữ liệu BW (Bảng 143; được ghi lại cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm) phản ánh kết quả mức sống sót chỉ có mức giảm cân mạnh tạm thời quan sát được ở các nhóm được bảo vệ (Thể liên hợp 45, 0,3 đến 3,0 mg/kg). Đột biến oseltamivir (H275Y) được thử nghiệm trong nghiên cứu này là đột biến có liên quan về mặt lâm sàng được thể hiện bởi nghiên cứu này là rất nhạy với thể liên hợp 45b.

Bảng 142: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	oseltamivir (200)	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	20	100	100	100	60

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	oseltamivir (200)	3	1	0,3	0,1
6	20	0	0	100	100	100	60
7	20	0	0	100	100	100	60
8	20	0	0	100	100	100	60
9	20	0	0	100	100	100	60
10	20	0	0	100	100	100	60
11	20	0	0	100	100	100	60
12	20	0	0	100	100	100	60
13	20	0	0	100	100	100	60
14	20	0	0	100	100	100	60

Bảng 143: Tỷ lệ phần trăm cân nặng (gam)

		Tác nhân thử nghiệm (mg/kg)		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (1)	oseltamivir (200)	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	99	97	99	98	97	98
2	95	93	92	96	96	93	94
3	88	85	84	93	90	85	86
4	82	80	78	95	888	84	80
5	78	75		94	90	84	79
6				96	94	85	
7				101	97	89	
8				100	96	88	
9				101	99	91	
10				99	99	91	
11				100	99	92	
12				101	99	94	
13				100	98	94	
14				103	101	99	

Ví dụ 179. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được tiêm dưới da với chủng cúm A/WSN/1933 (H1N1) ở mô hình chuột gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/WSN/1933) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl (2E3 virut/chuột nhắt), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày trong 21 ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một phương pháp điều trị dưới da (SC) duy nhất bằng thể liên hợp 45b ở liều lượng 3, 1, 0,3, 0,1, hoặc 0,03 mg/kg, hoặc mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1, hoặc tá dược (PBS) 2 giờ sau khi thử thách virut với thể tích liều là 10 ml/kg. Thiết kế nghiên cứu được tổng kết trong Bảng 144.

Bảng 144: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/ Phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	N (balb/c)
1	A/WSN/1933 (H1N1) ~2E3 PFU/chuột nhắt	PBS	SC, T+2 giờ	---	5
2		hIgG1	SC, T+2 giờ	1	5
3		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	3	5
4		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	1	5
5		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,3	5
6		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,1	5
7		Thể liên hợp 45b	SC, T+2 giờ	0,03	5

Như mong đợi, các con chuột tiếp nhận tá dược hoặc mẫu đối chứng dùng Fc hIgG1 đã tử vong vì lây nhiễm vào lần lượt Ngày 7 hoặc 8 (Bảng 145). Tuy nhiên,

chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở các nồng độ xuống đến 0,3 mg/kg, và mức bảo vệ 80% ở 0,1. Mức bảo vệ mất hoàn toàn bởi thể liên hợp 45b chỉ được quan sát ở nồng độ liều thấp nhất là 0,03 mg/kg.

Bảng 145: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
			3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	40	60	100	100	100	100	100
7	0	20	100	100	100	100	100
8	0	0	100	100	100	100	40
9	0	0	100	100	100	80	0
10	0	0	100	100	100	80	0
11	0	0	100	100	100	80	0
12	0	0	100	100	100	80	0
13	0	0	100	100	100	80	0
14	0	0	100	100	100	80	0

Các phép đo cân nặng hằng ngày phù hợp với các quan sát về mức sống sót. Như mong đợi, chuột được điều trị bằng tá dược hoặc Fc hIgG1 đã chứng minh mức giảm đều đặn về cân nặng cho đến khi nó vượt 20%, tại thời điểm đó chúng được ghi nhận là tử vong (Bảng 146).

Ngược lại với chuột đối chứng, các nhóm tiếp nhận thể liên hợp 45b ở liều lượng 3, 1, và 0,3 mg/kg duy trì cân nặng khỏe mạnh trong suốt quá trình nghiên cứu và không chứng minh được mức giảm cân mạnh tạm thời thấp hơn 3% (nhóm dùng liều 1 mk/kg, Ngày 18; Bảng 146). Bằng cả phép đo mức sống sót và cân nặng thể liên

hợp 45b đã chứng minh mức bảo vệ mạnh với thử thách gây tử vong của chủng cúm A/WSN/1933 với một liều dùng SC duy nhất thấp tới 0,3 mg/kg.

Bảng 146: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

			Thể liên hợp 45b (mg/kg)				
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	96,8	96,6	98,5	98,9	99	96,9	99,4
2	99,9	98,1	100,9	99,9	100,5	101,2	100,7
3	92	90,8	101,1	100,6	99	97	94,8
4	83,5	85,3	98,4	98,2	96	94,6	92,4
5	79,7	82,3	99	102,5	99,2	94,2	91,5
6	76,1	78,8	101,2	105,4	102,1	90,9	87,3
7			100	102,8	101,6	84,8	82,3
8			98,4	101,9	100,8	81,9	76
9			102,2	102,8	101,6	84,3	
10			101,9	103	101,7		
11			101,3	102,1	99,5		
12			99,5	99,9	99,3		
13			100	101,8	101,7		
14			102,1	102,3	102,7		
15			99,8	101,6	101,6		
16			100,1	102,1	103,1		
17			98,7	98,7	100,5		
18			99,3	97,8	99,4		
19			98,8	98,3	100,2		
20			100,1	100,1	100,8		
21			102,3	100,5	101,1		

Ví dụ 180. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được dùng liều tiêm tĩnh mạch với chủng cúm A/Texas/36/91 (H1N1) ở mô hình chuột gây tử vong do việc điều trị trì hoãn.

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm A (H1N1) gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Texas/36/91) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 2 lần (~75 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 50 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong, các dấu hiệu lâm sàng, và cân nặng được ghi lại hằng ngày trong 15 ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong.

Thiết kế nghiên cứu được nêu chi tiết trong Bảng 147, và bao gồm nhiều nhánh. Nhánh đối chứng bao gồm nhóm dùng tá dược (PBS) và các nhóm chỉ dùng Fc hIgG1, được dùng liều 24 giờ sau khi thử thách virut (nhóm không bị lây nhiễm cũng là một phần của nhánh này). Nhánh thứ hai gồm oseltamivir được dùng liều gấp 4 lần liều dùng ở người của nó, với thời điểm bắt đầu việc điều trị được trì hoãn trong 24, 48, 72, hoặc 96 giờ. Các nhánh cuối cùng gồm thể liên hợp 45b được dùng dưới dạng các liều IV duy nhất ở 1 hoặc 3 mg/kg; mỗi liều lượng được dùng theo phác đồ giống như nhánh oseltamivir nêu trên.

Như mong đợi, tá dược và Fc hIgG1 không có tác dụng bảo vệ khi được dùng liều 24 giờ sau khi thử thách virut và đã dẫn đến mức tử vong hoàn toàn vào ngày 6. Trong nghiên cứu này, oseltamivir, gấp 4 lần liều dùng ở người (200 mg/kg liều tích lũy) chỉ có hiệu quả một phần khi việc dùng liều bị trì hoãn 24 giờ (Bảng 148; mức sống sót 80%). Ở 48 giờ sau khi thử thách hiệu quả của oseltamivir giảm xuống thậm chí còn thấp hơn, chỉ có 40% chuột nhắt sống sót đến cuối nghiên cứu. Nếu việc điều trị bằng oseltamivir bị trì hoãn cho đến 72 hoặc 96 giờ thì sẽ không có tác dụng bảo vệ.

Ngược lại, thể liên hợp 45b đã bảo vệ hoàn toàn ở 1 và 3 mg/kg khi việc dùng liều bị trì hoãn 24 giờ. Ở 48 giờ sau khi thử thách nhóm dùng liều 3 mg/kg vẫn được bảo vệ hoàn toàn, và nhóm dùng liều 1 mg/kg gần như vậy, với mức sống sót 80%. Ở 72 giờ 1 mg/kg cũng cho thấy mức bảo vệ 80%, tuy nhiên nhóm dùng liều 3 mg/kg đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ chỉ là 20%. Nhìn chung, cả hai nhóm dùng liều thể

liên hợp 45b 1 và 3 mg/kg cho thấy hiệu lực vượt trội so với oseltamivir trong mô hình điều trị trì hoãn này như được đo bằng mức sống sót. Đáng chú ý là, tổng liều dùng của thể liên hợp 45b là 1 hoặc 3 mg/kg trong khi oseltamivir được dùng ở 200 mg/kg.

Như mong đợi, dữ liệu cân nặng hỗ trợ các phát hiện về mức sống sót (Bảng 149) và nói chung cho thấy chuột nhắt được điều trị bằng thể liên hợp 45b có khả năng duy trì được cân nặng vượt trội. Mặc dù không có ý nghĩa về mặt thống kê, trọng lượng được duy trì tốt hơn ở chuột nhắt được điều trị bằng thể liên hợp 45b, mặc dù các nhóm được điều trị bằng oseltamivir tiếp nhận liều dùng cao hơn nhiều.

Bảng 147: Thiết kế nghiên cứu

<table>
<tr><th rowspan="2">Nhóm (n=5)</th><th rowspan="2">Thử thách (Ngày 0)</th><th rowspan="2">Chất thử nghiệm</th><th colspan="3">Điều trị</th><th rowspan="2">Kết quả đọc</th></tr>
<tr><th>Liều dùng (mg/kg)</th><th>Phác đồ (pi)</th><th>Đường dùng</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="15">Virut cúm A, chủng H1N1 A/TX/36/91 qua đường dùng IN</td><td>Tá dược (PBS)</td><td>N/A</td><td>24 giờ</td><td rowspan="13">Điều trị duy nhất một lần IV</td><td rowspan="16">Theo dõi điểm số sức khỏe và cân nặng hằng ngày trong tổng cộng 15 ngày. (Ngày 0 – Ngày 14pi)

% mức sống sót</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Fc hIgG1</td><td>3</td><td>24 giờ</td></tr>
<tr><td>3</td><td rowspan="8">Thể liên hợp 45b</td><td rowspan="4">3</td><td>24 giờ</td></tr>
<tr><td>4</td><td>48 giờ</td></tr>
<tr><td>5</td><td>72 giờ</td></tr>
<tr><td>6</td><td>96 giờ</td></tr>
<tr><td>7</td><td rowspan="4">1</td><td>24 giờ</td></tr>
<tr><td>8</td><td>48 giờ</td></tr>
<tr><td>9</td><td>72 giờ</td></tr>
<tr><td>10</td><td>96 giờ</td></tr>
<tr><td>11</td><td rowspan="4">Oseltamivir phosphat</td><td rowspan="4">20</td><td>24 giờ</td><td rowspan="4">PO, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày</td></tr>
<tr><td>12</td><td>48 giờ</td></tr>
<tr><td>13</td><td>72 giờ</td></tr>
<tr><td>14</td><td>96 giờ</td></tr>
<tr><td>15</td><td colspan="5">Chuột nhắt nguyên thể: không được điều trị và không bị lây nhiễm</td></tr>
</table>

Bảng 148: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

			Thể liên hợp 45b (mg/kg)				Thể liên hợp 45b (mg/kg)				Oseltamivir (mg/kg)			
			1				3				20			
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	80	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	100	80	80	40	100	100	20	60	100	100	60	0
6	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	100	100	40	0
7	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	100	60	0	0
8	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
9	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
10	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
11	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
12	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
13	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
14	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0

51349

Bảng 149: Tỷ lệ phần trăm cân nặng

			Thể liên hợp 45b (mg/kg)				Thể liên hợp 45b (mg/kg)				Oseltamivir (mg/kg)				Naïve
			1				3				20				
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	98	100	98	98	98	100	103	102	100	101	98	101	99	99	99
2	96	102	97	97	99	99	104	103	100	100	99	99	99	99	102
3	88	93	92	90	91	90	99	95	92	92	94	93	89	89	103
4	83	87	93	88	85	85	99	92	85	85	95	92	86	84	101
5	78	81	95	91	83	79	103	96	79	80	94	91	82	78	101
6	73	79	98	93	87	76	105	97	91	80	91	88	83		103
7			100	95	87		106	102	92		88	84	81		103
8			101	99	93		108	105	99		91	88			104
9			98	98	96		103	103	100		97	91			104
10			100	99	98		105	105	100		100	93			105
11			100	98	98		103	105	100		101	91			104
12			101	100	99		104	107	99		102	93			106
13			100	99	100		105	106	99		101	94			105
14			101	100	101		107	107	102		103	96			105

51349

769/1174

Ví dụ 181. Độ an toàn của thể liên hợp 45b được đánh giá trong nghiên cứu độc tính tìm phạm vi liều dùng ở khỉ Cynomolgus trong 14 ngày

Khỉ Cynomolgus được dùng 5 mpk hoặc 20 mpk, hoặc 50 mpk thể liên hợp 45b bằng cách tiêm dưới da vào ngày 0 và 7 của nghiên cứu. So sánh với các nhóm dùng tá dược đối chứng cho thấy không có tác dụng đáng kể nào đối với việc tăng cân nặng, trọng lượng cơ quan, lượng thức ăn tiêu thụ được quan sát thấy ở liều bất kỳ được thử nghiệm. Việc phơi nhiễm huyết tương (được đo bằng AUC) tăng theo tỷ lệ thuận với liều dùng. Các kết quả về độ an toàn tiền lâm sàng này phù hợp với chỉ số điều trị cao (54X), dựa trên các tỷ lệ AUC từ liều dùng cao nhất trong nghiên cứu độc tính so với AUC cần thiết để bảo vệ khỏi nhiễm cúm trong 28 ngày ở các mô hình cúm gây tử vong chuột. Không có tác dụng phụ liên quan đến chất thử nghiệm quan sát được ở liều dùng bất kỳ được thử nghiệm. Tóm tắt các quan sát được cung cấp trong Bảng 150.

Bảng 150: Tóm tắt nghiên cứu độc tính của máy tìm liều dùng trong 14 ngày

Thông số	Các phát hiện ở liều dùng cao nhất (50mpk), so với tá dược
Các quan sát lâm sàng	Không phát hiện thấy
Huyết học	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Hóa học lâm sàng	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Đông tụ	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Phân tích nước tiểu	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Phân loại miễn dịch	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Xytokin	Không có thay đổi so với nhóm dùng tá dược
Mô bệnh học	Không phát hiện thấy

Ví dụ 182. Hiệu quả của thể liên hợp 45b được tiêm dưới da với chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) pdm ở mô hình chồn sương không gây tử vong.

Các lây nhiễm cúm A ở chồn sương thường được coi là có cơ chế sinh bệnh tương tự như quan sát được ở người. Do đó, thể liên hợp 45b được thử nghiệm trong mô hình chồn sương không gây tử vong được thử thách với chủng cúm A/CA/07/09, và chủng gây đại dịch H1N1 có liên quan về mặt lâm sàng. Tóm lại, chồn sương đực (3-5 tháng tuổi) được lấy từ các trang trại Tripe F và được xác minh là không có kháng

thể với cúm A H1N1. Mỗi con chồn sương tiếp nhận thể liên hợp 45b, tá dược (PBS), hoặc Fc hIgG1 bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) một lần 24 ± 2,0 giờ trước thử thách hoặc oseltamivir phosphat (20 mg/kg), bằng cách dùng qua đường miệng bằng ống thông dạ dày bắt đầu 4 ± 0,5 giờ trước khi cấy virut cúm. Việc dùng oseltamivir được tiếp tục hai lần mỗi ngày (cách nhau 12 ± 1,5 giờ) trong 5 ngày sau khi cấy virut. Các nồng độ thử nghiệm và thiết kế thí nghiệm được nêu chi tiết trong Bảng 151.

Các con chồn sương được thử thách trong mũi với các hạt lây nhiễm 1E6 của chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) với thể tích là 0,5 mL sau khi được gây mê bằng ketamin (25 mg/kg) và xylazin (2 mg/kg). Các con chồn sương cũng được gây mê như nêu trên để dùng chất thử nghiệm. Thời gian của nghiên cứu là 14 ngày và các dữ liệu bao gồm cân nặng hằng ngày (BW), các dấu hiệu lâm sàng, nhiệt độ, và dịch rửa mũi (0,5 mL) hoặc dịch ngoáy họng ở các thời điểm được liệt kê trong Bảng 151. Tải lượng virut trong dịch rửa mũi được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm mảng bám tiêu chuẩn với các tế bào MDCK. Tải lượng virut của dịch ngoáy họng được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp qPCR tiêu chuẩn. Các mẫu huyết tương cũng thu được từ nhóm 6 con chồn sương (được dùng liều với 3 mg/kg của thể liên hợp 45b) ở 5 phút, 2, 24, 72, và 120 giờ. Như được nêu chi tiết trong Bảng 152, các con chồn sương đối chứng được điều trị bằng tá dược (PBS) hoặc chỉ bằng Fc bắt đầu giảm BW bắt đầu vào ngày 1 mà đạt đỉnh vào ngày 6 (lần lượt là 10,8 và 10,1%). Mức giảm BW tương tự cũng quan sát được ở liều dùng thể liên hợp 45b thấp nhất (0,3 mg/kg). Ngược lại, các con chồn sương được điều trị bằng thể liên hợp nằm trong khoảng 1 và 30 mg/kg cho thấy mức giảm BW khoảng 50% bị giảm.

Theo dự đoán dựa trên BW, thể liên hợp 45b cũng đã chứng minh cho thấy mức giảm tải lượng virut từ dịch rửa mũi, vị trí chính của lây nhiễm cúm ở các con chồn sương (Bảng 153 và Bảng 154). Hiệu quả của thể liên hợp 45b được chứng minh rõ ràng nhất ở tải lượng Ngày 2, trong đó đạt được mức giảm gần 2-Log ở liều dùng cao nhất so với các con chồn sương được điều trị bằng tá dược. Hơn nữa, mức giảm hiệu giá virut với thể liên hợp 45b có khả năng đáp ứng với liều lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 1 mg/kg. Xu hướng này phần lớn được lặp lại trong hiệu giá Ngày 4, mặc dù hơi bị hạn chế vì hệ thống miễn dịch đóng vai trò lớn hơn trong các mô hình chồn sương không gây tử vong (bằng chứng là mức giảm hiệu giá được điều trị bằng tá dược nằm trong khoảng Ngày 2 và 4).

Dựa trên hai dữ liệu nghiên cứu chính (hiệu giá mũi và BW), nhìn chung, các dữ liệu này chứng minh khả năng của thể liên hợp 45b trong việc tiếp cận đường hô hấp trên ở các nồng độ điều trị ở mô hình quan trọng phản ánh bệnh tật ở người.

Bảng 151: Thiết kế nghiên cứu và phác đồ dùng liều

Nhóm	N	Nguyên liệu thử nghiệm	Đường dùng/phác đồ	Liều dùng	Dịch rửa mũi	Dịch ngoáy họng
1	5	PBS (tá dược)	IV, một lần duy nhất	---	2,4,6,8	2,4,6,8
2	5	Fc hIgG1	IV, một lần duy nhất	30	2,4,6,8	---
3	5	Oseltamivir[1]	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày, @ -4 giờ.	20	2,4,6,8	---
4	5	Thể liên hợp	IV, một lần duy nhất	30	2,4,6,8	2,4,6,8
5	5	Thể liên hợp	IV, một lần duy nhất	10	2,4,6,8	2,4,6,8
6	5	Thể liên hợp	IV, một lần duy nhất	3	2,4,6,8	2,4,6,8
7	5	Thể liên hợp	IV, một lần duy nhất	1	2,4,6,8	2,4,6,8
8	5	Thể liên hợp	IV, một lần duy nhất	0,3	2,4,6,8	---

Bảng 152: Mức thay đổi cân nặng trung bình vào các ngày (% ban đầu)

Nhóm	Ngày													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1	0,08	-4,34	-5,60	-6,15	-7,31	-10,80	-9,77	-7,61	-7,05	-5,67	-5,20	-5,53	-4,36	-4,23
G2	-1,90	-6,35	-7,19	-7,60	-8,02	-10,06	-9,71	-9,54	-7,71	-6,66	-5,94	-6,38	-7,32	-4,99
G3	1,78	-0,39	-0,90	-0,14	-0,90	-1,78	-1,00	-1,19	-2,57	0,04	0,39	0,10	0,22	2,15
G4	-1,59	-4,47	-3,26	-3,10	-3,81	-5,23	-5,34	-5,47	-5,51	-5,14	-5,12	-4,56	-5,23	-4,56
G5	0,41	-3,45	-2,95	-3,33	-2,90	-3,65	-4,03	-4,00	-4,46	-3,29	-3,29	-3,89	-3,06	-2,69
G6	-0,51	-6,03	-4,55	-3,43	-4,19	-5,72	-4,99	-5,90	-4,81	-4,09	-4,23	-2,51	-3,33	-2,69
G7	-0,47	-4,76	-5,29	-4,43	-5,97	-6,10	-5,95	-5,33	-4,98	-4,27	-4,17	-2,85	-4,17	-3,39
G8	0,10	-5,50	-7,74	-8,98	-9,76	-11,52	-9,16	-8,35	-7,73	-6,06	-4,63	-4,84	-4,53	-4,24

Bảng 153: Tải lượng virut trong dịch rửa mũi (Log10)

	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8
G1	6,12	4,36	Dưới LOD	Dưới LOD
G2	6,31	4,42	Dưới LOD	Dưới LOD
G3	5,80	-- --	Dưới LOD	Dưới LOD
G4	4,26	3,12	Dưới LOD	Dưới LOD
G5	4,34	3,37	Dưới LOD	Dưới LOD
G6	5,11	3,44	Dưới LOD	Dưới LOD
G7	5,62	3,84	Dưới LOD	Dưới LOD
G8	6,07	3,56	Dưới LOD	Dưới LOD

Bảng 154: Mức thay đổi tải lượng virut so với nhóm dùng tá dược (G1) (Log 10)

	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6	Ngày 8
G1	0,00	0,00	na	na
G2	0,19	0,06	Na	na
G3	-0,32	-- --	na	na
G4	-1,86	-1,24	na	na
G5	-1,79	-0,99	na	na
G6	-1,01	-0,92	na	na
G7	-0,50	-0,52	na	na
G8	-0,06	-0,80	na	na

Mức thay đổi nhiệt độ cũng được ghi lại (AM & PM) và được liệt kê trong Bảng 155. Mức thay đổi nhiệt độ trong suốt thời gian nghiên cứu phần lớn ủng hộ hiệu quả của thể liên hợp 45b quan sát được với tải lượng virut trong mũi và cân nặng. Đáng chú ý nhất là sự giảm tổng thể về thời gian các con chồn sương biểu hiện nhiệt độ tăng khi điều trị bằng thể liên hợp 45b hoặc oseltamivir, so với các con chồn sương được điều trị bằng tá dược.

Trong nghiên cứu này, các con chồn sương được quan sát hàng ngày và được chấm điểm các triệu chứng lâm sàng của bệnh cúm và mức độ nghiêm trọng của chúng. Trong mô hình không gây tử vong này, hắt hơi là dấu hiệu chính của bệnh được các kỹ thuật viên ghi lại (Bảng 156). So với các con chồn sương được điều trị bằng tá

dược, các con chồn sương được điều trị bằng thể liên hợp 45b hoặc mẫu đối chứng dương tính cho thấy ít trường hợp hắt hơi hơn, tình trạng này thuyên giảm nhanh hơn so với nhóm 1. Để rõ ràng hơn, nhóm được điều trị với liều dùng 0,3 mg/kg cùng với nhóm chất mang và oseltamivir được lập biểu đồ trên FIG. 96.

Trong nghiên cứu này, thể liên hợp 45b đã chứng minh hoạt tính mạnh mẽ so với các con chồn sương được điều trị bằng tá dược theo tất cả các kết quả đọc (tải lượng virut trong mũi, cân nặng, nhiệt độ và điểm số lâm sàng). Điều quan trọng là, thể liên hợp 45b mạnh hơn đáng kể so với các liều dùng oseltamivir cao hơn trong việc giảm tải lượng virut trong dịch rửa mũi, kết quả đọc chính cho nghiên cứu này. Hiệu quả quan sát được của thể liên hợp 45b trong mô hình quan trọng được công nhận là mô phỏng bệnh ở người hỗ trợ tiềm năng điều trị của ứng cử viên này.

Bảng 155: Mức thay đổi nhiệt độ trong quá trình nghiên cứu

	Mức thay đổi trung bình về độ (°C) theo ngày và thời gian (AM/PM)																		
Nhóm	1 (AM)	1 (PM)	2 (AM)	2 (PM)	3 (AM)	3 (PM)	4 (AM)	4 (PM)	5 (AM)	5 (PM)	6 (AM)	7 (AM)	8 (AM)	9 (AM)	10 (AM)	11 (AM)	12 (AM)	13 (AM)	14 (AM)
G1	0,8	0,9	0,2	0,5	0,8	0,2	0,1	-1,1	0,5	-0,1	0,5	0,6	0,0	0,6	0,2	0,4	0,5	0,3	-0,4
G2	1,2	0,8	-0,3	0,1	-1,1	0,7	0,5	-0,2	0,0	-0,4	0,8	0,6	0,5	0,5	0,0	0,8	0,5	0,5	-0,4
G3	-0,4	-0,1	0,8	0,0	-0,6	-0,3	0,5	-1,7	-0,3	-0,8	0,2	-0,1	-0,2	0,1	-1,2	-0,1	0,4	0,1	-0,1
G4	-0,9	-0,3	0,6	-0,8	-1,4	-0,5	0,2	-1,4	-0,9	-1,2	0,3	0,0	-0,4	0,5	0,3	0,1	0,1	0,3	-0,8
G5	-0,2	-0,1	0,7	-0,7	-0,8	-0,7	-0,4	-1,7	-0,1	-1,1	0,2	0,0	-0,2	0,1	-0,2	0,2	0,1	0,1	-0,4
G6	0,1	0,6	1,1	-0,1	-1,2	-0,8	0,7	-0,5	-0,7	-0,7	0,8	0,3	-0,4	0,2	0,4	0,1	0,1	0,5	-0,5
G7	-0,3	0,0	0,8	-0,5	-1,8	-0,4	-0,3	-1,1	-0,6	-0,9	-0,4	0,6	-0,1	-0,7	-0,2	0,1	0,3	0,5	0,1
G8	-0,1	0,6	0,8	0,1	-1,6	-0,4	0,3	-0,6	-0,2	-1,0	0,0	-0,3	0,1	-0,4	-0,2	0,2	0,1	0,2	-0,1

51349

Bảng 156: Điểm số lâm sàng

Nhóm	Số lượng con chồn sương có các dấu hiệu lâm sàng mỗi ngày													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1	0	3	2	2	3	2	4	4	2	3	3	0	2	0
G2	0	1	2	1	1	3	2	2	3	3	0	0	0	0
G3	0	0	2	2	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0
G4	0	2	1	2	3	1	1	1	1	2	1	0	0	0
G5	0	2	2	2	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0
G6	0	1	1	2	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0
G7	0	2	2	1	1	2	3	1	1	1	0	1	0	0
G8	0	1	2	1	1	3	1	1	1	0	1	0	0	0

51349

Ví dụ 183. Phân tích PK 5 ngày thể liên hợp 45b ở các con chồn sương sau khi tiêm IV một lần duy nhất 3 mg/kg

Các nghiên cứu PK ở chồn sương được thực hiện bởi Viện nghiên cứu IIT (IIT Research Institute) (IITRI) bằng cách sử dụng các con chồn sương đực 3-5 tháng tuổi. Các con chồn sương (n = 5) được dùng thể liên hợp 45b bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) một lần duy nhất ở liều dùng 3 mg/kg (thể tích liều dùng 2 mL) 24 giờ trước khi thử thách trong mũi với 1 x 10^6 đơn vị hình thành mảng bám (PFU) của chủng virut cúm A/California/07/2009 (H1N1). Các con chồn sương được gây mê trước khi dùng liều và thử thách virut bằng cách sử dụng hỗn hợp ketamin (25 mg/kg) và xylazin (2 mg/kg). Máu (~0,5-1 mL) được thu thập ở thời diểm 5 phút, 2, 24, 72 và 120 giờ sau khi dùng liều và được xử lý cho huyết tương. Dịch rửa mũi (0,5 mL trong PBS) được thu thập vào ngày 2, 4, 6, và 8. Các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên neuraminidaza (NA) hoặc các đĩa được phủ Fc và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Nồng độ huyết tương trung bình được sử dụng để tính toán các thông số dược động học bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 7.0. Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp dưới đây.

Trong ELISA bắt giữ NA, các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ 0,1 U/giếng NA từ A/California/04/2009 (H1N1) (mã số 11058-VNAHC, Sino Biological) trong 1X KPL dung dịch đệm phủ (mã số 5150-0041, SeraCare). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các chất pha loãng theo chuỗi chứa các mẫu huyết tương được dàn lên đĩa và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ kết hợp lắc (chất pha loãng mẫu: BSA 0,5% trong PBS Tween 20 0,025% + nồng độ cuối cùng của huyết tương chồn sương là 1:100; huyết tương được loại trừ khỏi các mẫu nước rửa mũi). Đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b nằm trong khoảng từ 0,230 đến 500 ng/mL được chạy trên mỗi đĩa hai lần giống nhau. Sau 2 giờ ủ, các đĩa được rửa 5 lần trong 300 µL PBS với Tween 20 0,05%. Thể liên hợp gắn kết với NA trên các đĩa sau đó được dò bằng kháng thể kháng IgG Fc F(ab')2 của người được liên hợp với HRP (mã số 709-036-098, Jackson) được pha loãng với tỷ lệ 1:2.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được rửa 8 lần trong 300 µL

PBS với Tween 20 0,05% và được phát triển với cơ chất TMB trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng với H_2SO_4 1N. Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ EnSpire (PerkinElmer). Thể liên hợp 45b trong các mẫu huyết tương được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism phiên bản 8 theo phân tích hồi quy tuyến tính (hình chữ S, phân tích 4PL) của các đường cong tiêu chuẩn. Nồng độ huyết tương trung bình thu được sau đó được sử dụng để tính toán các thông số dược động học bằng phân tích không phân chia bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 7.0.

Trong ELISA bắt giữ Fc, các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ qua đêm ở 4°C với 0,1 µg/100 µL/giếng dòng vô tính của chuột kháng IgG của người (miền CH2) R10Z8E9 (mã số MCA5748G, BioRad) trong dung dịch đệm cacbonat (mã số C3041, MilliporeSigma). Các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST và được phong bế bằng 200 µL/giếng sữa bột không béo 5% (mã số 9999S, Cell Signaling Technology) trong PBST trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các chất pha loãng theo chuỗi chứa các mẫu huyết tương được dàn lên đĩa và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ kết hợp lắc (chất pha loãng mẫu: sữa bột không béo 2,5% trong PBS Tween 20 0,025% + nồng độ cuối cùng của huyết tương chồn sương là 1:100; huyết tương được loại trừ khỏi các mẫu nước rửa mũi). Đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b nằm trong khoảng từ 0,03 đến 55 ng/mL được chạy trên mỗi đĩa hai lần giống nhau. Sau 2 giờ ủ, các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST. Thể liên hợp gắn kết với Fc trên các đĩa sau đó được dò bằng 100 µL/giếng kháng thể kháng IgG Fc F(ab')2 của người được liên hợp với HRP (mã số 709-036-098, Jackson Immunoresearch) được pha loãng với tỷ lệ 1:2.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc. Các đĩa sau đó được rửa 8 lần trong 300 µL/giếng PBST và được phát triển với 100 µL/giếng chất phản ứng cơ chất TMB (mã số 555214, BD) trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng với 100 µL/giếng H_2SO_4 1N và độ hấp thụ đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ EnSpire (PerkinElmer). Thể liên hợp 45b trong các mẫu huyết tương được nội suy bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính và các thông số PK được tính toán như được mô tả trên đây.

So sánh profil PK mức thể liên hợp 45b trong huyết tương và dịch rửa mũi được thể hiện lần lượt trên các FIG. 93 và 94. Đã quan sát được mức phơi nhiễm thể liên hợp 45b trong huyết tương tương tự đối với ELISA bắt giữ NA và Fc. Nồng độ

thể liên hợp 45b trung bình trong huyết tương chồn sương là ~10 µg/mL vào ngày 5 sau khi dùng một liều IV duy nhất ở 3 mg/kg. Các mức trong dịch rửa mũi là khoảng 3-5% mức trong huyết tương ở các thời điểm phù hợp.

Ví dụ 184. Hiệu quả của việc dùng dưới da thể liên hợp 45b với chủng cúm A/PR/8/34 (H1N1) ở mô hình gây tử vong chuột thử thách virut cao

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/PR/8/34) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột trong 2 nhánh thí nghiệm. Vào ngày 0, chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 2 lần (gấp 1 lần; các nhóm 1-5) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl hoặc với mức LD95 gấp 50 lần (gấp 25 lần; các nhóm 6-10), sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Mức tử vong và cân nặng được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày và các con chuột bất kỳ có mức giảm 20% cân nặng được ghi nhận là tử vong. Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một phương pháp điều trị dưới da (SC) duy nhất bằng thể liên hợp 45b ở 3, 1, 0,3, hoặc 0,1 mg/kg 2 giờ sau khi thử thách virut với thể tích liều là 10 ml/kg. Thiết kế nghiên cứu được tổng kết trong Bảng 157.

Trong nhánh nghiên cứu 1x, chuột được điều trị bằng tá dược đã tử vong vì virut thử thách vào ngày 6. Ngược lại, thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy hiệu lực đặc biệt và đã bảo vệ hoàn toàn các con chuột được thử thách virut 1x ở liều dùng thấp nhất (Bảng 158A). Dữ liệu cân nặng (Bảng 159A) cho thấy mức giảm cân mạnh tạm thời đã được hồi phục phần lớn vào cuối nghiên cứu đối với tất cả các con chuột nhắt được điều trị bằng thể liên hợp 45b.

Trong các nhóm được thử thách với lượng virut nhiều hơn 25 lần (LD95 gấp 50 lần), chuột chết nhanh hơn khi lây nhiễm với tỷ lệ chết là 80% vào ngày 5 và tỷ lệ chết là 100% vào ngày 6 (Bảng 158B). Chuột được điều trị bằng thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở liều dùng 1 hoặc 3 mg/kg, trong khi nhóm dùng liều 0,3 mg/kg có tỷ lệ sống sót là 60%. Điều đáng ngạc nhiên là ngay cả với thử thách virut lớn hơn, liều điều trị 1 và 3 mg/kg chỉ cho thấy sự giảm nhẹ về cân nặng và kết thúc nghiên cứu với mức tăng trọng lượng tịnh (Bảng 159B).

Nghiên cứu này chứng minh hiệu lực đặc biệt của thể liên hợp 45b ngay cả với thử thách bởi hiệu giá virut rất cao.

Bảng 157: Thiết kế nghiên cứu chung

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ)	Liều dùng (mg/kg)	N
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/chuột nhắt qua đường dùng IN	Tá dược (PBS)	SC, một lần duy nhất	---	5
2		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	3	5
3		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	1	5
4		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,3	5
5		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,1	5
6	A/PR/8/34 (H1N1) 7.5E3 PFU/chuột nhắt qua đường dùng IN	Tá dược (PBS)	SC, một lần duy nhất	---	5
7		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	3	5
8		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	1	5
9		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,3	5
10		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,1	5

Bảng 158A: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót (mức thử thách gấp 1 lần)

		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	3	1	0,3	0,1

		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
6	0	100	100	100	100
7	0	100	100	100	100
8	0	100	100	100	100
9	0	100	100	100	100
10	0	100	100	100	100
11	0	100	100	100	100
12	0	100	100	100	100
13	0	100	100	100	100
14	0	100	100	100	100

Bảng 158B: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót (mức thử thách gấp 25 lần)

		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	20	100	100	80	60
6	0	100	100	60	0
7	0	100	100	60	0
8	0	100	100	60	0
9	0	100	100	60	0

10	0	100	100	60	0
11	0	100	100	60	0
12	0	100	100	60	0
13	0	100	100	60	0
14	0	100	100	60	0

Bảng 159A: Tỷ lệ phần trăm cân nặng (mức thử thách gấp 1 lần)

		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	98,5	97,5	96,1	96,6	98,2
2	99,6	98,2	99,9	97,5	100
3	92,8	97,4	98,6	95,8	96,8
4	85,7	98,7	98,9	93,7	90,4
5	79	98,4	100,1	95,6	92,4
6		99,5	99,2	96,7	91,4
7		100,7	101,3	98,9	88,5
8		97,8	99,2	96,9	nd
9		102,9	103,2	100,7	92,1
10		101,4	101,4	99,7	95,9
11		100,9	101,5	99,6	96,7
12		102,1	104,5	100,9	98,8
13		102,7	102,6	101,8	99,3
14		101,9	103,4	101,1	98,6

nd = chưa xong

Bảng 159B: Tỷ lệ phần trăm cân nặng (mức thử thách gấp 25 lần)

		Thể liên hợp 45b (mg/kg)			
Ngày	Tá dược	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	97,2	96,6	97,4	97,6	98,6
2	95	99,6	100,9	98	98,7
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	79,9	98,5	90,3	82,8	82,5
5	75,7	100,3	91,5	82,7	76,7
6		100,2	96,4		
7		102,2	99,1		
8		99,5	97,5		
9		104,3	103		
10		103,5	102,2		
11		102,9	103,4		
12		105,5	106,1		
13		105,8	105,1		
14		103,9	106		

nd = chưa xong

Ví dụ 185. Hoạt tính của thể liên hợp 45b với chủng cúm A (H5N1, H7N9) lây nhiễm cao trong thử nghiệm tác động gây bệnh tế bào (CPE)

Một thử nghiệm *in vitro* để xác định hiệu lực của thể liên hợp 45b được tiến hành đối với chủng cúm A BSL-3 (lây nhiễm cao) và thường tuân theo các quy trình chuẩn. Tóm lại, các chất thử nghiệm với nồng độ khác nhau được trộn với virut (khoảng 250 TCID50) và được ủ ở 35°C trong một giờ. Sau khi ủ, hỗn hợp được bổ sung vào đơn lớp hợp lưu 80-90% của các tế bào MDCK. Sau khi ủ 90 phút, các tế bào được rửa sạch và chất thử nghiệm được dùng lại. Đơn lớp sau đó được phủ lên carboxymetylxenluloza để giảm thiểu sự lây lan của virut và được ủ trong hai ngày. Sau hai ngày nuôi cấy, các tế bào được rửa sạch bằng PBS và cố định bằng formalin 10%. Sau khi cố định, lớp đơn MDCK được thấm bằng Triton X-100 và nhuộm miễn

dịch bằng mAb chuột với nucleoprotein cúm. Các đơn lớp được đọc, và diện tích đã nhuộm trên mỗi giếng được tính toán để xác định giá trị $EC_{50/100}$.

Kết quả của nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 160 và chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 45b với các chủng có độc lực cao có khả năng gây đại dịch. Điều quan trọng là thể liên hợp 45b tạo ra các giá trị IC_{50} ở mức 17 nM hoặc thấp hơn đối với bốn thể phân lập H5N1 và một thể phân lập H7N9. Ngược lại, oseltamivir và zanamivir cho thấy phạm vi bao phủ không đầy đủ của các chủng lây nhiễm cao trong panen này. Đáng chú ý nhất là chúng không có hoạt tính với thể phân lập H7N9 quan trọng. Tuy nhiên, thể liên hợp 45b lại có hiệu lực cao đối với thể phân lập này (0,5 nM). Các kết quả này cho thấy tiềm năng của thể liên hợp 45b trong điều trị đại dịch do cúm có độc lực cao gây ra vượt trội hơn so với oseltamivir và zanamivir, và gần bằng baloxavir.

Bảng 160: Hoạt tính *in vitro* của thể liên hợp 45b với các thể phân lập cúm lây nhiễm cao.

		IC_{50} để sao chép virut (tính theo nM)				
Loại cúm	Loại HA/NA	Thể liên hợp 45b	Thể liên hợp 6	Oseltamivir	Baloxavir	Zanamivir
A/Vietnam/1194/2004	H5N1 (nhánh 1)	5,3	0,5	168,7	1,7	16,9
A/Indonesia/05/2005	H5N1 (nhánh 2,1)	16,9	0,5	≥ 300	1,7	16,9
A/Turkey/turkey/1/2005	H5N1 (nhánh 2,2)	1,7	0,5	168,7	1,7	5,3
A/Hong Kong/156/	H5N1 (nhánh 0)	0,5	1,7	≥ 300	1,7	53,3
A/Anhui/1/2013	H7N9	0,5	0,2	≥ 300	5,3	≥ 300
A/Netherlands/602/2009	H1N1*	1,7	0,5	≥ 300	1,7	≥ 300
*: Chủng so sánh theo mùa						

Ví dụ 186. Phân tích PK 8 ngày thể liên hợp 45b trong dịch rửa mũi của chồn sương sau khi tiêm IV một lần duy nhất ở 30, 10, 3, 1 hoặc 0,3 mg/kg

Các nghiên cứu PK ở chồn sương được thực hiện bởi Viện nghiên cứu IIT (IIT Research Institute) (IITRI) bằng cách sử dụng các con chồn sương đực 3-5 tháng tuổi. Các con chồn sương (n = 5) được dùng thể liên hợp 45b bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) một lần duy nhất ở 30, 10, 3, 1 hoặc 0,3 mg/kg (2 mL thể tích liều dùng) 24 giờ trước khi thử thách trong mũi với 1 x 10^6 đơn vị hình thành mảng bám (PFU) của chủng virut cúm A/California/07/2009 (H1N1). Các con chồn sương được gây mê trước khi dùng liều và thử thách virut bằng cách sử dụng hỗn hợp ketamin (25 mg/kg) và xylazin (2 mg/kg). Dịch rửa mũi được thu thập vào ngày 2, 4, 6 và 8 sau khi thử thách bằng cách gây mê các con chồn sương với ketamin (25 mg/kg) và xylazin (2 mg/kg), tiêm 0,5 mL PBS vô trùng có bổ sung penixilin (100 U/mL), streptomyxin (100 µg/mL) và gentamyxin (50 µg/mL) vào mỗi lỗ mũi và thu thập dịch lỏng bị đẩy ra vào cốc đựng mẫu. Thể tích dịch rửa mũi thu hồi được ghi lại và nồng độ của thể liên hợp 45b được xác định bằng ELISA bắt giữ Fc. Các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza hoặc các đĩa được phủ kháng thể kháng hIgG1 và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp với HRP. hIgG1 được bắt giữ bằng cách sử dụng kháng thể kháng Fc hIgG1.

Tóm lại, các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (mã số 12-565-136, ThermoFisher) được phủ qua đêm ở 4°C với 0,1 µg/100 µL/giếng dòng vô tính của chuột kháng IgG của người (miền CH2) R10Z8E9 (mã số MCA5748G, BioRad) trong dung dịch đệm cacbonat (mã số C3041, MilliporeSigma). Các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST và được phong bế bằng 200 µL/giếng sữa bột không béo 5% (mã số 9999S, Cell Signaling Technology) trong PBST trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc trên máy lắc đĩa quỹ đạo (500 vòng/phút). Các mẫu nước rửa mũi được pha loãng ban đầu 1:10 trong chất pha loãng phù hợp với ma trận (chất pha loãng dịch rửa mũi với tỷ lệ 1:10 từ các con chồn sương nguyên thể trong PBS với BSA 0,5% và Tween 20 0,025%), sau đó được pha loãng theo chuỗi gấp 3 lần và 100 µL/giếng được bổ sung vào các đĩa và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ kết hợp lắc. Các đường cong tiêu chuẩn đối với thể liên hợp 45b, nằm trong khoảng từ 0,03 đến 55 ng/mL, được chạy trên mỗi đĩa hai lần giống nhau. Sau 2 giờ ủ, các đĩa được rửa 5 lần với 300 µL/giếng PBST. Thể liên hợp 45b gắn kết với Fc trên các đĩa sau đó được dò bằng 100

µL/giếng kháng thể kháng IgG Fc F(ab')2 của người được liên hợp với HRP (mã số 709-036-098, Jackson Immunoresearch) được pha loãng với tỷ lệ 1:2.000 trong chất pha loãng mẫu trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc. Các đĩa sau đó được rửa 8 lần trong 300 µL/giếng PBST và được phát triển với 100 µL/giếng chất phản ứng cơ chất TMB (mã số 555214, BD) trong 7-8 phút. Phản ứng được dừng với 100 µL/giếng H_2SO_4 1N và độ hấp thụ đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ ENSPIRE® (PerkinElmer). Thể liên hợp 45b trong các mẫu nước rửa mũi của chồn sương được nội suy bằng cách sử dụng GraphPad Prism phiên bản 8 theo phân tích hồi quy tuyến tính (hình chữ S, phân tích 4PL) của các đường cong tiêu chuẩn. Profil PK so sánh thể liên hợp 45b trong dịch rửa mũi của chồn sương được thể hiện trên FIG. 94 và FIG. 95. Sự gia tăng theo liều lượng thể liên hợp 45b trong nước rửa mũi của chồn sương được quan sát thấy nằm trong khoảng 0,3 và 30 mg/kg IV. Thời điểm 8 ngày đối với nhóm dùng 0,3 mg/kg thấp hơn ngưỡng phát hiện bắt giữ Fc (1 ng/mL).

Ví dụ 187. Hiệu quả của thể liên hợp 45b với cúm A (H1N1) ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong, được dùng liều bằng ba đường dùng khác nhau

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/California/07/2009) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (~3E4 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê nhẹ bằng ketamin/xylazin (lần lượt là 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị một lần duy nhất bằng thể liên hợp 45b hoặc tá dược (PBS), 2 giờ sau khi thử thách, hoặc tiêm tĩnh mạch (IV), tiêm bắp (IM), hoặc tiêm dưới da (SC) (Bảng 160). Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 14 ngày. Con chuột bất kỳ giảm 20% BW được ghi nhận là tử vong.

Bảng 160: Thiết kế nghiên cứu chung

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ.)	Liều dùng (mg/kg)	N
1	A/CA/07/09	Tá dược (PBS)	IV, một lần duy	---	5

	(H1N1) 3E4 PFU/chuột nhắt qua đường dùng IN		nhất		
2		Thể liên hợp 45b	IV, một lần duy nhất	1	5
3		Thể liên hợp 45b	IV, một lần duy nhất	0,3	5
4		Thể liên hợp 45b	IV, một lần duy nhất	0,1	5
5		Thể liên hợp 45b	IM, một lần duy nhất	1	5
6		Thể liên hợp 45b	IM, một lần duy nhất	0,3	5
7		Thể liên hợp 45b	IM, một lần duy nhất	0,1	5
8		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	1	5
9		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,3	5
10		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,1	5

Để xác định hiệu lực của thể liên hợp 45b theo các đường dùng liều khác nhau, các nồng độ thể liên hợp phù hợp (1, 0,3 và 0,1 mg/kg) được dùng theo đường IV, IM hoặc SC. Khi đo bằng tỷ lệ sống sót, tất cả các đường dùng liều đều có hiệu quả 100% theo đường dùng liều bất kỳ ở mức 0,1 mg/kg, trước đây được xác định là liều hiệu quả thấp nhất khi thể liên hợp 45b được dùng theo đường SC (Bảng 161). Tuy nhiên, các con chuột được điều trị bằng tá dược đạt tỷ lệ tử vong 80% vào ngày 6. Khi đo bằng mức sống sót, các dữ liệu này chứng minh hiệu lực tương đương của thể liên hợp 45b bất kể đường dùng liều nào.

Bảng 161: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

	Tá dược	Thể liên hợp 45b (Đường dùng liều) (mg/kg)		
		IV	IM	SC

Ngày		1	0,3	0,1	1	0,3	0,1	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
14	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Dữ liệu về cân nặng ủng hộ mạnh mẽ dữ liệu về mức sống sót chứng minh rằng thể liên hợp 45b có hiệu lực cao theo đường dùng liều bất kỳ (Bảng 162). Như thường thấy đối với chủng gây đại dịch có độc lực cao này, chuột cho thấy mức giảm BW khoảng 10% vào khoảng Ngày 3 hoặc Ngày 4. Đáng chú ý là sự khác biệt về BW giữa các liều cùng nồng độ chỉ thay đổi rất ít theo đường dùng liều (xem phần in nghiêng, Bảng 162). Dữ liệu BW từ nghiên cứu này khẳng định thêm kết luận rằng thể liên hợp 45b có hiệu quả bất kể đường dùng liều nào.

Bảng 162: Tỷ lệ phần trăm cân nặng*

	Tá dược	Thể liên hợp 45b (Đường dùng liều) (mg/kg)								
		IV			IM			SC		
Ngày		1	0,3	0,1	1	0,3	0,1	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96,3	96,6	98,5	96,9	97,6	98	100	100,3	99,9	101,1

	Tá dược	Thể liên hợp 45b (Đường dùng liều) (mg/kg)								
		IV			IM			SC		
Ngày		1	0,3	0,1	1	0,3	0,1	1	0,3	0,1
2	96,8	100,7	100,7	100,3	101,8	100,2	100,9	101,9	101,3	101,4
3	87,7	91,4	*90,8*	91,9	92,3	91,3	90,4	93,1	90,8	90,7
4	82,8	94,3	91,1	89,8	94,5	91,4	*89*	91,3	*88*	88,4
5	80,8	97,5	94,2	92,2	96,6	93,5	93,1	95,1	90	89,5
6	78,9	97,4	95,5	93,2	96,8	95,2	94,8	96,8	90,6	90,1
7		100,1	97,5	96,8	99,7	96,7	96,7	96,9	95	92,9
8		98,5	97	95,1	98,4	94,9	96,4	97,1	94,8	93,2
9		99,8	96,8	95,7	98,5	94,8	95,7	96,6	93,8	93,3
10		99,3	97,3	95,5	98,7	94,8	97,7	95,2	94,8	93,9
11		103,4	100,8	101,4	103,3	100,1	101,1	100,2	99,4	98,1
12		102,3	100,4	100,3	101,7	99,4	100,5	99,1	98,2	98
13		102,2	100	99,8	101,4	99,5	101,1	99	98,7	98,4
14		103,6	101,8	100,4	102,5	101,2	102,7	101,9	100,4	99,9

*Dữ liệu là trung bình nhóm cho đến khi xuất hiện trường hợp tử vong đầu tiên trong nhóm

Theo hai kết quả đọc khác nhau, thể liên hợp 45b được phát hiện có hiệu quả như nhau nếu dùng theo đường tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Tính linh hoạt của đường tiêm thể liên hợp 45b là một lợi thế đáng kể, cho phép sử dụng các công thức và đường tiêm khác nhau cho các cơ sở bệnh viện và ngoại trú nếu cần.

Ví dụ 188 Tổng hợp thể liên hợp 46

Điều chế dung dịch thuốc thử Click: 0,0050M $CuSO_4$ trong PBS dung dịch đệm: 10,0 mg $CuSO_4$ được hòa tan trong 12,53 mL PBS, sau đó lấy 5,00 mL dung dịch $CuSO_4$ này và bổ sung 43,1 mg BTTAA (CAS# 1334179-85-9) và 247,5 mg natri ascorbat để thu được dung dịch thuốc thử Click (0,0050M $CuSO_4$, 0,020M BTTAA và 0,25M natri ascorbat).

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (65,5 mg, 10,0 mL, 1,13 μmol, azido DAR~5,9, SEQ ID NO: 76) in ống ly tâm dung tích 15 mL được bổ sung vào phân tử nhỏ được dẫn xuất alkyn (22,7 mg, 15,2 μmol, được mô tả trong Int-83. Ví dụ 145, 3,0

đương lượng cho mỗi azido của Fc). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch thuốc thử Click (1,80 mL). Hỗn hợp thu được được quay nhẹ trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem giao thức tinh chế thể liên hợp chung). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 66,420 Da (DAR = 5,8). Thu được 57 mg với độ tinh khiết 98%. Thể liên hợp thu được được thể hiện trên FIG. 102.

Người nộp đơn lưu ý rằng thể liên hợp 46 có thể được điều chế theo cách khác bằng cách sử dụng miền Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77, tương ứng với sự khác biệt trong kiểu gen Fc. Các kiểu gen khác nhau được kỳ vọng sẽ có đặc tính giống với các đặc tính được mô tả ở đây.

Người nộp đơn cũng lưu ý rằng cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 46 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 46 được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 76. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 189. Nghiên cứu PK so sánh ở động vật linh trưởng không phải là người 30 ngày theo đường dùng IV thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46

Các nghiên cứu PK ở động vật linh trưởng không phải là người (NHP) được thực hiện bởi BTS Research (San Diego, CA) bằng cách sử dụng khỉ Cynomolgus đực và cái 5-9 tuổi với cân nặng nằm trong khoảng từ 3,5-8,5 kg. NHP được tiêm IV với 2 mg/kg chất thử nghiệm (0,4 mL/kg thể tích liều dùng). Động vật linh trưởng được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp các con chuột không bị lấy máu đến chết (qua tĩnh mạch đùi hoặc tĩnh mạch đầu) với máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian (Bảng 163). Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46 ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA dạng bánh kẹp (sandwich ELISA). Tóm lại, chất thử nghiệm được bắt giữ lên các đĩa được phủ Fc và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-Fc của người được liên hợp

với HRP. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b hoặc thể liên hợp 46. Phần mô tả phương pháp chi tiết hơn được cung cấp trên đây. Các đường cong so sánh thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46 được thể hiện trên FIG. 97. Thể liên hợp 46 chứng minh thời gian bán hủy cuối cùng được cải thiện đáng kể ~45 ngày so sánh với ~10 ngày đối với thể liên hợp 45b. AUC đối với thể liên hợp 46 lớn hơn gấp 2 lần so với AUC đối với thể liên hợp 45b (Bảng 163).

Bảng 163: PK của khỉ, thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46

				Thời gian (giờ)												
				0,25	4	8	24	72	120	168	240	336	672			
Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Thể liên hợp		Nồng độ										Tmax	Cmax	AUClast	Chu kỳ bán rã
				(ug/mL)										(giờ)	(ug/mL)	(giờ*ug/mL)	(giờ)
2	IV	Thể liên hợp 45b	Giá trị trung bình	32,6	24,8	20,1	14,1	9,97	7,61	6,33	4,47	3,62	1,47	0,25	32,6	3450	249
2	IV	Thể liên hợp 46	Giá trị trung bình	35,4	29	25,7	20,5	15,1	13	11,2	10,4	8,71	7,97	0,25	35,4	7210	1080

51349

793/1174

Ví dụ 190. Hoạt tính của thể liên hợp 45b và các chất so sánh tiêu chuẩn chăm sóc với các chủng cúm A theo mùa, đại dịch và kháng thuốc trong thử nghiệm tác động gây bệnh tế bào (CPE)

Thử nghiệm *in vitro* để xác định hiệu lực của thể liên hợp 45b so với các mẫu đối chứng của Oseltamivir, Zanamivir và Baloxavir được tiến hành như được thực hiện trong Ví dụ 166 và thường tuân theo các quy trình tiêu chuẩn. Dữ liệu được thể hiện trong các bảng 164-167.

Bảng 164: CPE với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm ở các tế bào MDCK SIAT1

Phân tử	MOI 0,001 EC_{50} [nM]	MOI 0,01 EC_{50} [nM]
Oseltamivir	18,54	34,2
Zanamivir	16,321	33,16
Thể liên hợp 45b	0,8355	2,964
Baloxavir	<0,3	2,216

Bảng 165: CPE với chủng cúm A dạng dại và thể đột biến H275Y (H1N1) ở các tế bào MDCK SIAT1

EC_{50} [nM]	Chủng cúm A/California/12/2012 (H1N1)		Chủng cúm A/Texas/23/2012 (H1N1) H275Y	
Phân tử	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,001	MOI 0,01
Oseltamivir	107,6	1653	>10.000	>10.000
Zanamivir	54,59	558,1	327,7	>10.000
Thể liên hợp 45b	0,7043	20,1	2,101	81,86
Baloxavir	3,718	4,924	3,318	21,24

Bảng 166: CPE với chủng cúm A dạng dại và thể đột biến E119V (H3N2) ở các tế bào MDCK SIAT1

Hiệu quả tế bào học EC_{50} [nM]	Chủng cúm A/Washington/12/2007 (H3N2)		Chủng cúm A/Texas/12/2007 (H3N2) E119V	
Phân tử	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,001	MOI 0,01
Oseltamivir	N/A	12,39	96,04	>10.000
Zanamivir	N/A	29,57	50,17	940,1
Thể liên hợp 45b	N/A	0,0637	1,193	43,12
Baloxavir	N/A	0,9758	5,196	27,87

Bảng 167: CPE [nM] với cúm B ở MOI 0,01

Phân tử	TM	DAR	Fc	Liên kết cầu nối trung tâm	B/Florida/4/2006	B/Brisbane/60/2008	B/Malaysia/2506/2004	B/Colorado/6/2017
Oseltamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	1203	1568	735,7	>10.000
Zanamivir	N/A	N/A	N/A	N/A	61,57	607,9	360,7	2746
Thể liên hợp 45b	Int-83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 nguyên tử	10,78	7,291	6,252	25,93
Baloxavir	N/A	N/A	N/A	N/A	20,95	46,84	61,33	100,9

Ví dụ 191. Nghiên cứu PK ở chuột trong 14 ngày so sánh nồng độ của thể liên hợp 45b trong huyết tương và dịch lót biểu mô (ELF)

Chuột cái BALB/c từ Phòng thí nghiệm Charles River được để thích nghi trong 5 ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu. Các con chuột được nhốt 3-6 con trong một lồng với thức ăn và nước uống có sẵn. Tất cả các quy trình đều được thực hiện theo chính sách và hướng dẫn của NeoSome IACUC. Các con chuột được tiêm dưới da (SC) 20 mg/kg chất thử nghiệm (thể tích liều 10 mL/kg). Tại các thời điểm đã chọn, 3 con chuột được an tử bằng cách hít CO_2. Máu được lấy ra bằng cách chọc tim vào ống K2EDTA để giữ lại huyết tương. Sau khi lấy máu, rửa phế quản phế nang (BAL) được

thực hiện bằng cách phanh khí quản, lắp bộ chuyển đổi ống 23G và thực hiện 2 lần rửa 0,5 mL bằng PBS 1X vô trùng ở độ pH 7,4. Thể tích dịch thu hồi được ghi lại và giữ lại. Sau khi hoàn tất quy trình BAL, phổi được lấy ra, cân và bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các phần nhỏ của huyết tương và dịch BAL (BALF) được chiết ra trước khi bảo quản mẫu ở nhiệt độ -80°C để sử dụng trong thử nghiệm định lượng urê. BALF thu thập được ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng để tạo viên các đại thực bào phế nang, đồng thời viên và dịch nổi được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi chuyển đến nhà tài trợ. Nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương tại mỗi thời điểm được đo bằng phương pháp ELISA gián tiếp như mô tả chi tiết trên đây. Tóm lại, các phân tử thể liên hợp 45b được thu thập trên các đĩa được phủ neuraminidaza (NA) và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của người đặc hiệu với Fcγ được liên hợp với HRP, dạng $F(ab')_2$. Phương pháp ELISA giống như vậy được thực hiện trên BALF thu hoạch như được mô tả ở trên. Nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Thể tích ELF và nồng độ thể liên hợp 45b trong ELF được xác định bằng cách sử dụng urê làm chất đánh dấu pha loãng như đã mô tả trước đây (Rennard et al., 1986 J Appl Physiol 60:532-538). Các đường cong so sánh mức thể liên hợp 45b với ELF được thể hiện trên FIG. 98. Sau 2 giờ tiêm, mức dịch lót biểu mô của thể liên hợp 45b (ELF) bằng ~60% mức phơi nhiễm huyết tương (AUC) trong suốt thời gian còn lại, cho thấy sự phân chia gần như ngay lập tức của thể liên hợp 45b từ huyết tương đến ELF trong phổi (FIG. 98, Bảng 168).

Bảng 168: Mức thể liên hợp 45b trong huyết tương và ELF ở chuột trong 2 tuần.

	Thời gian												
	(giờ)												
	1	2	4	8	24	48	72	120	168	336			
Nhóm	Nồng độ										Tmax	Cmax	AUClast
	(ug/mL)										(giờ)	(ug/mL)	(giờ*ug/mL)
ELF	5,61	29,9	70,6	98,4	149	105	94,2	49,5	47,4	16,1	24	149	19000
Huyết tương	30,7	63,9	110	180	197	178	144	104	87	29,4	24	197	32500

Ví dụ 192. Nghiên cứu PK ở chuột trong 7 ngày so sánh đường dùng IV, SC và IM của thể liên hợp 45b ở chuột SCID.

Nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực bị suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID) 6 tuần tuổi không có hệ thống miễn dịch thích ứng. Chuột được tiêm IV, SC hoặc IM với 5 mg/kg chất thử nghiệm (10 mL/kg thể tích liều dùng). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp các con chuột không bị lấy máu đến chết (sau hốc mắt, má, hoặc theo tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian. Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA như được mô tả chi tiết trên đây. Tóm lại, các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza (NA) và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của người đặc hiệu với Fcγ được liên hợp với HRP, dạng $F(ab')_2$. Đối với ELISA bắt giữ Fc, hIgG1 được bắt giữ bằng cách sử dụng kháng thể kháng Fc hIgG1 và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của người đặc hiệu với Fcγ được liên hợp với HRP, dạng $F(ab')_2$. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Các đường cong so sánh profil PK thể liên hợp 45b ở chuột SCID trong 7 ngày được thể hiện trên các FIG. 99-100. Mức phơi nhiễm với thể liên hợp 45b trong huyết tương đối với SC và IM là tương đương và tính sinh khả dụng thu được từ đường dùng SC hoặc IM là khoảng 77% so

với đường dùng IV. Nồng độ thể liên hợp 45b trong huyết tương là tương đương đối với tất cả các đường dùng liều ở khoảng 24 giờ sau khi tiêm.

Ví dụ 193. Nghiên cứu PK ở chuột trong 7 ngày so sánh việc dùng SC thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46

Nghiên cứu PK ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng chuột đực CD-1 6 tuần tuổi. Các con chuột được tiêm SC với 10 mg/kg chất thử nghiệm (10 mL/kg thể tích liều dùng). Các con chuột được nuôi trong điều kiện nuôi tiêu chuẩn được IACUC chấp thuận. Ở các thời điểm thích hợp các con chuột không bị lấy máu đến chết (sau hốc mắt, má, hoặc theo tĩnh mạch đuôi) với máu được thu thập vào ống K2EDTA để ngăn ngừa đông máu. Máu đã thu thập được ly tâm (2.000 x *g*, trong 10 phút) và huyết tương được rút ra để phân tích nồng độ của chất thử nghiệm theo thời gian. Nồng độ huyết tương đối với thể liên hợp 45b ở mỗi thời điểm được đo bằng ELISA gián tiếp như được mô tả chi tiết trên đây. Tóm lại, các phân tử thể liên hợp 45b được bắt giữ lên các đĩa được phủ neuraminidaza (NA) và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của người đặc hiệu với Fcγ được liên hợp với HRP, dạng $F(ab')_2$. Nồng độ protein được tính toán trong GraphPad Prism bằng cách sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính 4PL các đường cong tiêu chuẩn của thể liên hợp 45b. Các đường cong so sánh profil PK trong 7 ngày của thể liên hợp 45b và thể liên hợp 46 được thể hiện trên FIG. 101. Mức phơi nhiễm huyết tương đối với thể liên hợp 46 lớn hơn khoảng 50% so với đối với thể liên hợp 46. So với IgG1 của người dạng dại, thời gian bán hủy của biến thể IgG1 YTE Fc của người được biết là bị giảm ở chuột do gắn kết FcRn của chuột được tăng cường ở độ pH trung tính, điều này phủ nhận sự gắn kết được cải thiện với FcRn của chuột ở độ pH có tính axit (Dall' Acqua *et al.* 2002 *J Immunol* 169:5171-5180).

Ví dụ 194. Điều trị kết hợp thể liên hợp 45b và Baloxavir

Tác dụng gây bệnh tế bào (CPE). Đơn lớp tế bào MDCK Siat1 bị lây nhiễm các nhóm phụ cúm A ở MOI thích hợp dao động từ 0,01 – 1. Thể liên hợp 45b được thử nghiệm riêng lẻ hoặc kết hợp với tác nhân chăm sóc tiêu chuẩn, như baloxavir, ở nồng độ từ 1 – 1.000 nM và ủ trong 3 ngày đối với cúm A ở 37°C, CO_2 5%. CPE được xác định bằng cách nhuộm màu tím pha lê bằng cách đọc độ hấp thụ ở 595 nm. Dữ liệu

được thể hiện trong Bảng 169-172. Khi được sử dụng kết hợp với baloxavir, thể liên hợp 45b có hiệu quả trong việc ức chế sự sao chép của virut ở nồng độ thấp hơn đáng kể so với khi sử dụng riêng lẻ (với mức giảm EC_{50} >10 lần), ngay cả khi baloxavir có mặt ở nồng độ thấp hơn EC_{50} của nó.

Bảng 169: Biến thể trong thể liên hợp 45b EC_{50} với sự có mặt của nồng độ baloxavir cố định trong CPE so với chủng cúm A/CA/07/2009(H1N1)pdm trong tế bào MDCK SIAT ở MOI 0,01

Phân tử	Baloxavir [nM]	MOI 0,01 EC_{50} [nM]
Thể liên hợp 45	0	7,369
	1	0,7347
	2	<0,39
	4	<0,39
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39
	64	<0,39

EC_{50} của một mình Baloxavir = 2,41 nM

Bảng 170: Biến thể trong thể liên hợp 45b EC_{50} với sự có mặt của nồng độ baloxavir cố định trong thử nghiệm CPE so với chủng cúm A/CA/07/2009(H1N1)pdm trong tế bào MDCK SIAT ở MOI 0,1

Phân tử	Baloxavir [nM]	MOI 0,1 EC_{50} [nM]
Thể liên hợp 45b	0	>100 (405,5)
	1	9,169
	2	4,671
	4	<0,39
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39
	64	<0,39

EC_{50} của một mình Baloxavir = 7,95 nM

Bảng 171: Biến thể trong thể liên hợp 45b EC_{50} với sự có mặt của nồng độ baloxavir cố định trong thử nghiệm CPE so với chủng cúm A/Texas/71/2017 (H3N2)pdm trong tế bào MDCK SIAT ở MOI 0,01

Phân tử	Baloxavir [nM]	MOI 0,01 EC_{50} [nM]
Thể liên hợp 45b	0	45,93
	1	5,242
	2	2,429
	4	0,8822
	8	0,2175
	16	0,02432
	32	0,04907
	64	0,1346

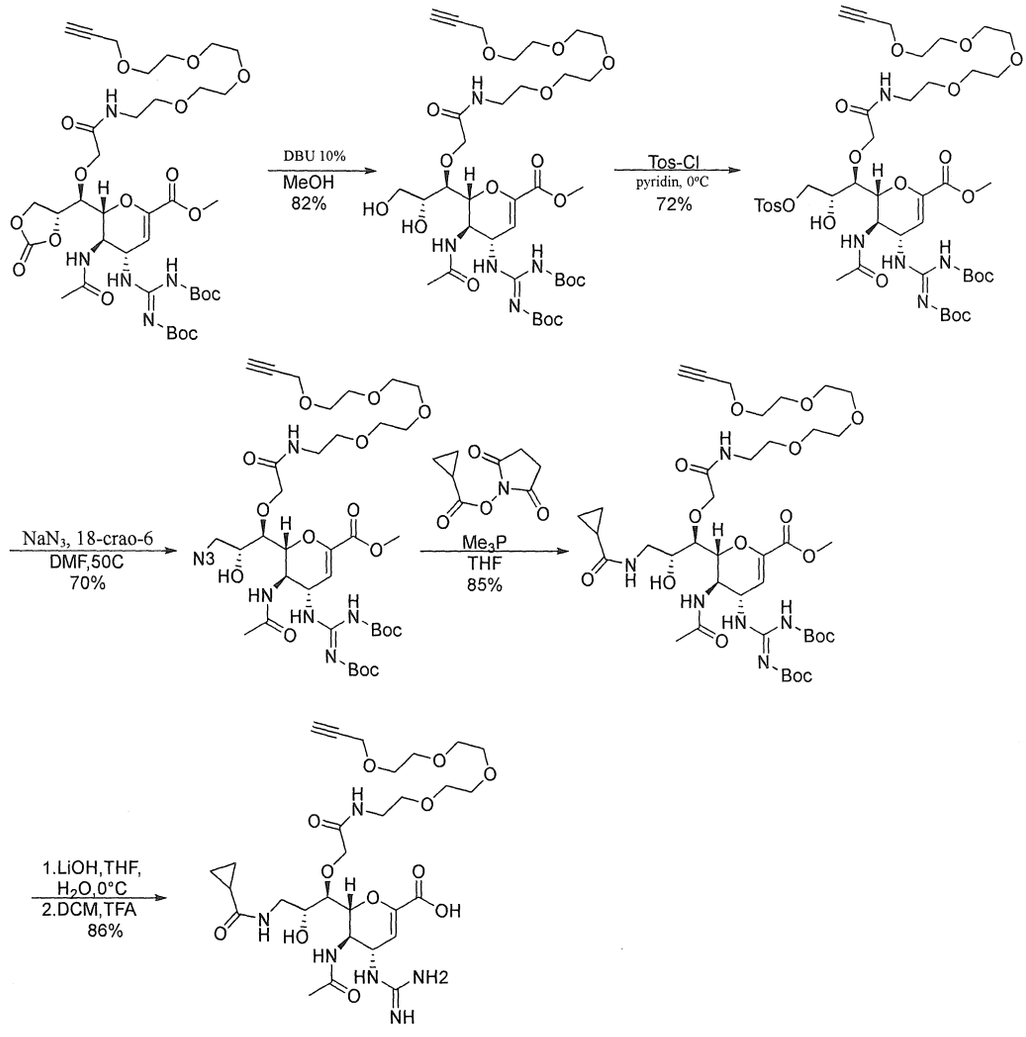
EC_{50} của một mình Baloxavir = 8,238 nM

Bảng 172: Biến thể trong thể liên hợp 45b EC_{50} với sự có mặt của nồng độ baloxavir cố định trong thử nghiệm CPE so với chủng cúm A/Texas/71/2017 (H3N2)pdm trong tế bào MDCK SIAT ở MOI 0,1

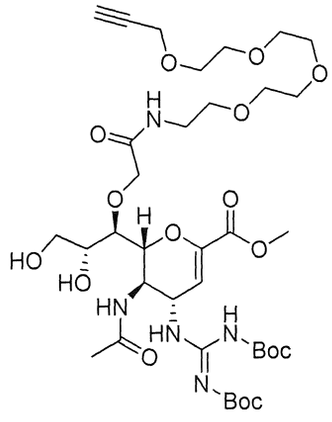
Phân tử	Baloxavir [nM]	MOI 0,1 EC_{50} [nM]
Thể liên hợp 45b	0	30015
	1	105
	2	100,9
	4	10,17
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39
	64	<0,39

EC_{50} của một mình Baloxavir = 17,31 nM

Ví dụ 195. Tổng hợp Int-91



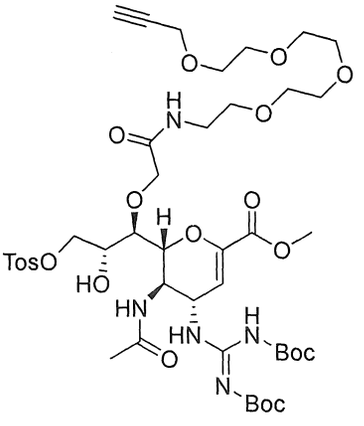
Bước a.



Dung dịch khuấy ở 0°C chứa dẫn xuất zanamivir được điều chế trước đó (1,993 g, 2,362 mmol, Int-22 được mô tả trong Ví dụ 79) trong metanol (30 mL) được bổ sung DBU (2,4 mL). Nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ xung quanh và sau 1 giờ dung

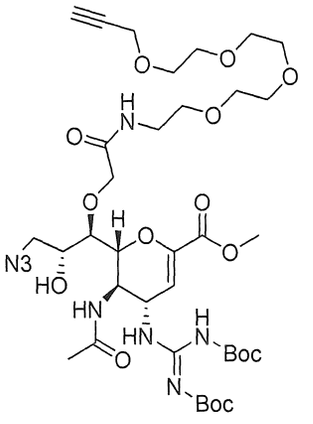
dịch phản ứng thoát ra hoàn toàn thành sản phẩm mong muốn. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco CombiFlash rửa giải với metanol 0% đến 30% và diclometan. Thu được 1,584 g, hiệu suất 82%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+$ = 840,0, $[(M + H)]^+$ = 818,2.

Bước b.



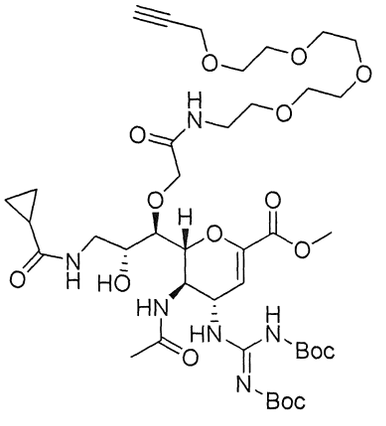
Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước a (500 mg, 0,611 mmol) trong pyridin (15,0 mL) được bổ sung tosyl clorua (146 mg, 0,764 mmol) 5,0 mL diclometan) hơn 1 giờ với sự hỗ trợ của máy bơm tiêm. Khi tiêu thụ hoàn toàn tosyl clorua (theo dõi bằng HPLC) một lượng nhỏ bằng nhau của tosyl clorua được bổ sung theo cùng kiểu, và việc bổ sung này được thực hiện lặp lại thêm hai lần (tổng đương lượng của tosyl clorua ở cuối phản ứng là 5). Dung dịch phản ứng được làm lạnh nhanh bằng metanol (0,5 mL), và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 30% và diclometan. Thu được 0,429 g, hiệu suất 72%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+$ = 972,2.

Bước c.



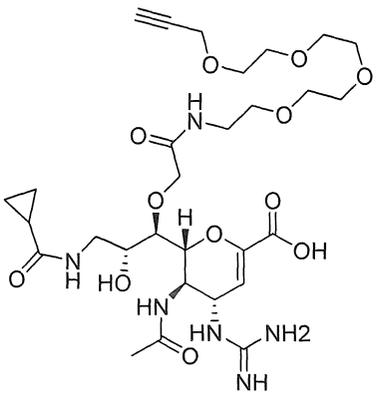
Dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước b (547 mg, 0,563 mmol) trong DMF (5,0 mL) được bổ sung 18-crao-6 (59 mg, 0,225 mmol), và natri azit (183 mg, 2,814 mmol), sau đó nhiệt độ được nâng lên 50°C. Khi hoàn thành phản ứng bằng LCMS, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 30% và diclometan. Thu được 0,333 g, hiệu suất 70%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 843,2$.

Bước d.



Dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước c (548 mg, 0,650 mmol) trong THF (8,0 mL) được bổ sung este N-hydroxysuxinimidyl của axit xyclopropan (237 mg, 1,300 mmol) và trimetylphosphin (133 µL, 1,300 mmol). Khi hoàn thành bằng LCMS, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 0,488 g, hiệu suất 85%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 885,2$.

Bước e.



Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước d (488 mg, 0,551 mmol) trong tetrahydrofuran và nước (2,0 mL) được bổ sung lithi hydroxit (14 mg, 0,606 mmol). Khi hoàn thành bằng LCMS, hổ phách IRN-77 được bổ sung cho đến khi phát hiện độ pH là axit. Hỗn hợp được lọc với sự hỗ trợ của etyl axetat, và nhựa được gạn bỏ. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay và nguyên liệu thô được hòa tan trong diclometan (4,0 mL) và TFA (2,0 mL). Khi hoàn thành, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 40% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 370 mg, hiệu suất 86%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 671,2$.

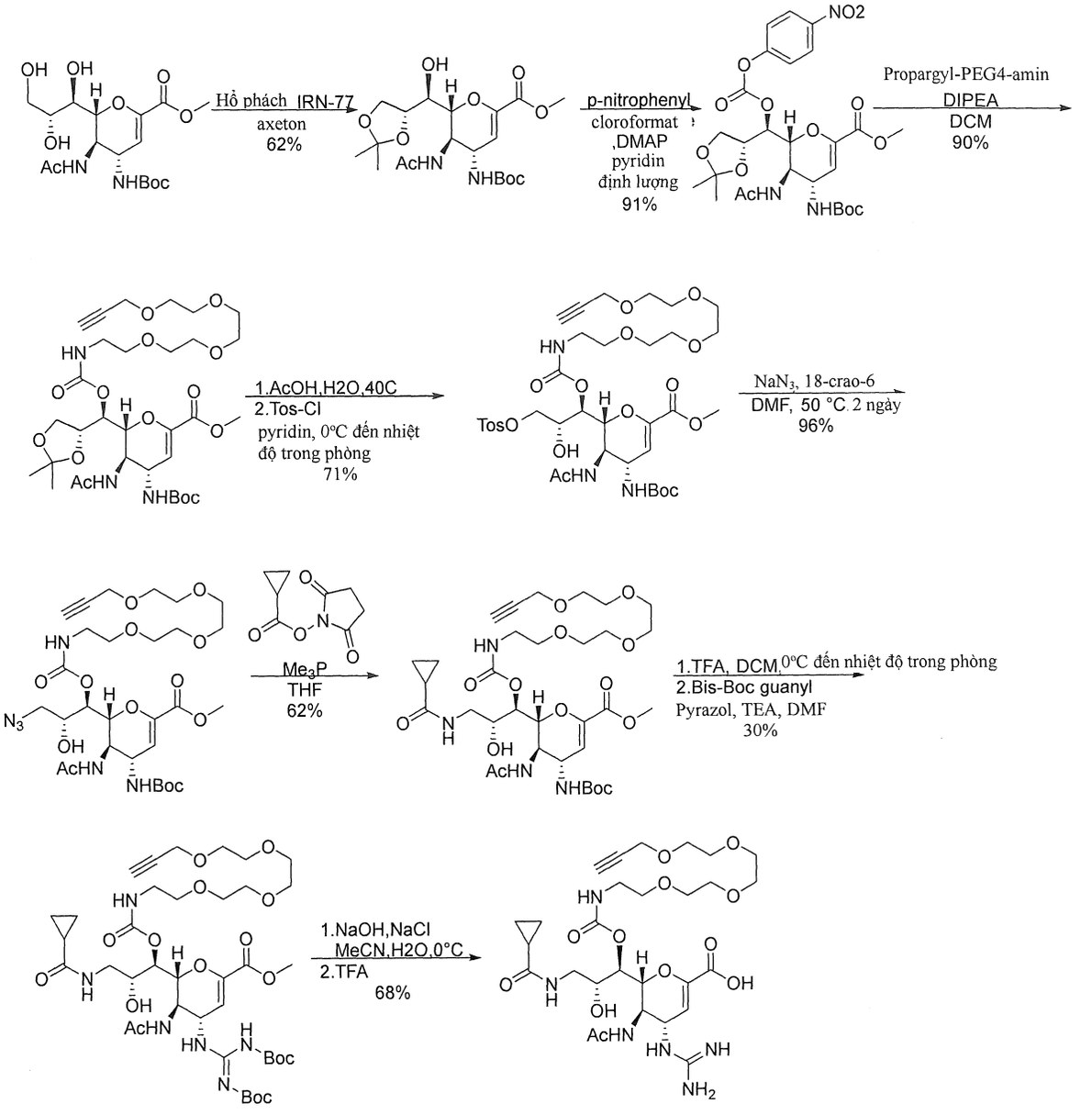
Ví dụ 196. Tổng hợp thể liên hợp 47

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (50 mg, 5,0 mL, 0,862 µmol, SEQ ID NO: 73, DAR-7,0) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 40 mL chứa phân tử nhỏ được chức hóa alkyn (6,1 mg, 7,760 µmol, Int-91, được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 195). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, nó được bổ sung dung dịch chứa natri của axit L-ascorbic (12,3 mg, 62,08 µmol), đồng (II) sulfat (2,5 mg, 15,52 µmol), và BTTAA (26,7 mg, 62,08 µmol) trong dung dịch đệm PBS 7,4 (6,984 mL). Hỗn hợp thu được được lắc nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem giao thức tinh chế thể liên hợp chung được cung cấp ở đây). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 64,423 Da (DAR = 6,9). Thu được 35,3 mg, hiệu suất 70%.

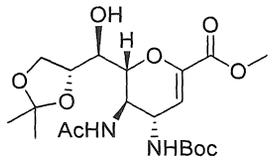
Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 47 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng

C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 47 được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 197. Tổng hợp carbamat Int-92

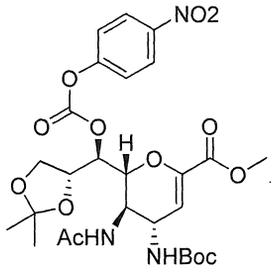


Bước a.



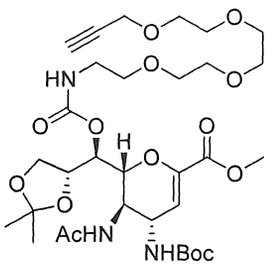
Sản phẩm trung gian được điều chế như được mô tả ở Ví dụ 21 (5,15 g, 12,74 mmol) được hòa tan trong axeton (100 mL). Nhựa axit hổ phách IRN-77 được bổ sung, đưa độ pH đến ~4, khi được đo bằng giấy pH. Phản ứng được gia nhiệt cho đến khi tất cả nguyên liệu ban đầu được tiêu thụ. Khi làm lạnh, phản ứng được lọc, và sản phẩm lọc được cô đặc bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 30% và diclometan. Thu được 3,535 g, hiệu suất 62%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+ = 467,2$, $[(M + H - t\text{-}Bu)]^+ = 389,2$, $[(M + H - Boc)]^+ = 345,2$.

Bước b.



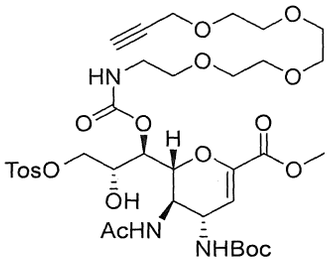
Dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước a (3,258 g, 7,391 mmol) và p-nitrophenol cloroformat (2,979 g, 14,78 mmol) trong pyridin (80 mL), được bổ sung DMAP (1,806 g, 14,78 mmol). Sau 18 giờ, p-nitrophenol cloroformat bổ sung (1,490 g, 7,391 mmol) và DMAP (0,903 g, 7,391 mmol) được bổ sung. Khi hoàn thành phản ứng, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được hấp thụ trong DCM (250 mL), và được lọc. Phần lọc được rửa bằng dung dịch axit sulfuric 2 N (3 x 100 mL), sau đó dung dịch natri bicacbonat bão hòa (3 x 100 mL). Chất hữu cơ được làm khô bằng nước muối (200 mL), sau đó magie sulfat, lọc và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với axeton và hexan 0% đến 100%. Thu được 4,122 g, hiệu suất 91%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+ = 632,1$, $[(M + H)]^+ = 554,0$, $[(M + H - Boc)]^+ = 510,2$.

Bước c.



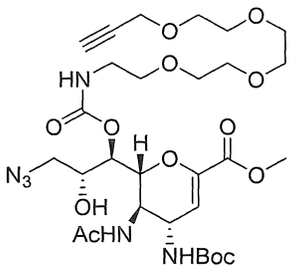
Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước b (4,00 g, 6,562 mmol) và DIPEA (2,400 mL, 13,78 mmol) trong DCM (40 mL), được bổ sung propargyl-PEG4-amin. Nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ xung quanh và tiếp tục khuấy cho đến khi hoàn thành bằng LCMS. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 4,130g, hiệu suất 90%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+$ = 724,1, $[(M + H - Boc)]^+$ = 602,2.

Bước d.



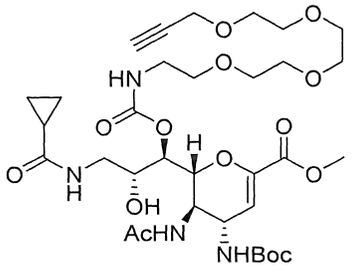
Sản phẩm của bước c (4,13 g, 5,885 mmol) được hòa tan trong axit axetic (24 mL) và nước (12 mL), sau đó được khuấy cho đến khi sự chuyển hòa hoàn thành được quan sát bằng LCMS. Phản ứng được cô đặc bằng cô quay. Dung dịch khuấy chứa phần cặn này (4,60 g, 5,340 mmol) trong pyridin (150 mL) được bổ sung chậm dung dịch chứa Tosyl-Cl (1,392 g, 7,299 mmol) trong DCM (10 mL) bằng máy bơm tiêm. Khi bổ sung Tos-Cl, và lượng bổ sung (1,392 g, 7,299 mmol) được bổ sung. Khi chuyển hóa hoàn thành nguyên liệu ban đầu, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 3,380 g, hiệu suất 71%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+$ = 838,0, $[(M + H - Boc)]^+$ = 716,2.

Bước e.



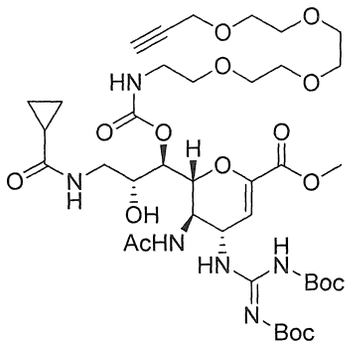
Dung dịch khuấy chứa tosylat của bước d (3,280 g, 4,020 mmol) trong DMF (30 mL) được bổ sung 18-crao-6 (425 mg, 1,608 mmol), và natri azit (1,307 g, 20,10 mmol), sau đó nhiệt độ được nâng lên 50°C. Khi hoàn thành bằng LCMS, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 2,651 g, hiệu suất 96%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H + Na)]^+ = 709,2$, $[(M + H - Boc)]^+ = 587,2$.

Bước f.



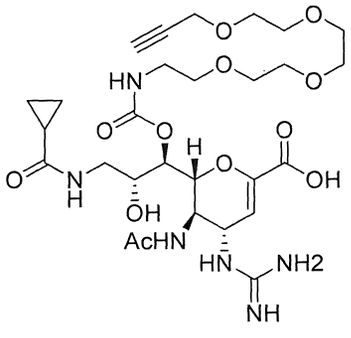
Dung dịch khuấy chứa sản phẩm của bước e (2,649 mg, 3,858 mmol) trong THF (20 mL) được bổ sung este N-hydroxysuxinimidyl của axit xyclopropan (1,413 g, 7,715 mmol) và trimetylphosphin (795 µL, 7,715 mmol). Khi hoàn thành phản ứng bằng LCMS, tất cả các chất dễ bay hơi được bay hơi bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 1,744 g, hiệu suất 62%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 729,2$.

Bước g.



Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước f (1,744 g, 2,393 mmol) trong DCM (15 mL) được bổ sung TFA (15 mL), sau đó nhiệt độ được tăng đến nhiệt độ xung quanh. Khi bổ sung tất cả nguyên liệu ban đầu, các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phân tích LCMS nguyên liệu thô này cho thấy $[(M + H)]^+ = 629,2$. Nguyên liệu này được hấp thụ vào dung dịch khuấy ở 0°C chứa DIPEA (7,502 mL, 43,07 mmol) trong DCM (15 mL), và được xử lý bằng bis-Boc-p-nitrophenol cloroformat (817 mg, 2,632 mmol). Khi bổ sung nguyên liệu ban đầu, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cột silica bằng cách sử dụng sắc ký lỏng Isco COMBIFLASH® rửa giải với metanol 0% đến 50% và diclometan. Thu được 631 mg, hiệu suất 30%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 871,2$.

Bước h.



Dung dịch khuấy ở 0°C chứa sản phẩm của bước g (315 mg, 0,362 mmol) trong axetonitril (4,0 mL) và dung dịch NaCl 1,0 M trong nước (8 mL), nó được bổ sung dung dịch NaOH 1,0 M trong nước (15 mg, 380 µL, 0,380 mmol). Tiếp tục khuấy qua đêm, trong khi nhiệt độ được nhẹ nhàng cho phép đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch phản ứng được làm lạnh nhanh bằng axit axetic (100 µL) và tất cả

các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tạo huyền phù trong DCM : MeOH = 9: 1 và được lọc. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phân tích LCMS nguyên liệu thô này cho thấy đỉnh chính với [(M + H)]+ mong muốn = 857,2. Phần cặn được hòa tan trong DCM (3,0 mL) và TFA (3,0 mL) để loại bỏ các nhóm Boc. Khi hoàn thành bằng LCMS, tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ bằng cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng HPLC (metanol 0 đến 40% và nước, bằng cách sử dụng TFA 0,1% làm chất cải biến). Thu được 370 mg, hiệu suất 86%. Các ion được phát hiện bởi LCMS: $[(M + H)]^+ = 657,2$.

Ví dụ 198. Tổng hợp thể liên hợp 48

Dung dịch chứa Fc được chức hóa azido (33,3 mg, 3,33 mL, 0,576 μmol, SEQ ID NO: 73; DAR-7,0) được bổ sung vào ống ly tâm dung tích 50 mL chứa phân tử nhỏ được chức hóa alkyn (6,1 mg, 7,760 μmol, Int-92 được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 197). Sau khi lắc nhẹ để hòa tan tất cả các chất rắn, dung dịch này được bổ sung dung dịch chứa natri của axit L-ascorbic (8,6 mg, 11,21 μmol), đồng (II) sulfat (2,5 mg, 15,52 μmol), và BTTAA (26,7 mg, 62,08 μmol) trong dung dịch đệm PBS 7,4 (6,984 mL). Dung dịch thu được được quay nhẹ qua đêm. Nó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột protein A, tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (xem giao thức tinh chế thể liên hợp chung được mô tả ở đây). Phân tích Maldi TOF sản phẩm cuối cùng đã tinh chế thu được khối lượng trung bình là 63,734 Da (DAR = 6,2). Thu được 35,3 mg, hiệu suất 63%.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 48 bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 48 được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 199. Tác dụng của DAR đối với việc ức chế neuraminidaza

Ức chế neuraminidaza (NAI)

Chất thử nghiệm được ủ với virut sống ở PFU/mL được chỉ định trong 20 phút ở 37°C, CO_2 5%. Cơ chất NA-Fluor được bổ sung vào các giếng thích hợp và được ủ

trong 1 giờ ở 37°C, CO_2 5%. NAI được xác định bằng cách đọc huỳnh quang ở bước sóng kích thích 355 nm/phát xạ 460 nm. % NAI được tính toán bằng cách sử dụng công thức: % NAI = (1-(FI $_{\text{virut với TA}}$ – FI $_{\text{không có virut}}$)) / (FI $_{\text{chỉ có virut}}$ - FI $_{\text{không có virut}}$) x 100. IC_{50} được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hồi quy phi tuyến tính trong GraphPad Prism.

Thể liên hợp 45a đã chứng minh cho thấy hoạt tính tăng phụ thuộc vào DAR đạt hoạt tính tối đa ở DAR 3,3 hoặc lớn hơn với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) (Bảng 173).

Thể đột biến A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K cho thấy tính kháng với oseltamivir và cho thấy giảm độ nhạy với zanamivir. Thể liên hợp 45a không thay đổi với thể đột biến này và đã chứng minh cho thấy hoạt tính tăng phụ thuộc vào DAR đạt hoạt tính tối đa ở DAR 3,3 hoặc lớn hơn với cúm (Bảng 173).

Bảng 173: IC_{50} tóm tắt đối với thể liên hợp 110 với phân nhóm của chủng cúm A (H1N1) và (H3N2)

Chất thử nghiệm	DAR	IC_{50} [nM] A/PR/8/1934 (H1N1)	IC_{50} [nM] A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K
Oseltamivir	N/A	5,276	>1,000
Zanamivir	N/A	1,072	20,79
Int-83	N/A	11,48	510,6
Thể liên hợp 45a	0,4	23,61	78,79
Thể liên hợp 45a	1	12,25	29,31
Thể liên hợp 45a	3,3	2,772	4,166
Thể liên hợp 45a	4,7	2,706	3,13
Thể liên hợp 45a	5,1	3,259	3,583
Thể liên hợp 45a	7,3	3,098	2,509

Ví dụ 200. Mô hình chuột lây nhiễm thứ phát

Mô hình lây nhiễm vi khuẩn thứ phát với MRSA.

Nghiên cứu hiệu quả được thực hiện ở chuột BALB/c cái 6-8 tuần (Charles River) được thử thách trong mũi với 3E3 PFU/chuột nhắt (dưới mức gây tử vong) của

A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Virapur, Lot# E1020A1). Thể liên hợp 45b hoặc các mẫu đối chứng IgG1 Fc của người được dùng dưới dạng một liều tiêm dưới da duy nhất (SC) 2 giờ sau khi thử thách ở 0,3 – 3 mg/kg. Vào ngày 6 sau khi lây nhiễm, chuột được thử thách trong mũi với liều dưới mức gây tử vong của *Staphylococcus aureus* (MRSA) TCH1516 kháng methixilin ở 5E7 đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) (FIG. 104).

Để xác định tải lượng vi khuẩn trong phổi, chuột được giết bằng CO_2 và cả hai thùy phổi được thu hoạch để xác định tải lượng vi khuẩn ở 24 giờ sau khi lây nhiễm với MRSA. Phổi được nghiền đồng nhất với hạt silica 1 mm trong 1 mL PBS bằng cách sử dụng MagNA Lyser (Roche). Việc nghiền đồng nhất được thực hiện ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 60 giây và ướp lạnh trong đá trong 5 phút giữa các lần chạy. Để xác định CFU, dịch nghiền đồng nhất phổi được pha loãng 10 lần theo chuỗi trong PBS và dàn mỏng lên các đĩa LA. CFU được tính toán so với khối lượng của phổi (CFU/g phổi). Đối với các nghiên cứu về mức sống sót tình trạng sức khỏe chung của động vật được theo dõi và cân nặng (BW) được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày. Động vật đang hấp hối hoặc động vật có mức giảm cân mạnh >20% cân nặng (BW), được ghi là đã tử vong. Mức sống sót, đường cong BW, và phân tích thống kê được thực hiện với GraphPad Prism (phiên bản 6,07).

Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ với mô hình chuột siêu lây nhiễm vi khuẩn với thử thách dưới mức gây tử vong của chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm tiếp theo là lây nhiễm dưới mức gây tử vong với MRSA. Một cách tích tụ, hai lây nhiễm dưới mức gây nhiễm đã dẫn đến mức tử vong 100% ở chuột được điều trị bằng Fc hIgG1 (FIG. 105A). Điều trị bằng thể liên hợp 45b ở 0,3 hoặc 3 mg/kg – để ngăn ngừa bệnh cúm – đã dẫn đến mức sống sót 100% của chuột. Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức giảm tải lượng vi khuẩn trong phổi khi so sánh với Fc hIgG1 ở 24 giờ sau khi thử thách với MRSA (FIG. 105B). Tải lượng vi khuẩn sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45b là tương đương với tải lượng quan sát được ở chuột chỉ được thử thách với MRSA.

Các dữ liệu này chứng minh tiềm năng đối với thể liên hợp 45b trong việc giảm thiểu các biến chứng do lây nhiễm cúm như siêu lây nhiễm *S. aureus* góp phần gây ra mức tử vong liên quan đến lây nhiễm cúm.

Mô hình lây nhiễm vi khuẩn thứ phát với Streptococcus pneumoniae

Nghiên cứu hiệu quả được thực hiện ở chuột BALB/c cái 6-8 tuần (Charles River) được thử thách trong mũi với 3E1 PFU/chuột nhắt (dưới mức gây tử vong) của A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Virapur, Lot#1512B4) (FIG. 106). Thể liên hợp 45b hoặc các mẫu đối chứng IgG1 Fc của người được dùng dưới dạng một liều tiêm dưới da duy nhất (SC) 2 giờ sau khi thử thách ở 0,3 mg/kg. Vào ngày 6 sau khi lây nhiễm, chuột được thử thách trong mũi với liều dưới mức gây tử vong của chủng *Streptococcus pneumoniae* (SPN) 6301 ở 1E5 CFU. Sức khỏe chung của động vật được theo dõi và BW được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày. Các con chuột đang hấp hối, hoặc các con chuột có mức giảm cân mạnh >20% BW hoặc cao hơn, được ghi là đã tử vong. Mức sống sót, đường cong BW, và phân tích thống kê được thực hiện với GraphPad Prism (phiên bản 6,07).

Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ với mô hình chuột siêu lây nhiễm vi khuẩn với thử thách dưới mức gây tử vong của chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm tiếp theo là lây nhiễm dưới mức gây tử vong với SPN. Một cách tích tụ, hai lây nhiễm dưới mức gây nhiễm đã dẫn đến mức tử vong 100% ở chuột được điều trị bằng Fc hIgG1. Điều trị bằng thể liên hợp 45b ở 0,3 mg/kg – để ngăn ngừa bệnh cúm – đã dẫn đến mức sống sót 100% của chuột chứng minh tiềm năng đối với thể liên hợp 45b trong việc giảm thiểu các biến chứng do lây nhiễm cúm với nguyên nhân phổ biến nhất là siêu lây nhiễm vi khuẩn, *S. pneumoniae* (FIG. 107). Siêu lây nhiễm vi khuẩn góp phần đáng kể vào mức tử vong liên quan đến bệnh cúm.

Ví dụ 201. Nghiên cứu tối ưu hóa dùng liều đối với việc điều trị bằng thể liên hợp 45a của lây nhiễm virut cúm A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) ở chuột BALB/c

Chuột BALB/c cái 18-20g thu được từ Phòng thí nghiệm Charles River (Wilmington, MA) cho thí nghiệm này. Các con chuột được cách ly trong 6 ngày trước khi sử dụng và duy trì trên Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) và nước máy ở Trung tâm nghiên cứu động vật thí nghiệm của Đại học bang Utah.

Dịch cúm gia cầm A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) có độc lực cao, thu được từ Trung tâm tham khảo về dịch bệnh (the Centers for Disease Reference) (Atlanta, GA). Sự lan truyền virut được thực hiện trong tế bào thận chó Madin-Darby (MDCK) (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Virut bố mẹ được cấy chuyển

một lần để chuẩn bị cho nhóm thử thách. Nhóm thử thách sau đó được chuẩn độ trong các tế bào MDCK trước khi sử dụng.

Số lượng chuột và các nhóm nghiên cứu được mô tả trong Bảng 174. Các nhóm chuột được điều trị bằng cách tiêm dưới da (SC) với các liều lượng 0,3, 1, 3, và 10 mg/kg của thể liên hợp 45a vào một lần duy nhất, hoặc 7 ngày trước khi lây nhiễm virut, hoặc 4 giờ sau khi lây nhiễm virut. Oseltamivir (10 mg/kg), được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính đối với liều lượng thử thách virut, được dùng bằng cách dùng qua đường miệng bằng ống thông dạ dày hai lần mỗi ngày, bắt đầu 4 giờ sau khi lây nhiễm. Fc không liên hợp, được sử dụng làm giả dược, được dùng theo cách tương tự với thể liên hợp 45a. Ngoài ra, ba con chuột đối chứng không được điều trị được duy trì để so sánh trọng lượng.

Đối với thử thách virut bệnh cúm, chuột được gây mê bằng cách tiêm trong màng bụng ketamin/xylazin (50 mg/kg//5 mg/kg) trước khi thử thách bằng đường dùng trong mũi với khoảng 5 đơn vị hình thành mảng bám (1x LD_{90}) của virut cho mỗi con chuột ở thể tích chất cấy 90 µl.

Các con chuột được cân trước khi điều trị và sau đó mỗi Ngày sau đó để đánh giá tác động của việc điều trị đối với việc cải thiện mức giảm cân mạnh do lây nhiễm virut. Tất cả các con chuột quan sát được về mức tử vong và mức tử vong qua ngày 21.

Đường cong mức sống sót Kaplan-Meier được tạo ra và so sánh bằng thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox) tiếp theo là so sánh từng cặp bằng cách sử dụng thử nghiệm Gehan-Breslow-Wilcoxon trong Prism 8,3 (GraphPad Software Inc.). Giá trị trung bình cân nặng được phân tích bằng phân tích phương sai một chiều (ANOVA) tiếp theo là các thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey bằng cách sử dụng Prism 8,3.

Bảng 174: Nghiên cứu tối ưu hóa dùng liều đối với hiệu quả

Số lồng	Số nhóm	Có hoặc Không bị lây nhiễm	Hợp chất	Liều dùng	Phác đồ điều trị	Kết quả quan sát/Thử nghiệm
10	1	Có	Thể liên hợp 45a	10 mg/kg	Một lần, 7 ngày trước khi	Quan sát được với mức giảm cân mạnh và mức
10	3	Có	Thể liên hợp 45a	3 mg/kg		

Số lồng	Số nhóm	Có hoặc Không bị lây nhiễm	Hợp chất	Liều dùng	Phác đồ điều trị	Kết quả quan sát/Thử nghiệm
10	5	Có	Thể liên hợp 45a	1 mg/kg	lây nhiễm	tử vong qua ngày 21
10	7	Có	Thể liên hợp 45a	0,3 mg/kg		
10	9	Có	Giả dược (Fc không liên hợp, SEQ ID NO: 72)	-	Một lần, 4 giờ sau khi lây nhiễm	
10	11	Có	Thể liên hợp 45a	10 mg/kg		
10	13	Có	Thể liên hợp 45a	3 mg/kg		
10	15	Có	Thể liên hợp 45a	1 mg/kg		
10	17	Có	Thể liên hợp 45a	0,3 mg/kg		
10	19	Có	Oseltamivir	30 mg/kg/ngày	b.i.d. x 5d, beg 4h sau khi lây nhiễm	
3	2	Không	Chuột không được điều trị quan sát được với mức tăng cân bình thường			

Sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45a ở 7 ngày trước khi lây nhiễm virut, mức bảo vệ 100% quan sát được đối với liều lượng 10 mg/kg, mức bảo vệ 80% đối với các liều lượng 0,3 và 3 mg/kg, và mức bảo vệ 70% đối với liều dùng 1 mg/kg (Fig. 108A). Mức sống sót 30% ở nhóm dùng giả dược là bất thường, vì vậy liều lượng 1 mg/kg không cung cấp mức bảo vệ đáng kể. Ngoài ra, tất cả các liều lượng đều cung cấp mức bảo vệ đáng kể khỏi sự giảm cân mạnh (Fig. 108B).

Sau khi điều trị bằng thể liên hợp 45a ở 4 giờ sau khi lây nhiễm virut, mức bảo vệ 100% quan sát được đối với các liều lượng 1, 3, và 10 mg/kg, và mức bảo vệ 70% đối với liều dùng 0,3 mg/kg (Fig. 109A). Do mức sống sót 30% quan sát được trong nhóm dùng giả dược, liều lượng 0,3 mg/kg không cung cấp mức bảo vệ đáng kể.

Ngoài ra, tất cả các liều lượng đều cung cấp mức bảo vệ đáng kể khỏi sự giảm cân mạnh (Fig. 109B).

Ví dụ 202. Thử nghiệm lectin được liên kết với enzym (ELLA).

Thử nghiệm ELLA được tiến hành như được báo cáo trong Gao et al. (*J. Vis. Exp.* Doi:10,3791/54573, 2016) với các cải biến nhỏ. Tóm lại, các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (ThermoFisher) được phủ 2,5 µg fetuin (Sigma-Aldrich) trong 1X KPL dung dịch đệm phủ (SeraCare) qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, các đĩa được rửa bằng PBS ở độ pH 7,4 có bổ sung Tween 20 0,05% (PBST). Chất thử nghiệm được thử nghiệm ở 0,001 – 1000 nM và bổ sung trong 50 µL/giếng. Virut cúm được bổ sung ở 1e5 – 1e6 PFU/giếng trong 50 µL/giếng. Các đĩa được ủ trong 16-18 giờ ở 37°C, CO_2 5%. Sau khi rửa các đĩa, chất ngưng kết trong đậu phộng được liên hợp với HRP (PNA-HRP) ở 0,13 µg trong 2 giờ, được rửa lại và được phát triển với 100 µL/giếng cơ chất TMB (BD) trong 3-5 phút. Phản ứng được dừng với 100 µL/giếng H_2SO_4 1N. Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ EnSpire. IC_{50} được tính toán với GraphPad Prism phiên bản 8 bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Liều lượng-đáp ứng (Sự ức chế)).

Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy hiệu lực tăng khi so sánh với oseltamivir hoặc zanamivir trong ELLA với IC_{50} giữa với các chủng cúm A và B đại diện (Bảng 175).

Bảng 175: Hoạt tính của thể liên hợp 45b trong thử nghiệm lectin được liên kết với enzym (ELLA) với cúm A và B (IC_{50})

Chủng cúm	Nhóm phụ/dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Fc hIgG1 [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/PR/8/1934	H1N1	0,11	> 1,000	25,4	3,8
A/CA/7/2009	H1N1pdm	0,02	> 1,000	0,99	0,09
A/Hong Kong/1/1968	H3N2	0,003	> 1,000	0,07	0,24
B/Florida/4/2006	Yamagata	0,02	> 1,000	1,00	0,09
B/Malaysia/2506/2004	Victoria	0,15	> 1,000	3,2	9,3

Ví dụ 203. Thể liên hợp 45b góp phần cho phép gắn kết đa trị tiềm năng với neuraminidaza của virut cúm

Thể liên hợp 45b bao gồm thể liên hợp thích hợp về mặt hóa học và sinh học của Int-83 với miền Fc hIgG1 được kéo dài ở đầu tận cùng N (SEQ ID NO: 73). Như được thể hiện trên FIG. 110B, Int-83 bao gồm các dime zanamivir được ngẫu hợp đối xứng qua các gốc metyl carbamat trên C7-hydroxyl của zanamivir với liên kết cầu nối trung tâm 15 Å linh hoạt có khoảng cách giữa monome zanamivir khoảng 18 Å. Nhiều bản sao của Int-83 được liên hợp với bề mặt tiếp xúc với các gốc lysin trên miền Fc thông qua liên kết cầu nối ngang dựa trên polyetylen glycol (PEG) linh hoạt 32 nguyên tử, mà nhô ra khỏi bề mặt của Fc 35 - 40 Å khi liên kết cầu nối được mở rộng hoàn toàn (Fig. 110B). Các gốc lysin tiếp xúc với dung môi cụ thể là các vị trí để liên hợp (Fig. 110B). Tỷ lệ trung bình giữa Int-83 và Fc được sử dụng trong thể liên hợp 45b was 4,5:1. Tổng hợp thể liên hợp 45b được mô tả trong Ví dụ 156. Phân bố không gian của các vị trí được ưu tiên để liên hợp (Fig. 110B) kết hợp với chiều dài và tính linh hoạt của liên kết cầu nối ngang cho phép, về nguyên tắc, đối với thể liên hợp 45b để tương tác đồng thời với nhiều vị trí hoạt động NA trong tetrame (ca. 45 hoặc 70 Å, tương ứng, Fig. 110A). Ngoài ra, khoảng cách của Int-83 trong thể liên hợp 45b cho phép tạo cầu các vị trí hoạt động NA qua các tetrame NA lân cận trên cùng một virion (25 - 30 Å), hoặc qua hai virion (16 Å).

Hoạt tính phổ quát, và khả năng kháng thấp của thể liên hợp 45b in vitro

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu hoạt tính kháng virut nội tại của thể liên hợp 45b khi không có sự tham gia miễn dịch bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế neuraminidaza (NAI) tiêu chuẩn dùng cơ chất phân tử nhỏ. Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy hoạt tính tiềm năng với cúm A và B với IC_{50} trung bình bằng 1,7 nM với các chủng cúm A H1N1 (n=7, nằm trong khoảng từ 1,1 nM đến 4,8 nM), 4,2 nM với các chủng cúm A H3N2 (n=6, nằm trong khoảng từ 0,3 nM đến 14,9 nM) và 4,4 nM với các chủng cúm B (n=6, nằm trong khoảng từ 1,0 nM đến 20,7 nM), tương ứng (Bảng 176). Nói chung, thể liên hợp 45b được thực hiện tương tự với zanamivir và oseltamivir, nhưng mạnh hơn so với oseltamivir với các chủng cúm B (Bảng 176). Điều quan trọng là, thể liên hợp 45b IC_{50}s không chuyển sang các biến thể có liên quan về mặt lâm sàng với khả năng nhạy giảm với chất ức chế neuraminidaza đã được

chấp thuận. Hoạt tính của thể liên hợp 45b là 1,7 nM với H275Y ở các phân nhóm H1N1, 2,6 nM E119V, 1,2 nM R292K ở phân nhóm H3N2 hoặc 6,7 nM R152K ở dạng B. Oseltamivir hoặc zanamivir mất hiệu lực lên đến >100 lần hoặc >10 lần, tương ứng, với các biến thể này (Bảng 177). Thể liên hợp 45b gữ được hoạt tính mạnh với sản phẩm ly giải tế bào từ các virut H5N1 và H7N9, với IC_{50}s bằng 1,9 nM và 1,2 nM, tương ứng (Bảng 178). Oseltamivir và zanamivir có hoạt tính tương đương với H5N1, nhưng oseltamivir và zanamivir đã mất hoạt tính với H7N9 với các IC_{50} >1 μM hoặc >100 nM, tương ứng (Bảng 178).

Bảng 176: Hoạt tính phổ quát, phổ rộng của thể liên hợp 45b với cúm A (H1N1), (H3N2) và B (Yamagata và Victoria dòng) trong ức chế neuraminidaza (IC_{50} trung bình) và thử nghiệm hiệu quả tế bào học trên cơ sở tế bào (EC_{50} trung bình).

Phân tử	Dạng/phân nhóm	IC_{50} [nM]	EC_{50} [nM]
Thể liên hợp 45b	A (H1N1)	1,7	1,9
	A (H3N2)	4,2	0,9
	B	4,4	7,4
Oseltamivir	A (H1N1)	2,2	2414
	A (H3N2)	0,4	8185
	B	37,7	758,5
Zanamivir	A (H1N1)	1,0	1093
	A (H3N2)	1,3	>10.000
	B	6,3	80,2

Bảng 177: Hoạt tính của thể liên hợp 45b với các biến thể với tính nhạy giảm trong ức chế neuraminidaza (IC_{50})

Chủng cúm sống	Biến thể	Nhóm phụ/dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Texas/23/2012	H275Y	H1N1pdm09	1,7	507,1	1,1
A/Texas/12/2007	E119V	H3N2	2,6	148,9	3,8
A/Bethesda/956/2006	R292K	H3N2	1,2	>1000	22,18
B/Memphis/20/1996	R152K	Yamagata	6,7	>1000	125,5

Bảng 178: Hoạt tính của thể liên hợp 45b với sản phẩm ly giải tế bào từ chủng cúm A H5N1 và H7N9 trong ức chế neuraminidaza (IC_{50})

Sản phẩm ly giải tế bào NA từ	Nhóm phụ/dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Anhui/1/2005	H5N1	1,9	3,7	0,6
A/Shanghai/1/2013	H7N9	1,2	>1,000	100,4

Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hoạt tính của thể liên hợp 45b trong thử nghiệm lectin được liên kết với enzym (ELLA) trong đó glycoprotein lớn được sử dụng làm cơ chất. Sự trình diện của axit sialic (Sia) trong thử nghiệm ELLA là giống với sự trình diện cơ chất NA trên bề mặt tế bào hơn. Kết quả là, khả năng tiếp cận của cơ chất bị hạn chế hơn và hoạt tính NA trong thử nghiệm ELLA đã được chứng minh là bị ảnh hưởng bởi các yếu tố phong bế việc tiếp cận với vị trí hoạt tính NA (Chen Y. Q., et al., *J. Virol.* 93: doi.10,1128/JVI.01526-18, 2019). Điều thú vị là, so sánh với kết quả ức chế NA bằng cách sử dụng cơ chất phân tử nhỏ như được mô tả trên đây, hoạt tính của thể liên hợp 45b được tăng cường (>10x) so với zanamivir và oseltamivir với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) (Bảng 179). Với thể liên hợp 45b, sự cản trở lập thể của các vị trí hoạt động NA tetrame nội hoặc liên NA liền kề bởi miền Fc, hoặc sự tham gia đích đa trị gây ra sự kết tụ virut có thể đã góp phần vào việc tăng cường hiệu lực quan sát được trong thử nghiệm ELLA.

Bảng 179: Hoạt tính phổ rộng của thể liên hợp 45b với cúm A và B ở CPE (EC_{50}).

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/WSN/1933	H1N1	0,2059	51,36	29,12
A/PR/8/1934	H1N1	0,782	1461	7581
A/PR/8/1934 (đã được làm thích nghi với chuột)	H1N1	32,49	>10.000	không được thử nghiệm
A/CA/7/2009	H1N1pdm	2,964	34,2	33,16
A/CA/12/2012	H1N1pdm09	0,4931	>10.000	1093
A/Texas/23/2012 H275Y	H1N1pdm09	2,886	>10.000	>10.000
A/Illinois/08/2018	H1N1pdm09	9,584	3366	4278

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Illinois/37/2018 I38L	H1N1pdm09	0,4304	200,4	179,1
A/Illinois/08/2018 I38T	H1N1pdm09	1,35	>10.000	>10.000
A/Hong Kong/1/1968 (đã được làm thích nghi với chuột)	H3N2	36,57	6369	không được thử nghiệm
A/Texas/71/2017	H3N2	0,3748	>10.000	>10.000
A/Washington/01/2007	H3N2	0,04449	1,908	1,968
A/Texas/12/2007 E119V	H3N2	0,6594	351,4	2,096
A/Louisiana/50/2017	H3N2	1,41	>10.000	>10.000
A/Louisiana/49/2017 I38M	H3N2	0,606	>10.000	4815
A/Bethesda/956/2006 R292K	H3N2	20,1	1653	558,1
B/Florida/4/2006	Yamagata	12,8	1030	76,89
B/Brisbane/60/2008	Victoria	6,288	487	254,2
B/Malaysia/2506/2004	Victoria	1,512	471,2	83,52
B/Colorado/6/2017	Victoria	8,485	4480	56,98

Sự phân biệt thậm chí còn lớn hơn giữa thể liên hợp 45b và zanamivir và oseltamivir đã được quan sát thấy trong các thử nghiệm tác động gây bệnh tế bào dựa trên tế bào (cell-based cytopathic effect - CPE). Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy hoạt tính tiềm năng với các dạng cúm A và B với các EC_{50} trung bình là 1,3 nM đối với các chủng cúm A H1N1 (n=6, nằm trong khoảng từ 0,43 nM đến 32,4 nM), 0,9 nM đối với các chủng cúm A H3N2 (n=4, nằm trong khoảng từ 0,04 nM đến 36,6 nM) và 7,4 nM đối với các chủng cúm B (n=4, nằm trong khoảng từ 1,5 nM đến 12,8 nM), tương ứng trong MDCK SIAT1 hoặc đối với các chủng cúm đã được làm thích nghi với chuột trong các tế bào MDCK (Bảng 179). Đáng chú ý là, thể liên hợp 45b có hoạt tính mạnh hơn 3 log so với oseltamivir và zanamivir với một số chủng cúm được thử nghiệm (Bảng 176). Khi thể liên hợp 45b được thử nghiệm với các chủng có khả năng gây bệnh cao trong các thử nghiệm trung hòa vi mô dựa trên tế bào, các EC_{50} đối với thể liên hợp 45b là 1,7 nM so với các chủng H5N1 (n=4) và 5,3 nM so với chủng H7N9 (n=1) (Bảng 180). CC_{50} đối với thể liên hợp 45b trong MDCK-SIAT1 hoặc các tế bào MDCK là >10.000 nM (dữ liệu không được thể hiện). Do đó, chỉ số chọn lọc

tính toán (SI) đối với thể liên hợp 45b trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào là >1,000x đối với các dạng cúm A và B.

Bảng 180: Hoạt tính phổ rộng của thể liên hợp 45b với chủng cúm A (H5N1) và (H7N9) có khả năng gây bệnh cao trong quá trình trung hòa vi mô (IC_{50}).

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45b [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Vietnam/1194/2004	H5N1	1,7	168,7	16,9
A/Indonesia/05/2005	H5N1	1,7	>300	16,9
A/turkey/Turkey/1/2005	H5N1	1,7	168,7	5,3
A/Hong Kong/156/97	H5N1	1,7	>300	53,3
A/Anhui/1/ 2013	H7N9	5,3	>300	>300
A/Netherlands/602/2009*	H1N1pdm09	1,7	>300	>300

* Chủng cúm đối chứng A gây đại dịch

Ngoài thử nghiệm CPE, thí nghiệm cấy chuyển theo chuỗi được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào MDCK được lây nhiễm với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm để so sánh khả năng kháng của thể liên hợp 45b với hai loại thuốc kháng virut cúm chiếm ưu thế về mặt thương mại, oseltamivir và baloxivir. Thể liên hợp 45b có profil kháng vượt trội so với cả hai chất so sánh và đã chứng minh cho thấy không có sự giảm hoạt tính kháng virut trong 10 lần cấy chuyển trong thí nghiệm. Hoạt tính kháng virut của baloxivir và oseltamivir đã giảm so với hoạt tính của các nhóm đối chứng không dùng thuốc sau 6 và 8 lần cấy chuyển, tương ứng. Việc giải trình tự các bộ gen virut từ các mảng bám virut kháng thuốc trong các lần cấy chuyển oseltamivir sau này cho thấy rằng tính kháng thuốc được truyền qua đột biến vị trí hoạt tính NA (E119K) đã được quan sát về mặt lâm sàng (REF).

Sự tham gia của tế bào miễn dịch bởi thể liên hợp 45b

Miền IgG1 Fc của người được chọn lọc làm chất mang protein đối với thể liên hợp 45b, vì nó là isotyp kháng thể IgG của người hoạt hóa mạnh nhất với thời gian bán hủy lưu thông dài nhất. Mặc dù sử dụng chiến lược liên hợp lysin không đồng nhất với thể liên hợp 45b, các tác giả sáng chế đã quan sát sự gắn kết thụ thể Fcγ tương tự với

tất cả các thụ thể Fcγ của người và chuột được thử nghiệm với thể liên hợp 45b so với mẫu đối chứng Fc không liên hợp và IgG1 của người (các FIG. 111A-111H). Trong các thử nghiệm chức năng, thể liên hợp 45b gây cảm ứng độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) mạnh ở MOI- (FIG. 111I) và sự phụ thuộc vào liều lượng với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) đã lây nhiễm các tế bào MDCK SIat1 (FIG. 111J). Do đó, thể liên hợp 45b có thể gắn kết với các thụ thể Fcγ và tham gia chức năng tế bào miễn dịch.

Thể liên hợp 45b có hiệu quả cao trong nhiều mô hình thử thách cúm gây tử vong

Hiệu lực và phổ kháng virut của thể liên hợp 45b quan sát được trong *vitro* được dịch sang hiệu quả trong các mô hình lây nhiễm động vật. Liều đơn dưới da (SC), 0,3 mg/kg hoặc các liều thấp hơn của thể liên hợp 45b bảo vệ hoàn toàn trong các mô hình thử thách chuột gây tử vong với A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, A/WSN/1933 (H1N1), A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09, A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y variant, A/Hong Kong/1/1968 (H3N2), B/Florida/4/2006 (Yamagata) và B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (các FIG. 112A-112H). Việc điều trị với thể liên hợp 45b thường dẫn đến giảm cân mạnh ở mức độ hạn chế, tạm thời sau theo liều dùng bảo vệ tối thiểu (các FIG. 113A-113H). Khi được thử nghiệm với chủng gây đại dịch gia cầm A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) ở chuột, thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ 70% ở 0,3 mg/kg và mức bảo vệ 100% ở 1 mg/kg hoặc cao hơn (FIG. 112I). Oseltamivir ở liều lượng gấp 6 lần liều lượng được làm giống như liều lượng của người ở chuột chỉ có khả năng bảo vệ 90% (FIG. 112I).

Để định lượng tốt hơn hiệu quả của thể liên hợp 45b, và để so sánh đặc tính của nó với oseltamivir, mật độ virut và mức xytokin trong phổi được đo 4 Ngày sau khi lây nhiễm theo mô hình thử thách gây tử vong với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) đã được làm thích nghi với chuột. Trong mô hình này, liều lượng bảo vệ tối thiểu of thể liên hợp 45b là 0,1 mg/kg (SC) (FIG. 112A) và kèm theo sự giảm cân nặng (BW) tạm thời khoảng 5% (FIG. 113A). Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức giảm phụ thuộc vào liều lượng trong tải lượng virut trong phổi (PFU/g trong mô phổi) là 1,06 log ở liều lượng 0,1 mg/kg, 2,12 log ở 0,3 mg/kg và 3,17 log ở 1 mg/kg và 3,63 log ở liều dùng 3 mg/kg như được xác định bằng thử nghiệm mảng bám. Bằng phép so sánh, oseltamivir được dùng liều ở liều dùng tương đương của người (5 mg/kg) (BID x 4

ngày) hoặc ở 10x liều dùng tương đương của người (50 mg/kg) (BID x 4 ngày) cho thấy không có đáp ứng liều lượng, và đã dẫn đến làm giảm nhẹ mức giảm mật độ virut khoảng 0,8 log. Điều thú vị là, hai liều oseltamivir được thử nghiệm dẫn đến kết quả mức sống sót khác nhau. Oseltamivir ở 5 mg/kg hoặc 50 mg/kg được dùng liều trong 5 ngày BID đã dẫn đến mức sống sót 0% hoặc 80%, tương ứng (các FIG. 114A-114B).

Để hiểu được hiệu quả của thể liên hợp 45b trong việc làm giảm đáp ứng miễn dịch có hại có thể dẫn đến tổn thương phổi, mức độ cytokine gây viêm và tổn thương phổi cụ thể được đo ở cùng một thời điểm. Thể liên hợp 45b làm giảm các mức một cách hiệu quả theo cách phụ thuộc vào liều lượng, với tất cả các các mức xytokin với tất cả các được đo đều đạt các mức tương tự như nhóm đối chứng không bị lây nhiễm ở liều 3 mg/kg (các FIG. 112K-112L và các FIG. 115A-115C. Nhìn chung, mức độ giảm xytokin do thể liên hợp 45b gây ra rõ rệt hơn so với mức giảm xytokin được tạo ra khi điều trị bằng liều tương đương ở người của oseltamivir đối với tất cả các xytokin được thử nghiệm và cao hơn đối với KC, MIP-1a, MCP-1 khi so sánh với chuột được điều trị bằng liều tương đương ở người của oseltamivir gấp 10 lần (các FIG. 112K-112L và FIGS. 115A-115C). Các dữ liệu này chứng minh rằng thể liên hợp 45b gây ra sự giảm mạnh, phụ thuộc vào liều lượng tải lượng virut tương quan với sự giảm nồng độ xytokin trong phổi bằng thể liên hợp 45b mà không quạn sát thấy ở oseltamivir.

Tác động của đường dùng liều đến hiệu quả được đánh giá đối với thể liên hợp 45b. Ở mô hình thử thách gây tử vong bằng cách sử dụng chuột với A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, thể liên hợp 45b được bảo vệ hoàn toàn ở liều lượng 0,1 mg/kg theo đường dùng tiêm tĩnh mạch (IV), tiêm bắp (IM) hoặc tiêm dưới da (các FIG. 116A-116B). Khi so sánh mức huyết tương ở chuột sau khi dùng liều IV, IM hoặc SC, mức thể liên hợp 45b trong huyết tương là tương đương sau 24 giờ như được xác định bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Lưu ý là, hai phương pháp bắt giữ ELISA khác nhau được sử dụng để đo mức thể liên hợp 45b trong huyết tương – một phương pháp sử dụng kháng thể bắt giữ kháng Fc của người để đo mức Fc, và một phương pháp sử dụng NA virut để bắt giữ nhằm phát hiện thể liên hợp nguyên vẹn (các FIG. 116C-116D). Mức thể liên hợp 45b trong huyết tương được đo bằng cả hai phương pháp giống hệt nhau trong phạm vi sai số thí nghiệm, chứng minh rằng thể liên hợp 45b là thích hợp làm thể liên hợp nguyên vẹn *in vivo*.

Thể liên hợp 45b có hiệu quả cao ở những vật chủ bị suy giảm miễn dịch

Các nhóm nguy cơ cao đối với các trường hợp lây nhiễm nặng do cúm và các biến chứng do lây nhiễm cúm bao gồm người cao tuổi và người suy giảm miễn dịch. Để xác định hiệu quả của thể liên hợp 45b trong bối cảnh suy giảm miễn dịch, các tác giả sáng chế đã xác định hiệu quả của thể liên hợp 45b ở chuột bị suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID), thiếu tế bào T và tế bào B trưởng thành và thiếu bổ thể. Thể liên hợp 45b đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ đầy đủ với một liều duy nhất 0,3 mg/kg ở chuột SCID được lây nhiễm với A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (FIG. 112M), là liều bảo vệ tương tự đối với những con chuột có hệ miễn dịch bình thường.

Tổng hợp lại, các kết quả này làm nổi bật tiềm năng của thể liên hợp 45b trong việc cung cấp khả năng bảo vệ với bệnh cúm phổ biến ở những quần thể khỏe mạnh và có nguy cơ cao.

Thể liên hợp 45b chứng minh thời gian tác động kéo dài ở mô hình ngăn ngừa bệnh

Các nghiên cứu về dược động học (PK), hiệu quả phòng ngừa và độc tính tiền lâm sàng làm nổi bật thêm tiềm năng để sử dụng thể liên hợp 45b là một tác nhân bền vững, có tác dụng kéo dài để phòng ngừa cúm nói chung. Chu kỳ bán rã của thể liên hợp 45b được xác định sau khi dùng IV một lần duy nhất ở chuột nhắt và khỉ Cynomolgus và nằm trong khoảng từ 5-10 ngày trong các nghiên cứu PK tuần 1 và 4, tương ứng. Các kết quả này là điển hình cho mAB và được hỗ trợ bởi các đường cong gắn kết tương đương của thể liên hợp 45b, Fc hIgG1 và kháng thể đối chứng isotyp IgG1 của người có chiều dài đầy đủ với FcRn của chuột, khỉ Cynomolgus, và người trong sự phụ thuộc vào độ pH (các FIG. 117A-117C). Thể liên hợp 45b thể hiện PK tuyến tính liều ở chuột trong phạm vi liều dao động từ 1-100 mg/kg (FIG. 118A). Ở mô hình chuột, thể liên hợp 45b thiết lập trạng thái cân bằng nhanh giữa huyết tương và phổi, cho phép khởi phát tác dụng nhanh chóng để chỉ định điều trị và phân phối vào dịch lót biểu mô (ELF) ở mức cao (FIG. 118B). Nồng độ cao của thể liên hợp 45b trong ELF xuất hiện nhanh chóng và được duy trì ở mức khoảng 60% nồng độ huyết tương (FIG. 118B).

Để đánh giá hiệu quả của thể liên hợp 45b trong bối cảnh ngăn ngừa, và xác định mức huyết tương đích cần thiết để bảo vệ trong mô hình thử thách chủng cúm gây

tử vongs, chuột được dùng liều 28 ngày trước khi lây nhiễm. Một liều dùng SC duy nhất là 1 mg/kg mang lại mức bảo vệ đầy đủ với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, A/HK/1/1968 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) và B/Florida/4/2006 (Yamagata) (các FIG. 118C-118F). Mức thể liên hợp 45b trong huyết tương tương ứng cần thiết để bảo vệ, được đo ở thời gian lây nhiễm, là 0,5 µg/mL (8 nM, dữ liệu không được thể hiện). PK đa loài và mức thể liên hợp 45b đích trong huyết tương cần thiết để bảo vệ sẽ được sử dụng để ước tính liều lượng cần thiết cho người để ngăn ngừa lâu dài ở người, và được sử dụng để ước tính biên độ điều trị đối với thể liên hợp 45b trong các nghiên cứu độc chất tiền lâm sàng. Trong nghiên cứu độc tính tìm kiếm phạm vi liều dùng trong hai tuần được tiến hành ở khỉ Cynomolgus không có tác dụng phụ nào được quan sát thấy ở liều cao nhất được thử nghiệm (20 mg/kg). Chỉ số điều trị (TI) dựa trên tỷ lệ phơi nhiễm huyết tương ở khỉ dùng liều 20 mg/kg và chuột dùng liều 1 mg/kg là > 50 (các Bảng 181 và 182). Biên độ an toàn này, kết hợp với việc điều chỉnh kích thước dị hợp kết hợp với hiệu lực cao và tiếp xúc liên tục của thể liên hợp 45b (dữ liệu không được thể hiện), đề xuất rằng một đến hai liều, bảo vệ cho toàn bộ mùa cúm với thể liên hợp 45b có thể đạt được ở người.

Bảng 181: Tỷ lệ liều lượng của thể liên hợp 45b ở chuột

Chất thử nghiệm	Liều dùng [mg/kg]	T_{max} [h]	C_{max} [µg/mL]	AUC [h x µg/mL]
Thể liên hợp 45b	1	4	9,39	436
	3	24	11,4	1520
	10	24	41,3	4280
	30	24	125	14200
	100	4	733	60700

Bảng 182: Tỷ lệ liều lượng của thể liên hợp 45b ở khỉ Cynomolgus

Chất thử nghiệm	Ngày	Liều dùng [mg/kg]	T_{max} [h]	C_{max} [µg/mL]	AUC [h x µg/mL]
Thể liên hợp 45b	1	5	72	26,1	3800
	8	5	8	61	7740
	1	20	72	107	14600
	8	20	24	197	25400

Trong nghiên cứu độc tính học ở khỉ Cynomolgus, sau 2 liều SC hàng tuần ở 5 hoặc 20 mg/kg, không có tác dụng phụ trên BW, hóa học lâm sàng, huyết học, sự đông máu, xytokin, hoặc phân tích nước tiểu được quan sát (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 204. Xác định tỷ lệ thuốc-kháng thể tối ưu (DAR) của thể liên hợp 45a với cúm A (H1N1) ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong.

Biến thể DAR của thể liên hợp 45a được đánh giá trong mô hình lây nhiễm cúm H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 2 nhánh nghiên cứu với tổng cộng 25 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (~2E4 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê nhẹ bằng ketamin/xylazin(lần lượt 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị một lần duy nhất của thể liên hợp 45a, biến thể DAR của thể liên hợp 45a, chỉ có Fc, hoặc tá dược (PBS), 2 giờ sau khi thử thách virut bằng cách tiêm bắp (IM). Các biến thể thể liên hợp 45a được thử nghiệm với DAR trung bình là 0,4, 1,0, 3,3, 4,7, 5,1, hoặc 7,3. Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 14 ngày. Con chuột bất kỳ giảm hơn 20% BW được ghi nhận là tử vong. Phác thảo thí nghiệm cho mỗi nhánh nghiên cứu được tổng kết trong các bảng 183 và 184.

Bảng 183: Thiết kế nghiên cứu nhánh DAR trung bình thấp

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Điều chế hợp chất			N
						Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	---	1	5
2		Fc một mình	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
3		Thể liên hợp 45a	0,4	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
4		Thể liên hợp 45a	0,4	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
5		Thể liên hợp 45a	0,4	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5
6		Thể liên hợp 45a	1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
7		Thể liên hợp 45a	1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
8		Thể liên hợp 45a	1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5
9		Thể liên hợp 45a	3,3	IM, một lần duy	0,3	5	0,06	1	5

51349

827/1174

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Điều chế hợp chất			N
						Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
				nhất, T+2 giờ					
10		Thể liên hợp 45a	3,3	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
11		Thể liên hợp 45a	3,3	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5
12		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
13		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
14		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5

51349

Bảng 184: Thiết kế nghiên cứu nhánh DAR cao

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Điều chế hợp chất			N
						Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	---	1	5
2		Fc một mình	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
3		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
4		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
5		Thể liên hợp 45a	4,7	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5
6		Thể liên hợp 45a	5,1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
7		Thể liên hợp 45a	5,1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
8		Thể liên hợp 45a	5,1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5

51349

829/1174

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Điều chế hợp chất			N
						Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
9		Thể liên hợp 45a	7,3	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
10		Thể liên hợp 45a	7,3	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
11		Thể liên hợp 45a	7,3	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5

51349

830/1174

Trong nhánh nghiên cứu thứ nhất, các biến thể với DAR trung bình là 0,4, 1,0, 3,3, hoặc 4,7 được chạy ở các nồng độ là 0,03, 0,1, và 0,3 mg/kg (dùng IM một lần duy nhất ở T+2h so với thử thách virut). Trong nghiên cứu này, chuột được điều trị bằng tá dược (PBS) đã bị lây nhiễm vào ngày 7, và các con chuột chỉ được điều trị bằng Fc (SEQ ID NO: 72) đạt mức tử vong vào ngày 6 (Bảng 185). Ngược lại, các biến thể thể liên hợp 45a với DAR trung bình là 1,0, 3,3, và 4,7 được bảo vệ hoàn toàn ở nồng độ liều lượng cao nhất (0,3 mg/kg). Chỉ có thể liên hợp có DAR trung bình là 0,4 không cung cấp được sự bảo vệ, với chuột đạt mức tử vong vào ngày 9, chỉ ra nó có DAR trung bình có hiệu lực thấp nhất của các thể liên hợp được thử nghiệm. Ở liều dùng thể liên hợp thấp nhất tiếp theo (0,1 mg/kg) chỉ có chuột được điều trị với thể liên hợp có DAR trung bình là 3,3 hoặc 4,7 được bảo vệ hoàn toàn. Hai thể liên hợp có DAR trung bình thấp hơn (0,4 và 1,0) đạt mức tử vong vào ngày 7 và 9, tương ứng, ở liều lượng này. Trong nhóm liều lượng cuối cùng (0,03 mg/kg) chỉ có biến thể thể liên hợp 45a với DAR trung bình là 4,7 đã chứng minh cho thấy hiệu lực bất kỳ (mức sống sót 80%). Dựa trên dữ liệu mức tử vong một xu hướng rõ ràng đã được chứng minh trong nhánh nghiên cứu này, với DAR trung bình tăng dẫn đến tăng hiệu lực.

Dữ liệu BW đối với các nhóm nghiên cứu nhánh 1 hỗ trợ các xu hướng quan sát được trong dữ liệu mức tử vong (Bảng 186). Ví dụ, ở các nhóm dùng liều lượng 0,3 mg/kg, Các biến thể thể liên hợp 45a với DAR trung bình là 1,0, 3,3, và 4,7 tất cả đều được bảo vệ dựa trên mức tử vong, nhưng các con chuột tiếp nhận biến thể DAR trung bình 1,0 có mức giảm BW lớn hơn so với các cấu trúc DAR trung bình cao hơn. Điều này đã dẫn đến việc mất khả năng bảo vệ bởi biến thể DAR trung bình 1,0 khi liều lượng được hạ xuống còn 0,1 mg/kg. Tương tự, ở liều lượng 0,1 mg/kg các con chuột tiếp nhận biến thể DAR trung bình 3,3 được bảo vệ khỏi thử thách gây tử vong dựa trên mức tử vong, nhưng có mức giảm BW lớn hơn so với các con chuột được điều trị bằng biến thể DAR trung bình 4,7. Theo cả hai kết quả nghiên cứu (tỷ lệ tử vong và BW), hiệu lực cao hơn được ghi nhận khi DAR trung bình tăng.

Bảng 185: Dữ liệu mức tử vong (% mức sống sót) đối với nhánh 1.

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc một mình	DAR trung bình											
			0,4			1,0			3,3			4,7		
		(0,3 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	40	0	100	60	80	100	100	80	100	100	100	100	100	100
7	0		40	0	0	100	80	0	100	100	80	100	100	100
8			20			100	20		100	100	60	100	100	100
9			0			100	0		100	100	20	100	100	80
10						100			100	100	0	100	100	80
11						100			100	100		100	100	80
12						100			100	100		100	100	80
13						100			100	100		100	100	80
14						100			100	100		100	100	80

51349

Bảng 186: Dữ liệu BW đối với nhánh 1. BW trung bình của nhóm cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm.

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc một mình	DAR trung bình											
			0,4			1,0			3,3			4,7		
		(0,3 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96,9	98,8	98,2	97,9	97,7	98	97,6	97,9	97	97,1	99,9	97,7	97,8	99,8
2	100	101,9	101,2	100,3	99,8	99,9	99,6	100,9	101,8	99,2	102,9	102,4	100,9	100,7
3	93,1	93,4	96,8	95	98,3	96,3	96,6	94,3	100,1	97,7	98,1	101,3	98,2	99,4
4	83,6	83,3	89	84,7	88,1	91,6	88,8	86,3	99,7	93,9	92	100,9	95	97,2
5	79,9	80	86,3	81,8	84,2	95,6	89,1	82,9	101,1	96,3	91,8	100,4	97,4	98,9
6			81,8	76,9	77,5	95,7	84,5	77,4	102,3	96,6	88,8	103,5	99,9	97,5
7			76,8			91,4	78,9		103,6	92,3	82,4	105	100,8	91,3
8						95,7			104,5	92,9		103,9	101,3	85,3
9						97,2			104,2	96,4		103,9	103,4	83,9
10						98,5			105	98,2		107,8	104,3	
11						98,2			104,7	99,8		106,8	103,5	
12						98,9			105,1	102,9		108,7	104,5	
13						99,7			107,2	104,3		110,5	106,1	
14						99,9			105,8	103,6		109	104,7	

51349

Trong nhánh 2 của nghiên cứu, Các biến thể thể liên hợp 45a với DAR trung bình là 4,7, 5,1, và 7,3 được đánh giá ở cùng mức liều dùng như nhánh 1 (0,3, 0,1, và 0,03 mg/kg). Ngược lại với kết quả quan sát được trong nhóm 1, tăng DAR trung bình trên 4,7 không làm tăng hiệu lực của thể liên hợp 45a. Tất cả ba biến DAR có thể có hiệu lực xấp xỉ bằng nhau dựa trên mức tử vong và BW (các Bảng 187 và 188, tương ứng). Chỉ có sự khác biệt nhỏ quan sát được trong các cấu trúc DAR cao hơn này nằm trong phạm vi sai số thí nghiệm bình thường quan sát được trong các mô hình hiệu quả (lưu ý thời gian chết nhanh hơn một chút đối với các con chuột được điều trị bằng tá dược Trong nhánh 2). Điểm sau bao gồm quan sát rằng thể liên hợp có DAR trung bình 4,7 có tác dụng bảo vệ ở nhánh thứ nhất ở 0,03 mg/kg, chứ không phải ở nhánh 2. Nhìn chung, kết quả của cả hai nhánh nghiên cứu đều cho thấy sự gia tăng rõ rệt về hiệu lực lên đến DAR trung bình là 4,7, nhưng sau đó sự gia tăng tiếp theo trong DAR trung bình không chuyển thành hiệu lực lớn hơn. Do đó, DAR trung bình là 4,7 là DAR trung bình tối thiểu đạt được hiệu lực tối đa của thể liên hợp 45a.

Bảng 187: Dữ liệu mức tử vong (% mức sống sót) đối với nhánh 2

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc một mình	DAR trung bình								
			4,7			5,1			7,3		
		(0,3 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7		0	100	100	60	100	100	80	100	100	100
8			100	100	60	100	100	40	100	100	80
9			100	100	40	100	100	20	100	100	40
10			100	100	0	100	80	0	100	100	0
11			100	100		100	80		100	100	
12			100	100		100	80		100	100	
13			100	100		100	80		100	100	
14			100	100		100	80		100	100	

51349

Bảng 188: Dữ liệu BW đối với nhánh 2: BW trung bình của nhóm cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc một mình	DAR trung bình								
			4,7			5,1			7,3		
		(0,3 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,5	98,4	98,4	98,3	98,2	98,1	98,5	98,6	99,4	96,5	99,4
2	98,7	100,3	99,9	100,5	99,3	97,7	98,5	101,3	100,2	102	99,1
3	93,7	95,8	99,8	100,7	99,3	101,1	99,7	100,8	100,7	100,9	100,3
4	81	84,9	99,6	99	93,2	98	95,4	93,5	100,1	99,9	97,4
5	77,7	81,2	100	98,8	91,5	98,5	97,1	91	96,7	99,7	93,7
6		76,9	100	98,9	86	99,9	95,6	85,9	100,3	99,2	88,6
7			102,5	100,5	81,6	102	88,8	82,9	103,4	97,8	85,3
8			102,8	100,8		103,3	87,8		103,5	98,8	
9			101,9	103,3		104,9	89,4		104,5	102,3	
10			103,6	105,4		105,6	95,3		106,4	105	
11			103,4	104		105,1			106,2	103,9	
12			104	104		104,5			105,4	104,2	
13			103,8	104		105,1			104,9	103,1	
14			102,3	102,5		102,8			103,1	103,1	

51349

Ví dụ 205. Xác định thể liên hợp 45a hiệu lực với chủng cúm A gây đại dịch (A/California/12/2012; H1N1) ở mô hình chuột gây tử vong.

Thể liên hợp 45a được đánh giá trong a mô hình lây nhiễm cúm H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/CA/12/2012) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, với 5 con chuột mỗi nhóm. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (3E4 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê nhẹ bằng ketamin/xylazin(lần lượt 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị một lần duy nhất của thể liên hợp 45a, Fc hIgG1, hoặc tá dược (PBS), 2 giờ sau khi thử thách virut bằng cách tiêm bắp (IM) (sườn bên phải). Thể liên hợp 45a được thử nghiệm ở các nồng độ of 3, 1, 0,3, 0,1, và 0,03 mg/kg. Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 21 ngày. Con chuột bất kỳ giảm hơn 20% BW được ghi nhận là tử vong. Phác thảo thí nghiệm được tổng kết trong Bảng 189.

Bảng 189: Phác thảo nghiên cứu

Nhóm	Chất thử nghiệm	Đường dùng/ Phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	N (balb/c)
1	PBS	IM, T+2 giờ	---	5	---	1	5
2	Fc một mình	IM, T+2 giờ	3	5	0,6	1	5
3	Thể liên hợp 45a	IM, T+2 giờ	3	5	0,6	1	5
4		IM, T+2 giờ	1	5	0,2	1	5
5		IM, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
6		IM, T+2 giờ	0,1	5	0,02	1	5
7		IM, T+2 giờ	0,03	5	0,006	1	5

Trong nghiên cứu này, việc dùng một lần duy nhất bằng tiêm bắp thể liên hợp 45a đã bảo vệ hoàn toàn chuột khỏi thử thách gây tử vong bởi thể phân lập cúm mùa gây đại dịch (H1N1) ở 0,3, 1, và 3 mg/kg (Bảng 190). Ngoài ra, mức bảo vệ một phần quan sát được (so với tá dược) trong các nhóm dùng hai liều lượng thấp nhất (0,1 và 0,03 mg/kg) với mức sống sót 60 và 20%, tương ứng. Ngược lại, các con chuột được điều trị bằng tá dược đã bị lây nhiễm vào ngày 8, trong khi chỉ có các con chuột được

điều trị bằng Fc hIgG1 đạt mức tử vong 80%. Hiệu lực của thể liên hợp 45a cũng được hỗ trợ bởi dữ liệu BW. Chuột được điều trị bằng các liều lượng có tác dụng bảo vệ hoàn toàn (3, 1, và 0,3 mg/kg) hiển thị mức giảm BW tạm thời quanh ngày 3-5, trước khi phục hồi đều đặn BW cho đến cuối nghiên cứu (Ngày 21) (Bảng 191). Nhìn chung, nghiên cứu này đã chứng minh cho thấy hiệu lực của thể liên hợp 45a, bằng cả các kết quả mức tử vong và BW, với thể phân lập cúm gây đại dịch quan trọng.

Bảng 190: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc hIgG1 (3 mpk)	Thể liên hợp 45a (3 mpk)	(1 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	40	60	100	100	100	60	20
6	20	20	100	100	100	60	20
7	20	20	100	100	100	60	20
8	0	20	100	100	100	60	20
9		20	100	100	100	60	20
10		20	100	100	100	60	20
11		20	100	100	100	60	20
12		20	100	100	100	60	20
13		20	100	100	100	60	20
14		20	100	100	100	60	20
15		20	100	100	100	60	20
16		20	100	100	100	60	20

51349

839/1174

17		20	100	100	100	60	20
18		20	100	100	100	60	20
19		20	100	100	100	60	20
20		20	100	100	100	60	20
21		20	100	100	100	60	20

51349

840/1174

Bảng 191: Mức giảm cân nặng trung bình (%), cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Fc hIgG1 (3 mpk)	Thể liên hợp 45a				
			(3 mpk)	(1 mpk)	(0,3 mpk)	(0,1 mpk)	(0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	97,8	99	96,8	97,9	97,1	99,8	98,4
2	91,6	92	96	93,8	91,8	90,8	91
3	84,5	86,9	93,5	92,2	87,1	84,7	84,3
4	80,4	82,5	95,8	92,3	88,1	80,1	80,3
5	76,5	77,6	95,2	90,6	86,9	78,2	76,6
6			98,2	94,5	89,7		
7			97,7	92,8	89,9		
8			98,6	94,1	91,4		
9			98,3	96,8	92,7		
10			99,7	98,2	95		
11			102,8	100,3	98,7		
12			99,6	99	96,2		
13			101,4	101,8	97,5		
14			101,5	100,8	96,4		
15			100,8	99,1	96,6		
16			100,4	101,4	97,7		

51349

17			102,7	103,9	100,1		
18			102,4	102,5	98,6		
19			103,9	103,9	100,9		
20			104,6	104,1	100,3		
21			104	103,9	99,5		

51349

842/1174

Ví dụ 206. Hiệu quả của thể liên hợp 45b kết hợp với baloxavir với cúm A (H1N1) ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong

Thể liên hợp 45b được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/California/07/2009) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 11 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (~3E4 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê nhẹ bằng ketamin/xylazin (lần lượt 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị với tá dược, thể liên hợp 45b, baloxavir marboxil (DC Chemicals, mã số DC11056; được tạo huyền phù trong metyl xenluloza 0,5%), hoặc dạng kết hợp (2 giờ sau khi thử thách). Baloxavir được dùng liều qua đường miệng (PO), hai lần mỗi ngày trong 3 ngày và thể liên hợp 45b được tiêm dưới da (SC) dưới dạng một liều dùng duy nhất (Bảng 192). Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 14 ngày. Con chuột bất kỳ giảm hơn 20% BW được ghi nhận là tử vong.

Bảng 192: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ)	Liều dùng (mg/kg)	N
1	A/CA/07/09 (H1N1) 3E4 PFU/chuột nhắt qua đường dùng IN	Tá dược (PBS)	SC, một lần duy nhất	---	5
2		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,01	5
3		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,03	5
4		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,1	5
5		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,3	5
6		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	1	5

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ)	Liều dùng (mg/kg)	N
7		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
8		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	10	5
9		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,01	5
10		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,03	5
11		Baloxavir	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
		Thể liên hợp 45b	SC, một lần duy nhất	0,1	5

Để xác định hiệu lực của thể liên hợp 45b và baloxavir riêng biệt phạm vi liều lượng được xác định đối với mỗi phân tử. Đối với các liều lượng thể liên hợp 45b là 0,1 và 0,3 mg/kg có tác dụng bảo vệ trong khi 0,01 và 0,03 không dựa trên mức sống sót (Bảng 193). Đối với các liều lượng baloxavir là 1 và 3 mg/kg có thể trì hoãn, nhưng không ngăn chặn được sự chết vào ngày 14. Ngược lại, liều lượng baloxavir 10 mg/kg có tác dụng bảo vệ 80%.

Đối với các nghiên cứu kết hợp, liều lượng baloxavir trung bình (3 mg/kg) được dùng liều kết hợp với thể liên hợp 45b ở 0,01, 0,03, và 0,1 mg/kg (các nhóm 9-11). Như được thể hiện trong Bảng 193, thể liên hợp 45b ở 0,03 mg/kg hoặc baloxavir ở liều dùng 3 mg/kg đều không có tác dụng bảo vệ riêng lẻ. Tuy nhiên, điều đáng chú ý là khi kết hợp, chúng đã chứng minh cho thấy mức bảo vệ 80% trong suốt thời gian nghiên cứu (nhóm 10).

Bảng 193: % mức sống sót

Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg) (SC, một lần duy nhất)				Baloxavir (mg/kg) (PO, hai lần mỗi ngày x3 ngày)			Thể liên hợp 45b / Baloxavir Combo (mg/kg)		
		0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	0,01 / 3	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	60	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	20	40	100	100	100	100	100	100	100	100
7	0	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	0	0	100	100	100	80	100	100	100	100
9	0	0	0	100	100	40	0	100	0	80	100
10	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
11	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
12	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
13	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
14	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100

51349

Dữ liệu cân nặng minh họa thêm hoạt tính tăng cường của hai phân tử được dùng kết hợp (Bảng 194). Khi được dùng liều ở 0,1 / 3 mg/kg (Thể liên hợp 45b / baloxavir) đã quan sát được mức giảm đáng kể trong giảm BW. Thể liên hợp 45b được dùng liều ở liều lượng 0,1 mg/kg riêng lẻ có tác dụng bảo vệ nhưng các con chuột cho thấy cân nặng giảm 18,8% vào ngày 4. Tuy nhiên, liều lượng này được dùng cùng với liều lượng baloxavir không có tác dụng bảo vệ (3 mg/kg) làm giảm mức giảm BW tối đa xuống còn 4,5% (nhóm 11).

Bảng 194: % cân nặng

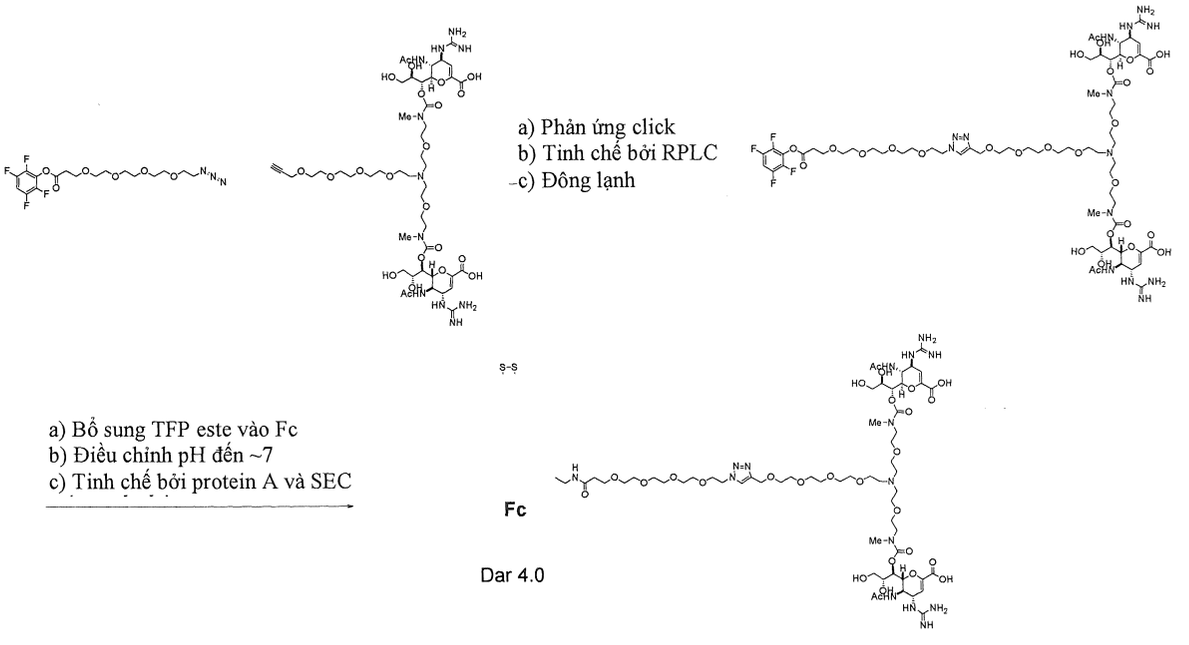
Ngày	Tá dược	Thể liên hợp 45b (mg/kg) (SC, một lần duy nhất)				Baloxavir (mg/kg) (PO, hai lần mỗi ngày x3 ngày)			Tổ hợp thể liên hợp 45b / Baloxavir (mg/kg)		
		0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	0,01 / 3	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96,9	97,9	97	97,7	99,8	99,2	97,1	95,9	97,5	96,7	96,8
2	94,3	96,8	95,2	97,3	99,3	99,8	99	101,8	98,9	95,4	98
3	85,4	86,3	85,5	85,5	88,4	90,3	92,1	97,4	94	93,2	95,5
4	78,9	79,8	79,8	81,2	86	90,5	92,5	98	94,2	92,7	95,5
5	77,2	78,7	79,3	81,6	95,3	94,6	97,3	100,8	99,1	96,9	100
6				83,9	98,6	91,1	89,9	98,9	93,3	94,3	99,2
7				85,8	99,1	84,6	83,3	91,1	85,6	87,8	100,4
8				87,9	99,6	79,5	77,9	86,9	79,4	83,9	99,8
9				90	99,1	75,7		86,4	74,8	85,2	102,4
10				89,2	99,9			88,2			100,4
11				92,8	99,9						101
12				97,7	100,8						100,9
13				98,7	101,8						100,3
14				101	101,4						102,1

51349

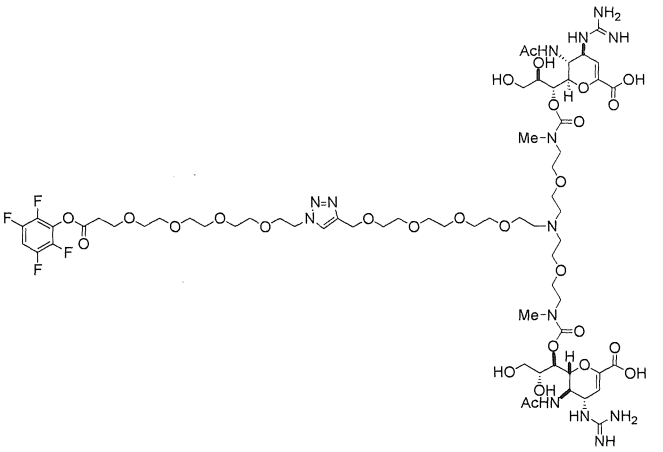
847/1174

Trong nghiên cứu quan trọng này, hai nhóm khác nhau đã chứng minh được hiệu lực tăng cường của thể liên hợp 45b khi dùng đồng thời baloxavir. Ngoài ra, không thể bỏ qua quan sát quan trọng là hai hợp chất này không ức chế hoạt tính của nhau. Quan sát này cho thấy điều ngược lại là đúng, và sự kết hợp này hiệu quả hơn là lợi ích có thể chuyển thành lâm sàng.

Ví dụ 207. Phương pháp tổng hợp thay thế thể liên hợp 45a

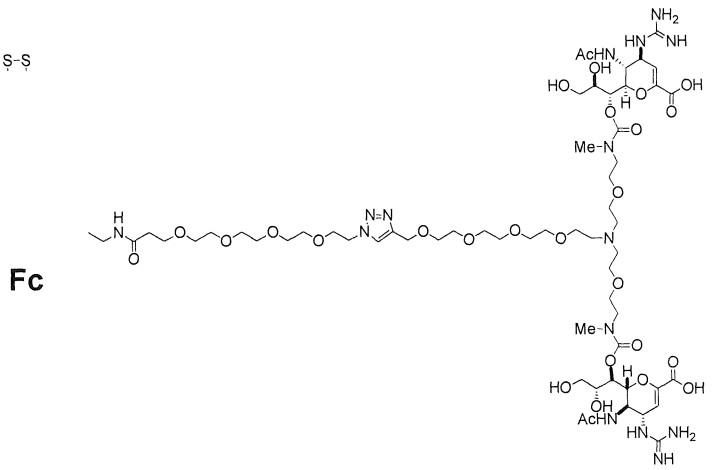


Bước a.



Dung dịch chứa este azido-PEG4-TFP (0,1g, 0,067 mmol) và dime được chức hóa alkyn (0,0383 g, 0,0871 mmol) trong DMF (2,0 mL), được điều trị bằng dung dịch chứa đồng(II)sulfat (0,0027g, 0,0168 mmol), natri ascorbat (0,0133g, 0,067 mmol), và THPTA (0,0116g, 0,027 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, trong nước (1,5 mL). Phản ứng sau đó được sục chân không bằng nitơ 3 lần và được khuấy trong điều kiện khí quyển nitơ. LCMS sau 30 phút cho thấy tiêu thụ hoàn toàn nguyên liệu ban đầu. Phản ứng được axit hóa bằng 400 uL axit axetic, và sau đó được tinh chế trực tiếp bằng sắc ký pha đảo rửa giải với građien của axetonitril 5% đến 100%/nước với TFA 0,1%. Sản phẩm chứa các phân đoạn được kết hợp, được đông lạnh, và đông khô qua đêm. Hiệu suất muối ba TFA là 69%. (Các) ion được phát hiện bởi LCMS: $(M+2H)^{+2}$ = 795,4, $(M+3H)^{+3}$ = 530,8, $(M+4H)^{+4}$ = 398,4.

Bước b.



Dung dịch chứa Fc (0,100g trong 5,2 mL, 1,717 umol, MW =58,218, SEQ ID NO: 72) trong dung dịch đệm PBS pH=7,4 được xử lý bằng este TFP rắn (0,0273 g, 17,17 umol) từ bước trước đó. Độ pH được điều chỉnh đến ~7,0 bằng dung dịch đệm borat (120 uL, 1M, pH 8,5) sau đó được rung nhẹ ở nhiệt độ trong phòng. Maldi TOF sau 1,5 giờ cho thấy DAR trung bình là 3,3, mà không thay đổi khi khuấy thêm. Sau 24 giờ este TFP bổ sung (0,0073 g, 4,6 umol) được bổ sung và tiếp tục rung thêm trong 3 giờ. Thể liên hợp thô là Protein A tinh chế và SEC theo các phương pháp tinh chế chung. Tổng hiệu suất sau Protein A là ~83%, và sau SEC ~77%. Maldi TOF của thể liên hợp tinh chế cho thấy khối lượng trung bình là 63,574, tương đương với DAR trung bình of 4,0.

Phương pháp tổng hợp thay thế được mô tả trong Ví dụ 207 có lợi thế là tránh tiếp xúc Fc với đồng+2 và natri ascorbat, dẫn đến thể liên hợp thô sạch hơn, độ tinh khiết 98,9% bằng SEC phân tích sau khi tinh chế riêng protein A. Ở mức tinh khiết này, có thể loại bỏ được quá trình tinh chế SEC, rất tốn thời gian và chi phí. Những nỗ lực ban đầu với este azido-PEG4-NHS chỉ thành công một phần vì este NHS quá phản ứng để tinh chế, và hỗn hợp phản ứng click thô phải được trộn với Fc, do đó cần phải loại bỏ đồng và loại bỏ kết tập có trọng lượng phân tử cao (do tiếp xúc với natri ascorbat). Ngoài ra, cách tiếp cận này không tạo ra DAR lớn hơn 2. Những nỗ lực tiếp theo sử dụng este có hoạt tính phản ứng ít hơn (TFP tetrafluorophenol) đủ ổn định để chịu được quá trình tinh chế pha đảo và đông khô, cho phép phản ứng click với este azido TFP được thực hiện riêng biệt với Fc, tinh chế, và sau đó trộn với Fc. Trong Ví dụ 207, DAR trung bình đạt được là 4,0 và có thể đạt được DAR cao hơn bằng cách bổ sung nhiều este TFP hơn.

Cấu trúc axit nucleic mã hóa Fc đối với thể liên hợp 45a bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63, bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C. Khi biểu hiện, lysin đầu tận cùng C của Fc của thể liên hợp 45a được phân cắt bằng protein, dẫn đến thu được Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72. Sự có mặt hoặc không có mặt của lysin đầu tận cùng C không làm thay đổi đặc tính của Fc hoặc thể liên hợp tương ứng.

Ví dụ 208. Hiệu quả của thể liên hợp 45a kết hợp với baloxavir với cúm A (H1N1) ở mô hình cúm chuột nhắt gây tử vong (nghiên cứu xác nhận)

Thể liên hợp 45a được đánh giá kết hợp với baloxavir marboxil (BXM) với sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Đây là phần tiếp theo của Ví dụ 206 mà được thử nghiệm cùng sự kết hợp trong thí nghiệm ban đầu, nhưng đã sử dụng đường dùng liều dưới da đối với thể liên hợp 45a thay vì tiêm bắp (IM), mà được sử dụng trong nghiên cứu hiện tại. Virut thử thách (A/California/07/2009) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 8 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (3E4 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê nhẹ bằng ketamin/xylazin(lần lượt 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị với tá dược, chỉ có Fc hIgG1, thể liên hợp 45a, BXM (DC Chemicals, mã số DC11056; được tạo huyền phù trong metyl xenluloza 0,5%), hoặc dạng kết hợp (2 giờ sau khi thử thách). BXM được dùng liều qua đường miệng (PO), hai lần mỗi ngày trong 3 ngày và thể liên hợp 45a được dùng bằng cách tiêm bắp dưới dạng một liều dùng duy nhất (Bảng 195). Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 21 ngày. Con chuột bất kỳ giảm hơn 20% BW vào 2 ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong.

Bảng 195: Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu kết hợp thể liên hợp 45a và BXM

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ)	Liều lượng (mg/kg)	N
1	A/CA/07/09 (H1N1) 3E4 PFU/chuột nhắt qua đường dùng IN	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất	---	5
2		Fc hIgG1	IM, một lần duy nhất	0,1	5
3		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất	0,03	5
4		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất	0,1	5
5		BXM	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+2 giờ)	Liều lượng (mg/kg)	N
6		BXM	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	10	5
7		BXM	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất	0,03	5
8		BXM	PO, hai lần mỗi ngày x 3 ngày	3	5
		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất	0,1	5

Để xác định hiệu lực của thể liên hợp 45a và BXM riêng biệt khoảng liều lượng được xác định đối với mỗi phân tử. Đối với thể liên hợp 45a a dose là 0,1 mg/kg có tác dụng bảo vệ, trong khi liều lượng 0,03 mg/kg không dựa trên mức sống sót (Bảng 196). Đối với BXM, nhóm tiếp nhận 10 mg/kg (bid x 3 ngày) được bảo vệ, trong khi các nhóm tiếp nhận 3 mg/kg với cùng phác đồ liều lượng thì không có tác dụng bảo. Các nhóm được dùng tá dược hoặc chỉ có Fc hIgG1 không được bảo vệ. Sự kết hợp của thể liên hợp 45a (0,1 mg/kg) with BXM (3 mg/kg) cũng đã bảo vệ hoàn toàn như mong đợi dựa trên các kết quả nêu trên.

Các con chuột trong nhóm 7 được dùng kết hợp cả thể liên hợp 45a (0,03 mg/kg) và BXM (3 mg/kg) ở mức dưới hiệu quả. Mặc dù không có chất thử nghiệm nào có tác dụng bảo vệ đáng kể khi dùng riêng lẻ, nhưng khi dùng kết hợp, chúng có tác dụng bảo vệ hoàn toàn (Bảng 196). Các con chuột trong nhóm 7 cũng chỉ bị giảm BW tạm thời, không vượt quá 5,2% (Ngày 3) (Bảng 197). Đến cuối nghiên cứu, nhóm này đã vượt quá BW ban đầu, đạt 106,3% BW ban đầu vào ngày 21. Ngoài việc không biểu hiện tác dụng đối kháng bất kỳ giữa thể liên hợp 45a và BXM, người ta còn phát hiện ra điều ngược lại, cho thấy lợi ích bổ sung của việc điều trị đồng thời bằng hai liệu pháp này.

Bảng 196: % mức sống sót đối với các nhóm nghiên cứu

	Các nhóm đối chứng		Thể liên hợp 45a (mg/kg) (IM, một lần duy nhất)		Baloxavir (mg/kg) (PO, hai lần mỗi ngày x3 ngày)		Sự kết hợp thể liên hợp 45a/Baloxavir (mg/kg)	
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (0,1 mg/kg)	0,03	0,1	3	10	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	80	100	100	100	100	100
5	80	60	60	100	100	100	100	100
6	80	20	20	100	100	100	100	100
7	60	0	20	100	100	100	100	100
8	0		20	100	60	100	100	100
9			20	100	0	100	100	100
10			20	100		100	100	100
11			20	100		100	100	100
12			20	100		100	100	100
13			20	100		100	100	100

51349

853/1174

14			20	100		100	100	100
15			20	100		100	100	100
16			20	100		100	100	100
17			20	100		100	100	100
18			20	100		100	100	100
19			20	100		100	100	100
20			20	100		100	100	100
21			20	100		100	100	100

Bảng 197: Cân nặng trung bình vào ngày (giá trị trung bình trong nhóm; cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm)

	Các nhóm đối chứng		Thể liên hợp 45a (mg/kg) (IM, một lần duy nhất)		Baloxavir (mg/kg) (PO, hai lần mỗi ngày x3 ngày)		Sự kết hợp thể liên hợp 45a/Baloxavir (mg/kg)	
Ngày	Tá dược	Fc hIgG1 (0,1 mg/kg)	0,03	0,1	3	10	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	102,1	100,2	99,9	99,6	97,9	97,9	100,3	100
2	94,9	94,3	93,3	95	90,5	98,7	99,9	99,6
3	85	84,2	83,1	83,7	88,5	94,6	94,8	94,3

51349

4	81,3	79,6	79,7	81,4	90,7	95,8	96,9	96,1
5	82,4	80,1	82,3	88,3	95,3	99,4	100,9	100,4
6				91,1	87,7	96,7	99	99,2
7				91,7	81	89,6	96,8	98,5
8				96,9	76,7	90,9	101,6	101,9
9				95,7		92,6	99,1	99
10				99,4		98,2	101,7	102,3
11				98,6		95,8	98,7	100,3
12				98,4		96,8	100,7	99,9
13				101		99,5	102,9	101,1
14				102,3		99,2	103,7	103,6
15				101,2		97,8	102,1	100,2
16				102,8		99,5	103,1	102,8
17				101,9		98,3	102,7	101,1
18				102,3		97,1	101,7	100,1
19				103,9		98,9	101,6	100,6
20				103,9		98,9	104,5	102,6
21				107		101,2	106,3	103,8

51349

Ví dụ 209. Xác định hiệu lực của thể liên hợp 45a với thành phần của vắc xin quadrivalent nửa cầu Bắc 2020-2021 (A/Hawaii/70/2019pdm; H1N1) trên mô hình chuột gây tử vong.

Thể liên hợp 45a được đánh giá trong mô hình lây nhiễm cúm H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Hawaii/70/2019) là thể phân lập H1N1 gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Nó cũng là một thành phần được khuyến nghị của vắc-xin quadrivalent nửa cầu Bắc 2020-2021.

Thí nghiệm bao gồm 9 nhóm, với 5 con chuột mỗi nhóm. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 2 lần (2E3 virut/chuột nhắt) bằng cách cấy qua đường mũi với thể tích là 30 µl sau khi được gây mê bằng ketamin/xylazin (lần lượt 100 và 10 mg/kg). Các nhóm tiếp nhận việc điều trị một lần duy nhất của thể liên hợp 45a, Fc hIgG1, hoặc tá dược (PBS), 2 giờ sau khi thử thách virut bằng cách tiêm bắp (IM, thể tích liều dùng 5 ml/kg) (sườn bên phải). Thể liên hợp 45a được thử nghiệm ở các nồng độ là 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, và 0,01 mg/kg. Nhóm không bị lây nhiễm cũng bao gồm trong nghiên cứu làm nhóm đối chứng. Mức tử vong và cân nặng (BW) được theo dõi hằng ngày trong 21 ngày. Con chuột bất kỳ duy trì mức giảm 20% BW vào hai ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong. Phác thảo thí nghiệm được tổng kết trong Bảng 198.

Trong nghiên cứu này, việc dùng một lần duy nhất bằng tiêm bắp thể liên hợp 45a đã bảo vệ hoàn toàn chuột khỏi thử thách gây tử vong bởi A/HA/70/2019 (H1N1) ở 0,3, 1, và 3 mg/kg (Bảng 199). Hiệu lực của thể liên hợp 45a ở các mức liều dùng này là đáng kể so với các con chuột được điều trị bằng tá dược (P=0,0031). Các con chuột được điều trị bằng tá dược và Fc hIgG1 ngược lại đạt 100% mức tử vong vào ngày 5. Mức bảo vệ một phần cũng quan sát được trong các nhóm dùng liều lượng 0,1 và 0,03 mg/kg (60 và 20% mức sống sót, tương ứng), nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê so với các con chuột được điều trị bằng tá dược. Nhìn chung, dữ liệu mức sống sót đã chứng minh cho thấy rằng thể liên hợp 45a có tác dụng mạnh với thể phân lập chủng cúm quan trọng này và đáp ứng rõ ràng với liều lượng được thể hiện rõ ở các nhóm dùng liều lượng thấp hơn (Fig. 119).

Hiệu lực của thể liên hợp 45a cũng được hỗ trợ bởi dữ liệu BW. Chuột được điều trị bằng các liều lượng có tác dụng bảo vệ hoàn toàn (3, 1, và 0,3 mg/kg) hiển thị

mức giảm BW tạm thời vào ngày 3 (Mức giảm tối đa là 12% BW ở liều lượng thể liên hợp 45a là 0,3 mg/kg), trước khi phục hồi đều đặn BW cho đến cuối nghiên cứu (Ngày 21) (Bảng 200). Xu hướng BW phản ánh kết quả mức sống sót của nghiên cứu và hỗ trợ hiệu quả của thể liên hợp chống lại thể phân lập của chủng H1N1 này.

Nhìn chung, nghiên cứu này đã chứng minh cho thấy hiệu lực của thể liên hợp 45a, bằng cả các kết quả tỷ lệ tử vong và BW, với thể phân lập của chủng cúm dây đại dịch quan trọng. Do A/HA/70/2019 đã được chọn để đưa vào vắc-xin bán cầu bắc năm 2020 nên nó được coi là thể phân lập có liên quan về mặt lâm sàng và là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng. Hiệu lực của thể liên hợp 45a đối với chủng gây đại dịch này với liều tiêm bắp duy nhất là 0,3 mg/kg hỗ trợ cho sự phát triển liên tục của nó như một liệu pháp chống lại bệnh cúm.

Bảng 198: Phác thảo về hiệu lực của thể liên hợp 45a với nghiên cứu A/HA/70/2019

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	Số con chuột
1	Không bị lây nhiễm	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	5
2	A/HA/70/2019 (H1N1) ~2E3 pfu/ml	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	5
3		Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 72)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	5
4		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	3	5	5
5		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	1	5	5
6		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	5
7		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5	5
8		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5	5
9		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,01	5	5

51349

Bảng 199: % mức sống sót của chuột theo nhóm và ngày

	Các mẫu đối chứng			Thể liên hợp 45a (mg/kg) (IM, một lần duy nhất)					
Ngày	Không bị lây nhiễm	Tá dược	Fc hIgG1 (0,3 mg/kg) (SEQ ID NO: 72)	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	60	60	100	100	100	100	100	80
5	100	0	0	100	100	100	60	20	60
6	100			100	100	100	60	20	60
7	100			100	100	100	60	20	40
8	100			100	100	100	60	20	0
9	100			100	100	100	60	20	
10	100			100	100	100	60	20	
11	100			100	100	100	60	20	
12	100			100	100	100	60	20	
13	100			100	100	100	60	20	
14	100			100	100	100	60	20	
15	100			100	100	100	60	20	
16	100			100	100	100	60	20	
17	100			100	100	100	60	20	

51349

18	100			100	100	100	60	20	
19	100			100	100	100	60	20	
20	100			100	100	100	60	20	
21	100			100	100	100	60	20	

Bảng 200: % cân nặng trung bình theo ngày (giá trị trung bình của nhóm; cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm)

	Các nhóm đối chứng			Thể liên hợp 45a (mg/kg) (IM, một lần duy nhất)					
Ngày	Không bị lây nhiễm	Tá dược	Fc hIgG1 (0,3 mg/kg)	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,8	97,9	97,2	98,6	98,4	98,1	98,5	98,4	99,2
2	103,2	93,9	94,3	100,3	98,9	96,5	96,3	95,9	95,5
3	100,9	84,3	84,8	94,1	92,6	88	85,8	86,2	84,1
4	103,4		78,2	95,1	95,3	88,2	84,1	81,3	81,2
5	103,1			97,5	96,2	91,5	82,7	77	
6	105,5			100,3	99,2	96,3			
7	104,4			99,6	99,1	95,6			
8	105,1			102,2	102,4	100,5			
9	104,7			100,7	100,7	99,9			
10	103,9			101,6	100,9	100,2			
11	106,8			102,3	101,7	100,9			

51349

860/1174

12	108,7			102,8	103,4	101,9			
13	105,7			102,1	102,3	101,5			
14	108,7			102,9	104,7	103,8			
15	110,15			103,1	104	102,8			
16	106,5			100,9	101,5	99,5			
17	105,5			100,7	101	100,3			
18	106,1			100,6	101,6	100,5			
19	107,7			100,9	103	101,5			
20	107,2			99,9	102,5	101,5			
21	107,6			102,5	102,8	104,2			

51349

861/1174

Ví dụ 210. Hiệu quả của thể liên hợp 45a với chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) trong mô hình chuột gây tử vong 4 tuần

Thể liên hợp 45a được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần bằng cách cấy trong mũi (IN) với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Ngoại lệ duy nhất là nhóm 1 gồm chuột không bị lây nhiễm được sử dụng làm nhóm có cân nặng (BW) đối chứng. Mức tử vong và BW được ghi lại hằng ngày trong 28 ngày và con chuột bất kỳ có tổng cân nặng giảm 20% trong 2 ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một lần tiêm bắp duy nhất (IM), 2 giờ sau khi thử thách virut của thể liên hợp 45a (0,01 đến 0,3 mg/kg), chỉ có Fc hIgG1 (0,3 mg/kg, SEQ ID NO: 72), hoặc tá dược (PBS). Các lần tiêm vào cơ đùi của chi sau bên phải ở thể tích liều là 5 ml/kg.

Bảng 201: Phác thảo nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	N
1	Không bị lây nhiễm	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5
2	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5
3		Fc hIgG1	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5
4		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5
5		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5
6		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5
7		Thể liên hợp 45a	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,01	5

Các con chuột chỉ được điều trị bằng tá dược bắt đầu tử vong vào ngày 5, với tỷ lệ tử vong là 100% vào ngày 7. Tương tự, các con chuột chỉ được điều trị bằng Fc hIgG1 (thiếu gốc kháng virut của thể liên hợp) đã tử vong hoàn toàn do lây nhiễm vào ngày 7 (FIG. 120 và Bảng 202). Ngược lại, các nhóm được dùng thể liên hợp 45a ở liều lượng 0,1 và 0,3 mg/kg được bảo vệ hoàn toàn cho đến khi nghiên cứu kết thúc vào ngày 28. So với các con chuột chỉ được điều trị bằng tá dược, sự khác biệt về mức sống sót này có ý nghĩa thống kê (P = 0,0020 cho cả hai nhóm theo thử nghiệm Log-rank (Mantel-Cox)). Tuy nhiên, thể liên hợp 45a được dùng ở mức liều lượng 0,01 và 0,03 mg/kg lại không hiệu quả, với các con chuột tử vong 100% vào ngày 8 và Ngày 7 (FIG. 120 và Bảng 202).

Bảng 202: % mức sống sót của các nhóm nghiên cứu theo ngày

	Các nhóm đối chứng			Thể liên hợp 45a (mg/kg)			
Ngày	Không bị lây nhiễm	Tá dược	Fc hIgG1 (0,3 mg/kg)	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	80	100	100	100	100	100
6	100	20	40	100	100	80	80
7	100	0	0	100	100	0	20
8	100			100	100		0
9	100			100	100		
10	100			100	100		
11	100			100	100		
12	100			100	100		
13	100			100	100		
14	100			100	100		
15	100			100	100		
16	100			100	100		
17	100			100	100		

	Các nhóm đối chứng			Thể liên hợp 45a (mg/kg)			
Ngày	Không bị lây nhiễm	Tá dược	Fc hIgG1 (0,3 mg/kg)	0,3	0,1	0,03	0,01
18	100			100	100		
19	100			100	100		
20	100			100	100		
21	100			100	100		
22	100			100	100		
23	100			100	100		
24	100			100	100		
25	100			100	100		
26	100			100	100		
27	100			100	100		
28	100			100	100		

Ngoài mức sống sót, BW cũng được theo dõi hàng ngày trong suốt quá trình nghiên cứu. Các con chuột không bị lây nhiễm (nhóm 1) tăng dần BW, đạt 108,7% BW ban đầu khi kết thúc nghiên cứu, cho thấy sức khỏe chung của các con chuột thử nghiệm tốt (Bảng 203). Ngược lại, các nhóm đối chứng âm tính (2 và 3) bắt đầu giảm BW vào ngày 1 cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong mỗi nhóm vào ngày 5 và Ngày 6 tương ứng. Sau khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm, các giá trị BW không được ghi lại vì nhóm trở thành quần thể có thành phần không đồng đều.

Các con chuột được điều trị bằng liều dùng thể liên hợp 45a có tác dụng bảo vệ (nhóm 4 và 5) chỉ biểu hiện tình trạng giảm BW tạm thời dưới 5%. Đến cuối nghiên cứu, cả hai nhóm này đều vượt quá BW ban đầu của chúng (lần lượt là 105,9 và 108,7%). Đúng như dự đoán, các con chuột được dùng liều thể liên hợp 45a dưới tác dụng bảo vệ (nhóm 6 và 7) cho thấy tình trạng giảm cân mạnh đều đặn cho đến khi các con chuột này bắt đầu tử vong.

Nhìn chung, dữ liệu này cho thấy hiệu lực của thể liên hợp 45a với thử thách gây tử vong do cúm A (H1N1). Điều đáng kể là khả năng bảo vệ đạt được bằng một lần tiêm bắp duy nhất với liều lượng thấp hơn 1 mg/kg. Cuối cùng, các con chuột được

theo dõi trong 4 tuần đầy đủ sau khi thử thách virut chỉ ra rằng các con chuột được bảo vệ rất có thể đã loại bỏ hoàn toàn sự lây nhiễm.

Bảng 203: % cân nặng trung bình vào ngày (giá trị trung bình của nhóm; cho đến khi xuất hiện ca tử vong đầu tiên trong nhóm)

	Các nhóm đối chứng			Thể liên hợp 45a (mg/kg) (IM, một lần duy nhất)			
Ngày	Không bị lây nhiễm	Tá dược	Fc hIgG1 (0,3 mg/kg)	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100,5	98,1	97,7	96	98,7	98,5	98,2
2	101,3	97,8	98,3	96,5	99	100,4	98,4
3	102	92,1	92,7	97,2	98,3	94,6	94,4
4	103,2	84,3	85,1	97,4	95,3	89,2	87,7
5	106,5		80,8	101,2	102,3	89,1	83,9
6	104,9		74,7	99,7	98,6	81,4	77,9
7	106,8			102,6	101,3		
8	108,3			102,3	102,7		
9	103,6			99,6	101,7		
10	108,4			103,9	105,4		
11	105,1			100,5	102,4		
12	108			103,8	107,1		
13	107,7			102,9	105,1		
14	106,3			102,9	105,3		
15	106,6			103,4	105,9		
16	104,2			101,2	102,9		
17	104,9			101,2	103,9		
18	107			103,9	106,9		
19	107,3			104,3	106,1		
20	105,6			103	105,7		
21	104,7			103	105,6		
22	108,5			106,8	107,8		
23	106,8			103,5	106		

24	106,4			101,4	107,7		
25	106,1			103,2	107		
26	109,3			106,1	109,4		
27	108			105,1	107,8		
28	108,7			105,9	108,7		

Ví dụ 211. Hiệu quả của thể liên hợp 45a và oseltamivir với cúm H1N1 A/CA/12/2012 và A/PR/8/1934 ở mô hình chuột gây tử vong.

Thể liên hợp 45a và oseltamivir đã được đánh giá về thử thách gây tử vong bởi hai nhóm phụ cúm H1N1 (A/PR/8/34 và A/CA12/12) ở chuột BALB/c cái (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột được chia thành hai nhánh thí nghiệm (Bảng 204). Vào thời điểm T+2 giờ, chuột được tiêm bắp (IM) thể liên hợp 45a với liều lượng 0,3 mg/kg một lần duy nhất. Cũng vào thời điểm T+2 giờ, chuột được dùng qua đường miệng oseltamivir với liều lượng 5 hoặc 50 mg/kg, hai lần mỗi ngày trong 5 ngày. Chuột đối chứng được tiêm IM chỉ bằng dung môi (PBS) hoặc Fc hIgG1. Hai giờ trước khi dùng hợp chất, chuột được thử thách qua đường mũi với liều LD95 gấp 3 lần A/PR/8/34 (3E2 pfu) hoặc A/CA/12/12 (3E4 pfu). Đối với thử thách virut, chuột được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg) và virut được đưa vào cơ thể với thể tích 30 µl. Tỷ lệ tử vong và cân nặng (BW) được ghi lại hàng ngày trong 14 ngày và con chuột bất kỳ giảm 20% BW đều được ghi nhận là tử vong.

Chuột thử thách với A/PR/8/34 chỉ được điều trị bằng tá dược hoặc Fc (SEQ ID NO: 72) đã tử vong vì lây nhiễm vào ngày thứ 7, trong khi các con chuột được dùng thể liên hợp 45a với liều lượng 0,3 mg/kg được bảo vệ hoàn toàn (Bảng 205). Đối với các con chuột được điều trị bằng oseltamivir, liều lượng 50 mg/kg có tác dụng bảo vệ 80% trong khi liều 5 mg/kg chỉ trì hoãn tử vong cho đến ngày thứ 10. Các con chuột đối chứng Against A/CA/12/12 bằng tá dược và Fc đạt tỷ lệ tử vong 100% vào ngày thứ 6 và một lần nữa, liều dùng 0,3 mg/kg thể liên hợp 45a có tác dụng bảo vệ hoàn toàn. Ngược lại, oseltamivir không có tác dụng bảo vệ ở liều 5 mg/kg và thậm chí nhóm liều 50 mg/kg cũng chỉ có 40% mức sống sót. Dữ liệu BW cho cả hai nhóm nghiên cứu đều hỗ trợ các phát hiện về mức tử vong (Bảng 205-208).

Nhìn chung, dữ liệu này chứng minh hoạt tính vượt trội của liều lượng thể liên hợp 0,3 mg/kg duy nhất vượt trội hơn so với oseltamivir, ngay cả khi liều dùng sau là 5 hoặc 50 mg/kg hai lần mỗi ngày trong 5 ngày.

Bảng 204: Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	Điều chế hợp chất			N
						Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	---	1	5
2		Chỉ có Fc	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
3		Thể liên hợp 45a	4,6	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
4		Oseltamivir	---	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	5	10	0,5	14	5
5		Oseltamivir	---	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	50	10	5	14	5
Nhánh II									
6	A/CA/12/12 (H1N1) 3E4 PFU/chuột	Tá dược (PBS)	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5	---	1	5
7		Chỉ có Fc	---	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5	0,06	1	5
8		Thể liên hợp	4,6	IM, một lần duy	0,3	5	0,06	1	5

51349

	nhắt	45a		nhất, T+2 giờ					
9		Oseltamivir	---	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	5	10	0,5	14	5
10		Oseltamivir	---	PO, hai lần mỗi ngày x 5 ngày	50	10	5	14	5

51349

Bảng 205: % mức sống sót của A/PR/8/34

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Oseltamivir (5 mpk)	Oseltamivir (50 mpk)
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
6	0	60	100	100	100
7		0	100	100	100
8			100	60	100
9			100	40	100
10			100	0	80
11			100		80
12			100		80
13			100		80
14			100		80

Bảng 206: % mức sống sót của chuột được thử thách A/CA/12/2012.

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Oseltamivir (5 mpk)	Oseltamivir (50 mpk)
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	80	100	100	100	100
5	0	20	100	20	40
6		0	100	20	40
7			100	20	40
8			100	0	40
9			100		40
10			100		40
11			100		40
12			100		40
13			100		40
14			100		40

Bảng 207: % BW trung bình của chuột được thử thách A/PR/8/34, cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Oseltamivir (5 mpk)	Oseltamivir (50 mpk)
0	100	100	100	100	100
1	98,9	100,2	99,6	98,5	98,6
2	102	104,2	102,5	100,7	99,2
3	94,7	97,1	100,6	99,4	100,3
4	85,8	88,8	100,9	93,5	97,9
5	78,9	81,5	99	88,5	90,5
6	74,9	77,6	102	90	96
7			104	84,5	89,7
8			103,9	79,4	84,2
9			104,6		86,3
10			105,4		90,3
11			103,4		
12			103,9		
13			104,3		
14			106,3		

Bảng 208: % BW trung bình của chuột được thử thách A/CA/12/2012, cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Oseltamivir (5 mpk)	Oseltamivir (50 mpk)
0	100	100	100	100	100
1	99,6	97,6	100,2	98,3	98,9
2	92,2	90,6	91,2	92,9	93,5
3	85,4	83,5	86,7	86,4	86,3
4	78	77,9	85,5	80,9	82,2
5			87,2	76,2	78,7
6			90,7		
7			94,2		
8			96,3		
9			97,8		
10			100		
11			98,6		
12			98,1		
13			98,5		
14			100,4		

Ví dụ 212. Hiệu quả của thể liên hợp 45a với chủng cúm B/Florida/4/2006 (Yamagata) ở mô hình ngăn ngừa chuột 28 ngày.

Thể liên hợp 45a được đánh giá về thử thách gây tử vong bởi nhóm phụ cúm mùa của chủng cúm B (B/Florida/4/2006) ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Vào ngày 0, chuột được tiêm dưới da (SC) thể liên hợp 45a với liều 3, 1, 0,3, 0,01 hoặc 0,3 mg/kg một lần. Chuột đối chứng cũng được điều trị theo cùng một đường với chất mang (PBS) hoặc chỉ Fc hIgG1. Hai mươi tám ngày sau khi dùng thuốc thử, chuột được thử thách qua đường mũi với liều LD95 gấp 3 lần B/Florida. Tóm tắt về thiết kế thí nghiệm được cung cấp trong Bảng 209. Đối với thử thách bằng virut, chuột được

gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg) và virut được đưa vào cơ thể với thể tích 30 µl. Mức tử vong và cân nặng (BW) được ghi lại hàng ngày trong 21 ngày và con chuột bất kỳ bị giảm 20% cân nặng đều được ghi nhận là tử vong.

Các con chuột được điều trị bằng chất mang chỉ đạt tỷ lệ tử vong vào ngày thứ 7, trong khi các con chuột được điều trị bằng mẫu đối chứng âm tính chỉ có Fc bị chết vì lây nhiễm vào ngày thứ 8 (Bảng 210). Ngược lại, các con chuột được dùng thể liên hợp 45a ở liều lượng 1 hoặc 3 mg/kg được bảo vệ hoàn toàn trong suốt quá trình nghiên cứu. Các con chuột của Nhóm 4 được điều trị với liều lượng 0,3 mg/kg cũng cho thấy tỷ lệ sống sót là 80%. Ở nồng độ liều lượng 0,1 mg/kg, tỷ lệ sống sót giảm xuống còn 40% và ở liều lượng 0,03 mg/kg, thể liên hợp 45a không có tác dụng bảo vệ. Dữ liệu BW (Bảng 211) phản ánh kết quả tử vong và các con chuột được dùng liều bảo vệ hoàn toàn (1 và 3 mg/kg) cho thấy mức giảm BW tạm thời dưới 5% vào ngày thứ 4, trước khi phục hồi BW ban đầu của chúng.

Nhìn chung, các dữ liệu này hỗ trợ hiệu lực mạnh mẽ của thể liên hợp 45a với phân nhóm cúm mùa quan trọng. Nó cũng chứng minh tính hữu ích của thể liên hợp 45a như một biện pháp phòng ngừa cúm dài hạn.

Bảng 209: Thiết kế nghiên cứu chung

Nhóm	Chủng cúm B (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	DAR	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)		Điều chế hợp chất			N
						Thời điểm dùng liều	Thể tích liều dùng ml/kg	mg/ml	Thể tích cần dùng (ml)	
1	B/FL/4/2006 (Yamagata) 5E4 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	---	SC, một lần duy nhất	---	T-28 ngày	10	---	1,5	5
2		Chỉ có Fc	---	SC, một lần duy nhất	3	T-28 ngày	10	0,3	1,5	5
3		Thể liên hợp 45a	4,7	SC, một lần duy nhất	3	T-28 ngày	10	0,3	1,5	5
4		Thể liên hợp 45a	4,7	SC, một lần duy nhất	1	T-28 ngày	10	0,1	1,5	5
5		Thể liên hợp 45a	4,7	SC, một lần duy nhất	0,3	T-28 ngày	10	0,03	1,5	5
6		Thể liên hợp 45a	4,7	SC, một lần duy nhất	0,1	T-28 ngày	10	0,01	1,5	5
7		Thể liên hợp 45a	4,7	SC, một lần duy nhất	0,03	T-28 ngày	10	0,003	1,5	5

51349

Bảng 210: % mức sống sót đối với các nhóm nghiên cứu

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (3 mpk)	Thể liên hợp 45a (3 mpk)	Thể liên hợp 45a (1 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,1 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	60	100	100	100	100	100	100
7	0	20	100	100	80	80	80
8		0	100	100	80	40	0
9			100	100	80	40	
10			100	100	80	40	
11			100	100	80	40	
12			100	100	80	40	
13			100	100	80	40	
14			100	100	80	40	
15			100	100	80	40	

16			100	100	80	40	
17			100	100	80	40	
18			100	100	80	40	
19			100	100	80	40	
20			100	100	80	40	
21			100	100	80	40	

Bảng 211: % BW hằng ngày trung bình cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược (PBS)	Chỉ có Fc (3 mpk)	Thể liên hợp 45a (3 mpk)	Thể liên hợp 45a (1 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,3 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,1 mpk)	Thể liên hợp 45a (0,03 mpk)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	97	94,9	97,1	98,3	96,9	96,9	97,2
2	97,8	96,3	97,7	98,5	99,5	97,9	98,9
3	93,9	94,3	99,9	100,9	99,7	97,6	98,8
4	84,5	85,3	95,8	95,8	90,9	88,9	89,3
5	81,4	83,1	102	99,4	95,1	90,6	87,5
6	76,5	78,2	101,1	99,8	91,9	85,9	81,9
7			98,7	97,9	87	79,5	76
8			99,6	97,9	88		

51349

9			99,6	99			
10			99,9	100,2			
11			101,9	100,7			
12			99,5	99,4			
13			100	99,4			
14			99,4	101			
15			98	97			
16			100	99,4			
17			97,5	98,2			
18			99,4	100,4			
19			98,8	100,9			
20			100,8	101,9			
21			100	100,1			

51349

Ví dụ 213. Đóng góp miễn dịch qua trung gian Fc của Conjugate 45a

Các nghiên cứu về hiệu quả đã được tiến hành trên chuột cái BALB/c (Charles River) 6-8 tuần tuổi hoặc Fcer1g$^{-/-}$ model 583 (Taconic) được thử thách qua đường mũi với 3E2 PFU/chuột (gấp 3 lần LD95) của chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) đã được làm thích nghi với chuột hoặc với 3e4 PFU/chuột của chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm. AVC hoặc các mẫu đối chứng - IgG1 Fc của người hoặc PBS - được dùng dưới dạng liều duy nhất tiêm dưới da (SC) hoặc tiêm bắp (IM) như đã chỉ định 2 giờ sau khi thử thách ở liều lượng 0,03 – 3 mg/kg. Cân nặng (BW) được ghi lại hàng ngày. Tỷ lệ tử vong được định nghĩa là mức giảm của cân nặng lớn hơn 20% trong hai ngày liên tiếp hoặc khi chuột hấp hối.

Đối với phân tích tải lượng virut và xytokin, sau 4 ngày lây nhiễm, chuột được giết bằng CO_2 và cả hai thùy phổi đều được thu hoạch. Phổi được nghiền đồng nhất bằng hạt silica 1 mm trong 1 mL PBS bằng cách sử dụng MagNA Lyser (Roche). Việc nghiền đồng nhất được thực hiện ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 60 giây và làm lạnh trên đá trong 5 phút giữa các lần chạy. Sau khi nghiền đồng nhất phổi, các ống được ly tâm trong 10 phút ở 600 x g và dịch trong được chuyển vào ống mới. Để xác định PFU, dịch trong của dịch đã nghiền đồng nhất phổi được pha loãng trong dung dịch đệm lây nhiễm có nồng độ từ 10-1 đến 10-6. 100 µL dịch pha loãng virut được bổ sung vào đơn lớp hợp lưu của tế bào MDCK trong các đĩa 24 giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với thao tác lắc sau mỗi 15 phút. Sau khi loại bỏ virut, môi trường phủ lỏng chứa Avicel được bổ sung vào tế bào MDCK. Các tế bào được ủ ở 37°C, CO_2 5% trong 40 giờ. Sau khi ủ, môi trường được lấy ra và các tế bào được nhuộm bằng tinh thể tím để đếm các mảng bám và các đơn vị hình thành mảng bám (PFU) được tính theo trọng lượng của phổi (PFU/g phổi). Đối với phân tích xytokin, dịch nổi của dịch nghiền đồng nhất phổi được pha loãng theo từng đợt 2 lần trong đĩa 96 giếng. Nồng độ xytokin đối vớiIL-6, MIP-1α và MCP-1 được xác định bằng ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Hệ thống R&D).

Thể liên hợp 45a ở liều lượng 0,03 mg/kg hoặc cao hơn có khả năng bảo vệ hoàn toàn với thử thách gây tử vong với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm ở chuột Balb/C (WT) và Fcer1g$^{-/-}$ (KO) (xem Bảng 212) cho thấy khả năng bảo vệ của liên hợp 45a không phụ thuộc vào sự đóng góp miễn dịch qua trung gian Fc.

Bảng 212: Hiệu quả của thể liên hợp 45a ở chuột Balb/C (WT) hoặc chuột Fcer1g$^{-/-}$ (KO) với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm.

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Đường dùng liều	Tình trạng của chuột	% mức sống sót
Fc hIgG1 [1]	IM	WT	0
Thể liên hợp 45a [0,03]	IM	WT	100
Thể liên hợp 45a [0,1]	IM	WT	100
Thể liên hợp 45a [0,3]	IM	WT	100
Thể liên hợp 45a [1]	IM	WT	100
Fc hIgG1 [1]	IM	KO	0
Thể liên hợp 45a [0,03]	IM	KO	100
Thể liên hợp 45a [0,1]	IM	KO	100
Thể liên hợp 45a [0,3]	IM	KO	100
Thể liên hợp 45a [1]	IM	KO	100

Thể liên hợp 45a ở liều lượng 0,1 mg/kg hoặc cao hơn có tác dụng bảo vệ hoàn toàn với thử thách gây tử vong với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở chuột Balb/C (xem Bảng 213). Để xác định sự đóng góp miễn dịch ở chuột Balb/c WT, một phiên bản của thể liên hợp 45a trên thể đột biến Fc không được glycosyl hóa (N297A), thể liên hợp 49 (ví dụ, Fc bao gồm SEQ ID NO: 72 bao gồm thêm thể đột biến N297A) được tạo ra. Thể đột biến Fc này được biết là dẫn đến chức năng miễn dịch bị hủy bỏ phần lớn. Thể liên hợp 49 cũng có tác dụng bảo vệ ở liều lượng 0,1 mg/kg, cho thấy khả năng bảo vệ do thể liên hợp 45a mang lại không phụ thuộc vào sự đóng góp miễn dịch qua trung gian Fc. Để xác định xem hiệu quả của thể liên hợp 45a có thể được tăng cường bằng chức năng tác nhân miễn dịch qua trung gian Fc tăng lên hay không, một phiên bản của thể liên hợp 45a được liên hợp với Fc bao gồm đột biến DE (S239D/I332E) (ví dụ, Fc bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72 bao gồm thêm đột biến S239D/I332E), thể liên hợp 50. Thể liên hợp 50 có tác dụng bảo vệ hoàn toàn ở liều lượng 0,1 mg/kg hoặc cao hơn, tương đương với hoạt tính của thể liên hợp 45a. Tuy nhiên, sau khi điều trị bằng thể liên hợp 50 ở liều lượng 0,03 mg/kg, một con chuột đã sống sót. Do đó, hoạt tính của thể liên hợp 45a ở DAR 4,5 không phụ thuộc vào sự đóng góp miễn dịch qua trung gian Fc.

Bảng 213: Hiệu quả của AVC với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở chuột Balb/C (WT).

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Đường dùng liều	Fc	% mức sống sót
Fc hIgG1 [1]	IM	WT	0
Thể liên hợp 45a [0,01]	IM	WT	0
Thể liên hợp 45a [0,03]	IM	WT	0
Thể liên hợp 45a [0,1]	IM	WT	100
Thể liên hợp 45a [0,3]	IM	WT	100
Thể liên hợp 49 [0,01]	IM	N297A	0
Thể liên hợp 49 [0,03]	IM	N297A	0
Thể liên hợp 49 [0,1]	IM	N297A	100
Thể liên hợp 49 [0,3]	IM	N297A	100
Thể liên hợp 49 [1]	IM	N297A	100
Thể liên hợp 50 [0,01]	IM	S239D/I332E	0
Thể liên hợp 50 [0,03]	IM	S239D/I332E	20
Thể liên hợp 50 [0,1]	IM	S239D/I332E	100
Thể liên hợp 50 [0,3]	IM	S239D/I332E	100

Sau thử thách gây tử vong với cúm ở mô hình chuột, tải lượng PFU trong phổi và mức xytokin phổi được xác định vào ngày thứ 4 sau khi lây nhiễm. Thể liên hợp 45a và thể liên hợp 49 đã chứng minh mức giảm logarit phụ thuộc vào liều lượng trong tải lượng virut ở mức tương đương (xem bảng 214). Thể liên hợp 50 đã chứng minh sự giảm tải lượng virut cao hơn ở mức 0,1 mg/kg giữa 0,96 hoặc 0,83 logarit cao hơn so với thể liên hợp 45a hoặc thể liên hợp 49. Không có sự khác biệt có liên quan về mặt sinh học được quan sát thấy giữa các mẫu đối chứng âm tính, PBS và Fc hIgG1 như mong đợi.

Bảng 214: Mức giảm tải lượng virut bởi các thể liên hợp vào ngày 4 sau khi lây nhiễm được thử thách với chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1) ở mô hình chuột nhắt.

Chất thử nghiệm [mg/kg]	Đường dùng liều	PFU/g	Mức giảm log
PBS	SC	2,19E+07	0,00
Fc hIgG1 [3]	SC	2,85E+07	-0,11
Thể liên hợp 45a [0,03]	SC	1,84E+07	0,07
Thể liên hợp 45a [0,1]	SC	6,34E+06	0,54
Thể liên hợp 45a [0,3]	SC	2,63E+05	1,92
Thể liên hợp 45a [1]	SC	9,99E+03	3,34
Thể liên hợp 45a [3]	SC	1,53E+03	4,16
Thể liên hợp 49 [0,03]	SC	9,06E+06	0,38
Thể liên hợp 49 [0,1]	SC	4,68E+06	0,67
Thể liên hợp 49 [0,3]	SC	1,36E+05	2,21
Thể liên hợp 49 [1]	SC	4,57E+04	2,68
Thể liên hợp 49 [3]	SC	5,89E+03	3,57
Thể liên hợp 50 [0,1]	SC	6,40E+05	1,53

Tương tự, thể liên hợp 45a và thể liên hợp 49 làm giảm xytokin, IL-6, MIP-1a, MCP-1, theo mức độ phụ thuộc liều lượng ở mức tương tự (xem Bảng 215). Đối với thể liên hợp 50 ở mức 0,1 mg/kg, mức IL-6 và MIP-1a thấp hơn một chút, nhưng vẫn quan sát thấy mức tương đương. Thể liên hợp 50 ở mức 0,1 mg/kg cho thấy mức MCP-1 tăng đáng kể so với thể liên hợp 45a và thể liên hợp 49. Không có sự khác biệt có liên quan về mặt sinh học nào được quan sát thấy giữa các mẫu đối chứng âm tính, PBS và Fc hIgG1 như mong đợi.

Bảng 215: Mức xytokin theo sự thay đổi theo số lần so với mẫu đối chứng không bị lây nhiễm đối với IL-6, MIP-1α và MCP-1 vào ngày 4 sau khi lây nhiễm được thử thách với chủng cúm A ở mô hình chuột nhắt.

Chất thử nghiệm [mg/kg]	IL-6	MCP-1	MIP-1α
PBS	4,4	30,0	13,7

Chất thử nghiệm [mg/kg]	IL-6	MCP-1	MIP-1α
Fc hIgG1 [3]	4,6	31,9	15,4
Thể liên hợp 45a [0,03]	3,1	14,8	14,3
Thể liên hợp 45a [0,1]	2,5	10,2	7,1
Thể liên hợp 45a [0,3]	2,1	3,2	3,7
Thể liên hợp 45a [1]	2,0	1,2	2,2
Thể liên hợp 45a [3]	2,0	1,2	2,1
Thể liên hợp 49 [0,03]	2,3	19,4	10,6
Thể liên hợp 49 [0,1]	2,4	11,1	5,7
Thể liên hợp 49 [0,3]	2,9	10,7	5,0
Thể liên hợp 49 [1]	2,5	4,7	2,4
Thể liên hợp 49 [3]	2,3	4,5	2,2
Thể liên hợp 50 [0,1]	1,9	25,6	4,9
Không bị lây nhiễm	1,0	1,0	1,0

Ví dụ 214. Hiệu quả của thể liên hợp 45a với các chủng vắc-xin cúm 2020-2021

Ức chế neuraminidaza (NAI).

Hoạt tính NAI được xác định bằng cách sử dụng kit thương phẩm NA-Fluor. Tóm lại, virut sống được điều chỉnh đến 1e5 PFU/mL và bổ sung vào các giếng thích hợp trong đĩa 96 giếng (màu đen). Chất thử nghiệm được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1.000 nM vào các giếng thích hợp. Virut và chất thử nghiệm được ủ trong 20-30 phút ở 37°C, CO_2 5%. Tiếp theo, cơ chất NA được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 1 giờ ở 37°C, CO_2 5%. NAI được xác định bằng cách đọc huỳnh quang ở bước sóng kích thích 355 nm/phát xạ 460 nm. IC_{50} được tính toán với GraphPad Prism phiên bản 8 bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Liều lượng-đáp ứng (Ức chế)).

Thể liên hợp 45a đã chứng minh cho thấy hiệu lực tương đương bởi IC_{50} khi so sánh với oseltamivir hoặc zanamivir ở NAI với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (Bảng 216).

Bảng 216: Hoạt tính của thể liên hợp 45a trong thử nghiệm ức chế neuraminidaza (NAI) với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (IC_{50})

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45a [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,21	0,32	0,26
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	4,8	0,76	1,05
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	4,58	24,44	2,78
B/Washington/02/2019	Victoria	3,11	16,71	2,3

Thử nghiệm lectin được liên kết với enzym (ELLA).

Các đĩa 96 giếng Nunc Maxisorp (ThermoFisher) được phủ 2,5 µg fetuin (Sigma-Aldrich) trong 1X KPL dung dịch đệm phủ (SeraCare) qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, các đĩa được rửa bằng PBS ở độ pH 7,4 có bổ sung Tween 20 0,05% (PBST). Chất thử nghiệm được thử nghiệm ở 0,001 – 1000 nM và bổ sung trong 50 µL/giếng. Virut cúm được bổ sung ở 5e4 – 5e5 PFU/mL trong 50 µL/giếng. Các đĩa được ủ trong 16-18 giờ ở 37°C, CO_2 5%. Sau khi rửa các đĩa, chất ngưng kết trong đậu phộng được liên hợp với HRP (PNA-HRP) được bổ sung ở 0,13 µg trong 100 uL buffer trong 2 giờ, được rửa lại và được phát triển với 100 µL/giếng cơ chất TMB (BD) trong 3-5 phút. Phản ứng được dừng với 100 µL/giếng H_2SO_4 1N. Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm bằng thiết bị đọc đĩa đa chế độ EnSpire. IC_{50} được tính toán với GraphPad Prism phiên bản 8 bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Liều lượng-đáp ứng (Ức chế)).

Thể liên hợp 45a đã chứng minh cho thấy hiệu lực tăng bởi IC_{50} khi so sánh với oseltamivir hoặc zanamivir ở NAI với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (Bảng 217).

Bảng 217: Hoạt tính của thể liên hợp 45a trong thử nghiệm lectin được liên kết với enzym (ELLA) với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (IC_{50})

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45a [nM]	Fc hIgG1 [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,2	>1,000	5,9	2,7
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	0,1	>1,000	0,3	0,4
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	2,8	>1,000	28,8	9
B/Washington/02/2019	Victoria	3,9	>1,000	47,9	6,6

Thử nghiệm giảm mảng bám (PRA).

Các chất thử nghiệm có phạm vi từ 0,3 đến 100 nM được ủ với virut đã được ủ sơ bộ trong dung dịch đệm chứa albumin huyết thanh bò 0,28% và Ca^{2+}/Mg^{2+} trong PBS trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT). Một đơn lớp hợp lưu của tế bào thận chó Madin Darby (MDCK) trong đĩa 24 giếng được rửa một lần bằng PBS. Sau khi ủ chất thử nghiệm và virut, cả hai đều được bổ sung vào tế bào MDCK. MOI cho mỗi tổ hợp thuốc-virut được chọn để hướng đích vào 30 mảng bám trong giếng đối chứng PBS. Virut và chất thử nghiệm được loại bỏ sau 1 giờ và các tế bào bị lây nhiễm được ủ trong 48 giờ ở 35°C khi có chất thử nghiệm pha loãng trong hỗn hợp gồm Avicel 1,25%, DMEM, DEAE 0,01%-dextran và 2 µg/mL TPCK trypsin. Sau 48 giờ, hỗn hợp Avicel được loại bỏ, các tế bào được cố định bằng paraformaldehyt và nhuộm bằng tinh thể tím 1% để đếm các mảng bám. EC_{50} được tính bằng GraphPad Prism phiên bản 8 sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính (Liều lượng-đáp ứng (Ức chế)).

Thể liên hợp 45a cho thấy hiệu lực tăng bởi EC_{50} so với oseltamivir, zanamivir hoặc baloxavir trong PRA với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (Bảng 218).

Bảng 218: Hoạt tính của thể liên hợp 45a trong thử nghiệm giảm mảng bám (PRA) với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (EC_{50})

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45a [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]	Baloxavir [nM]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,14	7,08	3,69	10,3
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	2,61	28,5	13,9	30,96
B/Washington/02/2019	Victoria	7,46	28,72	9,77	18,27

Hiệu quả tế bào học (CPE).

Đơn lớp hợp lưu của tế bào MDCK Siat1 trong đĩa 96 giếng được ủ với chất thử nghiệm ở các nồng độ dao động trong khoảng 0,01 – 10.000 nM. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng, virut cúm được bổ sung ở MOI 0,01. Sau khi ủ thêm trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các đĩa được ủ trong 3 ngày đối với cúm A hoặc 5 ngày đối với cúm B ở 37°C, CO_2 5%. CPE được xác định bằng cách nhuộm màu tím pha lê bằng cách đọc độ hấp thụ ở 595 nm. EC_{50} được tính toán với GraphPad Prism phiên bản 8 bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Liều lượng-đáp ứng (Ức chế)).

Thể liên hợp 45a đã chứng minh cho thấy hiệu lực tăng bởi EC_{50} khi so sánh với oseltamivir, zanamivir hoặc baloxavir trong PRA với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (Bảng 219).

Bảng 219: Hoạt tính của thể liên hợp 45a trong hiệu quả tế bào học (CPE) với các chủng vắc-xin cúm 2020-21 cho Bắc bán cầu (EC_{50})

Chủng cúm	Phân nhóm/ dòng	Thể liên hợp 45a [nM]	Oseltamivir [nM]	Zanamivir [nM]	Baloxavir [nM]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	1,65	326,6	686,2	11,1
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	0,38	7,7	170	1
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	0,33	27,6	5,2	10,01
B/Washington/02/2019	Victoria	1,06	1028	1,93	9,98

Ví dụ 215. Hiệu quả của thể liên hợp 45a (*cột protein A được tinh chế và *cột protein A chảy qua) với chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) ở mô hình chuột gây tử vong

Thể liên hợp 45a (protein A được tinh chế) và *Thể liên hợp 45a (cột protein A chảy qua) được đánh giá về sự lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/Puerto Rico/8/1934) là thể phân lập đã được làm thích nghi với chuột có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 13 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột và mục đích là nhằm đánh giá hiệu lực tương đối giữa ba tác nhân thử nghiệm. Vào ngày 0, tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 3 lần (5E2 pfu) bằng cách cấy trong mũi (IN) với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn

hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Nhóm 1 gồm đối chứng chuột chỉ được điều trị bằng tá dược, các nhóm còn lại tiếp nhận một trong các thể liên hợp ở các liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,3 mg/kg. Mức tử vong và cân nặng (BW) được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày và con chuột bất kỳ có tổng mức giảm cân nặng là 20% trong 2 ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong.

Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một lần tiêm bắp duy nhất (IM), 2 giờ sau khi thử thách virut của chất thử nghiệm (phác thảo nghiên cứu được nêu chi tiết trong Bảng 220). Các lần tiêm vào cơ đùi của chi sau bên phải ở thể tích liều là 5 ml/kg.

Bảng 220. Phác thảo nghiên cứu đối với nghiên cứu phát triển quy trình thể liên hợp 45a

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ	Liều lượng (mg/kg)	N
1	A/PR/8/34 (H1N1) 5E2 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	---	5
2		Thể liên hợp 45a (cột protein A được tinh chế)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5
3			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5
4			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5
5			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,01	5
6		*Thể liên hợp 45a (cột protein A chảy qua)	IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,3	5
7			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,1	5
8			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,03	5
9			IM, một lần duy nhất, T+2 giờ	0,01	5

Các con chuột chỉ được điều trị bằng tá dược bắt đầu tử vong vào ngày 6, với tỷ lệ tử vong là 100% vào ngày 8 (FIG. 121 và Bảng 221). Ngược lại, cả hai thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp 45a cột protein A được tinh chế và *thể liên hợp 45a cột protein A chảy qua) đều có tác dụng bảo vệ hoàn toàn ở liều lượng 0,1 và 0,3 mg/kg cho đến khi kết thúc nghiên cứu (Ngày 14). Ở hai nồng độ thử nghiệm thấp nhất (0,03 và 0,01 mg/kg), không thấy tác dụng bảo vệ hoặc tác dụng bảo vệ một phần (lần lượt là 40 và 0% đối với thể liên hợp 45a; 80 và 40% đối với *thể liên hợp 45a). Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các thể liên hợp ở liều lượng 0,03 và 0,01 mg/kg không có ý nghĩa thống kê (kiểm định Log-rank Mantel-Cox) và có thể biểu thị mức biến thiên thí nghiệm bình thường so với các nồng độ thử nghiệm rất thấp.

Bảng 221. % mức sống sót theo nhóm và ngày (mg/kg)

Ngày	Tá dược (PBS)	Thể liên hợp 45a (0,3)	Thể liên hợp 45a (0,1)	Thể liên hợp 45a (0,03)	Thể liên hợp 45a (0,01)	*Thể liên hợp 45a (0,3)	*Thể liên hợp 45a (0,1)	*Thể liên hợp 45a (0,03)	*Thể liên hợp 45a (0,01)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	80	100	100	100	100	100	100	100	100
7	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	100	100	100	40	100	100	100	80
9		100	100	40	0	100	100	80	40
10		100	100	40		100	100	80	40
11		100	100	40		100	100	80	40
12		100	100	40		100	100	80	40
13		100	100	40		100	100	80	40
14		100	100	40		100	100	80	40

Thể liên hợp 45a được tinh chế bằng cách sử dụng cột protein A;

*Thể liên hợp 45a từ cột protein A (ví dụ, thể liên hợp không gắn kết với protein A)

Dữ liệu về cân nặng (BW) (Bảng 222) cũng được đánh giá cho tất cả các nhóm liều dùng. Như mong đợi, dữ liệu BW phần lớn phản ánh dữ liệu về mức sống sót với tất cả các liều bảo vệ hoàn toàn với thể liên hợp bất kỳ chứng minh mức giảm tạm thời trước khi phục hồi vào cuối nghiên cứu. Trong các nhóm liều dùng này, BW trung bình vào ngày 14 là 100% trở lên. Tổng hợp dữ liệu này chứng minh hiệu lực của cả 3 thể liên hợp với thử thách gây tử vong do cúm A (H1N1). Điều đáng kể là khả năng bảo vệ đạt được bằng một lần tiêm IM duy nhất 0,1 mg/kg. Theo các điều kiện được đánh giá trong nghiên cứu này, thể liên hợp 45a và *thể liên hợp 45a (ví dụ, thể liên hợp không gắn kết với cột protein A) đã chứng minh hiệu lực tương đương.

Bảng 222. % BW của chuột theo nhóm và ngày (mg/kg) (Dữ liệu được thể hiện cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm)

Ngày	Tá dược (PBS)	Thể liên hợp 45a (0,3)	Thể liên hợp 45a (0,1)	Thể liên hợp 45a (0,03)	Thể liên hợp 45a (0,01)	*Thể liên hợp 45a (0,3)	*Thể liên hợp 45a (0,1)	*Thể liên hợp 45a (0,03)	*Thể liên hợp 45a (0,01)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,5	100,5	99	100,1	99,2	99	98	99,3	99,3
2	98,4	101,8	99,8	98,6	101	101,4	97,1	100,7	99
3	93,3	103,1	99,4	98	98,6	101,9	98,3	100,8	99,2
4	87,7	101,5	94,4	94,1	92,7	103	97,9	98,8	93,5
5	82,2	97,8	96	92,3	90	99,6	95,2	97	89,4
6	78,6	101,6	99,2	91,8	86,5	99,8	97,7	99,1	91,9
7		102,7	99,6	86,7	81,1	102,1	98,7	93,3	84
8		104,3	103,1	83,9	76,4	104,6	101,7	92,4	79,9
9		102,2	100,3	80,4		102,4	97,7	93,1	
10		99,2	100,8			102,5	98,4		
11		105	103,2			104,8	100,1		
12		105,1	101,8			103,8	101,1		
13		103,8	102			102,9	100,8		
14		105,1	103,8			102,4	101,1		

Thể liên hợp 45a được tinh chế bằng cách sử dụng cột protein A;

*Thể liên hợp 45a từ cột protein A (ví dụ, thể liên hợp không gắn kết với protein A)

Ví dụ 216. So sánh các thể liên hợp 45a và 46 trong mô hình chuột được nhân hóa (FcRn) với chủng cúm A/California/07/2009pdm (H1N1) trong nghiên cứu về lây nhiễm gây tử vong

Các thể liên hợp 45a và 46 đã được đánh giá về lây nhiễm cúm IAV H1N1 gây tử vong ở chuột cái B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ (6-8 tuần tuổi; Jackson Labs #014565). Các con chuột này biểu hiện thụ thể sơ sinh ở người (FcRn), một yếu tố thiết yếu trong thời gian bán hủy kéo dài của kháng thể hoặc thuốc điều trị chứa Fc. Thể Liên hợp 46 chứa đột biến YTE Fc đã được chứng minh là kéo dài thời gian bán hủy ở người và khỉ cynomolgus. Mặc dù đột biến YTE không biểu hiện ở chuột dạng dại, nhưng lại cho phép ở các loài chuột chuyển gen biểu hiện FcRn. Do đó, các tác giả sáng chế đã đánh giá hiệu quả tương đối của thể liên hợp 45a và 46 giống hệt nhau ngoại trừ sự có mặt của đột biến YTE ở đột biến sau, để xác định xem thời gian bán hủy kéo dài có mang lại lợi thế về hiệu lực trong mô hình phòng ngừa 7 ngày hay không.

Virus thử thách (A/California/07/2009) là chủng virut gây đại dịch H1N1 có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 10 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột (Bảng 223). Bảy ngày trước khi thử thách bằng virut, chuột được tiêm một liều duy nhất chất thử nghiệm bằng cách tiêm bắp (IM) vào cơ đùi của chi sau bên phải với thể tích liều là 5 ml/kg. Vào ngày 0, tất cả chuột đều được thử thách bằng virut ở mức LD95 gấp 3 lần (3E4 pfu) bằng cách tiêm qua đường mũi (IN) với thể tích 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Nhóm 1 bao gồm các con chuột đối chứng chỉ được điều trị bằng tá dược, và các con chuột trong nhóm 2 chỉ được dùng liều Fc (Fc hIgG1), các nhóm còn lại được dùng một trong Các thể liên hợp với liều lượng từ 1 đến 0,03 mg/kg. Tỷ lệ tử vong và cân nặng (BW) được ghi lại hàng ngày trong 14 ngày và các con chuột bất kỳ có tổng mức giảm cân mạnh 20% trong 2 ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong.

Dữ liệu về khả năng sống sót được trình bày trong Bảng 224 và cho thấy các con chuột đối chứng (nhóm 1 và 2) đã tử vong hoàn toàn vào ngày 6 như mong đợi. Ngược lại, các con chuột được dùng thể liên hợp ở liều dùng 1,0 hoặc 0,3 mg/kg đều được bảo vệ hoàn toàn cho đến khi kết thúc nghiên cứu (Ngày 21). Ở nồng độ liều lượng thấp nhất (0,03 mg/kg), không thấy có sự bảo vệ đáng kể nào đối với thể liên hợp bất kỳ. Tuy nhiên, ở liều lượng 0,1 mg/kg, sự khác biệt tương đối về hiệu lực giữa

thể liên hợp 45a và 46 đã rõ ràng. Thể liên hợp 45a chứa trình tự Fc dạng dại không mạnh hơn đáng kể so với các con chuột chỉ dùng tá dược hoặc Fc, trong khi các con chuột được điều trị bằng thể liên hợp 46 thì mạnh hơn (tỷ lệ sống sót là 80%; P = 0,0016 so với tá dược) (FIG. 122). Các dữ liệu này cho thấy đột biến YTE của thể liên hợp 46 có lợi thế về hiệu lực so với thể liên hợp 45a, có thể là do thời gian bán hủy kéo dài. Dữ liệu BW cho tất cả các nhóm nghiên cứu được liệt kê trong Bảng 225 và hỗ trợ dữ liệu về khả năng sống sót.

Nghiên cứu này chứng minh rằng thể liên hợp 46 có hiệu lực tăng lên so với thể liên hợp 45a. Vì cả hai thể liên hợp đều có các nhóm hướng đích giống hệt nhau nên sự cải thiện về hiệu quả của thể liên hợp 46 là do đột biến YTE. Kết luận này được hỗ trợ bởi nồng độ huyết tương của cả hai thể liên hợp thu thập từ các con chuột nghiên cứu (nhóm dùng liều 0,1 mg/kg) vào ngày trước khi thử thách virut (thể liên hợp 45a, 0,09 μg/ml; thể liên hợp 46, 0,48 μg/ml). Nồng độ cao hơn của thể liên hợp 46 trong huyết tương tại thời điểm thử thách virut dẫn đến khả năng bảo vệ vượt trội so với thể liên hợp 45a.

Bảng 223. Phác thảo chung về giao thức nghiên cứu trên chuột FcRn

Nhóm	Chủng cúm A (thử thách IN)	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thời điểm dùng liều	N
1	A/CA/-7/09 ~3E4 PFU/chuột nhắt	Tá dược (PBS)	IM, một lần duy nhất	---	T-7 ngày	5
2		Fc hIgG1		1		
3		Thể liên hợp 45a		1		
4		Thể liên hợp 45a		0,3		
5		Thể liên hợp 45a		0,1		
6		Thể liên hợp 45a		0,03		
7		Thể liên hợp 46		1		

8		Thể liên hợp 46		0,3		
9		Thể liên hợp 46		0,1		
10		Thể liên hợp 46		0,03		

Bảng 224. % mức sống sót theo nhóm và ngày (mg/kg)

Ngày	Tá dược (PBS)	Fc hIgG1	Thể liên hợp 45a (1)	Thể liên hợp 45a (0,3)	Thể liên hợp 45a (0,1)	Thể liên hợp 45a (0,03)	Thể liên hợp 46 (1)	Thể liên hợp 46 (0,3)	Thể liên hợp 46 (0,1)	Thể liên hợp 46 (0,03)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	0	100	100	80	80	100	100	100	20
7			100	100	60	20	100	100	100	0
8			100	100	20	20	100	100	80	
9			100	100	20	20	100	100	80	
10			100	100	20	20	100	100	80	
11			100	100	20	20	100	100	80	
12			100	100	20	20	100	100	80	
13			100	100	20	20	100	100	80	
14			100	100	20	20	100	100	80	
15			100	100	20	20	100	100	80	

51349

16			100	100	20	20	100	100	80	
17			100	100	20	20	100	100	80	
18			100	100	20	20	100	100	80	
19			100	100	20	20	100	100	80	
20			100	100	20	20	100	100	80	
21			100	100	20	20	100	100	80	

Bảng 225. % BW của các con chuột theo nhóm và ngày (mg/kg). *Dữ liệu được thể hiện cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

Ngày sau khi lây nhiễm	Tá dược (PBS)	Fc hIgG1	Thể liên hợp 45a (1)	Thể liên hợp 45a (0,3)	Thể liên hợp 45a (0,1)	Thể liên hợp 45a (0,03)	Thể liên hợp 46 (1)	Thể liên hợp 46 (0,3)	Thể liên hợp 46 (0,1)	Thể liên hợp 46 (0,03)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	97,2	97,7	97,8	100,4	99,4	98	96,9	100,8	99,4	98,6
2	89,5	90,7	96,7	95,6	94	92,8	96,3	100,7	94,3	91,8
3	82,9	83,8	98,7	91,9	86,8	88,3	97,8	95,2	86,5	85,4
4	79	80,1	100,9	93,3	84,4	85,3	97,7	97,1	86,5	83,5
5	75,1		98,5	91,9	81,8	84	96,7	97,3	84,6	79,3
6			102	93,7	80,4	82,2	97,8	101,4	84,4	76,7
7			99,5	94,1			97,2	99,9	82,5	

51349

8			99,8	94,5			98,3	100,8	84,8	
9			98,8				98,3	102,4		
10			99,3				97,2	103,1		
11			103,9				101,4	103,5		
12			103,8				99,8	103,2		
13			102,1				100,2	102,8		
14			103,8				104,3	104,9		
15			103,8				102,1	106,2		
16			101,9				100	101,9		
17			101,2				102,3	103,6		
18			101,9				103,6	104,5		
19			102,3				104,3	104		
20			102,4				102,3	105,5		
21			104,2				102	106,9		

51349

Ví dụ 217. Hiệu quả của thể liên hợp 45a trong mô hình chuột cúm A (H1N1) được thiết kế để mô phỏng các tác nhân gây bệnh ở giai đoạn đầu của lây nhiễm ở người

Các ví dụ trước đây được cung cấp trong sáng chế này sử dụng mô hình trong đó chuột được gây mê mạnh bằng ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg) trong quá trình thử thách virut. Sau khi thử thách virut qua đường mũi (IN) (gấp 3 lần LD95 trong 30 µl), chuột được giữ nằm ngửa cho đến khi hồi phục (khoảng 30 phút). Điều này giúp tăng cường dẫn lưu virut vào phổi (đường hô hấp dưới hoặc LRT) tạo ra mô hình sàng lọc mạnh mẽ và có khả năng tái tạo cao cho liệu pháp chống cúm. Tuy nhiên, nó không sao chép được quá trình lây nhiễm tự nhiên trong đó nói chung ít hạt virut hơn được gieo vào đường hô hấp trên (URT) của người. Nghiên cứu này được thiết kế để mô phỏng chặt chẽ hơn quá trình lây nhiễm tự nhiên bằng cách gieo virut vào URT và nghiên cứu hai loại vắc-xin thử thách khác nhau.

Nghiên cứu này sử dụng chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần) được thử thách chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1), một thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột, ở mức 3E4 (gấp 3 lần LD95) và 3E3 pfu/chuột. Thử thách virut được thực hiện trên chuột được gây mê bằng isoflurane (3%) bằng cách tiêm IN với thể tích 30 µl. Thí nghiệm bao gồm 13 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột và thiết kế nghiên cứu chung được thể hiện trong Bảng 226. Ba ngày trước khi thử thách virut, chuột được dùng một liều IM (cơ đùi) duy nhất của thể liên hợp 45a từ 0,001 đến 0,3 mg/kg. Các con chuột đối chứng âm tính chỉ được điều trị bằng PBS. Một nhóm cũng được "nhiễm giả" bằng PBS thay vì virut. Tỷ lệ tử vong và BW được ghi lại hàng ngày trong 14 ngày và các con chuột bất kỳ có tổng mức giảm cân nặng là 20% trong 2 ngày liên tiếp đều được ghi là tử vong.

Kết quả mức sống sót từ nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 227. Ở cả hai nồng độ virut (3E3 và 3E4 pfu/chuột), các con chuột được xử lý bằng tá dược không được bảo vệ hoàn toàn khỏi tỷ lệ tử vong như mong đợi. Nhóm PBS 3E3 đạt tỷ lệ tử vong 100% so với 60% ở 3E4. Mặc dù trái ngược với trực giác, đây có thể là kết quả của sự thay đổi thử nghiệm thông thường trong các mô hình URT. Điều quan trọng là, thể liên hợp 45a có khả năng bảo vệ hoàn toàn chống lại thử thách với pfu 3E4 xuống đến liều IM duy nhất là 0,03 mg/kg. Ở nhóm 3E3, thể liên hợp 45a cung cấp khả năng bảo vệ hoàn toàn với liều duy nhất 0,01 mg/kg (P = 0,0031 so với tá dược). Khả năng

bảo vệ đáng chú ý do thể liên hợp 45a mang lại dựa trên điểm cuối về khả năng sống sót cho thấy PK và hoạt tính vượt trội trong URT của chuột.

Dữ liệu BW cho các con chuột nghiên cứu được lập bảng trong Bảng 228 và phản ánh kết quả của dữ liệu sống sót. Nhóm liều bảo vệ hoàn toàn thấp nhất (0,03 mg/kg) chỉ cho thấy tình trạng giảm cân mạnh tạm thời so với chuột bị nhiễm giả (PBS) và BW giai đoạn cuối (Ngày 14) chỉ cách nhau 1,5% trong nhóm thử thách 3E4. Đối với nhóm 3E3, liều bảo vệ thấp nhất (0,01 mg/kg) chỉ cách nhau khoảng 5% so với các con chuột bị nhiễm giả khi kết thúc nghiên cứu.

Nhìn chung, nghiên cứu này chỉ ra rằng thể liên hợp 45a có mức phơi nhiễm đặc biệt ở URT của chuột và cực kỳ hiệu quả trong việc ngăn ngừa sự lây lan của virut vào LRT, nơi xảy ra các bệnh lây nhiễm gây tử vong. Hơn nữa, việc bảo toàn BW ở chuột được điều trị và không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng cho thấy thể liên hợp 45a có tiềm năng hoạt động như một biện pháp phòng ngừa vượt trội chống lại bệnh cúm A.

Bảng 226: Phác thảo nghiên cứu chung

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Thử thách virut (IN)	Đường dùng, phác đồ	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	N
1	Lây nhiễm giả	Tá dược (PBS)	PBS	IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	---	---	5
2	A/CA/07/09 (H1N1)	Tá dược (PBS)	3,00E+04	IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	---	5	
3		Thể liên hợp 45a		IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,3		
4				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,1		
5				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,03		
6				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,01		
7				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,003		
8		Tá dược (PBS)	3,00E+03	IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	---		
9		Thể liên hợp 45a		IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,1		
10				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,03		
11				IM, một lần duy nhất,	0,01		

51349

				T-72 giờ			
12				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,003		
13				IM, một lần duy nhất, T-72 giờ	0,001		

51349

Bảng 227: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót của các nhóm vào ngày

		Thể liên hợp 45a (mg/kg). 3E4 pfu/các nhóm thử thách chuột nhắt						Thể liên hợp 45a (mg/kg). 3E3 pfu/các nhóm thử thách chuột nhắt					
Ngày sau khi lây nhiễm	Lây nhiễm giả (PBS)	Tá dược (PBS)	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg	0,03 mg/kg	0,01 mg/kg	0,003 mg/kg	Tá dược (PBS)	0,1 mg/kg	0,03 mg/kg	0,01 mg/kg	0,003 mg/kg	0,001 mg/kg
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	60	100	100	100	60	60	100	100	100	100	100	100
7	100	60	100	100	100	60	20	60	100	100	100	100	80
8	100	60	100	100	100	60	20	0	100	100	100	80	80
9	100	60	100	100	100	60	20		100	100	100	80	80
10	100	60	100	100	100	60	20		100	100	100	80	80

51349

Bảng 228: Phần trăm BW bắt đầu của chuột theo nhóm và ngày. *Dữ liệu được thể hiện cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm

		Thể liên hợp 45a (mg/kg). 3E4 pfu/các nhóm thử thách chuột nhắt						Thể liên hợp 45a (mg/kg). 3E3 pfu/các nhóm thử thách chuột nhắt					
Ngày sau khi lây nhiễm	Lây nhiễm giả (PBS)	Tá dược (PBS) (3E4)	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg	0,03 mg/kg	0,01 mg/kg	0,003 mg/kg	Tá dược (PBS) (3E3)	0,1 mg/kg	0,03 mg/kg	0,01 mg/kg	0,003 mg/kg	0,001 mg/kg
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101,5	103,4	103,2	102,2	104,6	101,3	102,3	104,7	100,7	102,8	103,9	99,8	101,9
2	98,6	99,1	100,5	100,6	102,3	97,2	100	100,8	98,5	100,9	101,7	96,8	99,4
3	101,1	92,4	99,5	98,9	97,4	92,3	92,6	95,4	99,1	99,8	97,7	94,6	97,2
4	104,2	89	100,3	99,2	96,2	88,1	87,3	89,6	101,6	97,9	97,9	88,8	94
5	104,2	87,3	102,1	101,6	95,7	86	82,4	84,7	101,7	98,2	96,2	86,4	90,9
6	104,6	85,2	104,3	103,9	94,6	83		81	102,5	97,1	92,9	84	84,3
7	105,1	82,1	103,5	104,7	97,2			76,1	102,7	94,5	87,4	79,5	81,8
8	105,2		106,9	100,8	98,7				102,7	99,2	90	83	
9	103,9		104,3	104,1	99,8				101,2	98,8	93,3		
10	105,4		106,6	105,9	103,9				104,8	100,9	99,8		

51349

901/1174

Ví dụ 218. Hiệu quả của thể liên hợp 45a với chủng cúm A/California/07/2009 (H1N1) bằng đường dùng liều ở mô hình chuột được điều trị trì hoãn

Thể liên hợp 45a được đánh giá về sự lây nhiễm cúm A (H1N1) gây tử vong ở chuột cái BALB/c (Phòng thí nghiệm Charles River, 6-8 tuần). Virut thử thách (A/California/07/2009) là thể phân lập gây đại dịch có khả năng gây lây nhiễm gây tử vong ở chuột. Thí nghiệm bao gồm 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Thiết kế nghiên cứu chung được thể hiện trong Bảng 229, tóm lại: Vào ngày 0 tất cả các con chuột được thử thách với virut ở mức LD95 gấp 2-3 lần bằng cách cấy trong mũi (IN) với thể tích là 30 µl, sau khi được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin (lần lượt là 150 và 10 mg/kg). Các nhóm thử nghiệm tiếp nhận một lần tiêm bắp (IM) hoặc tiêm tĩnh mạch (IV) duy nhất, 24 giờ sau khi thử thách virut của thể liên hợp 45a (0,03 đến 0,3 mg/kg) hoặc tá dược (PBS). Việc tiêm IM vào cơ đùi của chi sau bên phải ở thể tích liều là 10 ml/kg. Các lần tiêm IV được dùng vào tĩnh mạch đuôi ở cùng thể tích liều dùng. Mức tử vong và BW được ghi lại hằng ngày trong 14 ngày và con chuột bất kỳ có tổng mức giảm cân nặng là 20% trong 2 ngày liên tiếp được ghi nhận là tử vong.

Kết quả mức sống sót từ nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 230. Các con chuột được điều trị bằng tá dược (PBS) nhanh chóng bắt đầu giảm BW sau thử thách, đạt tỷ lệ tử vong 100% vào ngày 5. Các con chuột được dùng thể liên hợp 45a với liều 0,3 mg/kg bằng đường tĩnh mạch (nhóm 2) hoặc tiêm bắp (nhóm 5) được bảo vệ hoàn toàn cho đến khi kết thúc nghiên cứu (Ngày 14). Cả hai nhóm cũng biểu hiện xu hướng BW tương tự, với tình trạng giảm cân mạnh tạm thời trước khi phục hồi và cuối cùng vượt quá BW ban đầu của chúng vào cuối nghiên cứu (Bảng 231).

Ở liều thể liên hợp 45a thấp nhất được thử nghiệm (0,03 mg/kg), tất cả các con chuột đều chết vì lây nhiễm vào ngày 6 bất kể đường dùng liều. Các nhóm liều trung gian (0,1 mg/kg) cho thấy tỷ lệ sống sót là 40% khi dùng liều qua đường tĩnh mạch và không có tác dụng bảo vệ (tỷ lệ sống sót là 0%) khi dùng liều qua đường tiêm bắp. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (P = 0,0993). Nhìn chung, nghiên cứu này đã chứng minh hiệu lực của thể liên hợp 45a đối với chủng cúm A (H1N1) gây đại dịch quan trọng chỉ với một liều IV hoặc IM duy nhất dưới 1 mg/kg. Điều quan trọng là hiệu quả tương đương giữa cả hai đường dùng liều, cho thấy khả năng sử dụng thể liên hợp 45a trong điều kiện ngoại trú (liều IM). Cuối cùng, thể liên hợp 45a có tác dụng bảo vệ hoàn toàn mặc dù liều dùng bị trì hoãn trong 24 giờ, cho

phép thời gian cấy ghép virut ban đầu hình thành/lan truyền. Điều này cho thấy thể liên hợp 45a có thể được sử dụng để điều trị như một biện pháp phòng ngừa và điều trị.

Bảng 229: Phác thảo nghiên cứu chung

Nhóm	Chủng cúm A	Chất thử nghiệm	Đường dùng, phác đồ (T+24 giờ)	Liều lượng (mg/kg)	ml/kg	N
1	A/CA/07/09 (3E4 pfu/chuột nhắt)	Tá dược (PBS)	IV, một lần duy nhất, T+24	---	10	5
2		Thể liên hợp 45a	IV, một lần duy nhất, T+24	0,3	10	5
3			IV, một lần duy nhất, T+24	0,1	10	5
4			IV, một lần duy nhất, T+24	0,03	10	5
5			IM, một lần duy nhất, T+24	0,3	10	5
6			IM, một lần duy nhất, T+24	0,1	10	5
7			IM, một lần duy nhất, T+24	0,03	10	5

Bảng 230: Tỷ lệ phần trăm mức sống sót theo nhóm và ngày (mg/kg) (Đường dùng liều)

Ngày	Tá dược (PBS)	Thể liên hợp 45a (0,3) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,1) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,03) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,3) (IM)	Thể liên hợp 45a (0,1) (IM)	Thể liên hợp 45a (0,03) (IM)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	0	100	80	20	100	40	60
6		100	40	0	100	0	0
7		100	40		100		
8		100	40		100		
9		100	40		100		
10		100	40		100		
11		100	40		100		
12		100	40		100		
13		100	40		100		
14		100	40		100		

51349

904/1174

Bảng 231: Tỷ lệ phần trăm BW bắt đầu của chuột theo nhóm và ngày (mg/kg) (Đường dùng liều). *Dữ liệu được thể hiện cho đến khi xuất hiện con chuột đầu tiên tử vong trong nhóm.

Ngày sau khi thử thách	Tá dược (PBS)	Thể liên hợp 45a (0,3) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,1) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,03) (IV)	Thể liên hợp 45a (0,3) (IM)	Thể liên hợp 45a (0,1) (IM)	Thể liên hợp 45a (0,03) (IM)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	97,5	99,5	96,9	99,1	98,6	97,2	97,6
2	95,1	99,4	96	94	97,1	95,5	95
3	86,6	94,5	89,9	86,8	89,7	88,8	89,1
4	79,9	93	82,6	79,2	89,1	80,8	81,2
5	74,6	94,7	81	74,6	92,1	76,4	75,7
6		97,4			94,3		
7		99,3			97,1		
8		101,9			98,7		
9		102			101,7		
10		105			103,6		
11		103,3			100,9		
12		102,4			101,2		
13		105,9			102,8		
14		104,2			101,6		

51349

Ví dụ 219. Nghiên cứu phạm vi tiêm dưới da liều đơn và nghiên cứu độc tính và động học độc tính liều đơn (phơi nhiễm trong 2 tuần) của thể liên hợp 45a ở chuột Sprague-Dawley

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng dung nạp ở chuột đực và chuột cái sau đó là độc tính và độc động học (TK) của thể liên hợp 45a khi được dùng dưới dạng một liều tiêm dưới da (SC) duy nhất cho chuột đực Sprague Dawley.

Nghiên cứu này bao gồm hai giai đoạn; Giai đoạn 1 dung nạp (Nhóm 1–3) và Giai đoạn 2 độc tính (Nhóm 4–7) và TK vệ tinh (Nhóm 8–10). Mỗi nhóm điều trị trong Giai đoạn 1 bao gồm một con chuột Sprague Dawley cái và một con chuột đực. Các con chuột Giai đoạn 1 được dùng thể liên hợp 45a 100 mg/kg (Nhóm 1), thể liên hợp 45a 200 mg/kg (Nhóm 2) hoặc thể liên hợp 45a 400 mg/kg (Nhóm 3) trong một ngày duy nhất thông qua tiêm dưới da với thể tích liều 5 mL/kg (5 mL X 2 vị trí cho Nhóm 3, giữa xương bả vai và lưng thắt lưng). Mỗi nhóm độc tính Giai đoạn 2 (Nhóm 4–7) bao gồm năm con chuột Sprague Dawley đực. Mỗi nhóm TK vệ tinh Giai đoạn 2 (Nhóm 8–10) bao gồm bốn con chuột Sprague Dawley đực. Dựa trên khả năng dung nạp ở Giai đoạn 1, chuột Giai đoạn 2 được dùng PBS (Nhóm 4), thể liên hợp 45a 50 mg/kg (Nhóm 5 và 8), thể liên hợp 45a 150 mg/kg (Nhóm 6 và 9) hoặc thể liên hợp 45a 400 mg/kg (Nhóm 7 và 10) trong một ngày duy nhất thông qua tiêm dưới da với liều lượng 5 mL/kg (5 mL X 2 vị trí cho Nhóm 3, giữa xương bả vai và thắt lưng phía sau cho Nhóm 7 và 10).

Các quan sát lâm sàng cho Giai đoạn 1 được ghi lại hai lần mỗi ngày vào ngày 1–3 và các quan sát chi tiết được ghi lại khi phân nhóm ngẫu nhiên. Các quan sát lâm sàng cho Giai đoạn 2 được ghi lại hai lần mỗi ngày vào ngày 1–15 và các quan sát chi tiết được ghi lại vào ngày 1 (trước khi dùng liều) và vào ngày 14. Các phép đo cân nặng được ghi lại khi phân nhóm ngẫu nhiên và trước khi dùng liều cho Giai đoạn 1. Các phép đo cân nặng cho Giai đoạn 2 được ghi lại khi phân nhóm ngẫu nhiên, vào ngày 1, Ngày 3, Ngày 7, Ngày 14 và vào ngày 15 trước khi khám nghiệm tử thi. Các phép đo lượng thức ăn tiêu thụ cho Giai đoạn 2 được ghi lại vào ngày 1, 4, 7, 10, 12 và 14. Các mẫu huyết tương được thu thập từ chuột TK vệ tinh (Nhóm 8–10) ở thời điểm 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240 và 336 giờ sau khi dùng liều để phân tích mức độ phơi nhiễm nội hấp với thể liên hợp 45a. Các mẫu nước tiểu được thu thập từ chuột chứa độc chất (Nhóm 4–7) trong 24 giờ từ Ngày 14 đến Ngày 15. Các mẫu máu để

đánh giá các điểm cuối về huyết học, hóa học và đông máu được thu thập vào ngày 15 từ chuột chứa độc chất (Nhóm 4–7). Sau khi thu thập mẫu máu, tiến hành khám nghiệm tử thi trên chuột chứa độc chất (Nhóm 4–7). Các mô được chỉ định trong giao thức được thu thập và đánh giá sơ bộ, các cơ quan được chọn được cân và các mô được cố định để đánh giá bằng kính hiển vi. Các mô sau đó được xử lý và đánh giá bằng kính hiển vi.

Khả năng dung nạp:

Dựa trên việc không quan sát thấy bất thường liên quan đến chất thử nghiệm, việc sử dụng thể liên hợp 45a ở <400 mg/kg dưới dạng tiêm dưới da một lần (tại một hoặc hai vị trí trong mỗi ngày dùng liều) được dung nạp tốt trong tối đa 3 ngày ở chuột Sprague Dawley đực và cái.

Độc tính động học:

Mức thể liên hợp 45a trong huyết tương được duy trì trong suốt thời gian phơi nhiễm 2 tuần và là tương đương giữa các thử nghiệm bắt giữ neuraminidaza (NA) và bắt giữ Fc. Quan sát này cho thấy rằng phân tử nguyên vẹn (chứa ít nhất 1 phần tử đích liên kết với nhóm Fc) vẫn ổn định sau khi dùng liều *in vivo*. Mức phơi nhiễm huyết tương trung bình dường như tăng theo tỷ lệ liều từ 50 đến 400 mg/kg.

Độc tính học:

Dựa trên việc không có thay đổi liên quan đến chất thử nghiệm về cân nặng, lượng thức ăn tiêu thụ, quan sát lâm sàng, trọng lượng cơ quan, các thông số huyết học, hóa học lâm sàng, phát hiện đại thể và phát hiện vi thể, việc sử dụng thể liên hợp 45a ở mức <400 mg/kg dưới dạng tiêm dưới da một lần (liều cao được tiêm ở hai vị trí) được dung nạp tốt trong tối đa 14 ngày ở chuột đực Sprague Dawley. Liều này tương ứng với giá trị AUC0-inf trung bình là 312.000 và 319.000 µg•hr/mL và giá trị Cmax trung bình là 1150 và 974 µg/mL cho thử nghiệm bắt giữ NA và bắt giữ Fc, tương ứng.

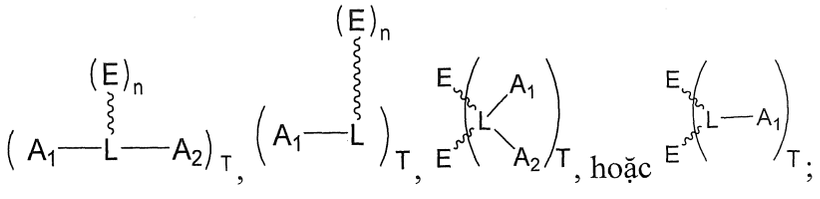
Ví dụ 220. Nghiên cứu phạm vi tiêm dưới da liều đơn và nghiên cứu độc tính liều đơn và động học độc tính (phơi nhiễm 2 tuần) của thể liên hợp 45a ở chuột Sprague-Dawley

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá khả năng dung nạp ở chuột đực và chuột cái, sau đó là độc tính và động học độc tính của thể liên hợp 45a khi được dùng dưới dạng liều tiêm dưới da (SC) duy nhất cho chuột Sprague Dawley đực. Các con chuột đực trong Giai đoạn 2 được dùng thể liên hợp 45a ở liều lượng 50, 150 hoặc 400 mg/kg/liều.

Tất cả các con chuột nghiên cứu đều sống sót sau khi được giết theo lịch trình. Không có các thay đổi liên quan đến chất thử nghiệm về trọng lượng cơ quan, các thông số huyết học, hóa học lâm sàng, phát hiện đại thể và phát hiện vi thể. Các phát hiện vi thể được ghi lại có tỷ lệ tương tự ở các con chuột đối chứng và các nhóm tiếp xúc với chất thử nghiệm, hoặc được coi là đại diện cho các phát hiện "cơ bản" ngẫu nhiên thường thấy ở chuột thuộc chủng và độ tuổi này.

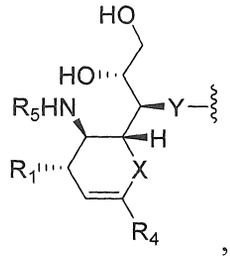
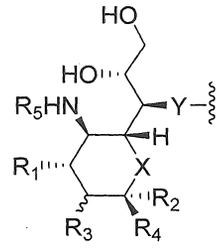
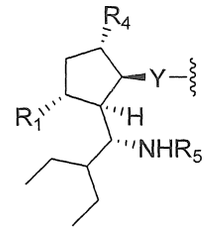
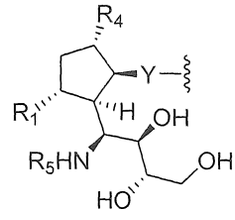
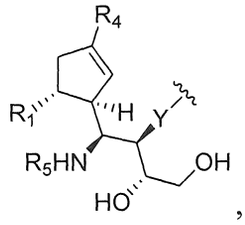
Các phương án được đánh số

1. Thể liên hợp được mô tả bằng công thức bất kỳ trong số các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2):



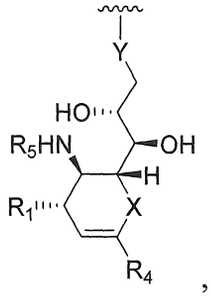
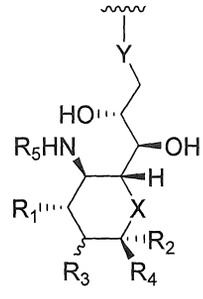
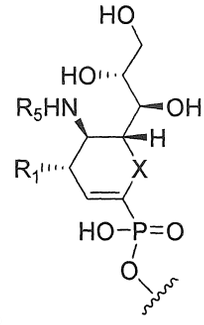
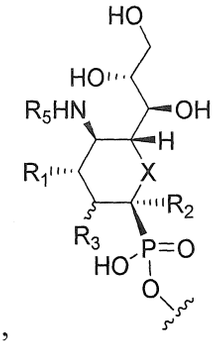
(D-I) (M-I) (1) (2)

trong đó mỗi A1 và mỗi A2 độc lập được mô tả bằng công thức (A-I)-(A-XII):

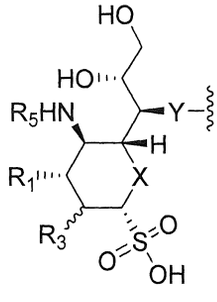
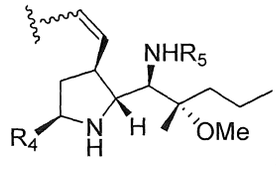
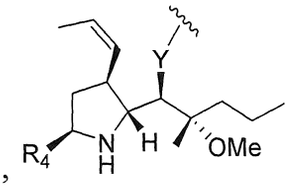






(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV)

(A-V)

(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)

(A-X) (A-XI) (A-XII)

trong đó R1 được chọn từ -OH, -NH2, -NHC(=NH)NH2, và -NHC(=NH)NHR6;

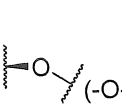
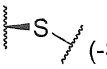
mỗi R2 và R3 độc lập được chọn từ -H, -OH, -F, -Cl, và -Br;

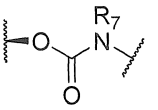
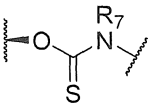
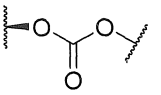
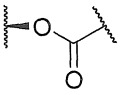
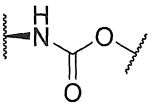
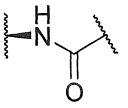
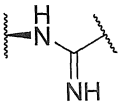
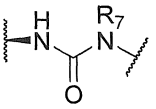
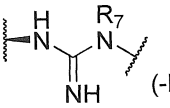
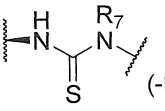
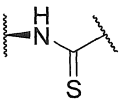
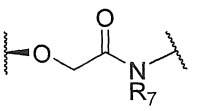
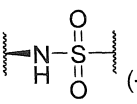
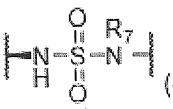
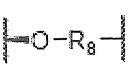
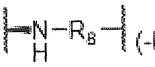
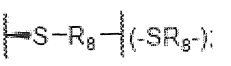
R4 được chọn từ -CO2H, -P(=O)(OH)2, -SO3H;

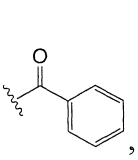
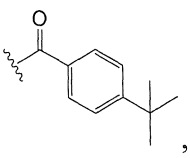
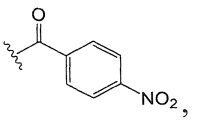
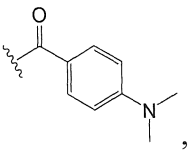
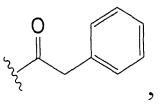
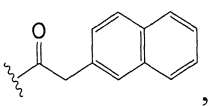
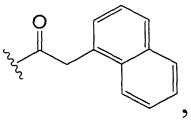
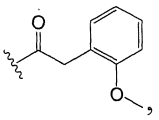
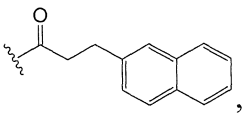
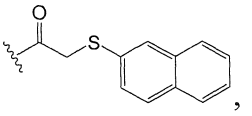
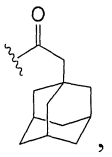
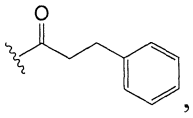
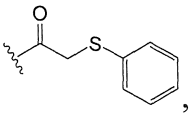
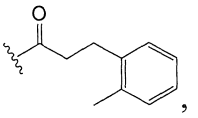
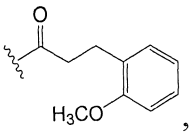
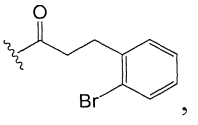
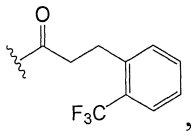
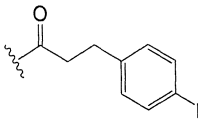
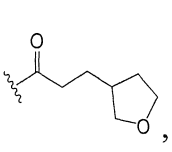
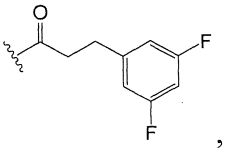
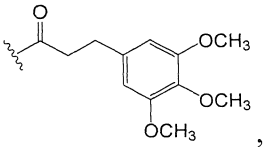
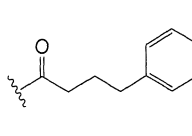
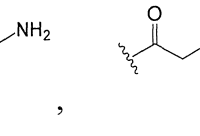
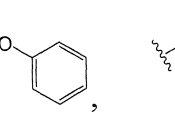
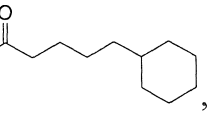
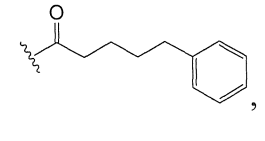
R5 được chọn từ -COCH3, -COCF3, -SO2CH3;

X được chọn từ -O- và -S-;

Y được chọn từ:


(-O-),

(-S-),

($-NR_7-$),

($-O(C=O)NR_7-$),

($-O(C=S)NR_7-$),

(-O(C=O)O-),

(-O(C=O)-),

(-NH(C=O)O-),

(-NH(C=O)-),

(-NH(C=NH)-),

($-NH(C=O)NR_7-$),

($-NH(C=NH)NR_7-$),

($-NH(C=S)NR_7-$),

(-NH(C=S)-),

($-OCH_2(C=O)NR_7-$),

($-NH(SO_2)-$),

($-NH(SO_2)NR_7-$),

($-OR_8-$),

($-NR_8-$), và

($-SR_8-$);

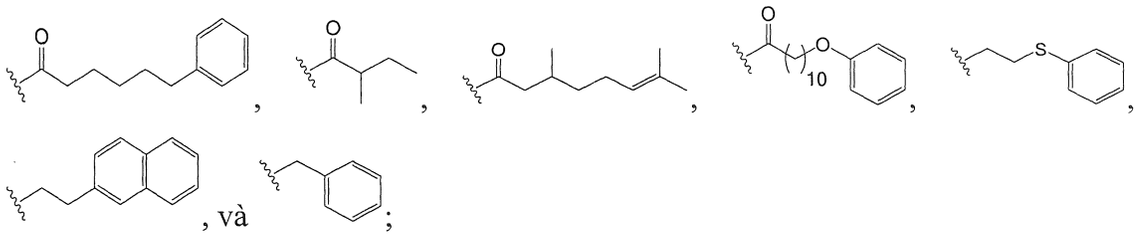
R6 được chọn từ

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



, và ;

R7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

R8 được chọn từ C3-C20 heteroxycloalkyl, C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

n bằng 1 hoặc 2;

mỗi E bao gồm monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

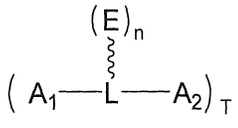
L là cầu nối liên kết gắn cộng hóa trị với E và với mỗi Y của mỗi A1 hoặc mỗi A1 và A2;

T là số nguyên từ 1 đến 20, và

mỗi đường lượn sóng trong các công thức (D-I), (M-I), (1), hoặc (2) chỉ ra rằng L được gắn cộng hóa trị với mỗi E;

hoặc muối dược dụng của nó.

2. Thể liên hợp theo phương án 1, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-I):



(D-I)

trong đó mỗi A1 và mỗi A2 độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

n bằng 1 hoặc 2;

T là số nguyên từ 1 đến 20; và

đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A1-L-A2 được gắn cộng hóa trị với E, hoặc muối dược dụng của nó.

3. Thể liên hợp theo phương án 2, trong đó mỗi A1 và mỗi A2 độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

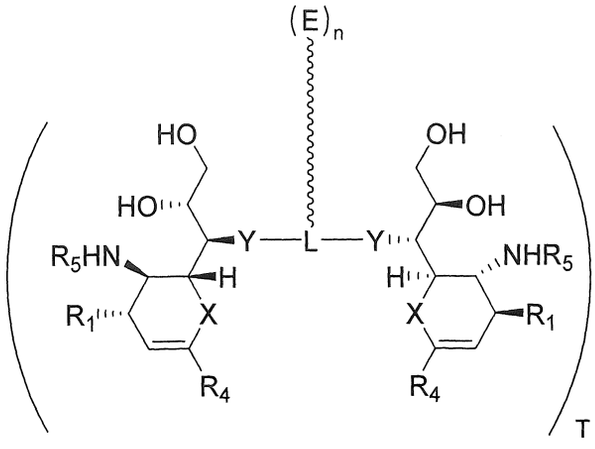
n bằng 1 hoặc 2;

T là số nguyên từ 1 đến 20; và

đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A1-L-A2 được gắn cộng hóa trị với E, hoặc muối dược dụng của nó.

4. Thể liên hợp theo phương án 3, trong đó mỗi A1 và mỗi A2 được mô tả bằng công thức (A-I) hoặc muối dược dụng của nó.

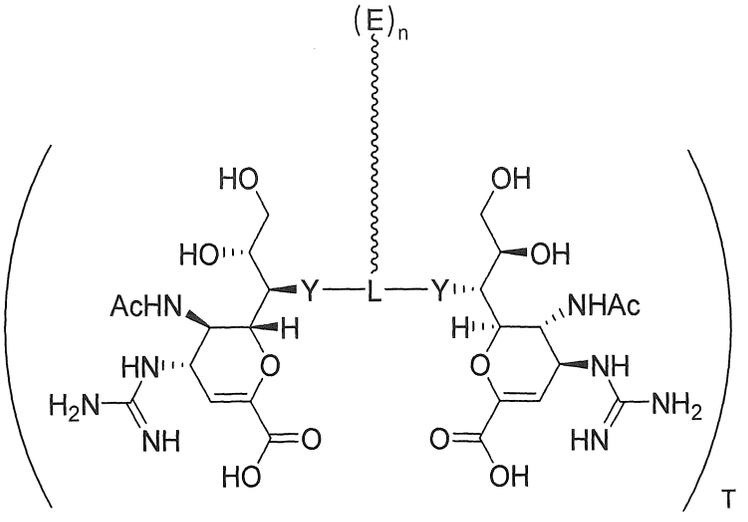
5. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-4, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II):



(D-II)

hoặc muối dược dụng của nó.

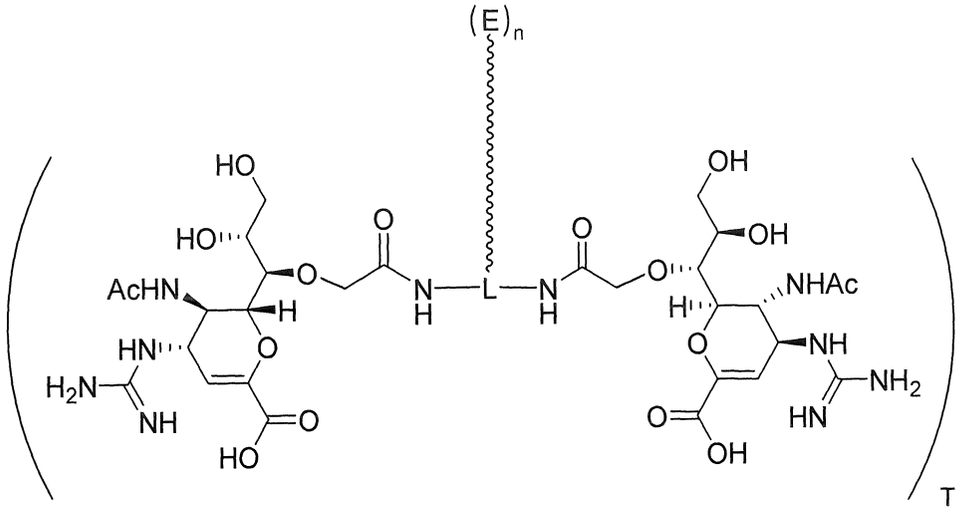
6. Thể liên hợp theo phương án 5, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-1):



(D-II-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

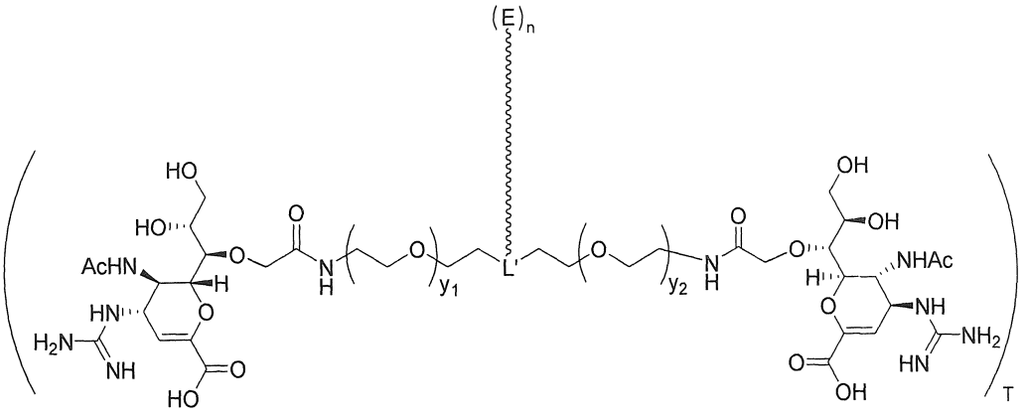
7. Thể liên hợp theo phương án 6, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-2):



(D-II-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

8. Thể liên hợp theo phương án 7, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-3):



(D-II-3)

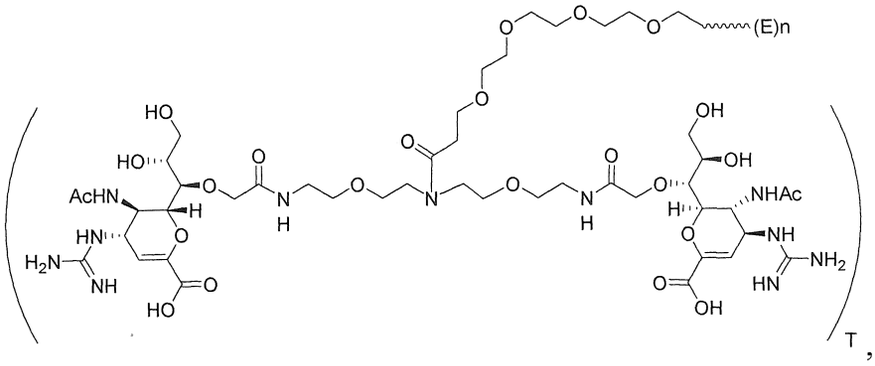
trong đó L' là phần còn lại của L, và

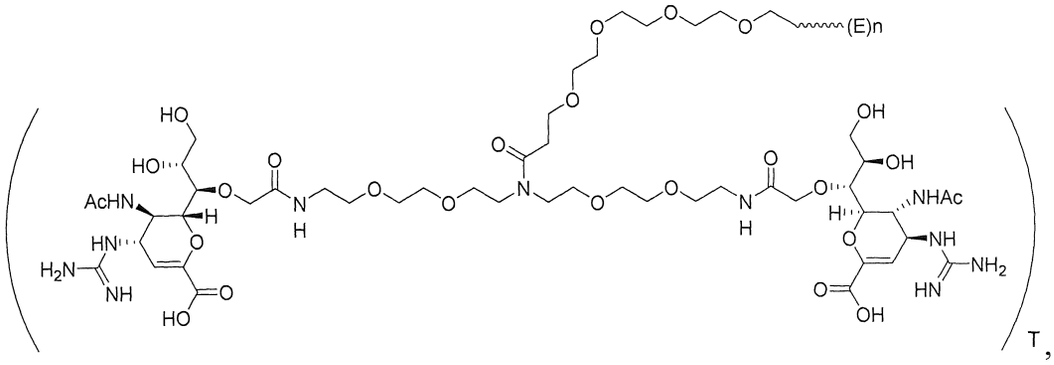
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

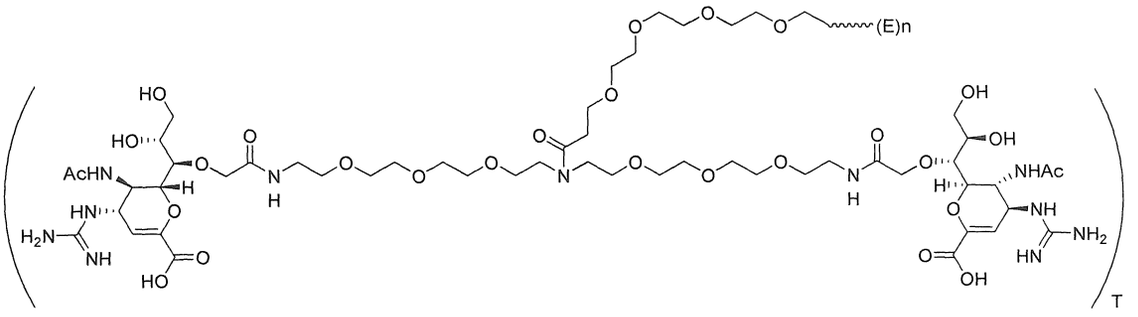
9. Thể liên hợp theo phương án 8, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

10. Thể liên hợp theo phương án 9, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc được chọn từ:

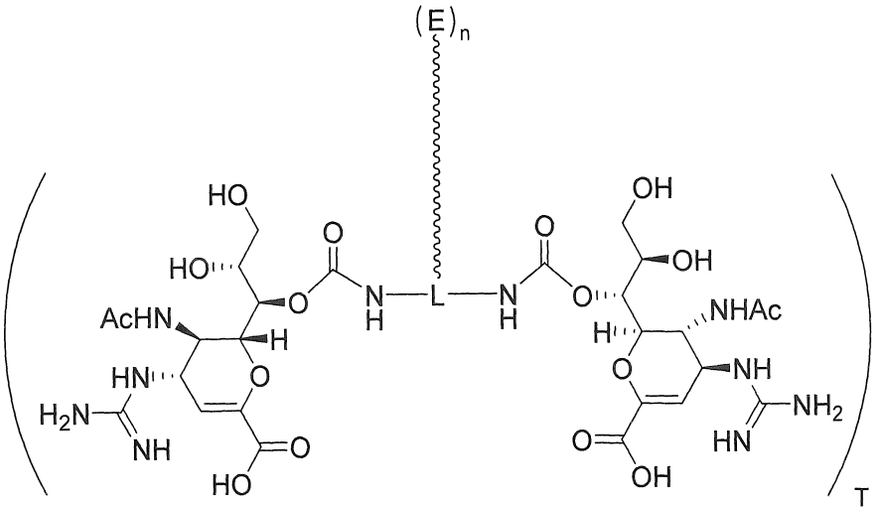




, hoặc



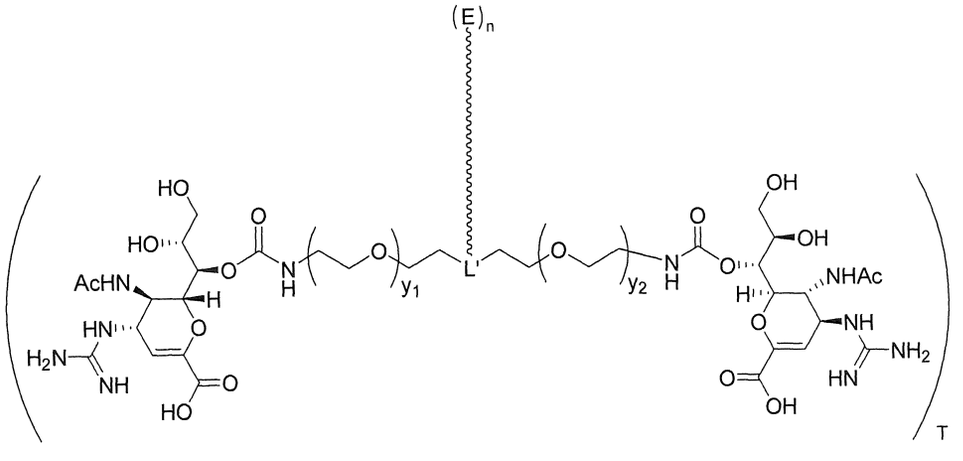
.11. Thể liên hợp theo phương án 6, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-4):



(D-II-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

12. Thể liên hợp theo phương án 11, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-5):



(D-II-5)

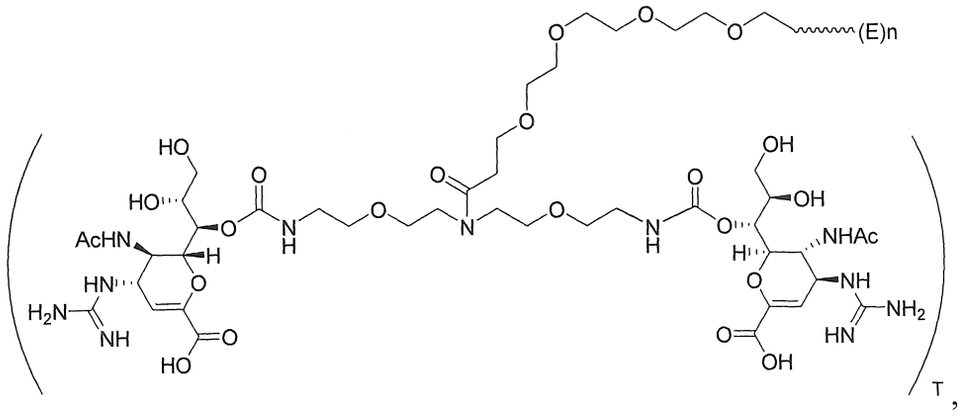
trong đó L' là phần còn lại của L, và

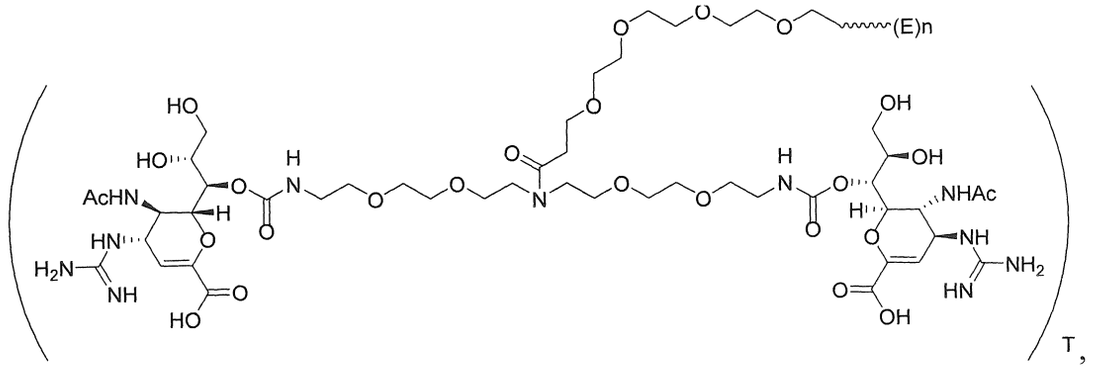
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

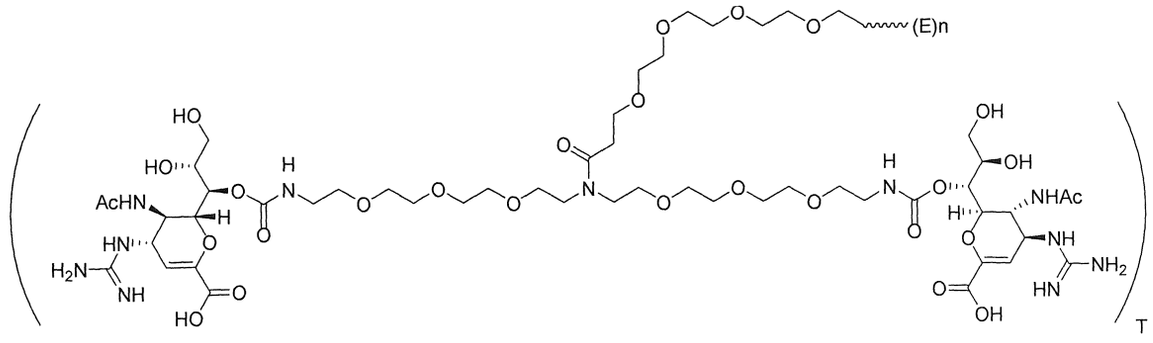
13. Thể liên hợp theo phương án 12, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

14. Thể liên hợp theo phương án 13, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc được chọn từ

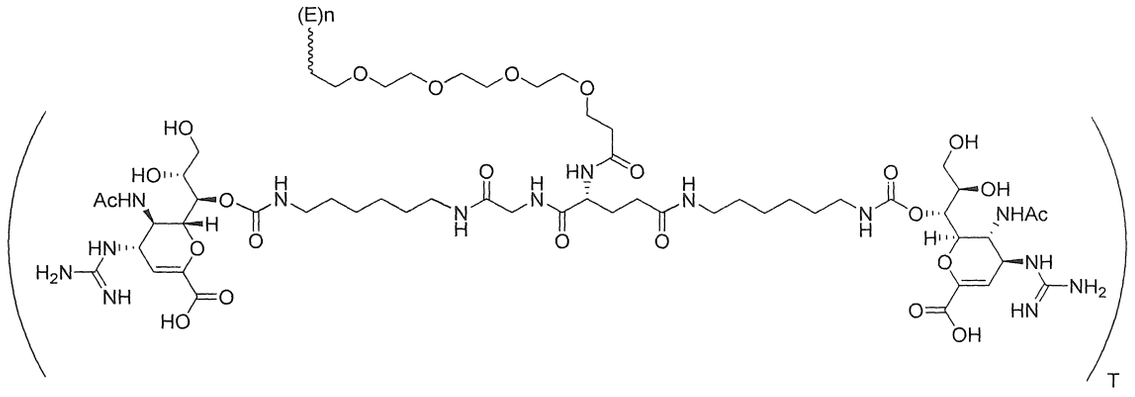




hoặc

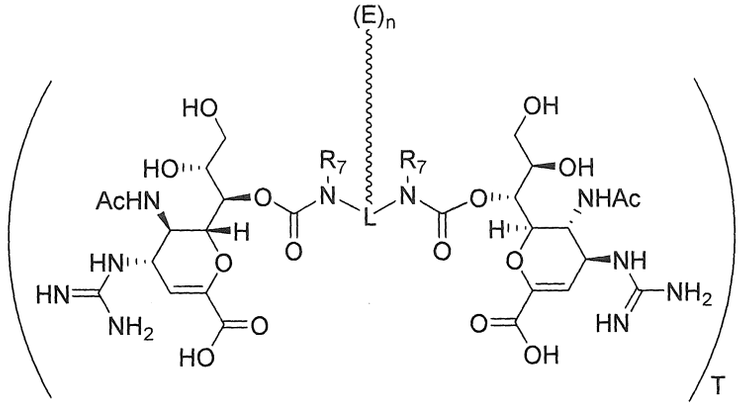


.15. Thể liên hợp theo phương án 11, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

16. Thể liên hợp theo phương án 6, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-6):



(D-II-6)

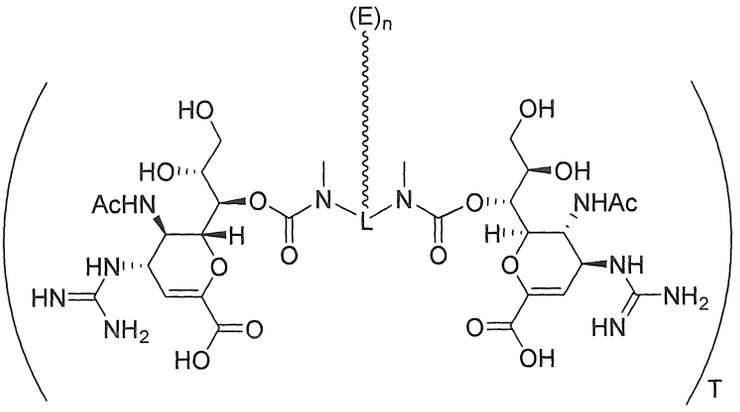
trong đó R7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

hoặc muối dược dụng của nó.

17. Thể liên hợp theo phương án 16, trong đó R7 được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

18. Thể liên hợp theo phương án 16 hoặc 17, trong đó R7 được chọn từ metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

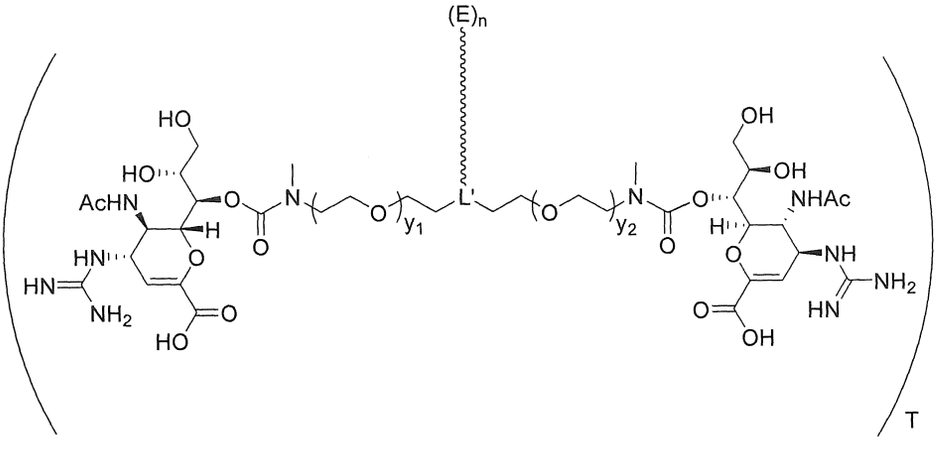
19. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 16-18, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-7):



(D-II-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

20. Thể liên hợp theo phương án 19, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-8):



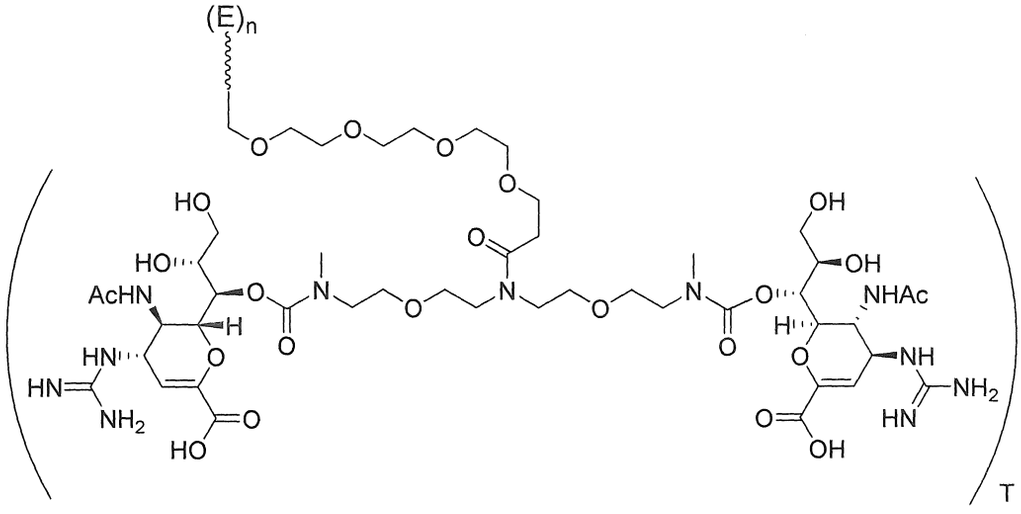
(D-II-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

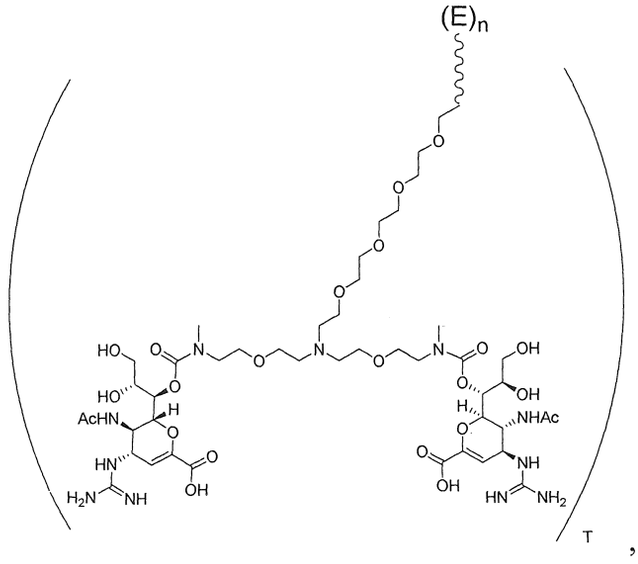
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

21. Thể liên hợp theo phương án 20, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



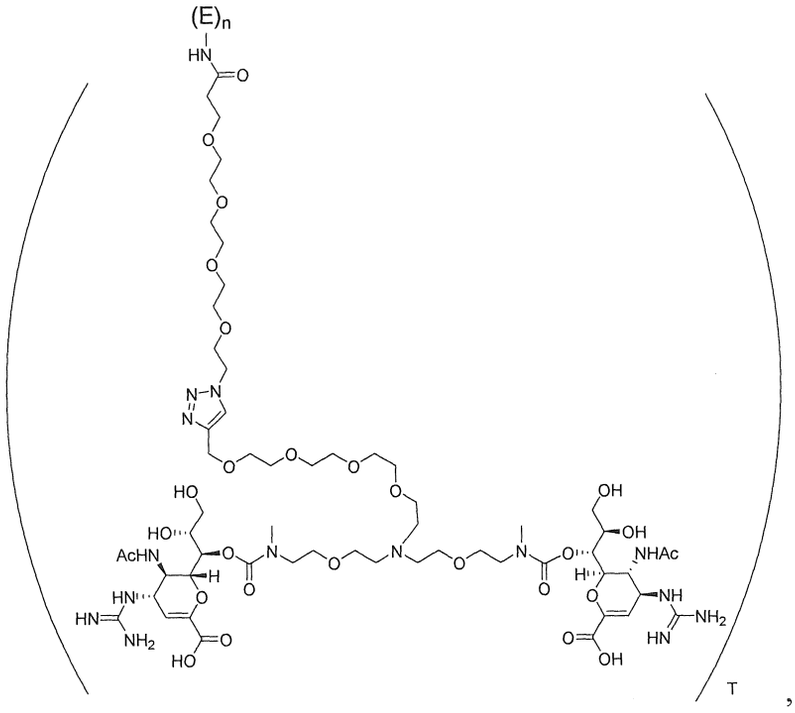
, hoặc



,

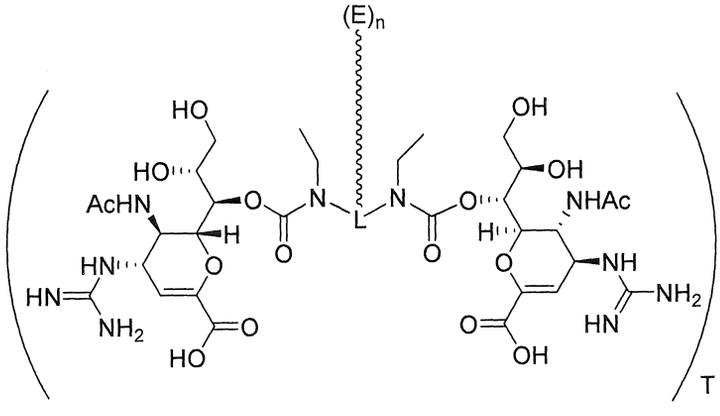
hoặc muối dược dụng của nó.

22. Thể liên hợp theo phương án 21, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng



hoặc muối dược dụng của nó.

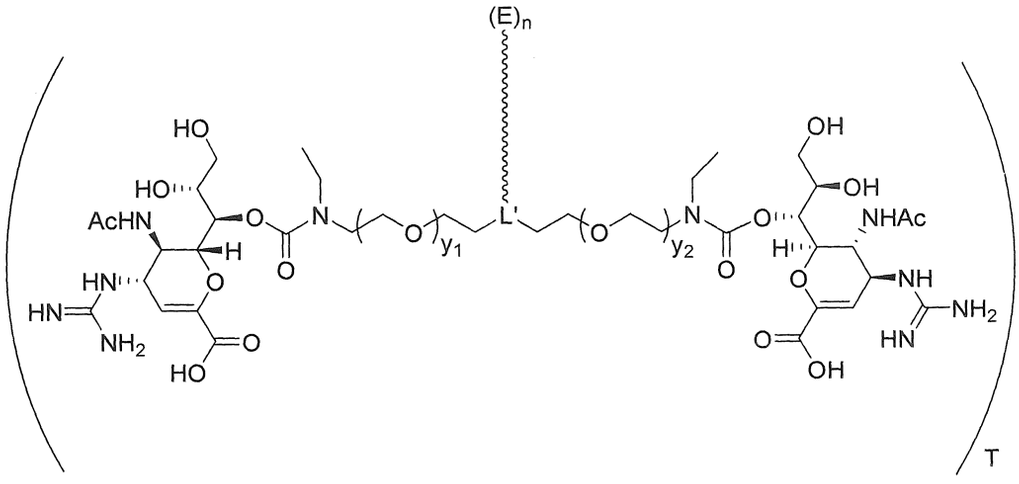
23. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 16-18, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-9):



(D-II-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

24. Thể liên hợp theo phương án 23, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-10):



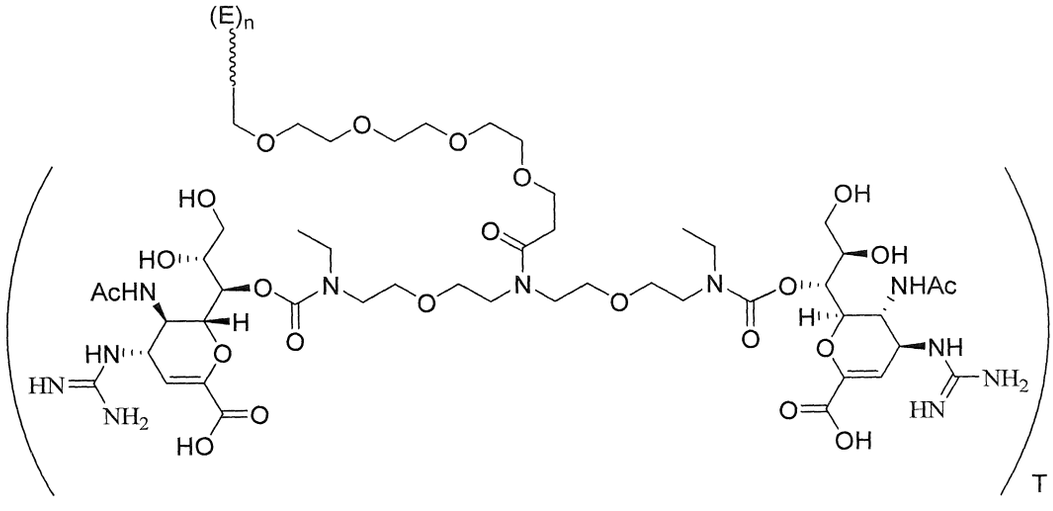
(D-II-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

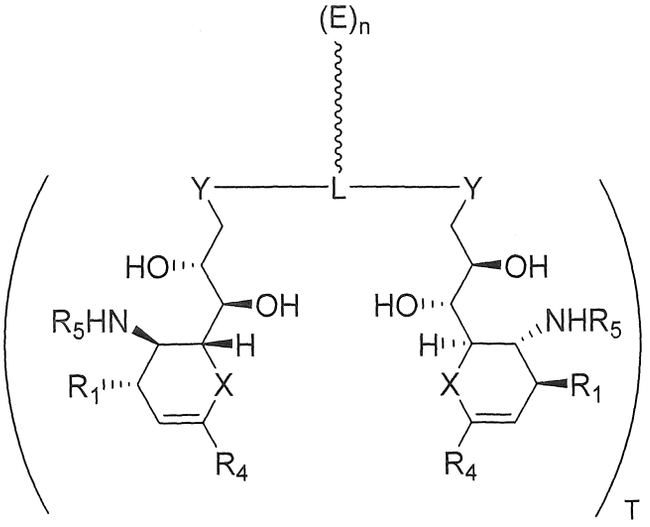
hoặc muối dược dụng của nó.

25. Thể liên hợp theo phương án 24, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc



hoặc muối dược dụng của nó.

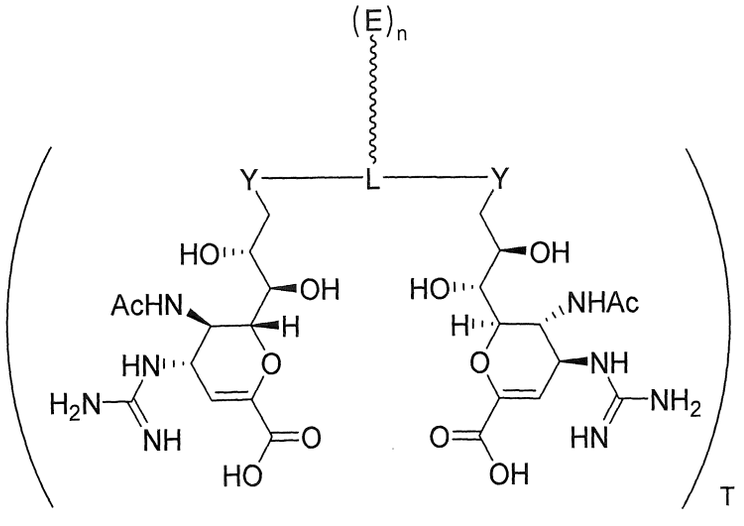
26. Thể liên hợp theo phương án 2 hoặc 3, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III):



(D-III)

hoặc muối dược dụng của nó.

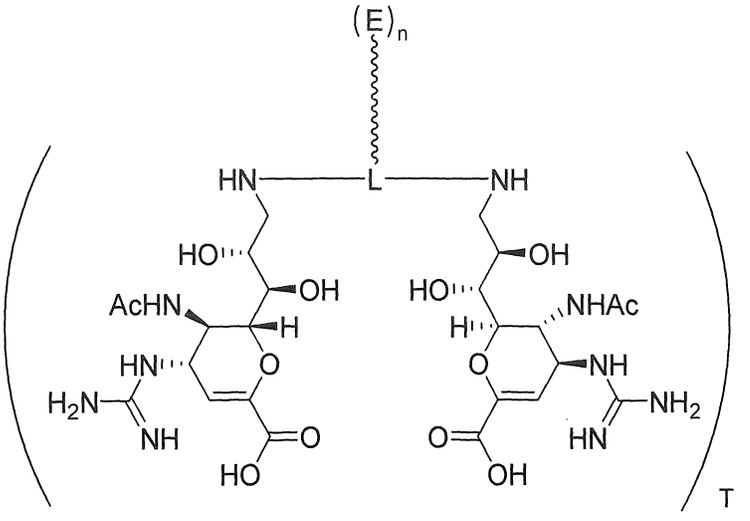
27. Thể liên hợp theo phương án 26, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-1):



(D-III-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

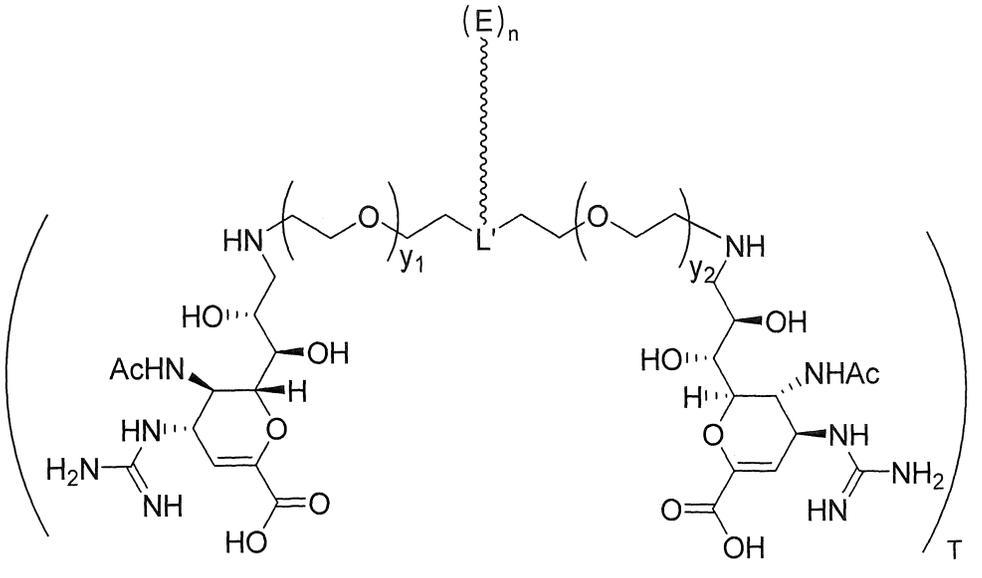
28. Thể liên hợp theo phương án 27, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-2):



(D-III-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

29. Thể liên hợp theo phương án 28, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-3):



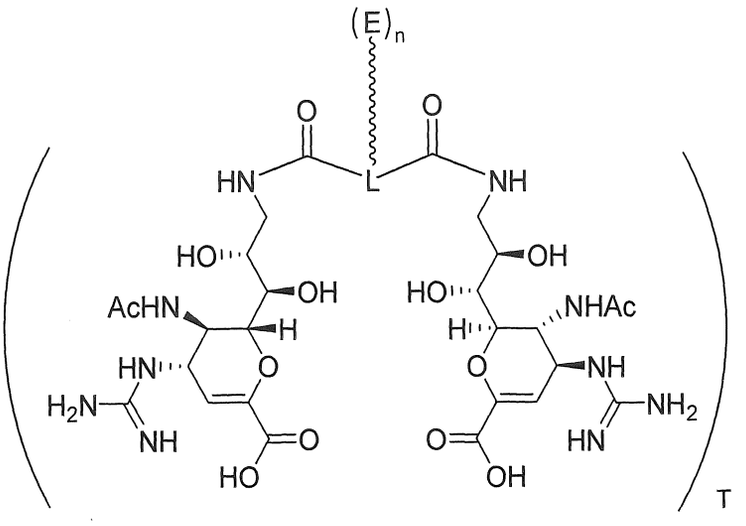
(D-III-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

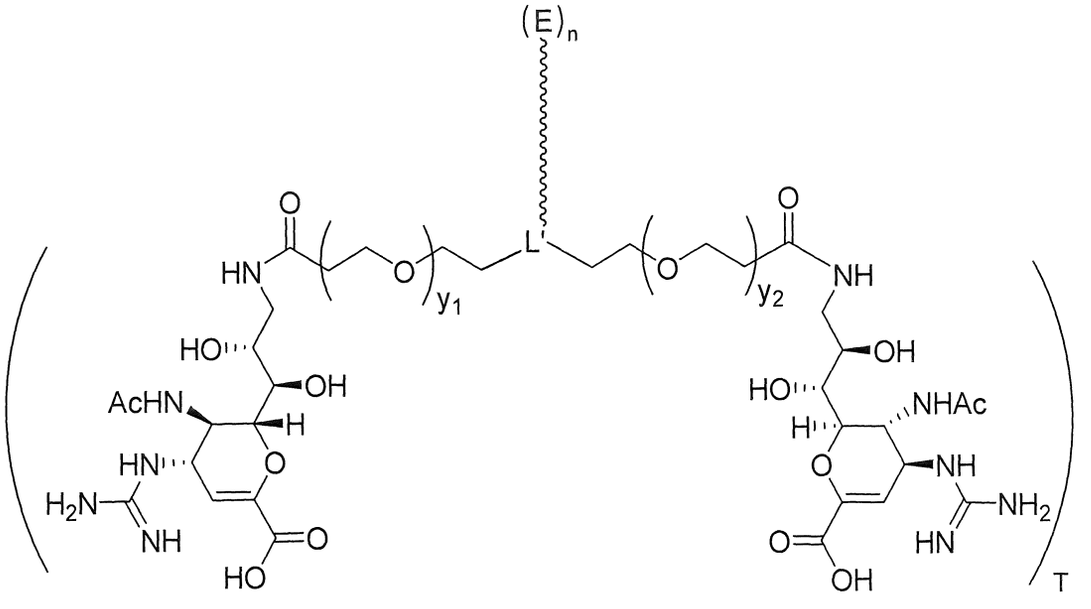
30. Thể liên hợp theo phương án 27, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-4):



(D-III-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

31. Thể liên hợp theo phương án 30, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-5):



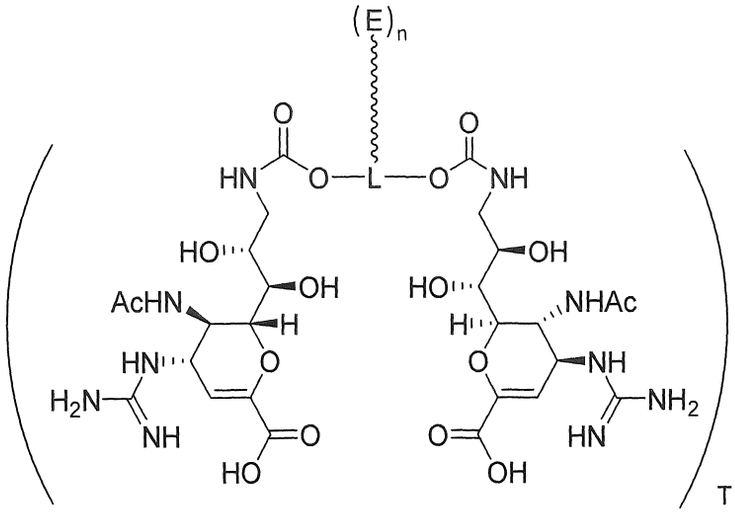
(D-III-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

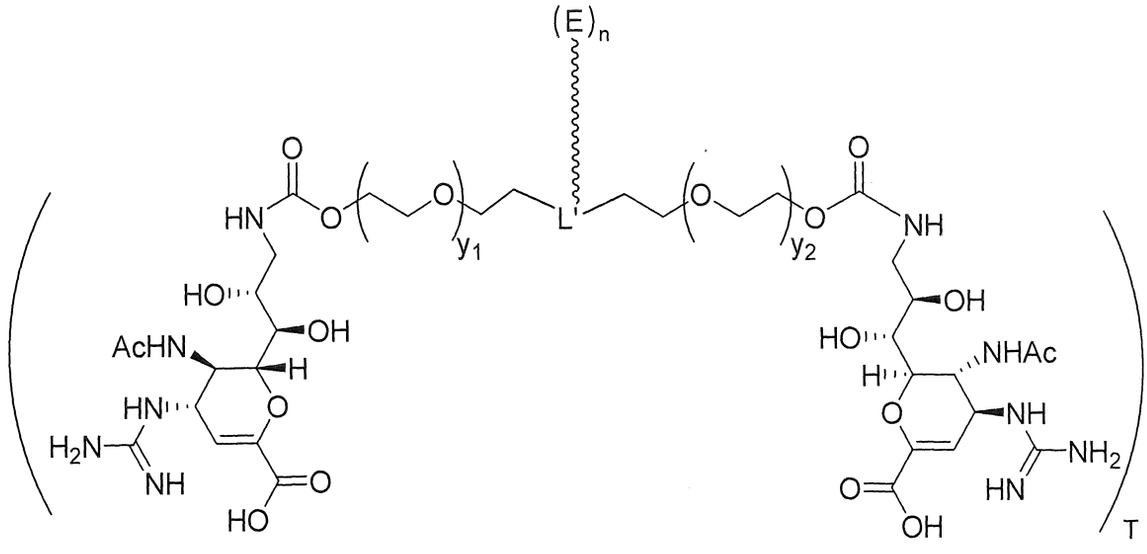
32. Thể liên hợp theo phương án 27, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-6):



(D-III-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

33. Thể liên hợp theo phương án 32, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-7):



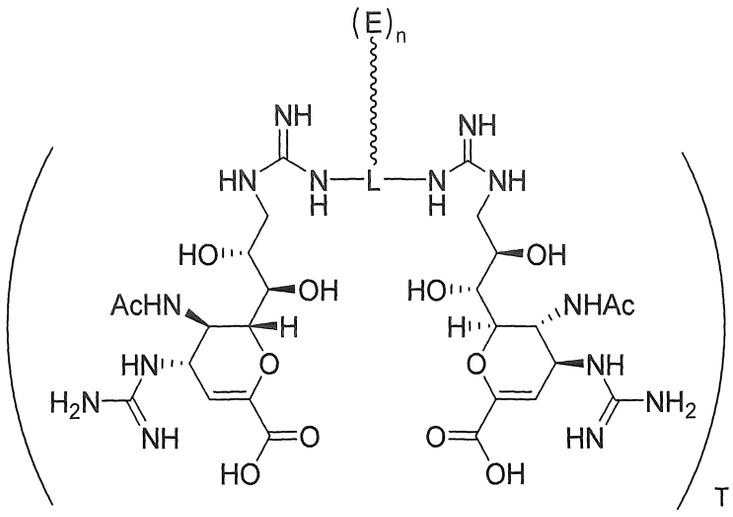
(D-III-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

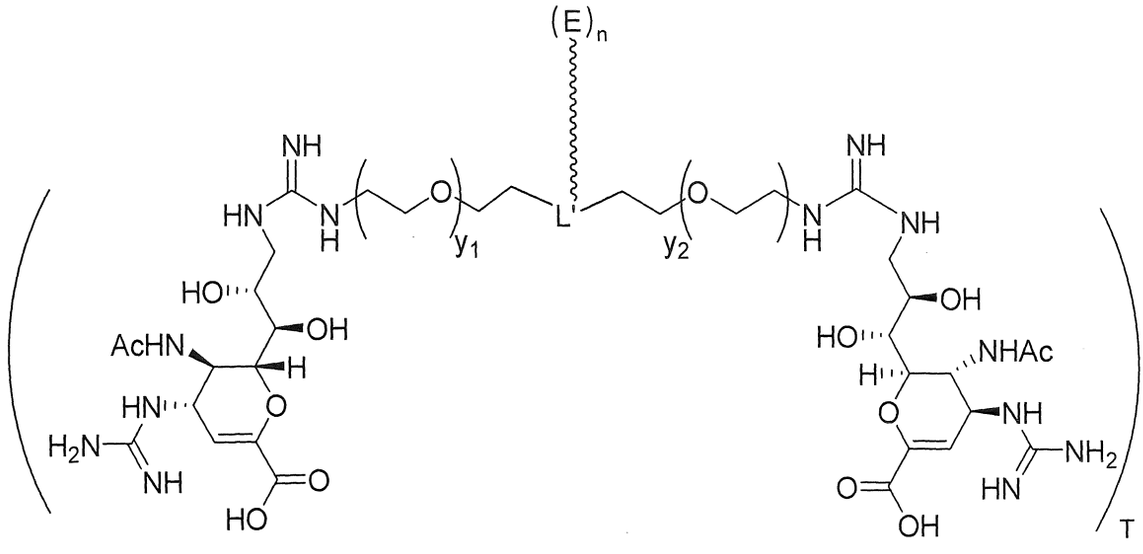
34. Thể liên hợp theo phương án 27, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-8):



(D-III-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

35. Thể liên hợp theo phương án 34, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-III-9):



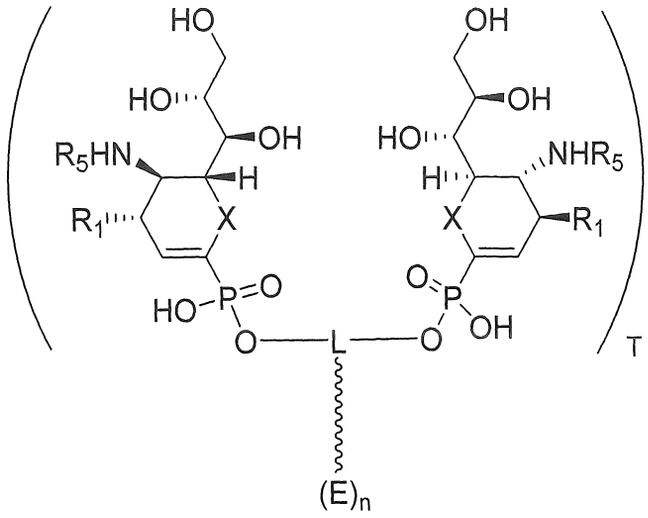
(D-III-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và3

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

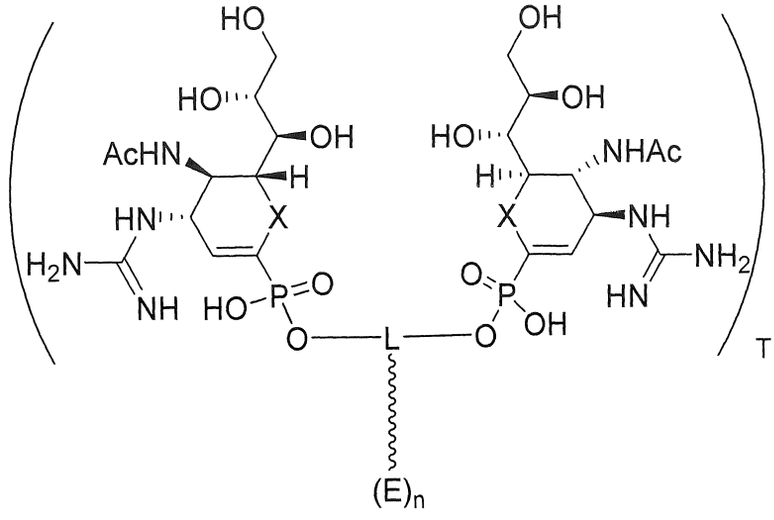
36. Thể liên hợp theo phương án 2, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IV):



(D-IV)

hoặc muối dược dụng của nó.

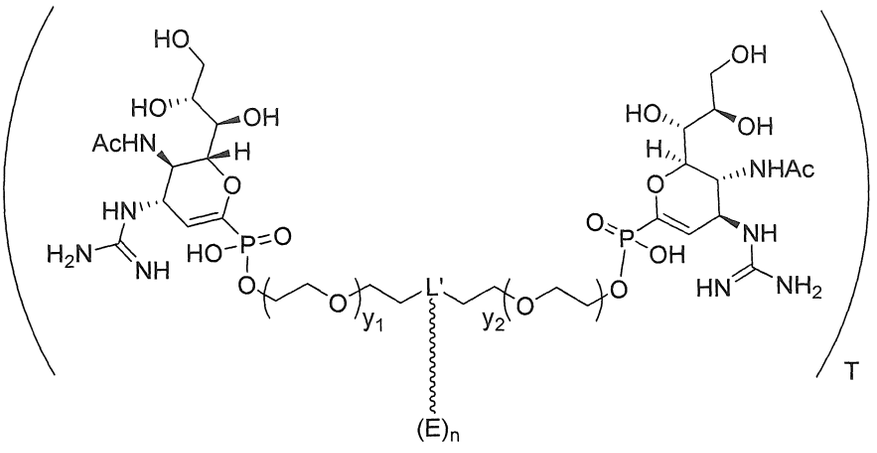
37. Thể liên hợp theo phương án 36, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IV-1):



(D-IV-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

38. Thể liên hợp theo phương án 37, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IV-2):



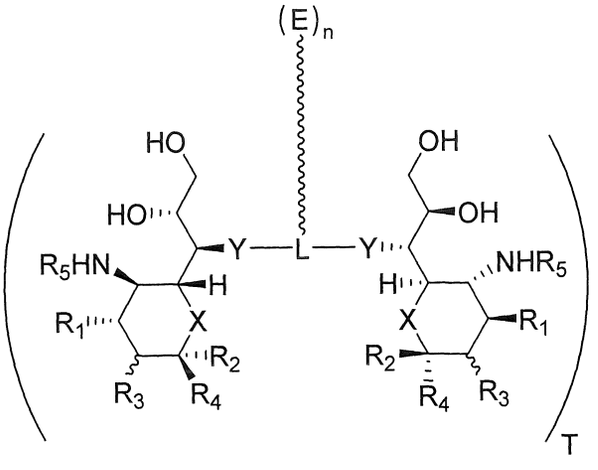
(D-IV-2)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

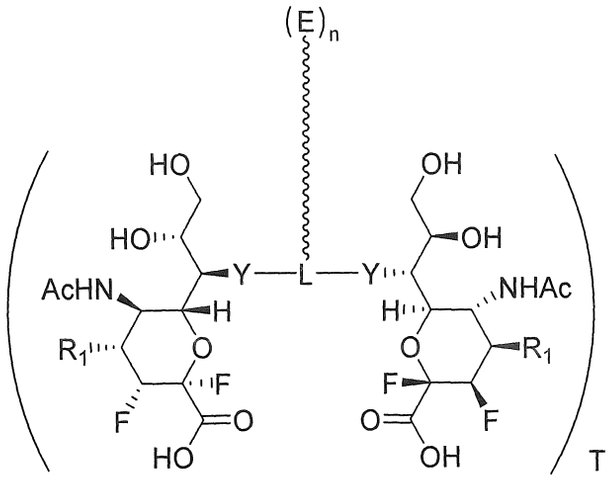
39. Thể liên hợp theo phương án 2 hoặc 3, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V):



(D-V)

hoặc muối dược dụng của nó.

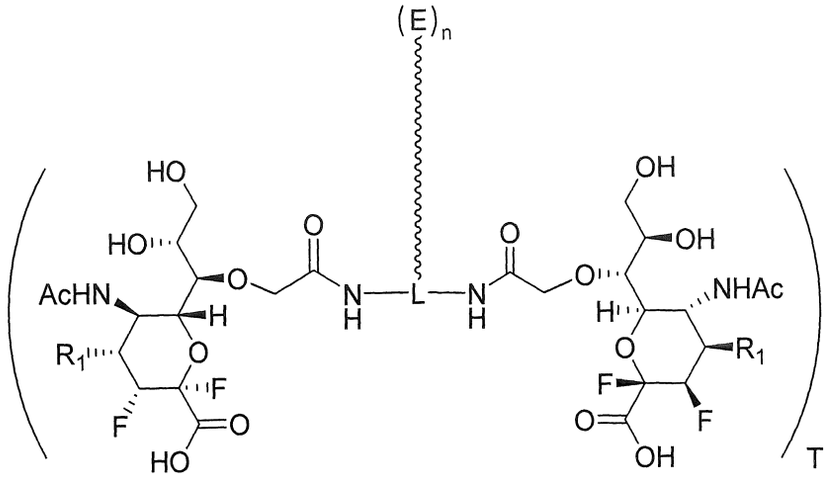
40. Thể liên hợp theo phương án 39, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-1):



(D-V-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

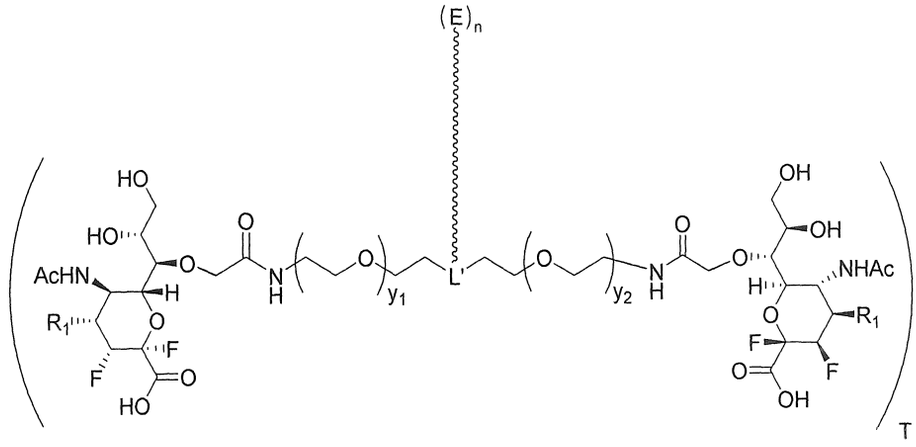
41. Thể liên hợp theo phương án 40, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-2):



(D-V-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

42. Thể liên hợp theo phương án 41, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-3):



(D-V-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

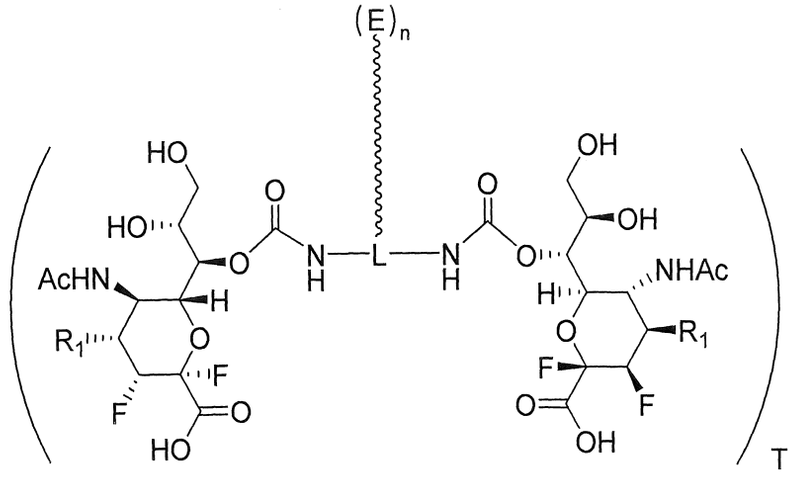
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

43. Thể liên hợp theo phương án 42, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

44. Thể liên hợp theo phương án 42, trong đó mỗi y1 và y2 bằng 1, mỗi y1 và y2 bằng 2, hoặc mỗi y1 và y2 bằng 3.

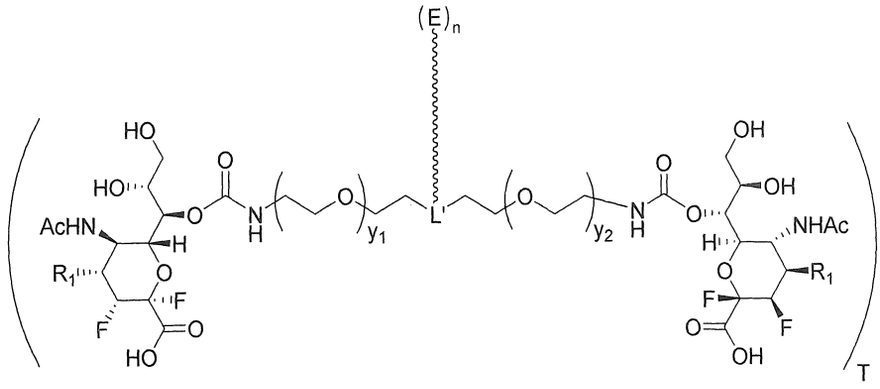
45. Thể liên hợp theo phương án 40, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-4):



(D-V-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

46. Thể liên hợp theo phương án 45, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-5):



(D-V-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

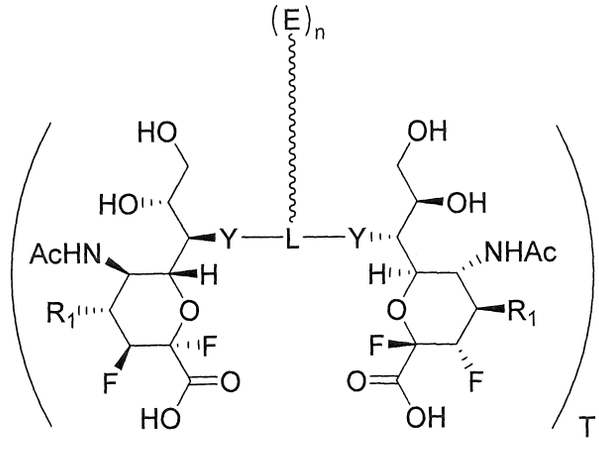
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

47. Thể liên hợp theo phương án 46, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

48. Thể liên hợp theo phương án 46, trong đó mỗi y1 và y2 bằng 1, mỗi y1 và y2 bằng 2, hoặc mỗi y1 và y2 bằng 3.

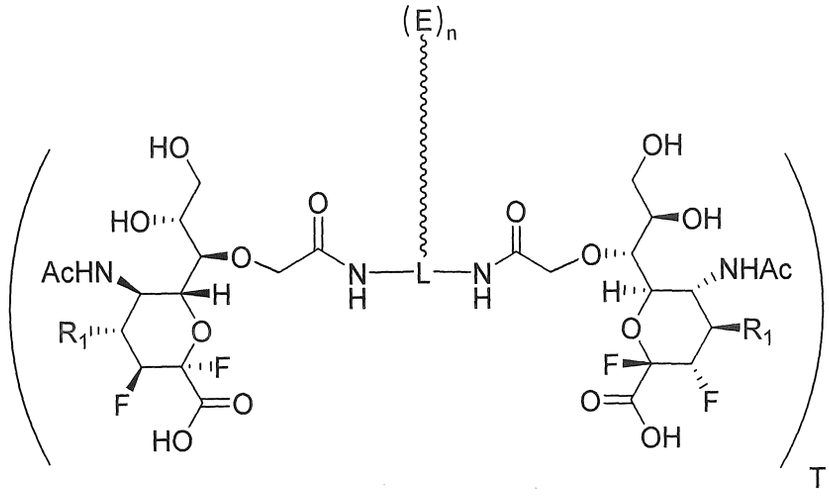
49. Thể liên hợp theo phương án 39, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-6):



(D-V-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

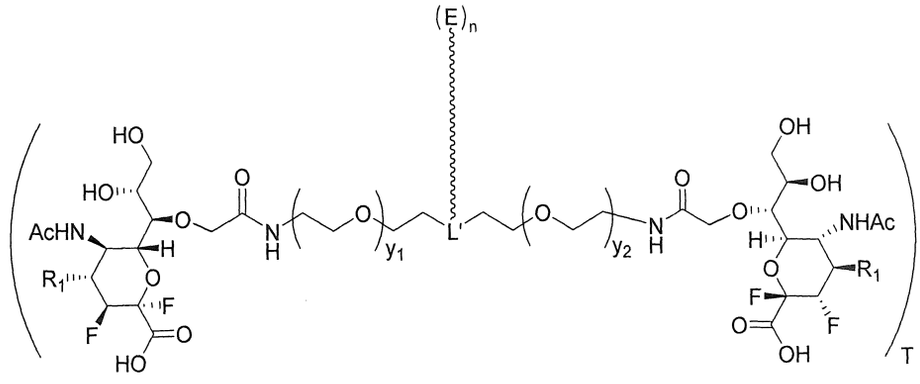
50. Thể liên hợp theo phương án 49, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-7):



(D-V-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

51. Thể liên hợp theo phương án 50, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-8):



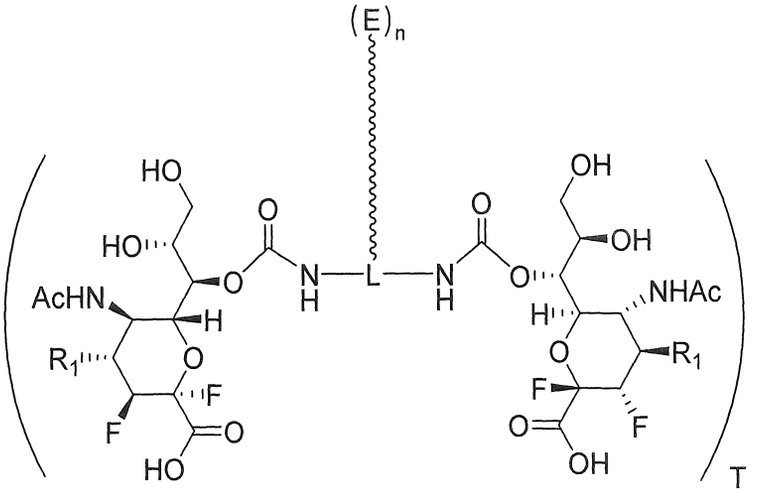
(D-V-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,
hoặc muối dược dụng của nó.

52. Thể liên hợp theo phương án 51, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

53. Thể liên hợp theo phương án 51, trong đó mỗi y1 và y2 bằng 1, mỗi y1 và y2 bằng 2, hoặc mỗi y1 và y2 bằng 3.

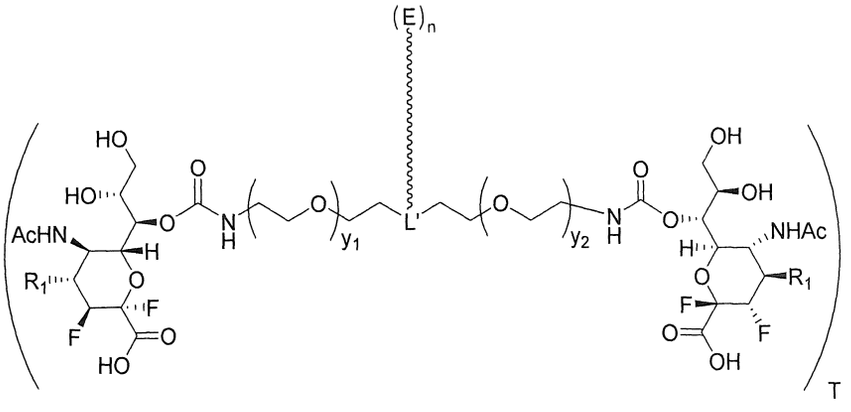
54. Thể liên hợp theo phương án 49, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-9):



(D-V-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

55. Thể liên hợp theo phương án 51, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-V-10):



(D-V-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

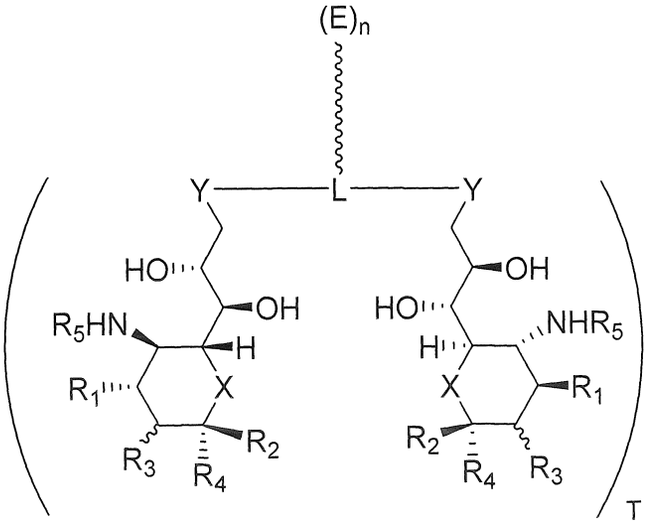
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

56. Thể liên hợp theo phương án 55, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

57. Thể liên hợp theo phương án 56, trong đó mỗi y1 và y2 bằng 1, mỗi y1 và y2 bằng 2, hoặc mỗi y1 và y2 bằng 3.

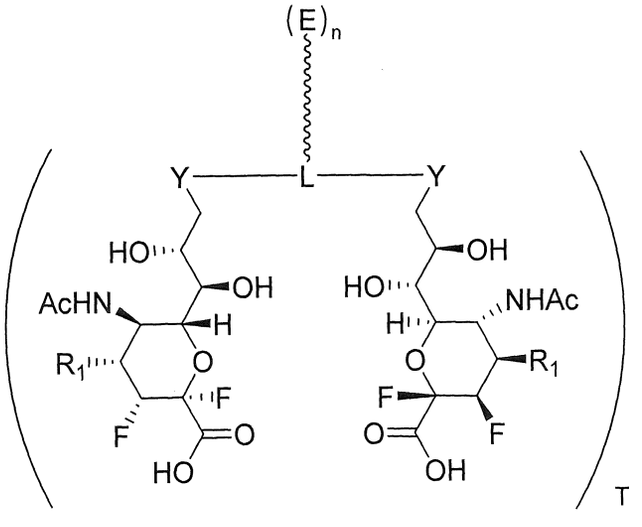
58. Thể liên hợp theo phương án 2 hoặc 3, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI):



(D-VI)

hoặc muối dược dụng của nó.

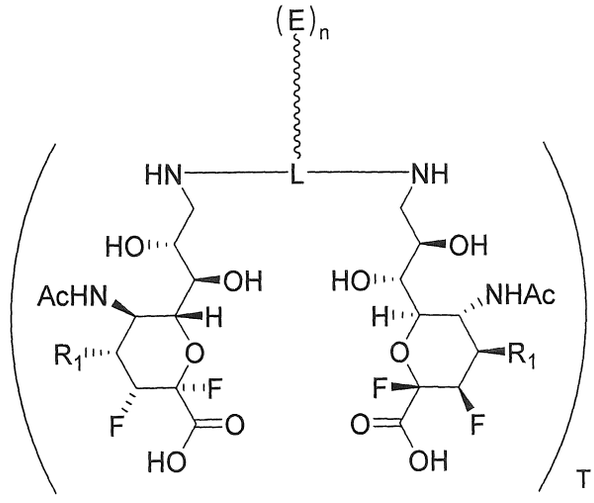
59. Thể liên hợp theo phương án 58, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-1):



(D-VI-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

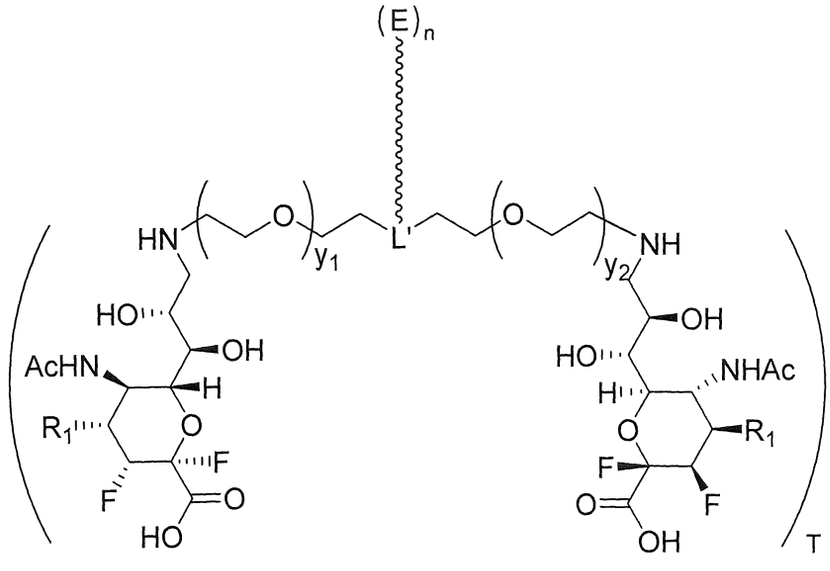
60. Thể liên hợp theo phương án 59, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-2):



(D-VI-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

61. Thể liên hợp theo phương án 60, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-3):



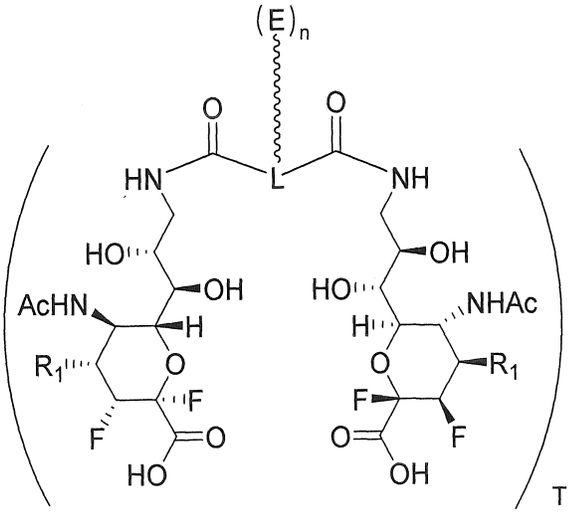
(D-VI-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

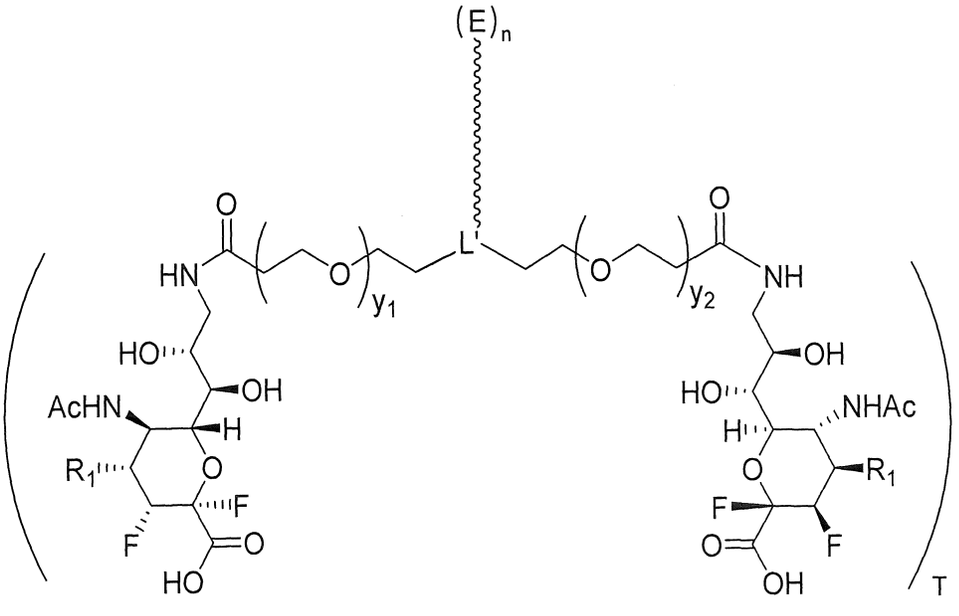
62. Thể liên hợp theo phương án 59, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-4):



(D-VI-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

63. Thể liên hợp theo phương án 62, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-5):



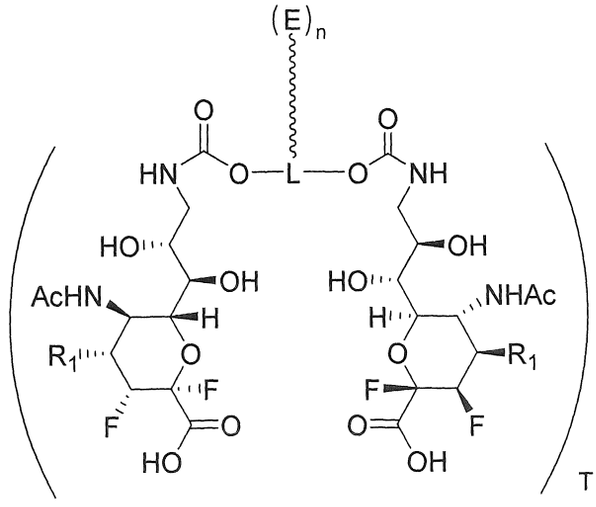
(D-VI-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

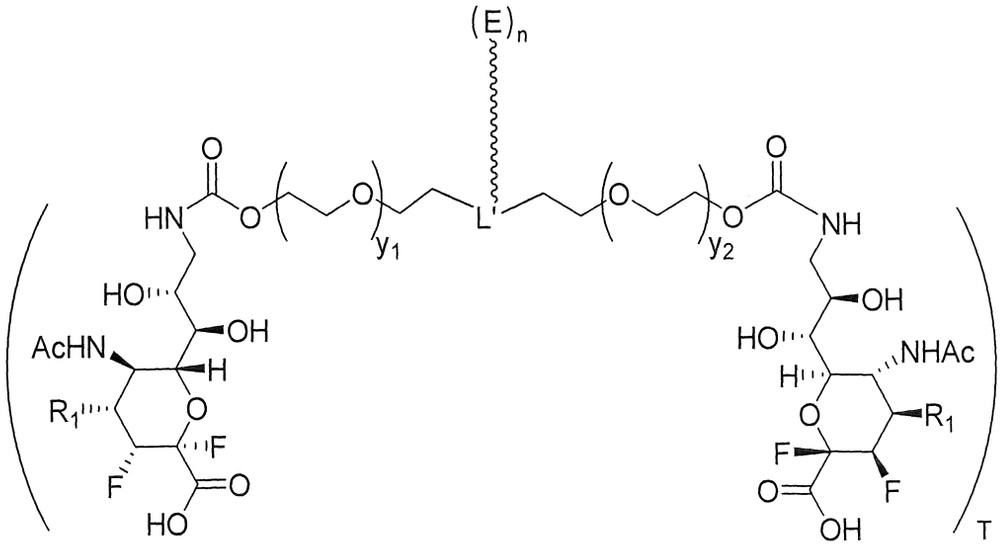
64. Thể liên hợp theo phương án 59, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-6):



(D-VI-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

65. Thể liên hợp theo phương án 64, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-7):



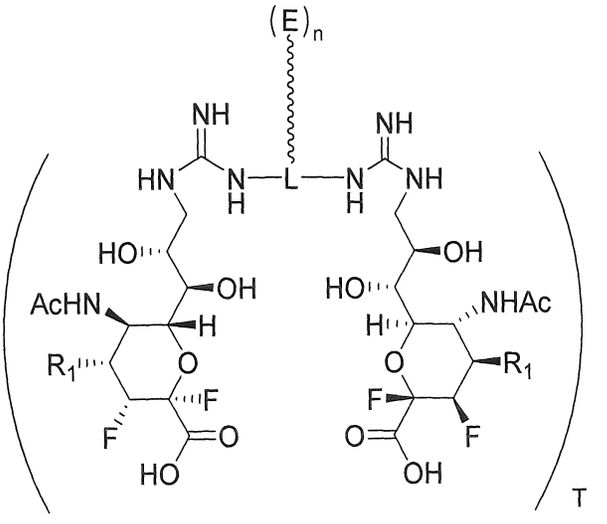
(D-VI-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

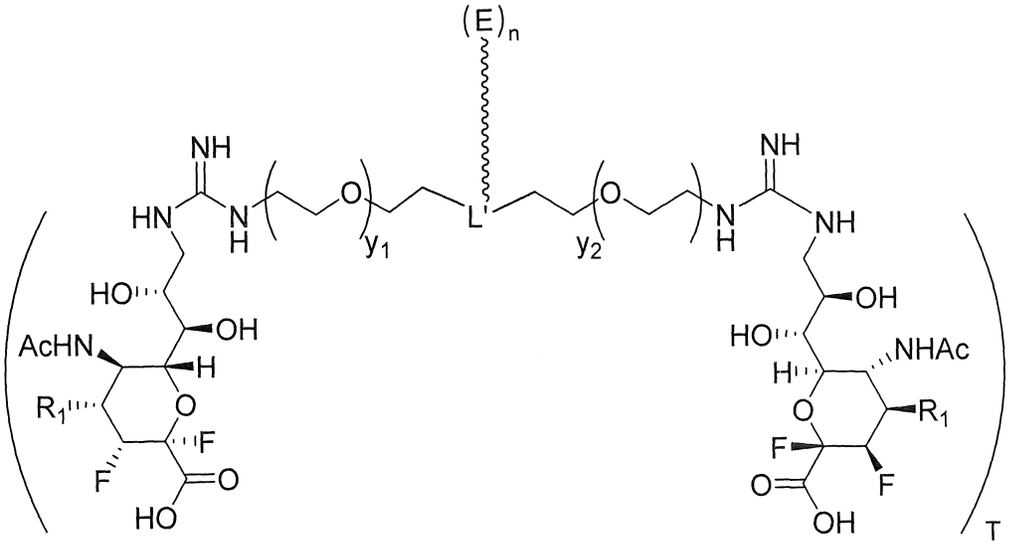
66. Thể liên hợp theo phương án 59, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-8):



(D-VI-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

67. Thể liên hợp theo phương án 66, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VI-9):

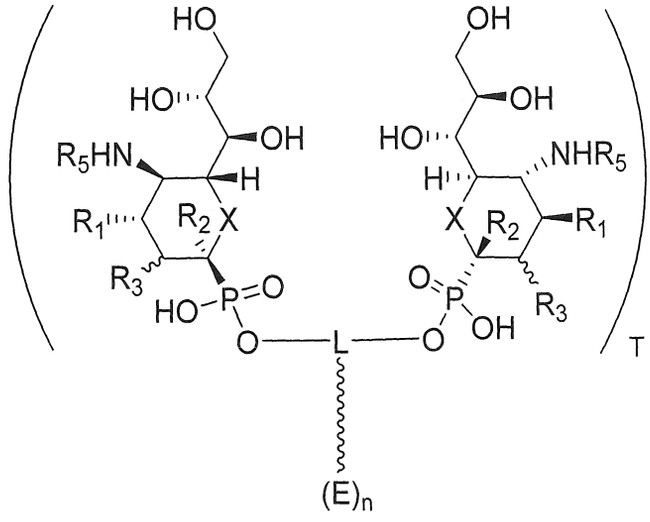


(D-VI-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và3

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,
hoặc muối dược dụng của nó.

68. Thể liên hợp theo phương án 2 hoặc 3, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VII):



(D-VII)

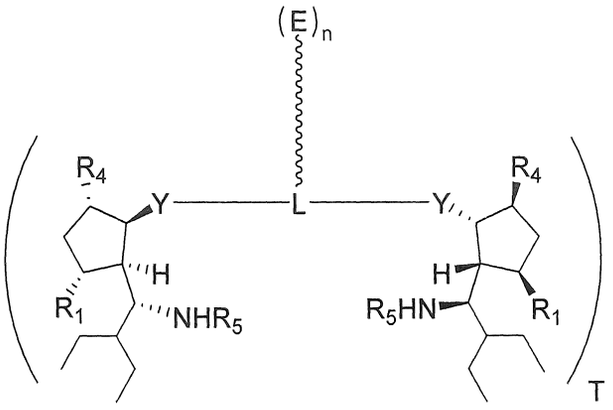
hoặc muối dược dụng của nó.

69. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 39-68 trong đó R1 là -OH.

70. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 39-68 trong đó R1 là -NH2.

71. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 39-68 trong đó R1 là -NHC(=NH)NH2.

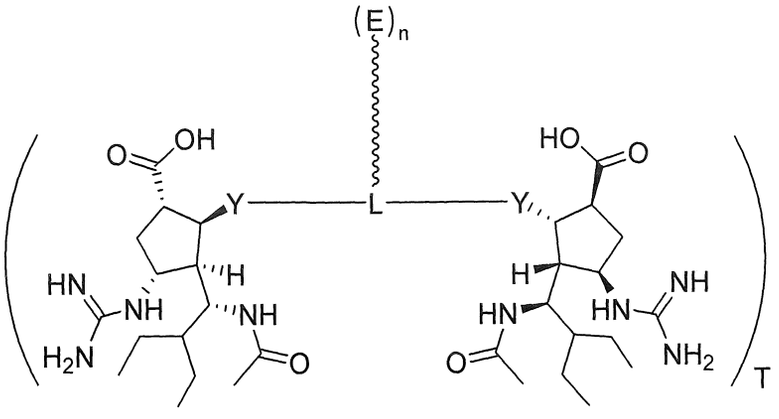
72. Thể liên hợp theo phương án 2, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII):



(D-VIII)

hoặc muối dược dụng của nó.

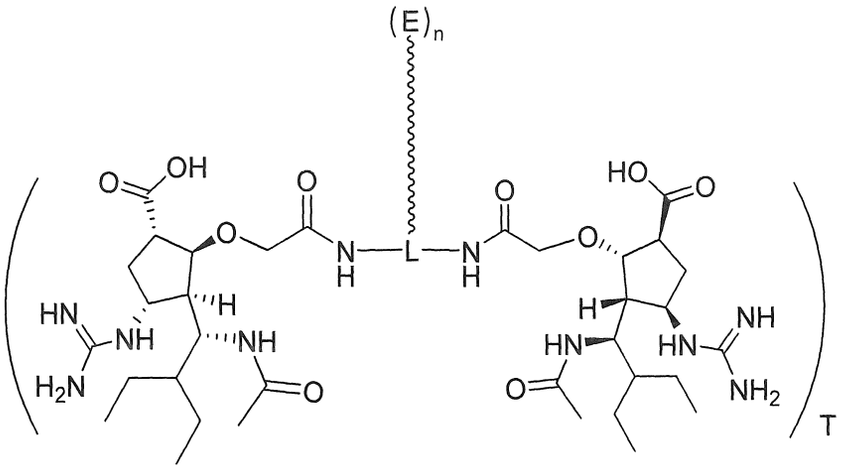
73. Thể liên hợp theo phương án 72, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-1):



(D-VIII-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

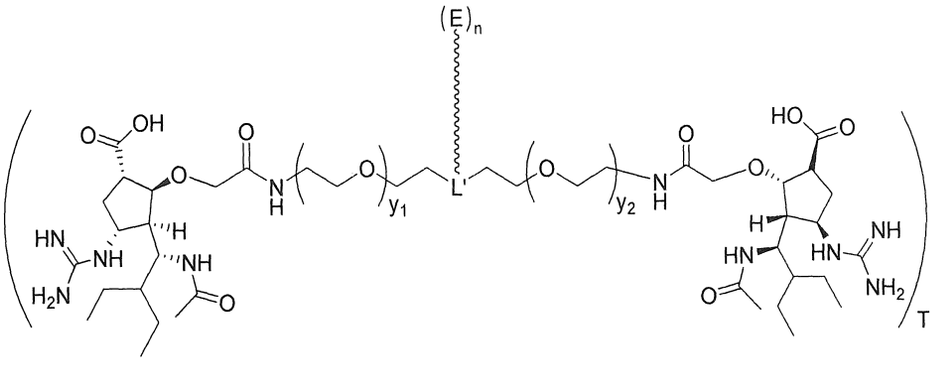
74. Thể liên hợp theo phương án 73, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-2):



(D-VIII-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

75. Thể liên hợp theo phương án 74, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-3):



(D-VIII-3)

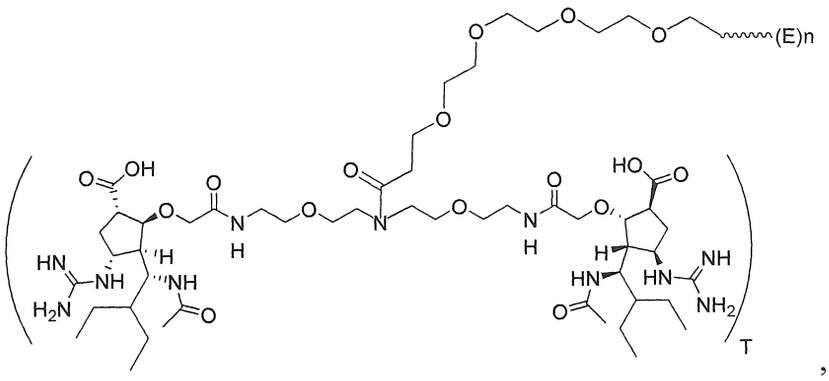
trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

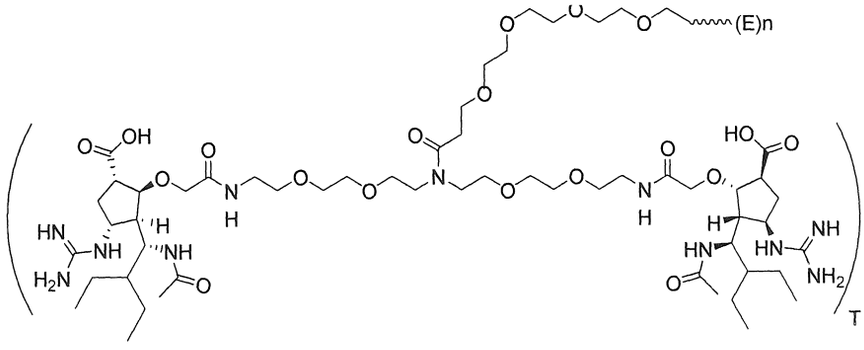
hoặc muối dược dụng của nó.

76. Thể liên hợp theo phương án 75, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

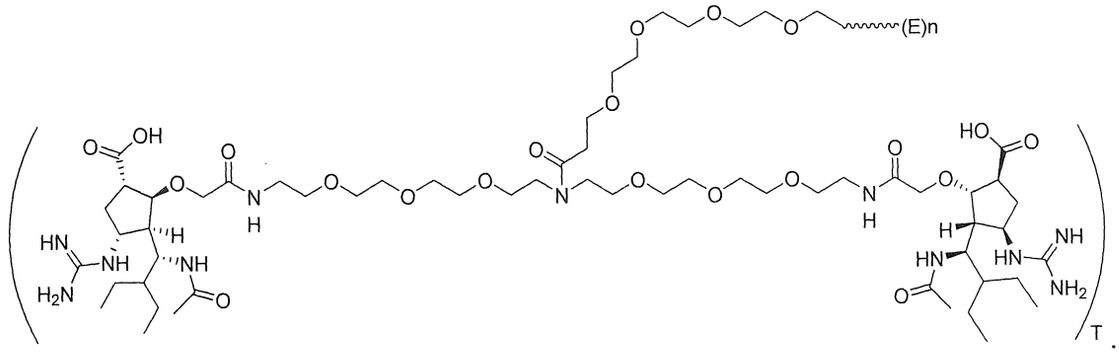
77. Thể liên hợp theo phương án 75, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc được chọn từ



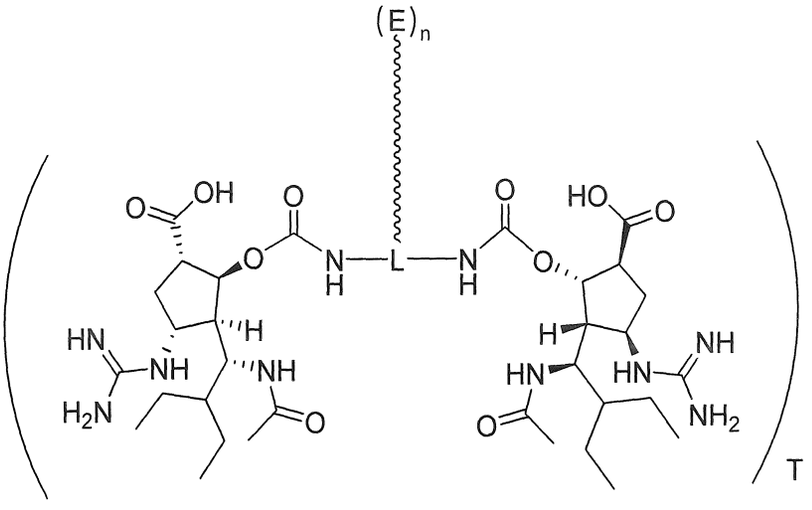
,



, hoặc



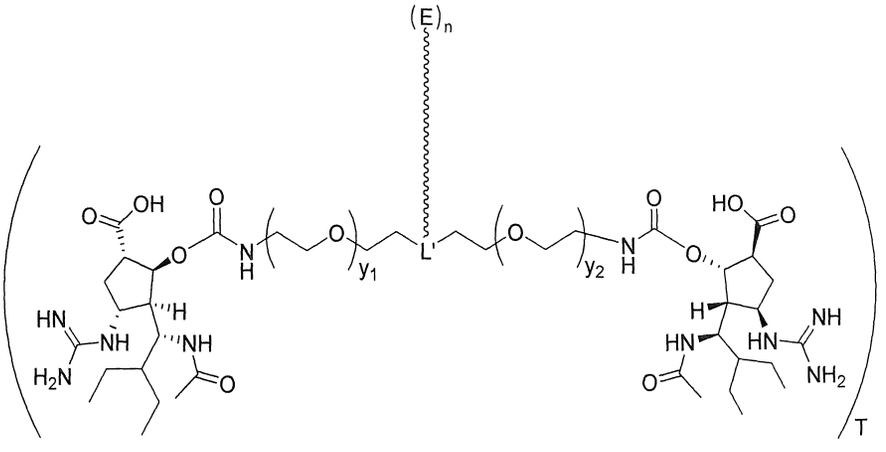
78. Thể liên hợp theo phương án 73, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-4):



(D-VIII-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

79. Thể liên hợp theo phương án 78, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-5):

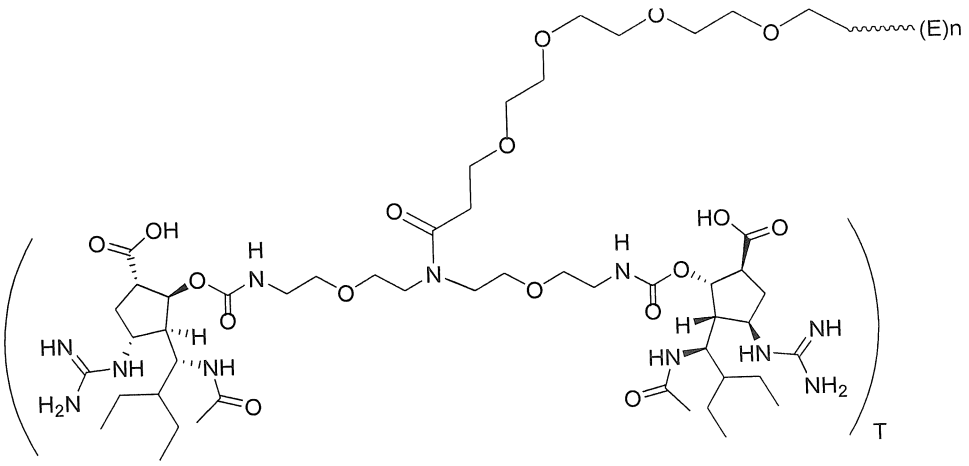


(D-VIII-5)

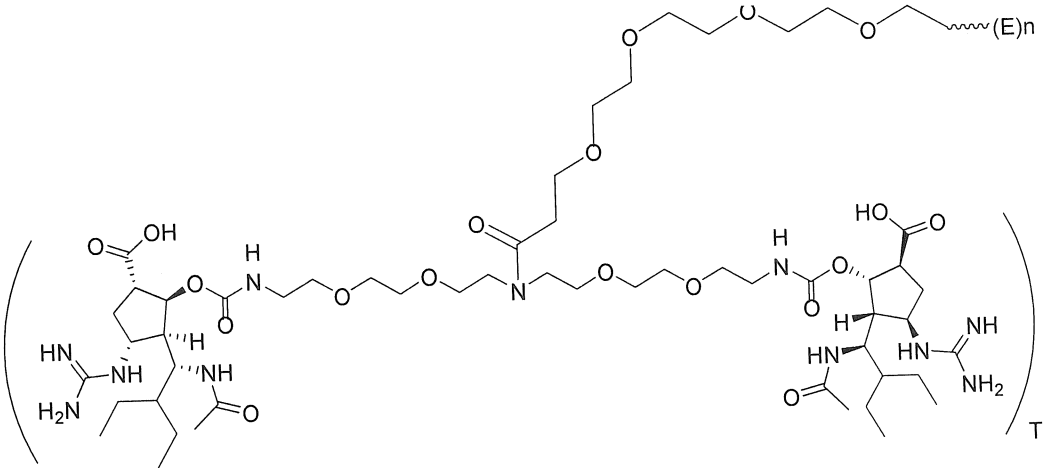
trong đó L' là phần còn lại của L, và
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,
hoặc muối dược dụng của nó.

80. Thể liên hợp theo phương án 79, trong đó L' là nguyên tử nitơ.

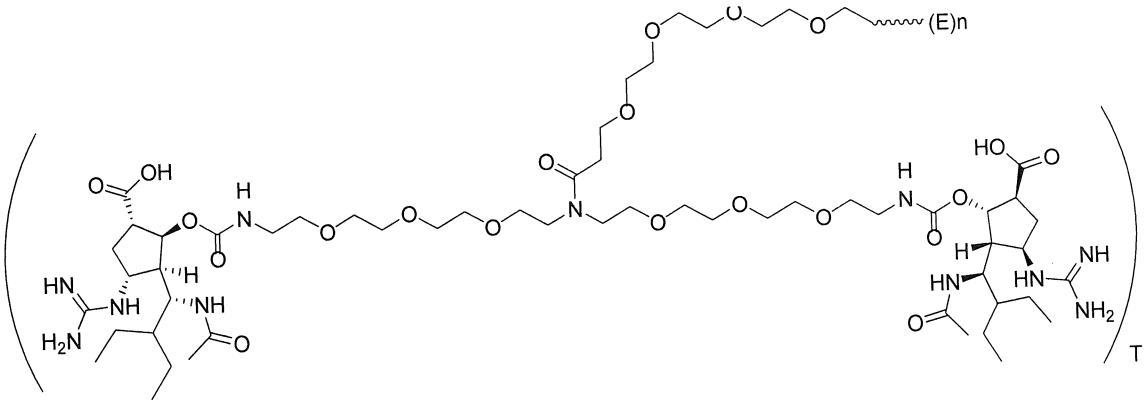
81. Thể liên hợp theo phương án 79, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc được chọn từ



,

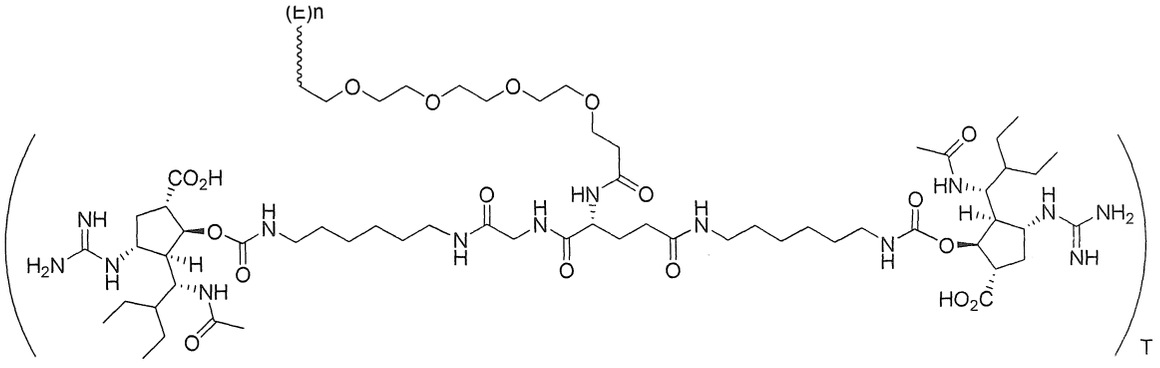


, hoặc



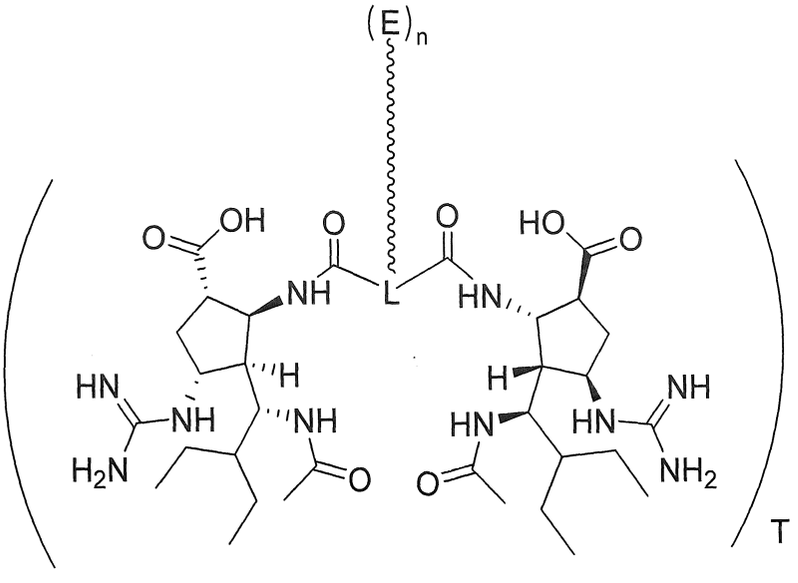
.

82. Thể liên hợp theo phương án 78, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng cấu trúc



.

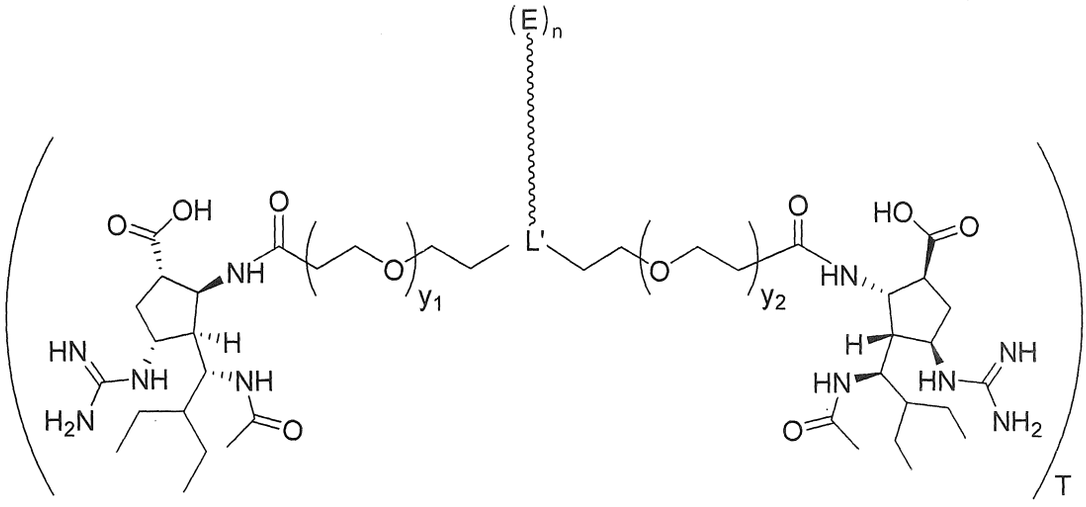
83. Thể liên hợp theo phương án 73, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-6):



(D-VIII-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

84. Thể liên hợp theo phương án 83, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-7):



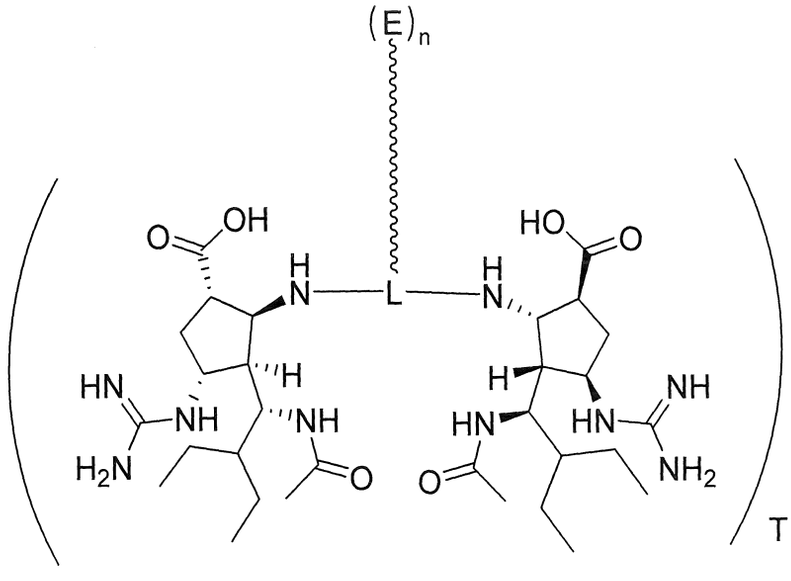
(D-VIII-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

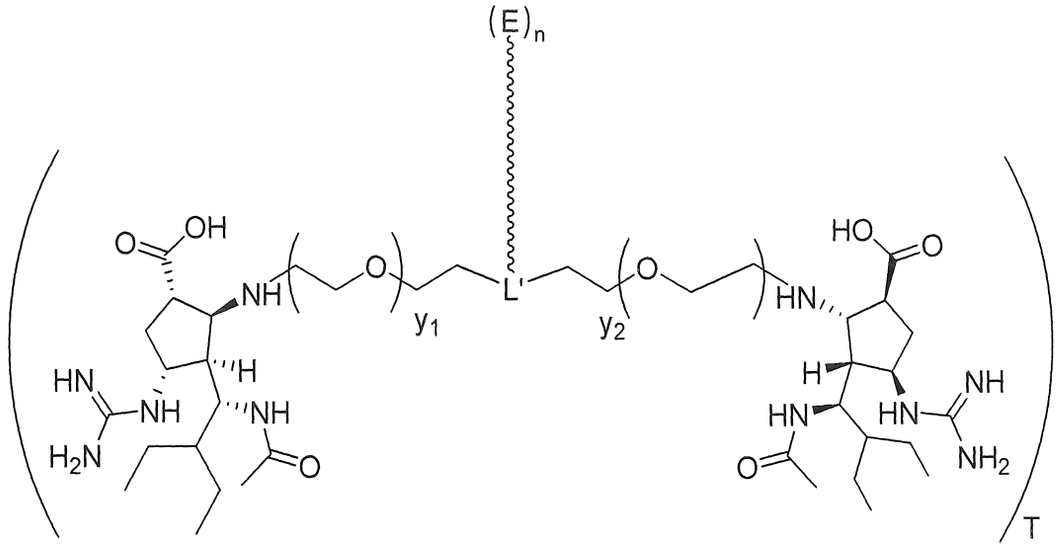
85. Thể liên hợp theo phương án 73, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-8):



(D-VIII-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

86. Thể liên hợp theo phương án 85, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-9):



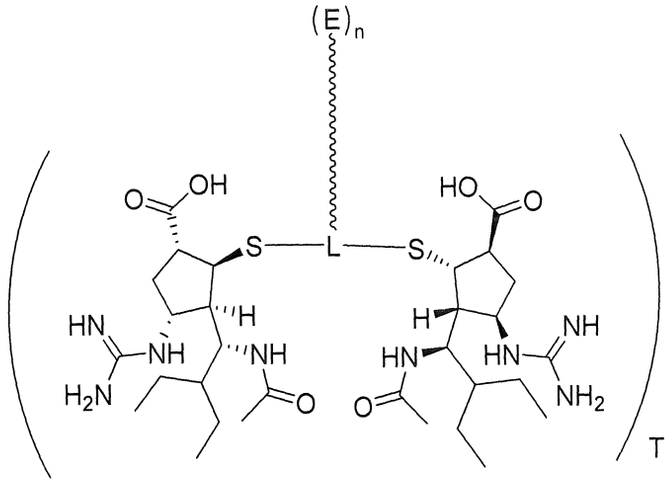
(D-VIII-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

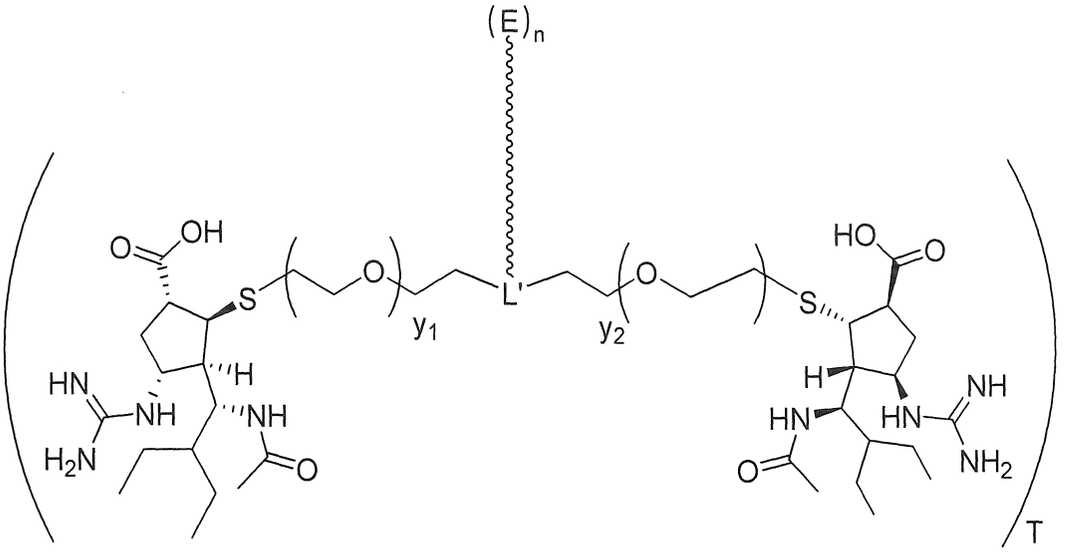
87. Thể liên hợp theo phương án 72, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-10):



(D-VIII-10)

hoặc muối dược dụng của nó.

88. Thể liên hợp theo phương án 87, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-VIII-11):



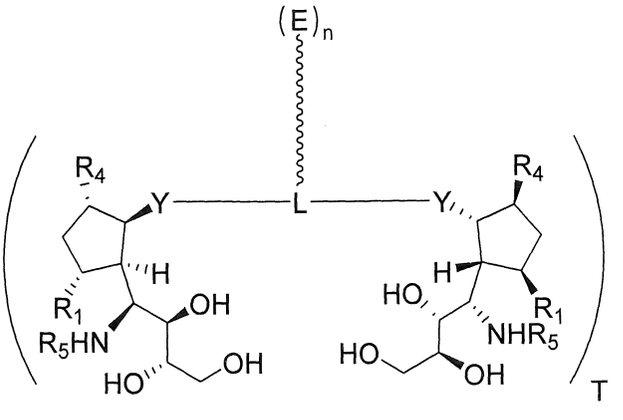
(D-VIII-11)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

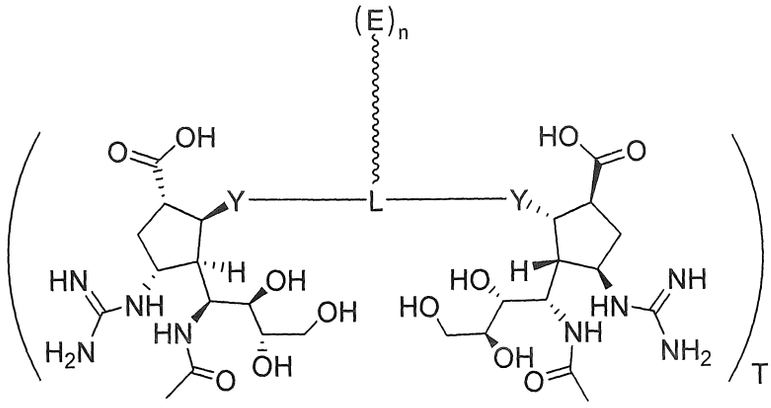
89. Thể liên hợp theo phương án 2, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX):



(D-IX)

hoặc muối dược dụng của nó.

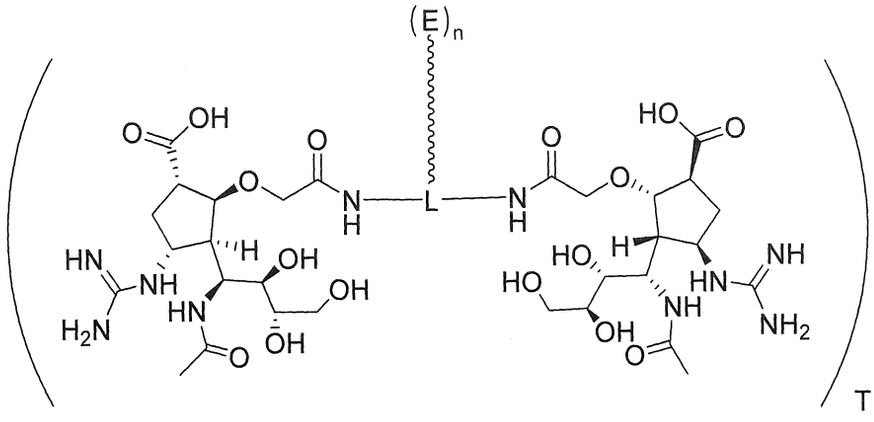
90. Thể liên hợp theo phương án 89, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-1):



(D-IX-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

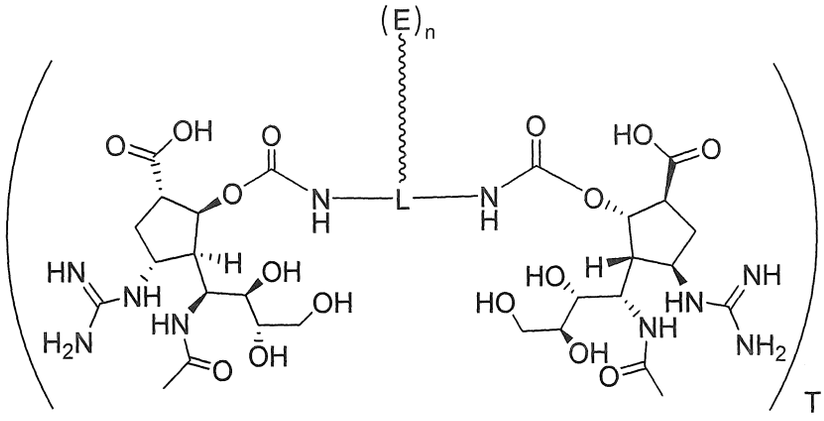
91. Thể liên hợp theo phương án 90, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-2):



(D-IX-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

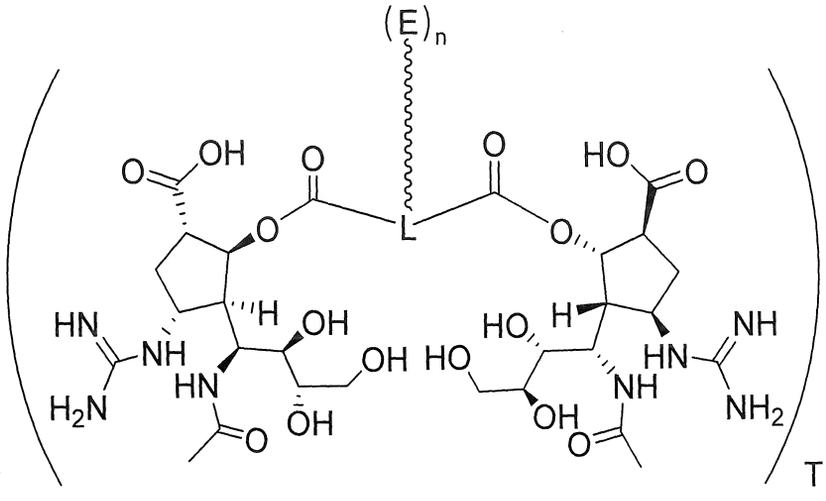
92. Thể liên hợp theo phương án 90, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-3):



(D-IX-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

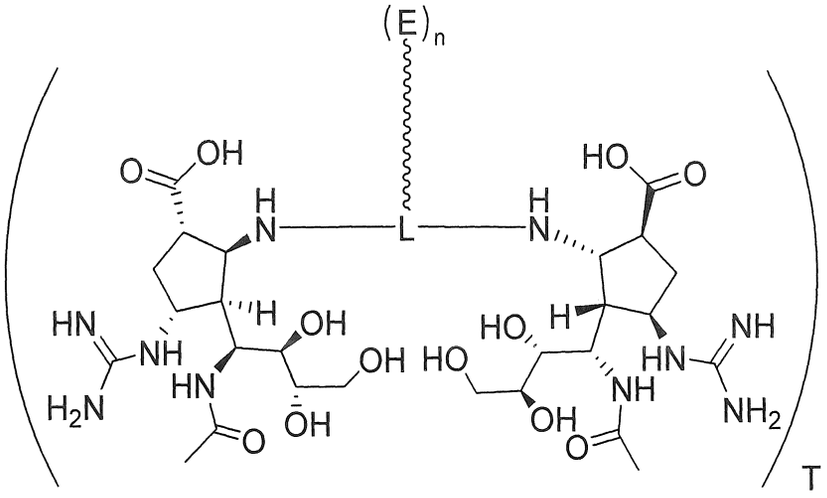
93. Thể liên hợp theo phương án 90, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-4):



(D-IX-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

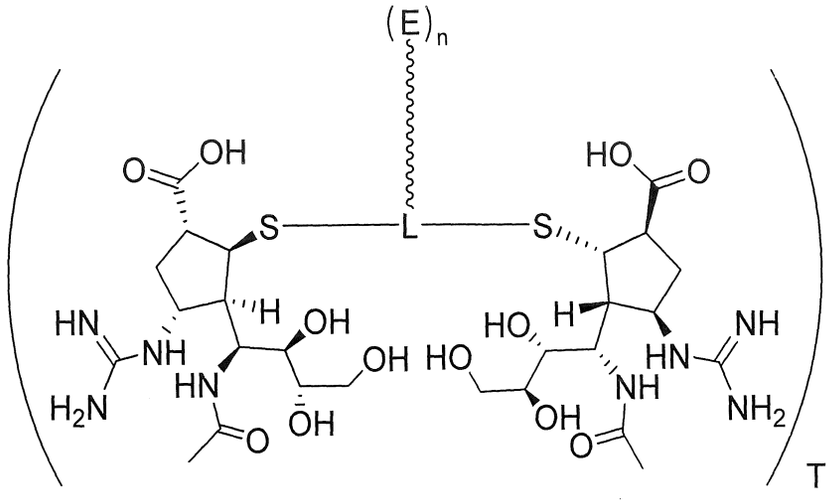
94. Thể liên hợp theo phương án 90, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-5):



(D-IX-5)

hoặc muối dược dụng của nó.

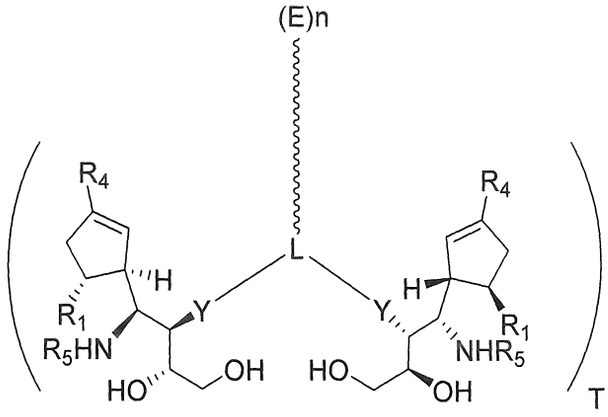
95. Thể liên hợp theo phương án 90, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-IX-6):



(D-IX-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

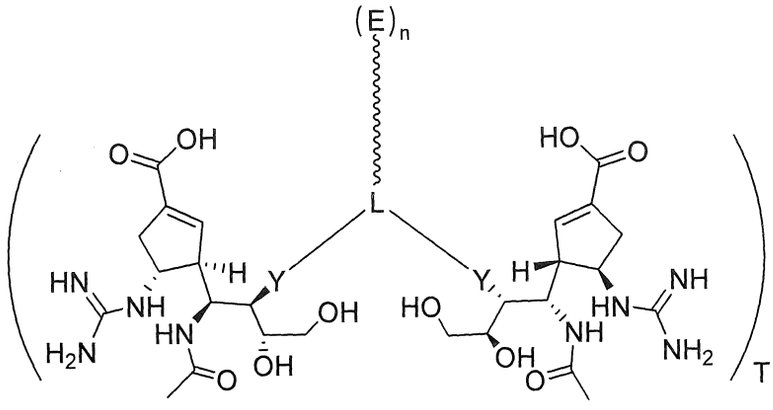
96. Thể liên hợp theo phương án 2, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-X):



(D-X)

hoặc muối dược dụng của nó.

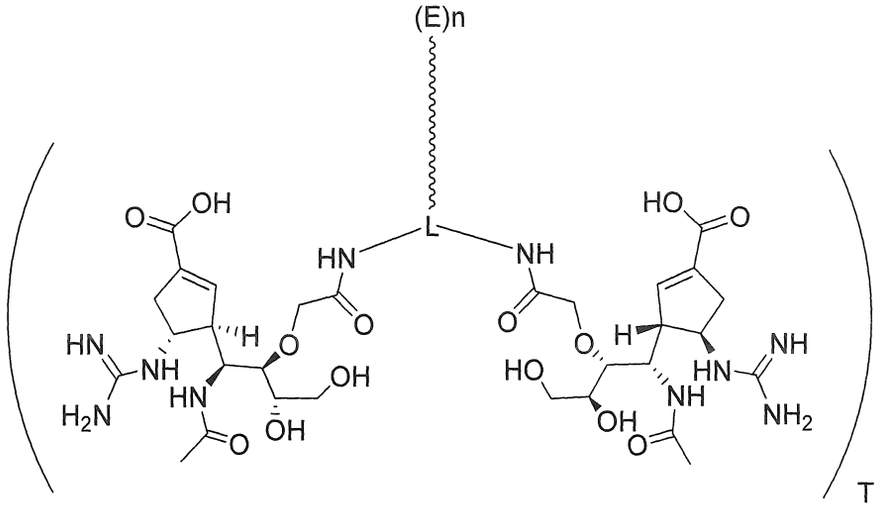
97. Thể liên hợp theo phương án 96, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-X-1):



(D-X-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

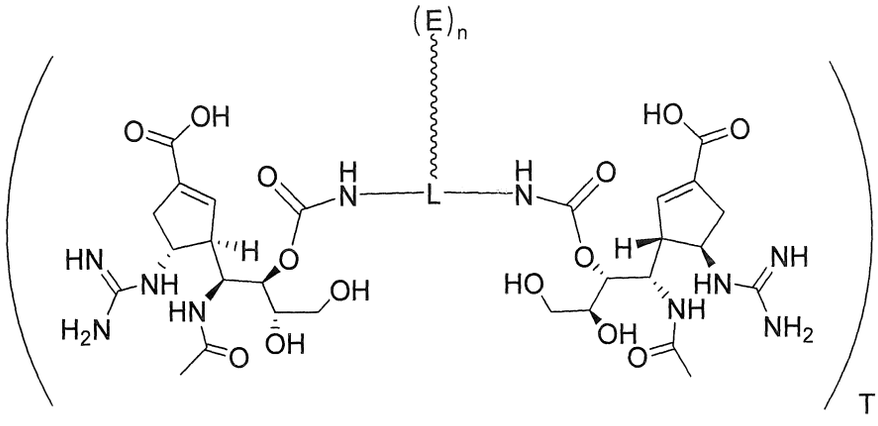
98. Thể liên hợp theo phương án 97, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-X-2):



(D-X-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

99. Thể liên hợp theo phương án 97, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-X-3):



(D-X-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

100. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-99, trong đó L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20

xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý, O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino,
trong đó Ri là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý.

101. Thể liên hợp theo phương án 100, trong đó khung của L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý, O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino,
trong đó Ri là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý.

102. Thể liên hợp theo phương án 100 hoặc 101, trong đó L hoặc L' được thế oxo.

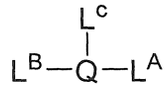
103. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-102, trong đó khung của L hoặc L' bao gồm không nhiều hơn 250 nguyên tử.

104. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-103, trong đó L hoặc L' có khả năng tạo thành liên kết amit, carbamat, sulfonyl, hoặc ure.

105. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-99, trong đó L hoặc L' là liên kết.

106. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-99, trong đó L hoặc L' là nguyên tử.

107. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-106, trong đó mỗi L được mô tả bằng công thức (D-L-I):



(D-L-I)

trong đó LA được mô tả bằng công thức GA1-(ZA1)g1-(YA1)h1-(ZA2)i1-(YA2)j1-(ZA3)k1-(YA3)l1-(ZA4)m1-(YA4)n1-(ZA5)o1-GA2;

LB được mô tả bằng công thức GB1-(ZB1)g2-(YB1)h2-(ZB2)i2-(YB2)j2-(ZB3)k2-(YB3)l2-(ZB4)m2-(YB4)n2-(ZB5)o2-GB2;

LC được mô tả bằng công thức GC1-(ZC1)g3-(YC1)h3-(ZC2)i3-(YC2)j3-(ZC3)k3-(YC3)l3-(ZC4)m3-(YC4)n3-(ZC5)o3-GC2;

GA1 là liên kết được gắn vào Q;

GA2 là liên kết được gắn vào A1;

GB1 là liên kết được gắn vào Q;

GB2 là liên kết được gắn vào A2;

GC1 là liên kết được gắn vào Q;

GC2 là liên kết được gắn vào E hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với E (ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic hoạt hóa và amin, isoxyanat và amin, azit và alkyn, và alken và tetrazin);

mỗi ZA1, ZA2, ZA3, ZA4, ZA5, ZB1, ZB2, ZB3, ZB4, ZB5, ZC1, ZC2, ZC3, ZC4, và ZC5 độc lập là C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý,

C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý;

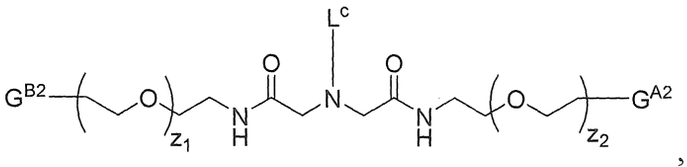
mỗi YA1, YA2, YA3, YA4, YB1, YB2, YB3, YB4, YC1, YC2, YC3, và YC4 độc lập là O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino;

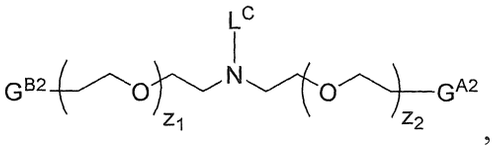
Ri là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý;

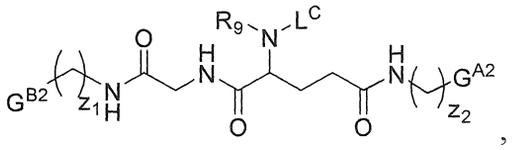
mỗi g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3, và o3 độc lập bằng 0 hoặc 1;

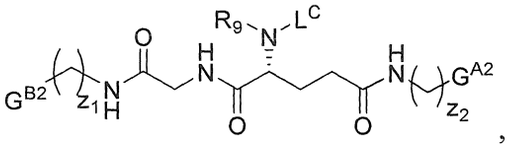
Q là nguyên tử nitơ, C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý.

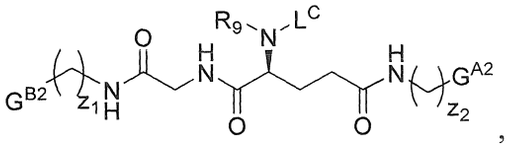
108. Thể liên hợp theo phương án 107, trong đó L được chọn từ

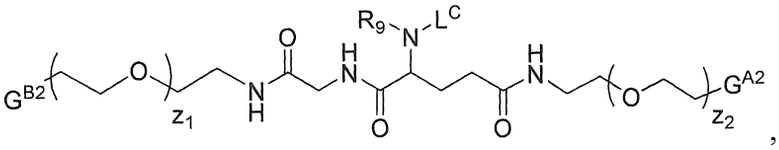


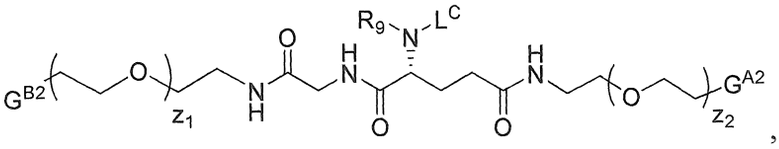


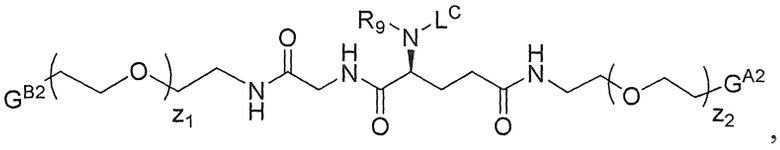


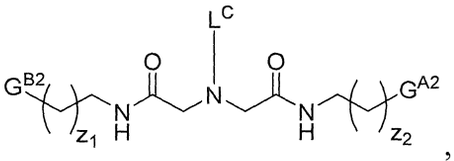


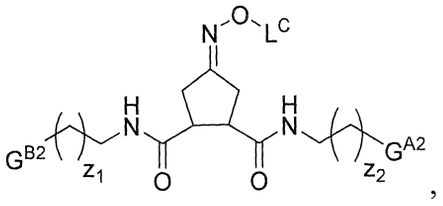


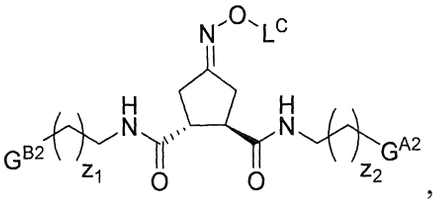


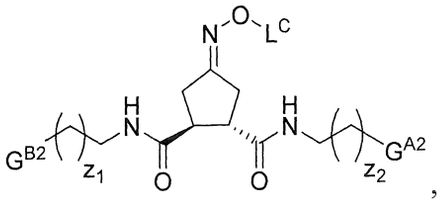


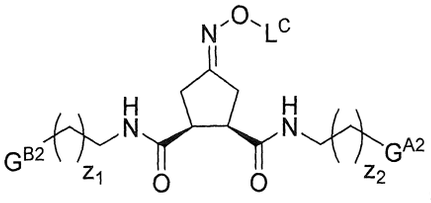


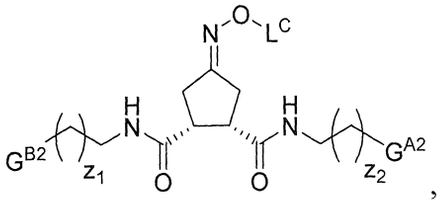


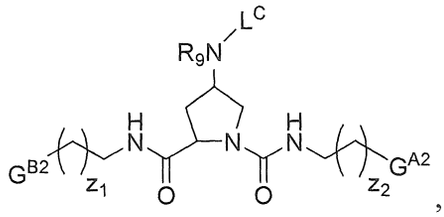
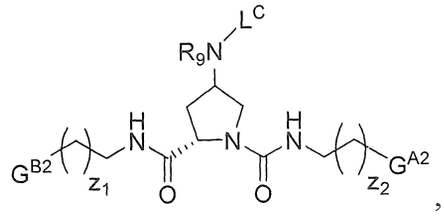
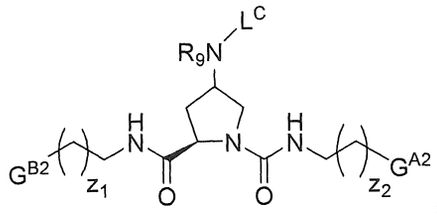
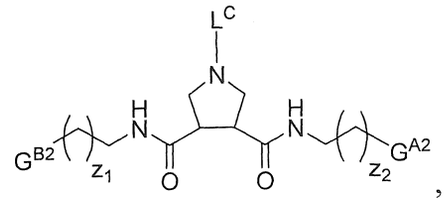
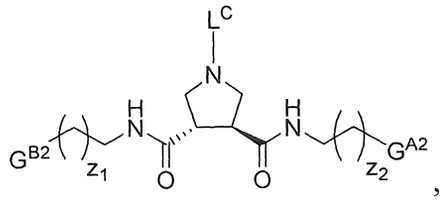
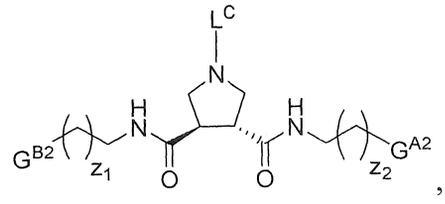
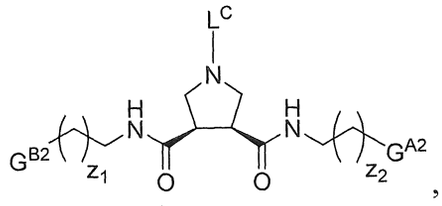
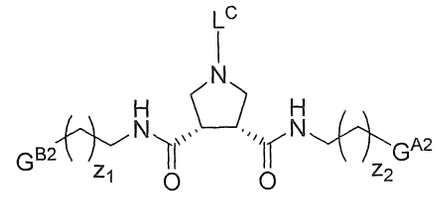
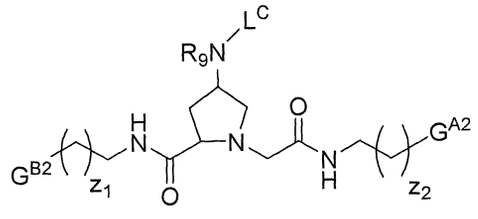
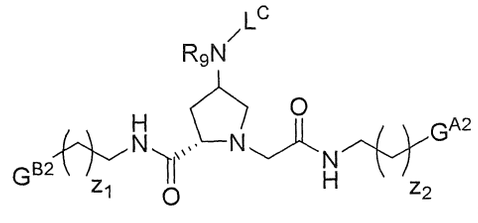
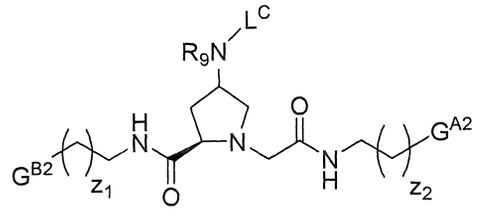
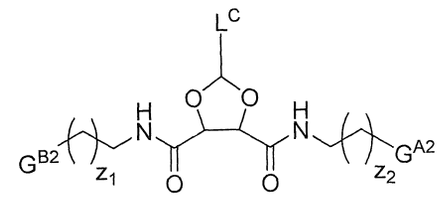
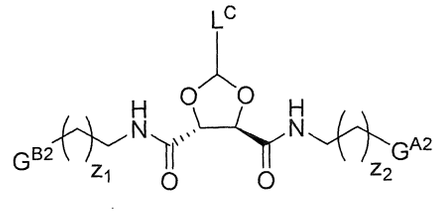
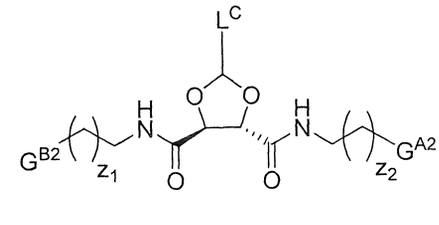






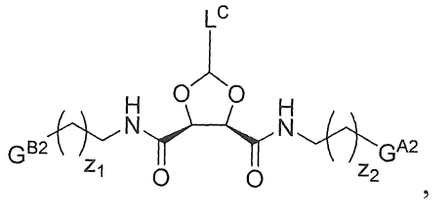
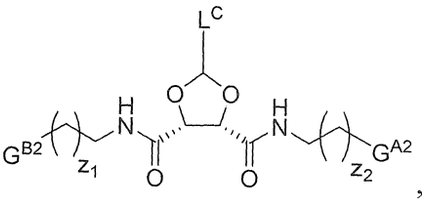
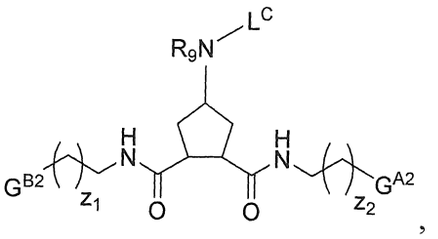
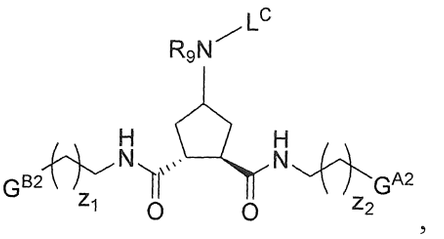
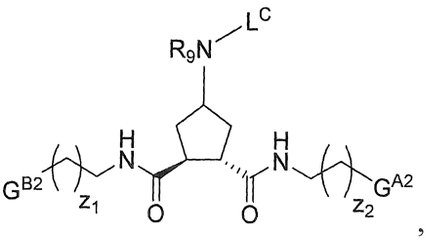
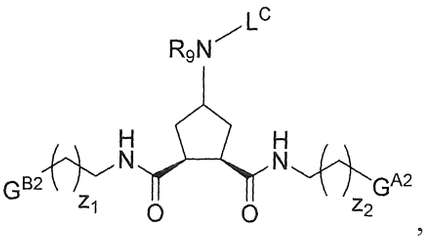
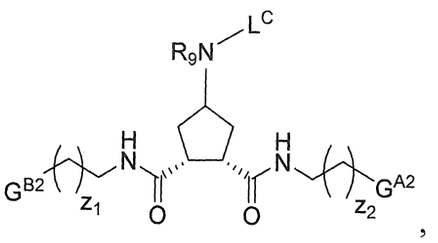
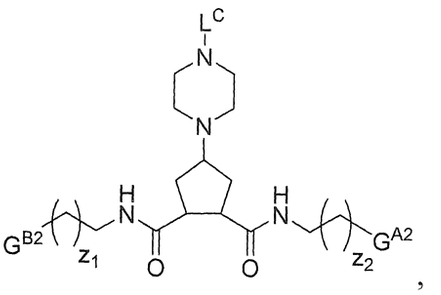
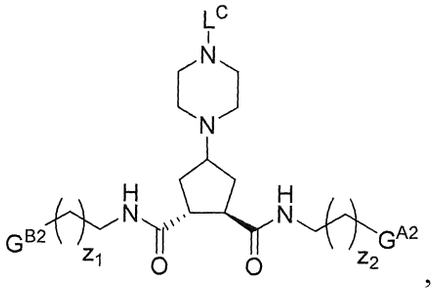
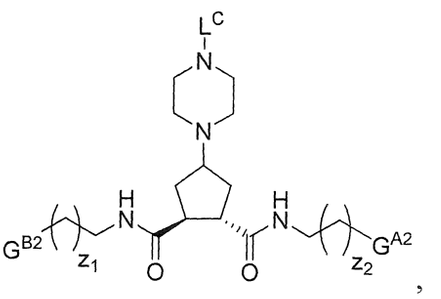
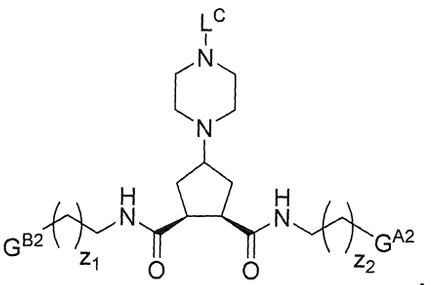
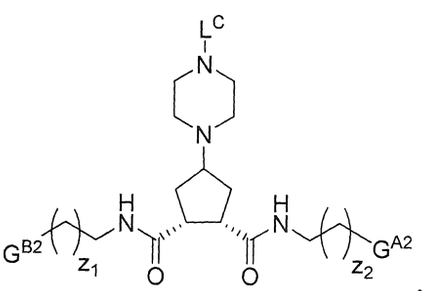





,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

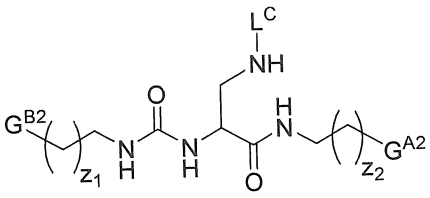
,

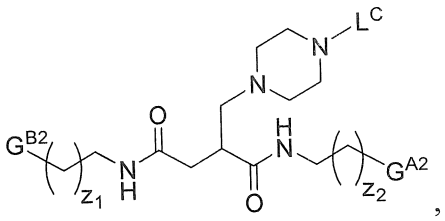
,

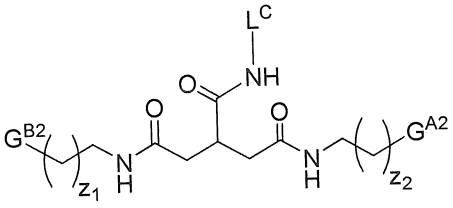

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

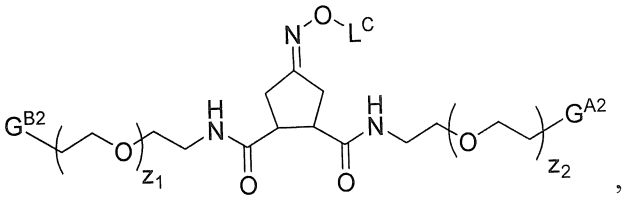
,

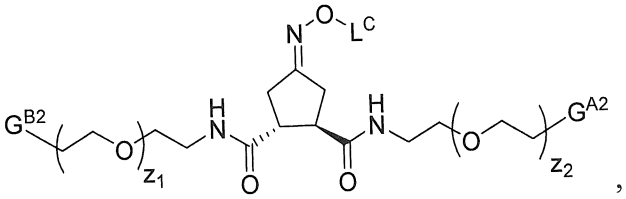
,

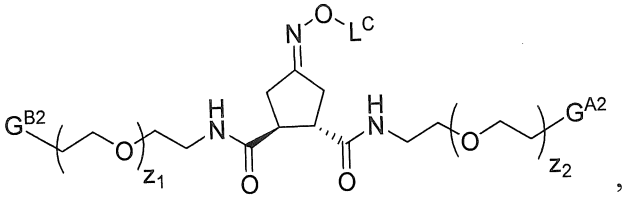

,

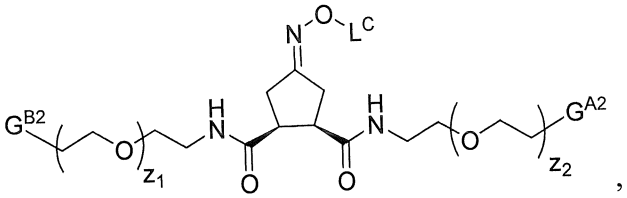

,

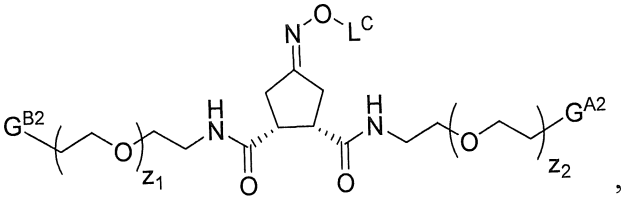

,

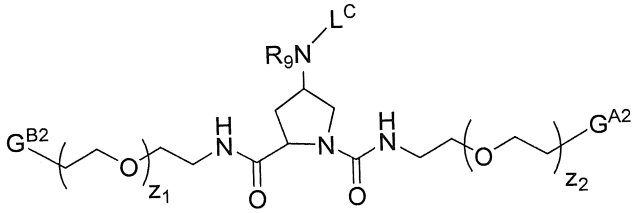

,

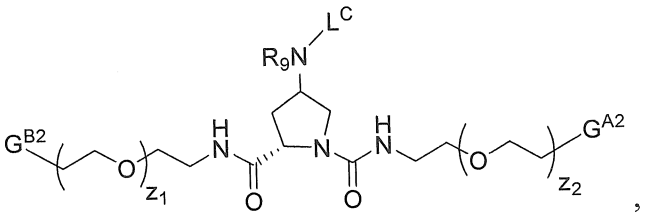

,


,

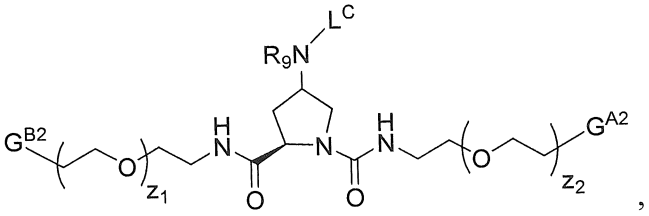

,


,

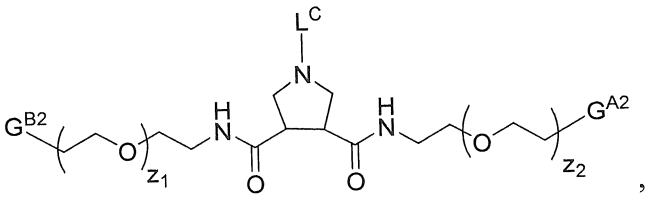




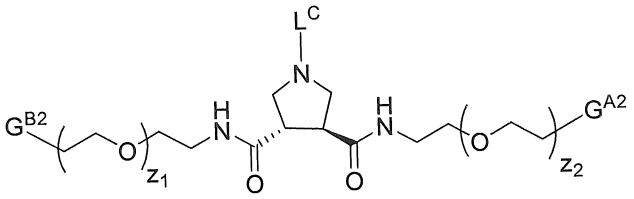
,



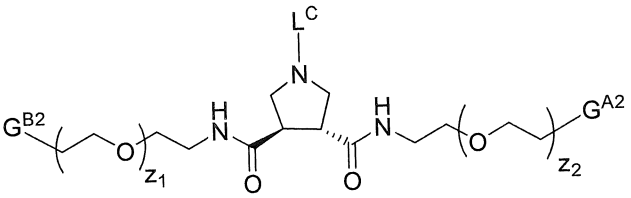
,



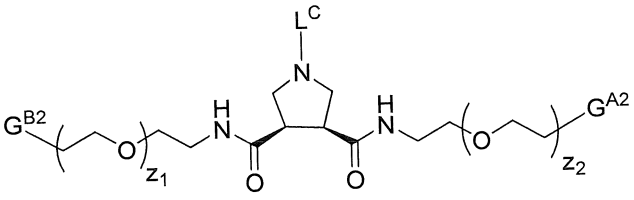
,



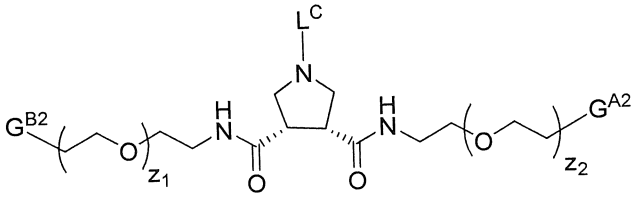
,



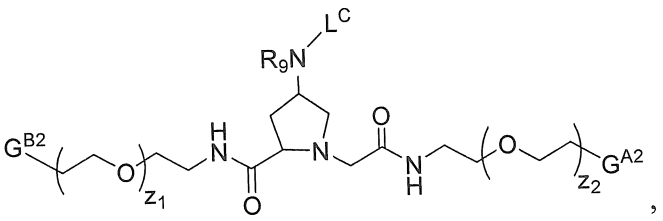
,



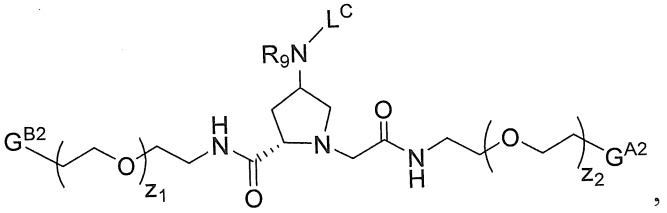
,



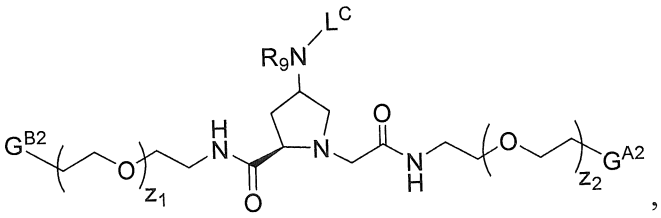
,



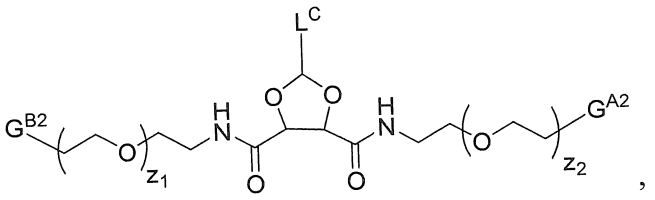
,



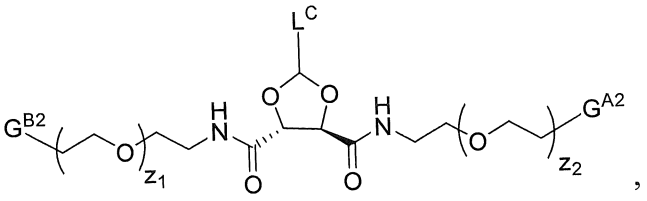
,



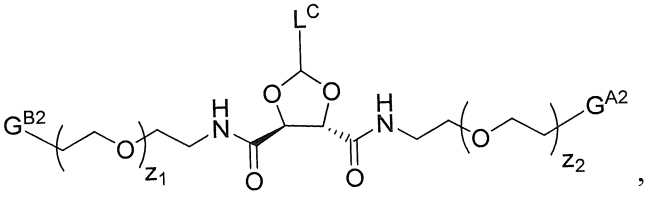
,



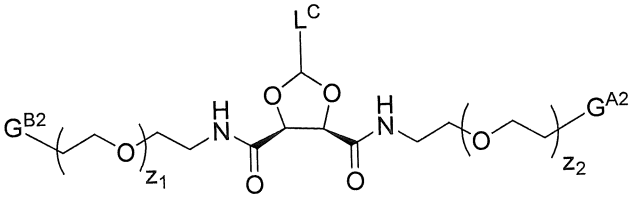
,



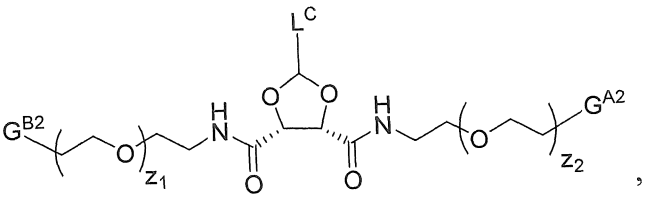
,

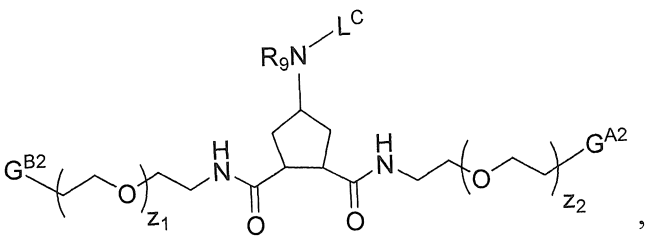


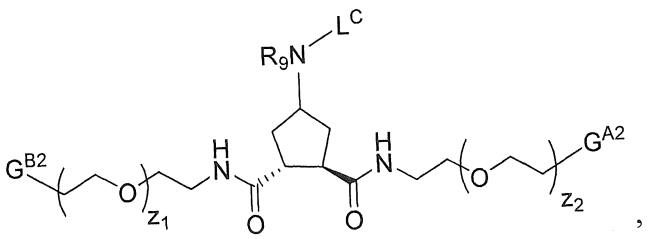
,

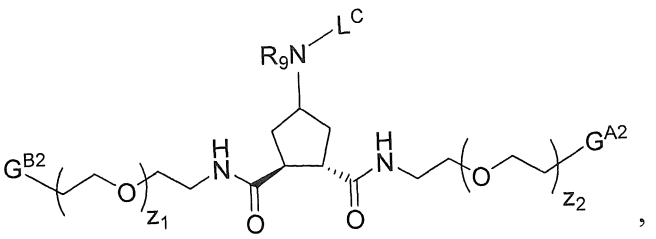


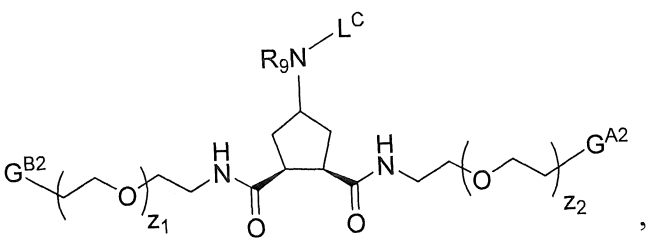
,

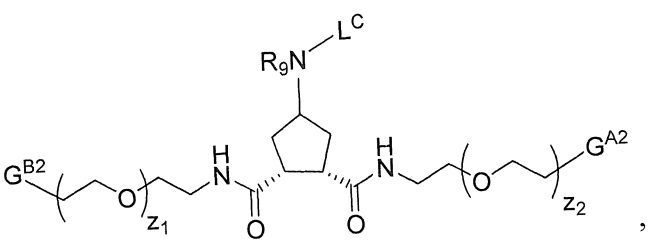


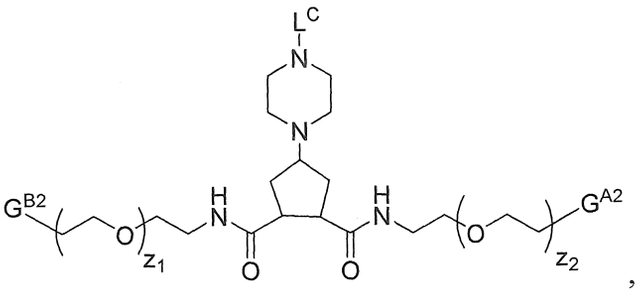




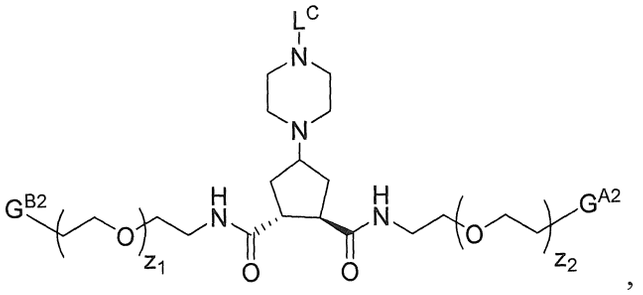




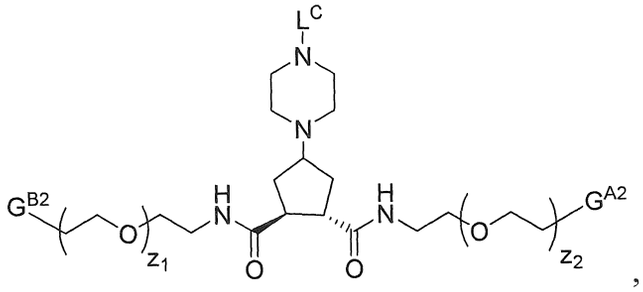




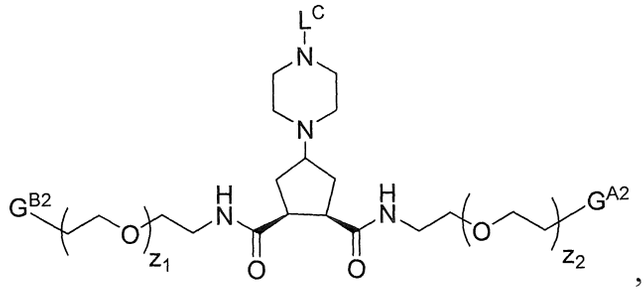
,



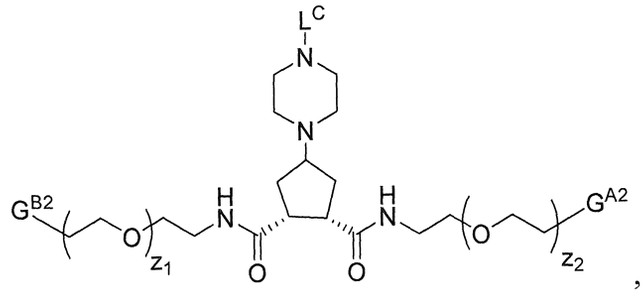
,



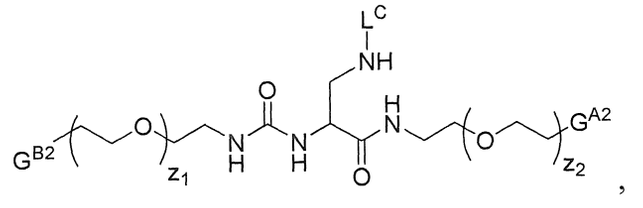
,



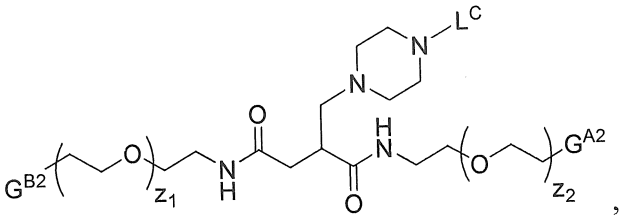
,

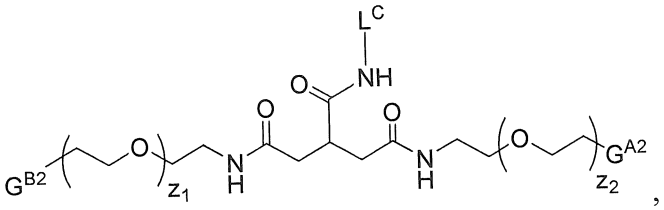


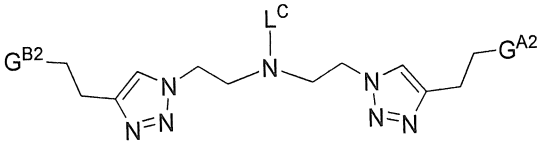
,

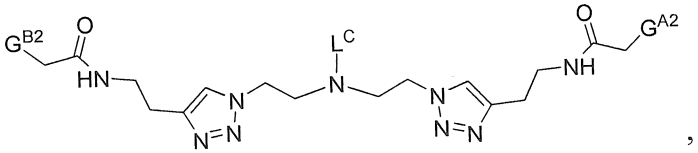


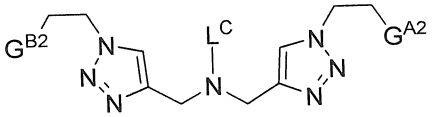
,

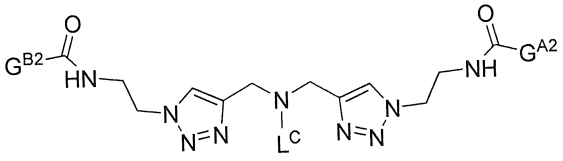


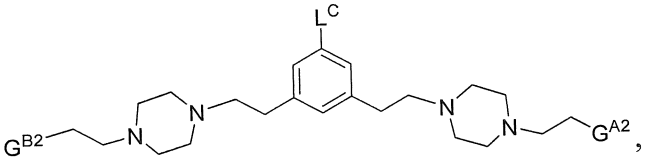


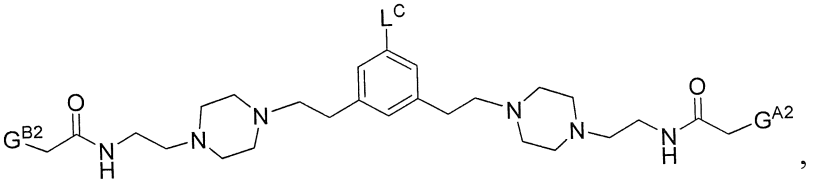


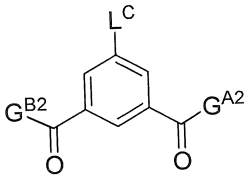


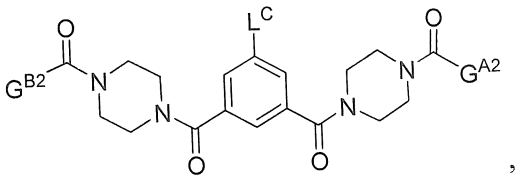


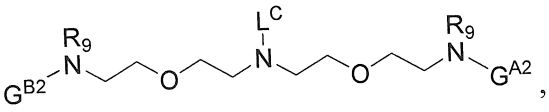


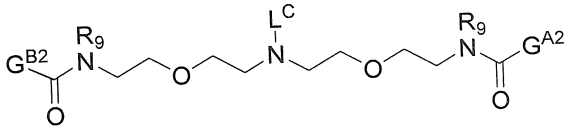


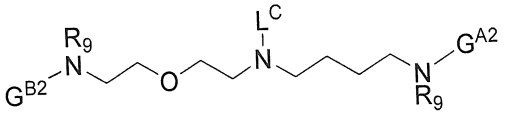


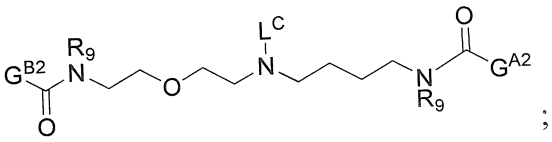

,

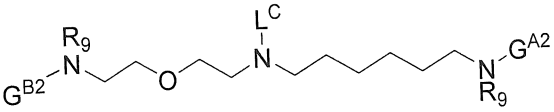

,

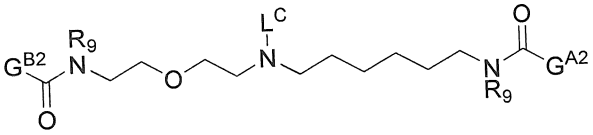

,

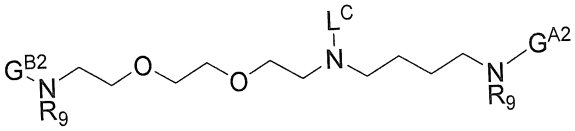

;

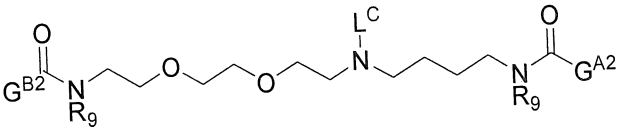

;

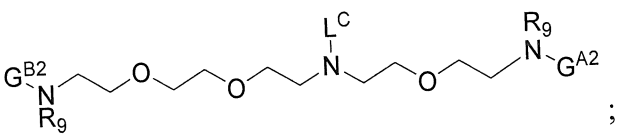

;

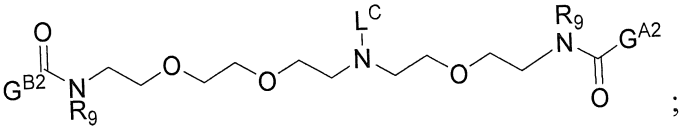

;

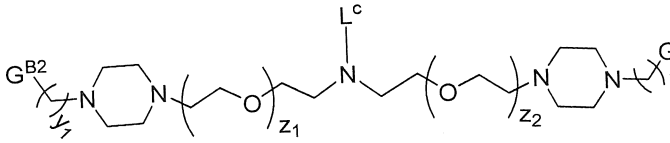

;


;

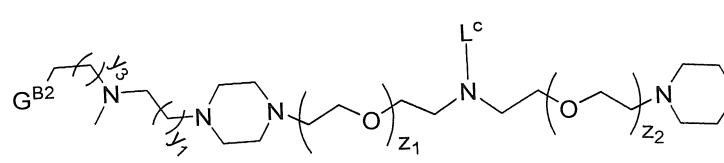

;


;

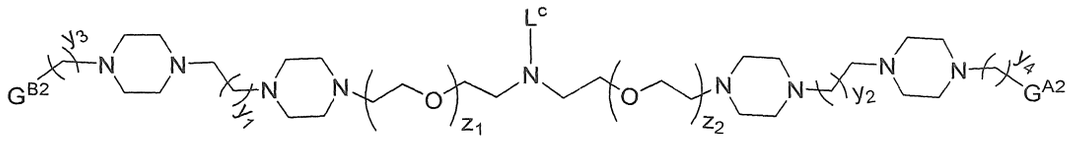

;


;

;


;

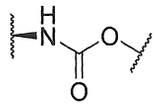
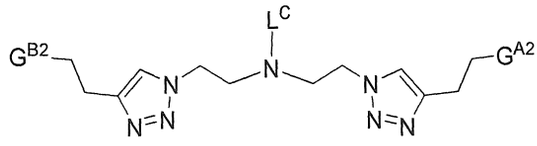
; or

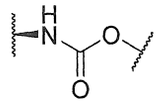
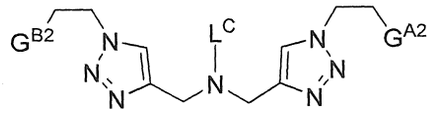


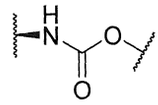
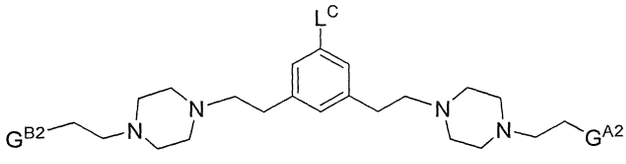
;

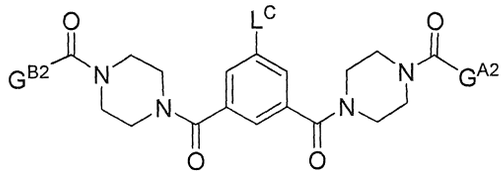
trong đó mỗi z1 và z2 độc lập và là số nguyên từ 1 đến 20; và

R9 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

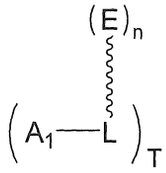
109. Thể liên hợp theo phương án 108, trong đó Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:  .

110. Thể liên hợp theo phương án 108, trong đó Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:  .

111. Thể liên hợp theo phương án 108, trong đó Y là:  (-NH(C=O)O-) và L là:  .

112. Thể liên hợp theo phương án 108, trong đó Y là:  (-O-) và L là:  .

113. Thể liên hợp theo phương án 1, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-I):



(M-I)

trong đó mỗi A1 độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I)-(A-XII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc;

n bằng 1 hoặc 2;

T là số nguyên từ 1 đến 20; và

L là cầu nối liên kết gắn cộng hóa trị với mỗi E và A1,

đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A1-L được gắn cộng hóa trị với E; hoặc muối dược dụng của nó.

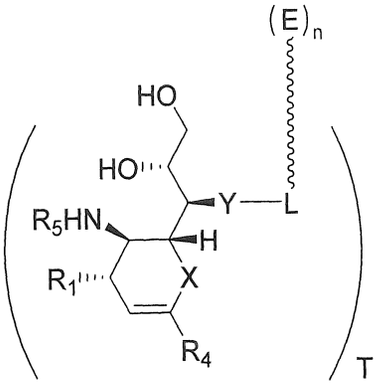
114. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó mỗi A1 độc lập được chọn từ công thức bất kỳ trong số các công thức (A-I), (A-II), (A-VI), hoặc (A-VII);

mỗi E bao gồm monome miền Fc, protein albumin, peptit liên kết protein albumin, hoặc peptit liên kết Fc, và

đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng mỗi A1-L được gắn cộng hóa trị với E; hoặc muối dược dụng của nó.

115. Thể liên hợp theo phương án 114, trong đó mỗi A1 độc lập được chọn từ công thức (A-I).

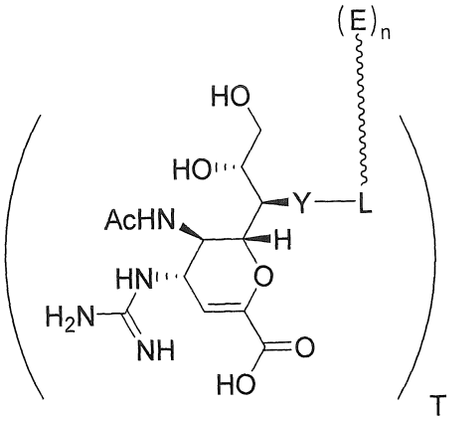
116. Thể liên hợp theo phương án 115, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II):



(M-II)

hoặc muối dược dụng của nó.

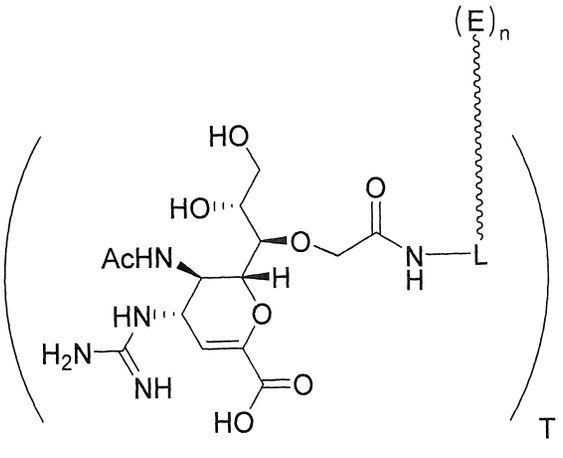
117. Thể liên hợp theo phương án 116, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-1):



(M-II-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

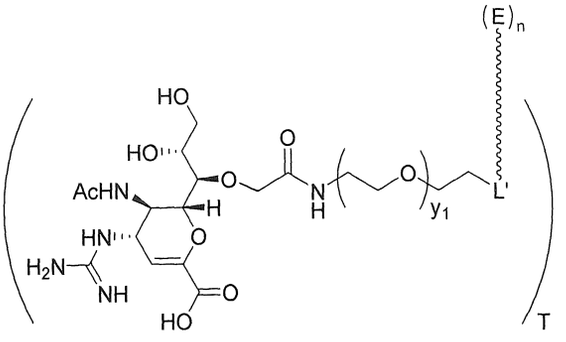
118. Thể liên hợp theo phương án 117, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-2):



(M-II-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

119. Thể liên hợp theo phương án 118, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-3):



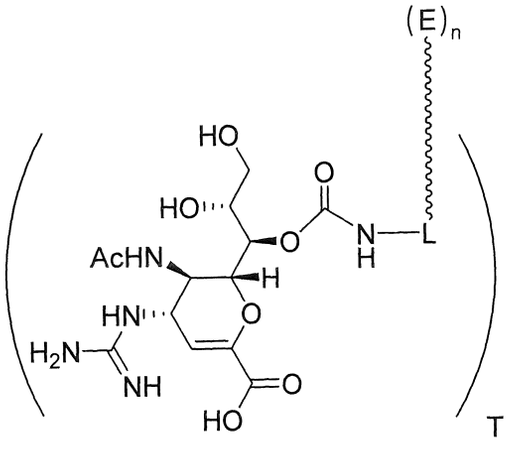
(M-II-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

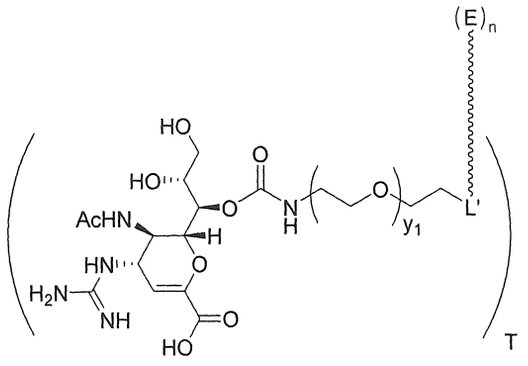
120. Thể liên hợp theo phương án 119, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-4):



(M-II-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

121. Thể liên hợp theo phương án 120, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-5):



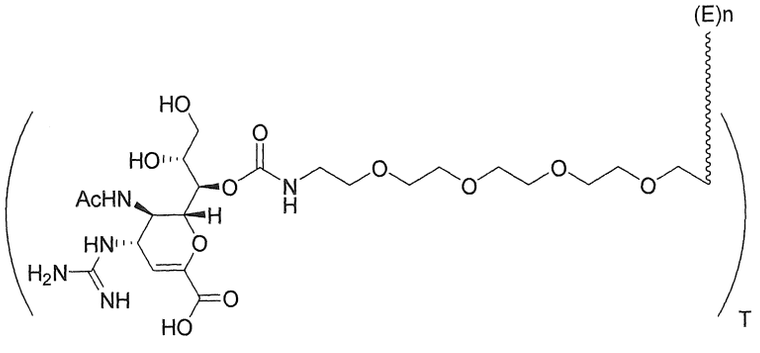
(M-II-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

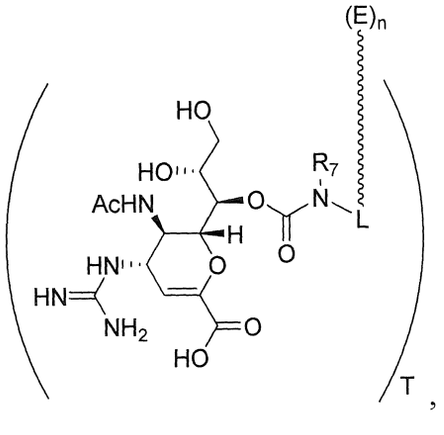
hoặc muối dược dụng của nó.

122. Thể liên hợp theo phương án 121, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc



hoặc muối dược dụng của nó.

123. Thể liên hợp theo phương án 116, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-6):



(M-II-6)

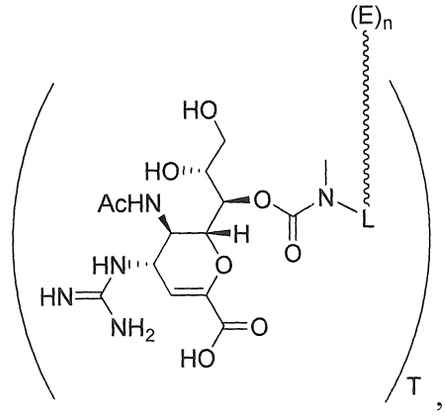
trong đó R7 được chọn từ H, C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl;

hoặc muối dược dụng của nó.

124. Thể liên hợp theo phương án 123, trong đó R7 được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

125. Thể liên hợp theo phương án 123 hoặc 124, trong đó R7 được chọn từ metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

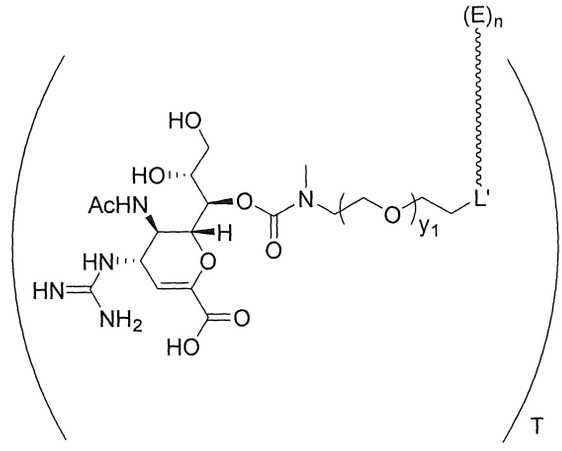
126. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 123-125, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-7):



(M-II-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

127. Thể liên hợp theo phương án 126, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-8):



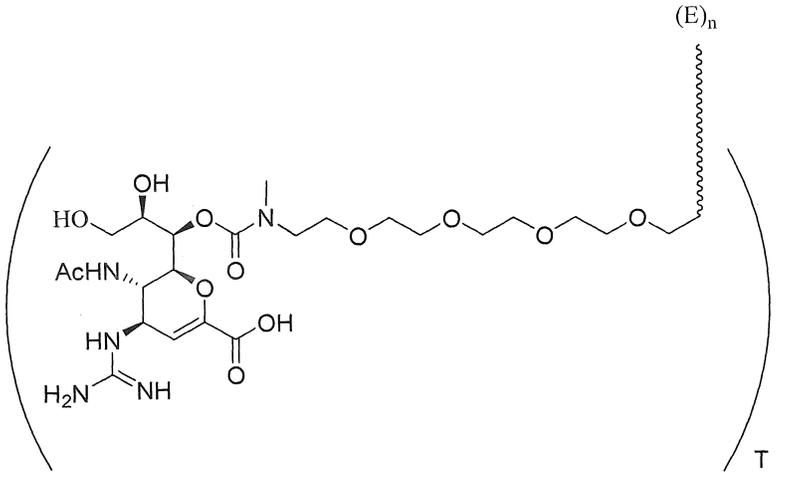
(M-II-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

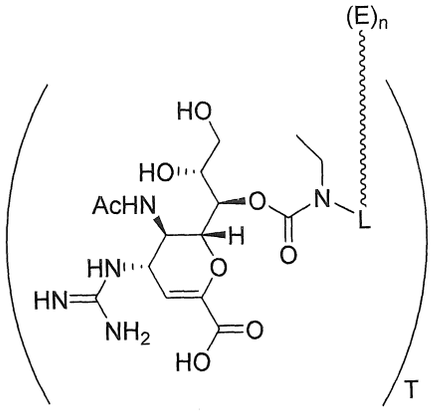
hoặc muối dược dụng của nó.

128. Thể liên hợp theo phương án 127, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc



hoặc muối dược dụng của nó.

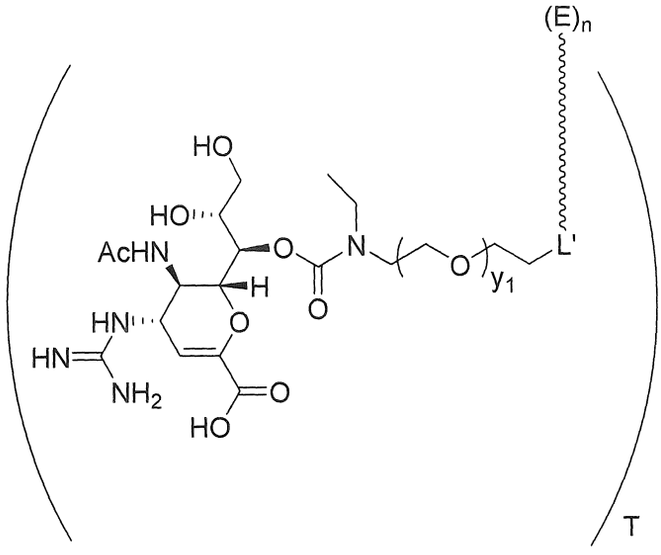
129. Thể liên hợp theo phương án 127, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-9):



(M-II-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

130. Thể liên hợp theo phương án 129, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-II-10):



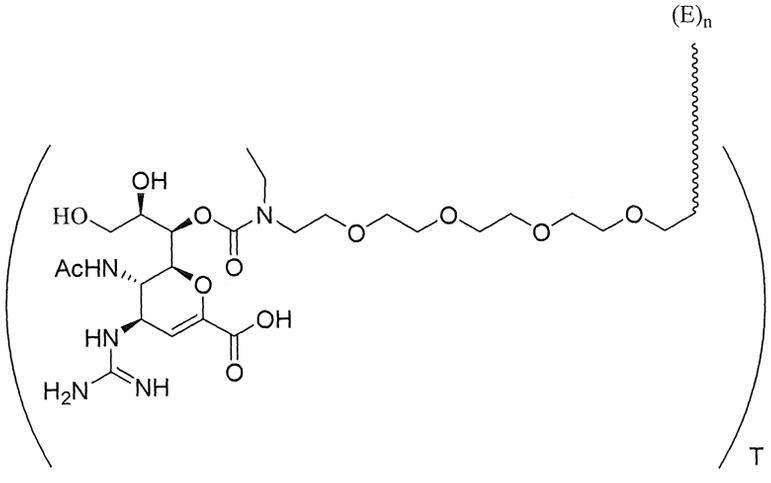
(M-II-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

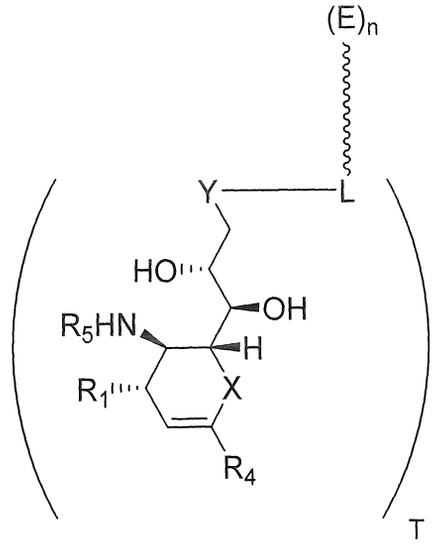
hoặc muối dược dụng của nó.

131. Thể liên hợp theo phương án 130, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc



hoặc muối dược dụng của nó.

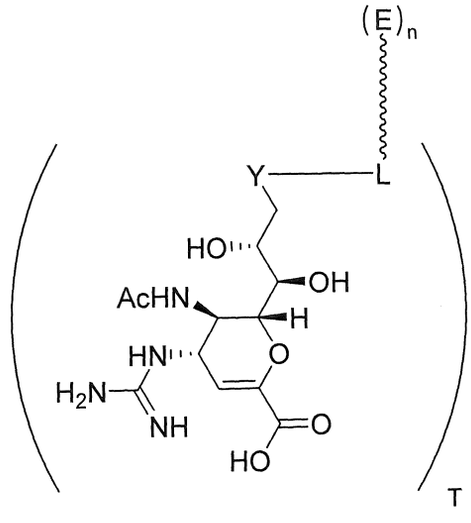
132. Thể liên hợp theo phương án 113 hoặc 114, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III):



(M-III)

hoặc muối dược dụng của nó.

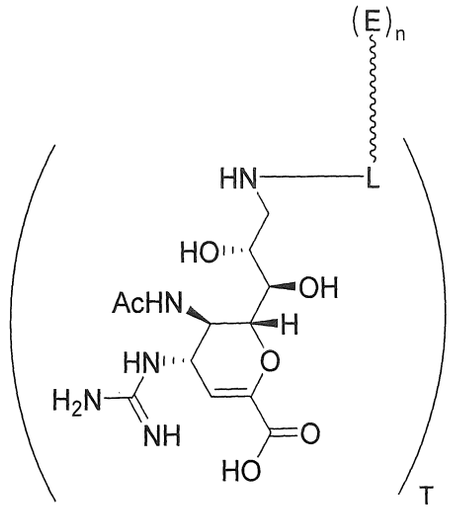
133. Thể liên hợp theo phương án 132, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-1):



(M-III-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

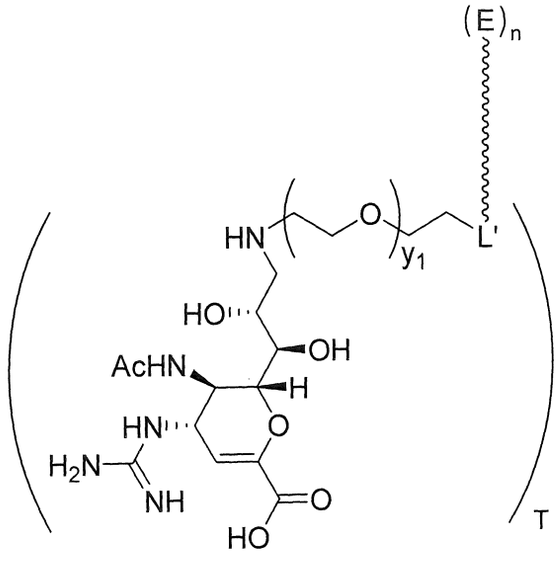
134. Thể liên hợp theo phương án 133, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-2):



(M-III-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

135. Thể liên hợp theo phương án 134, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-3):



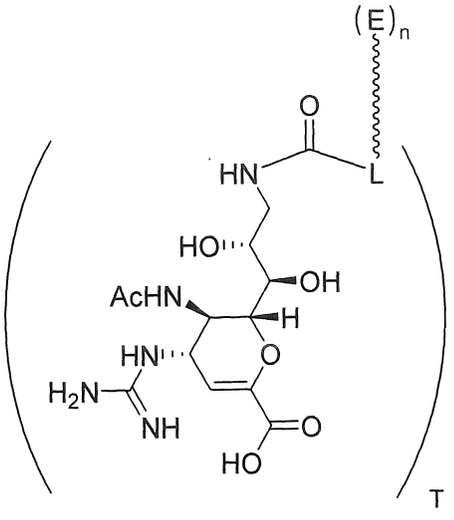
(M-III-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

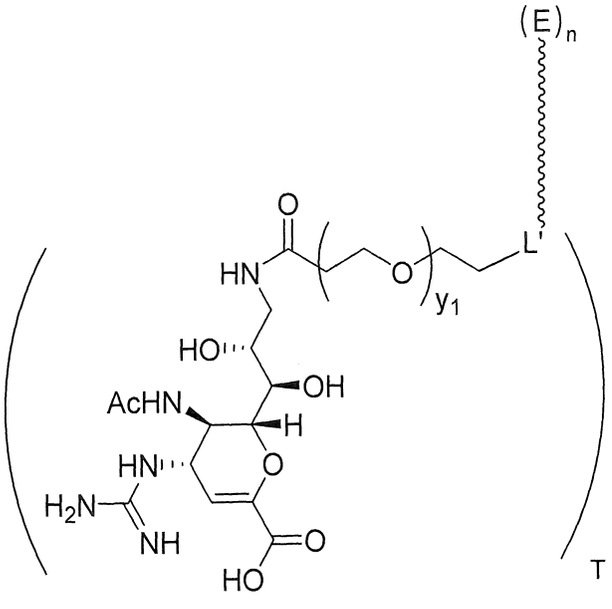
136. Thể liên hợp theo phương án 133, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-4):



(M-III-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

137. Thể liên hợp theo phương án 136, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-5):



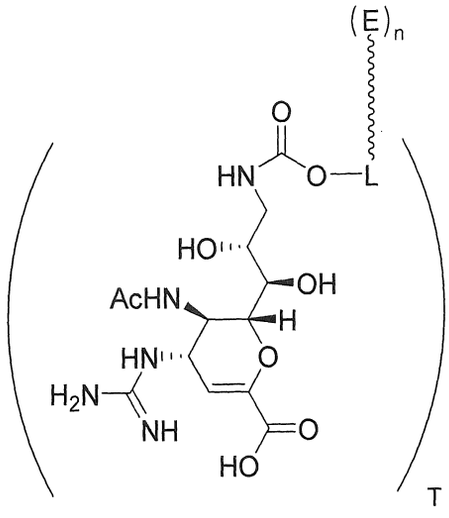
(M-III-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

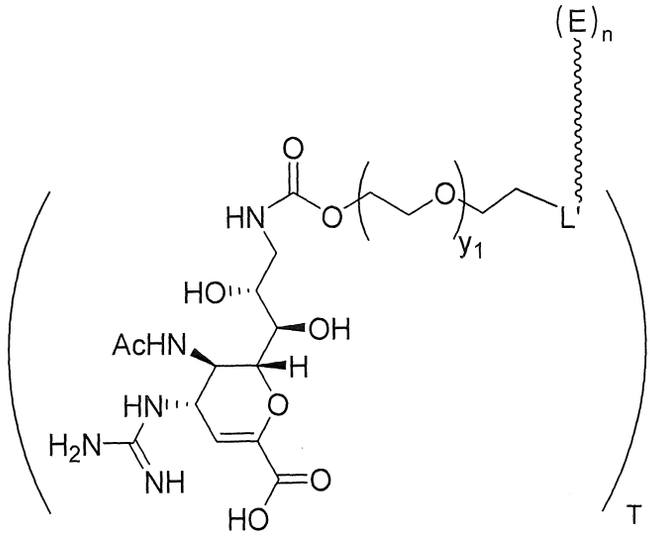
138. Thể liên hợp theo phương án 133, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-6):



(M-III-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

139. Thể liên hợp theo phương án 138, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-7):



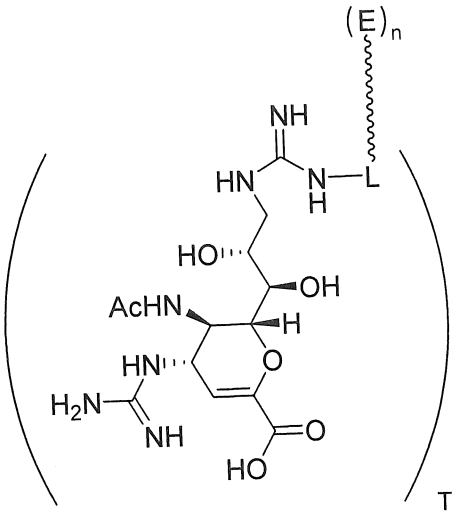
(M-III-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

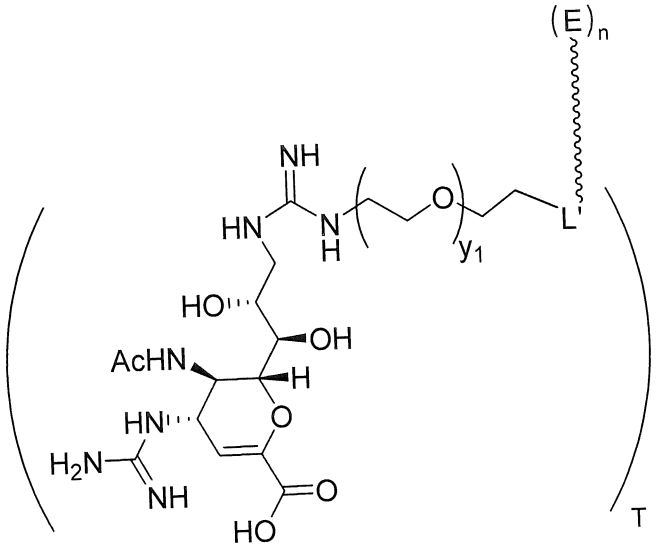
140. Thể liên hợp theo phương án 133, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-8):



(M-III-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

141. Thể liên hợp theo phương án 140, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-III-9):



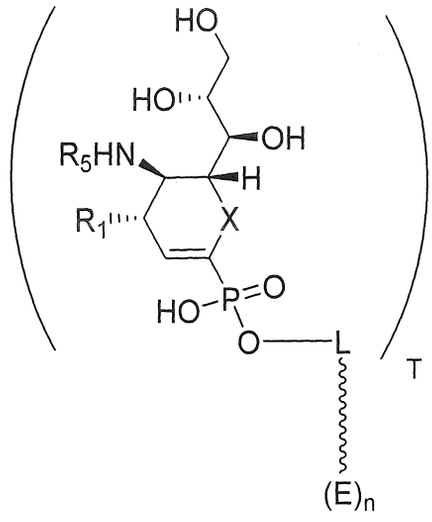
(M-III-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

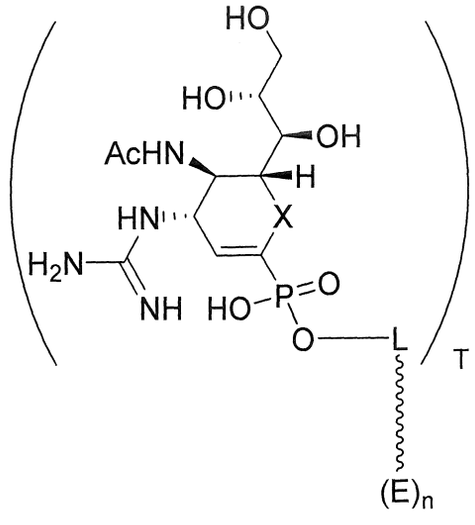
142. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IV):



(M-IV)

hoặc muối dược dụng của nó.

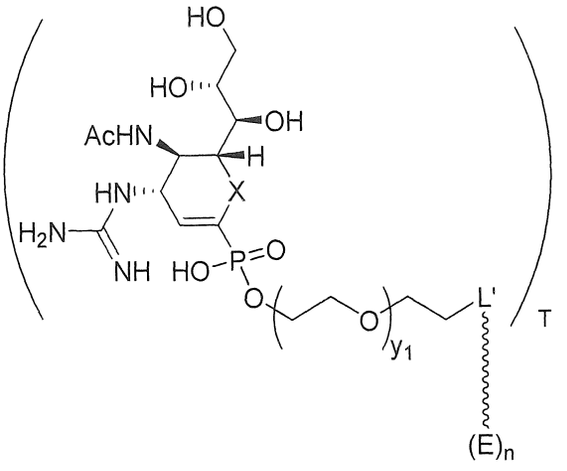
143. Thể liên hợp theo phương án 142, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IV-1):



(M-IV-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

144. Thể liên hợp theo phương án 143, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IV-2):



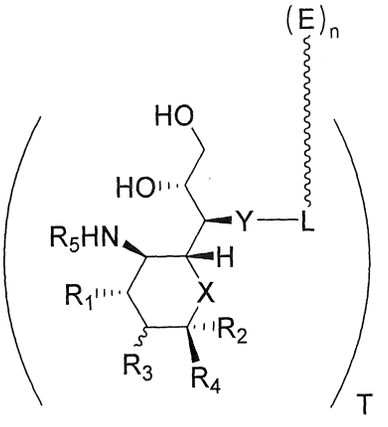
(M-IV-2)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

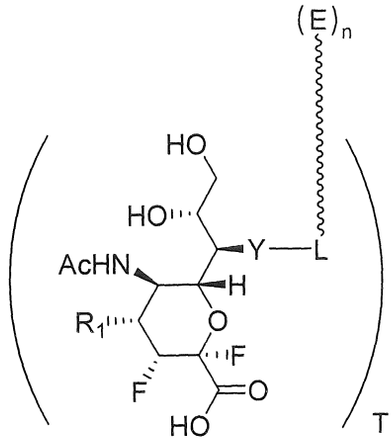
145. Thể liên hợp theo phương án 113 hoặc 114, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V):



(M-V)

hoặc muối dược dụng của nó.

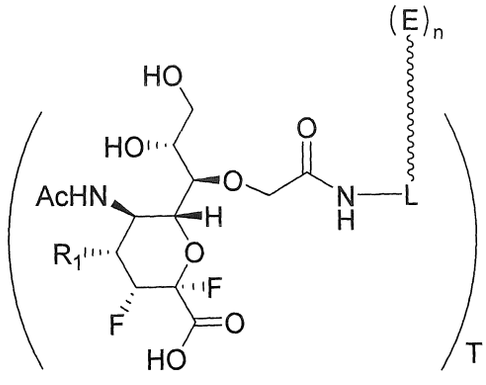
146. Thể liên hợp theo phương án 145, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-1):



(M-V-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

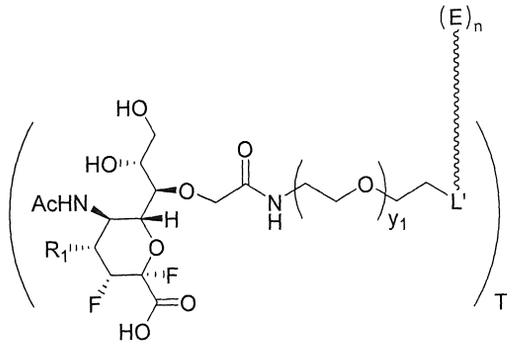
147. Thể liên hợp theo phương án 146, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-2):



(M-V-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

148. Thể liên hợp theo phương án 147, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-3):



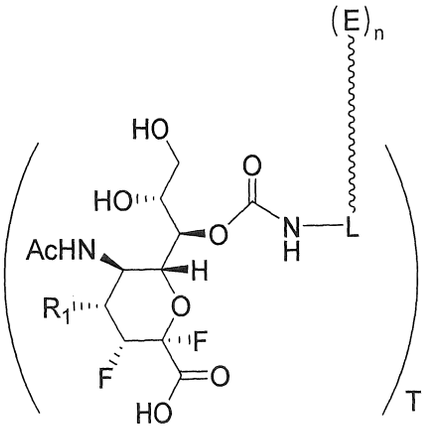
(M-V-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

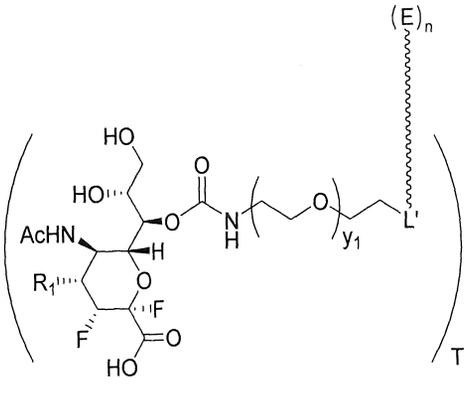
149. Thể liên hợp theo phương án 148, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-4):



(M-V-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

150. Thể liên hợp theo phương án 149, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-5):



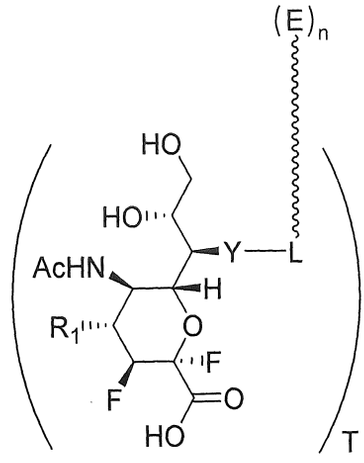
(M-V-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

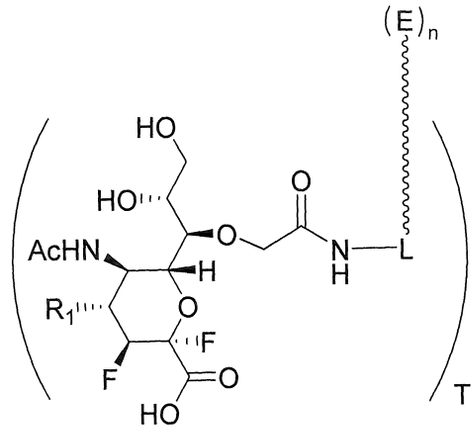
151. Thể liên hợp theo phương án 145, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-6):



(M-V-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

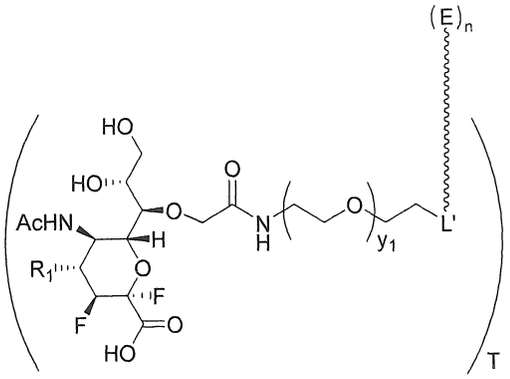
152. Thể liên hợp theo phương án 151, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-7):



(M-V-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

153. Thể liên hợp theo phương án 152, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-8):



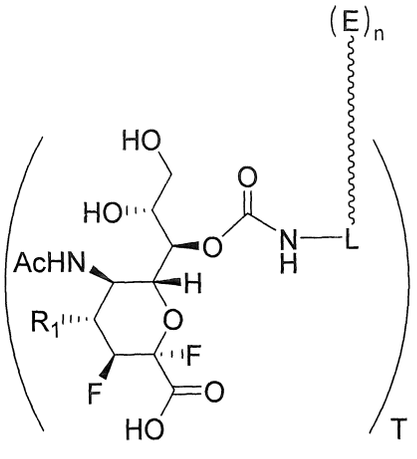
(M-V-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

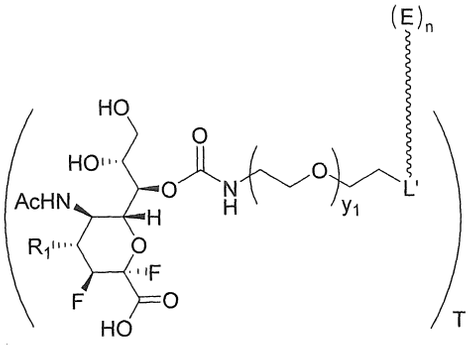
154. Thể liên hợp theo phương án 151, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-9):



(M-V-9)

hoặc muối dược dụng của nó.

155. Thể liên hợp theo phương án 154, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-V-10):



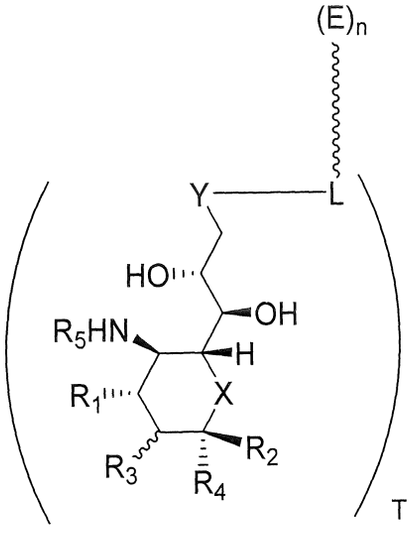
(M-V-10)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

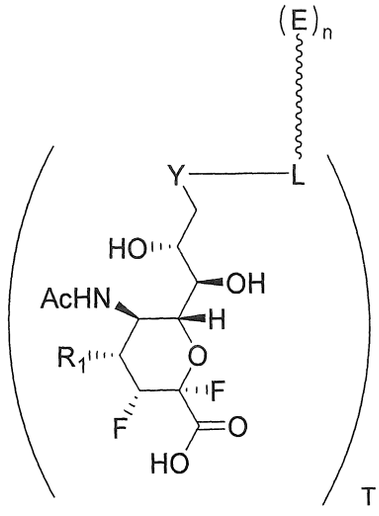
156. Thể liên hợp theo phương án 113 hoặc 114, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI):



(M-VI)

hoặc muối dược dụng của nó.

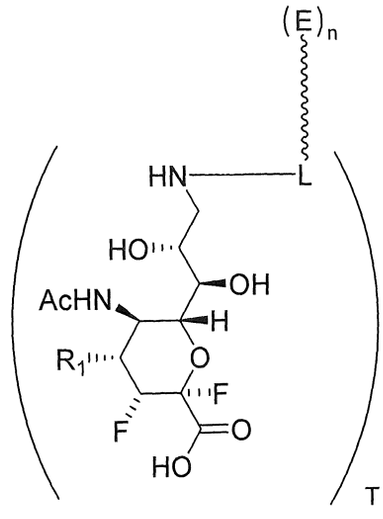
157. Thể liên hợp theo phương án 156, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-1):



(M-VI-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

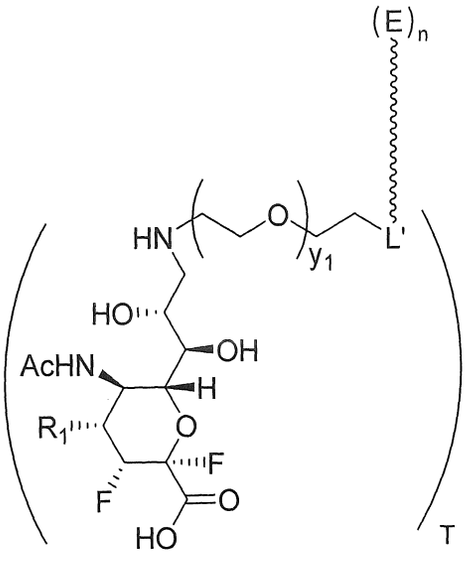
158. Thể liên hợp theo phương án 157, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-2):



(M-VI-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

159. Thể liên hợp theo phương án 158, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-3):



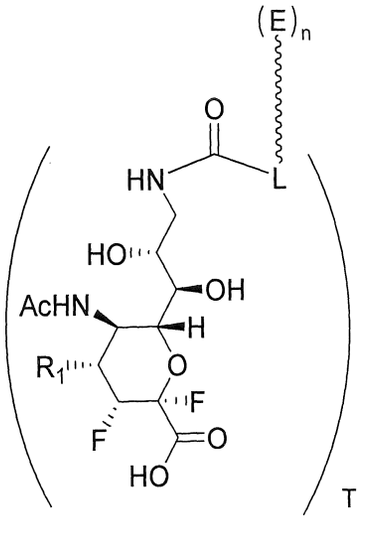
(M-VI-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

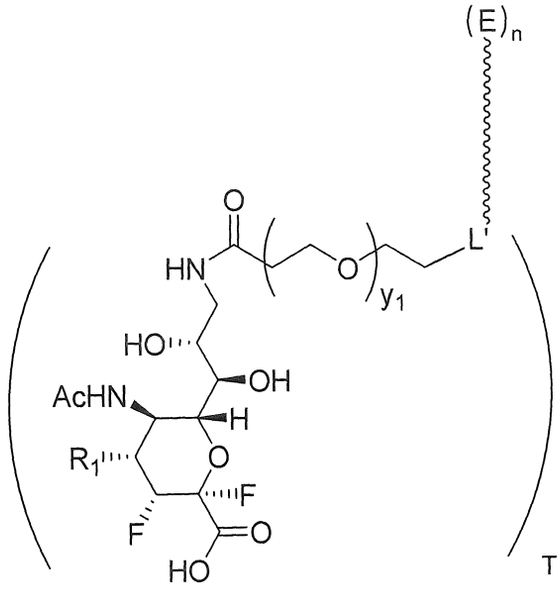
160. Thể liên hợp theo phương án 157, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-4):



(M-VI-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

161. Thể liên hợp theo phương án 160, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-5):



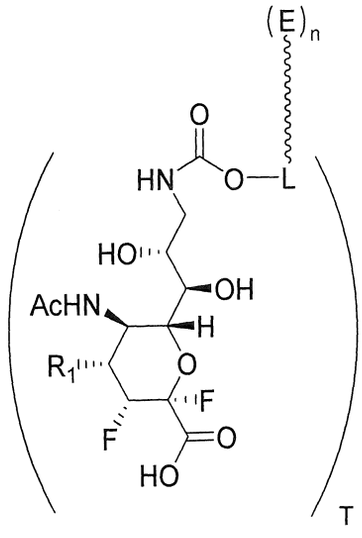
(M-VI-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

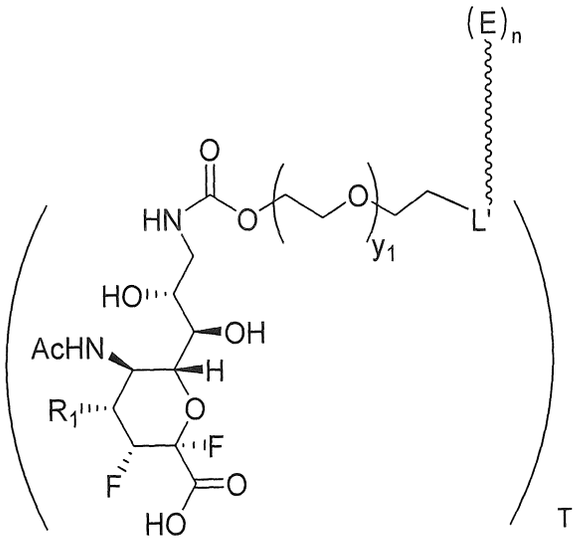
162. Thể liên hợp theo phương án 157, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-6):



(M-VI-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

163. Thể liên hợp theo phương án 162, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-7):



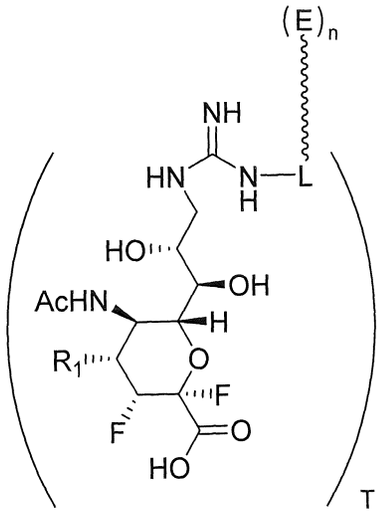
(M-VI-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

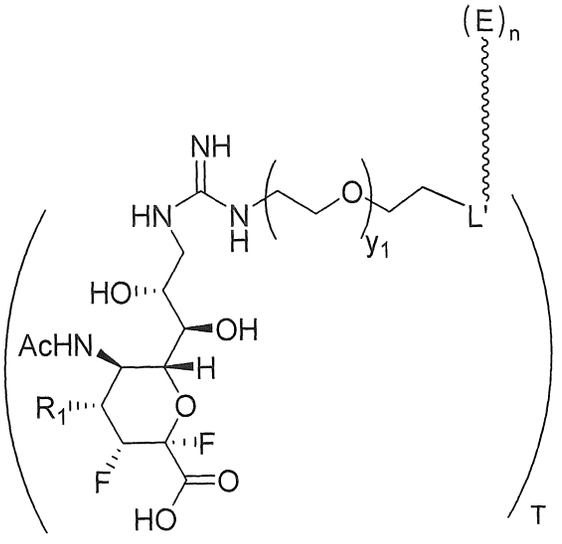
164. Thể liên hợp theo phương án 157, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-8):



(M-VI-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

165. Thể liên hợp theo phương án 164, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VI-9):



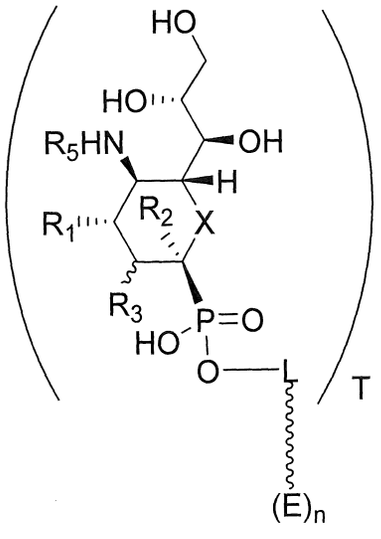
(M-VI-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và3

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

166. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VII):



(M-VII)

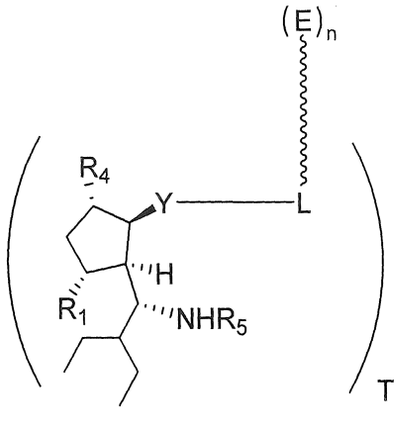
hoặc muối dược dụng của nó.

167. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-166 trong đó R1 là OH.

168. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-166 trong đó R1 là NH2.

169. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-166 trong đó R1 là -NHC(=NH)NH2.

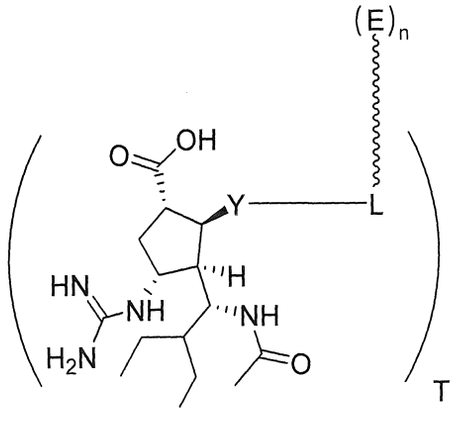
170. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII):



(M-VIII)

hoặc muối dược dụng của nó.

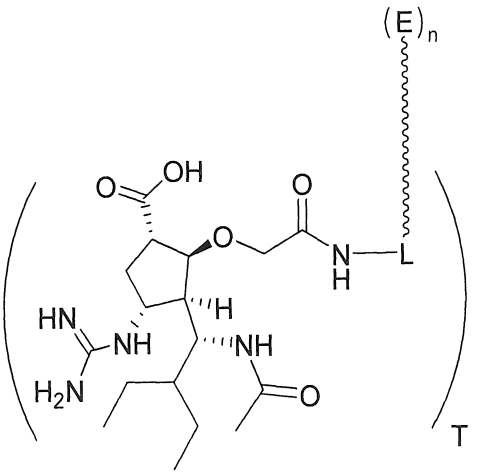
171. Thể liên hợp theo phương án 170, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-1):



(M-VIII-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

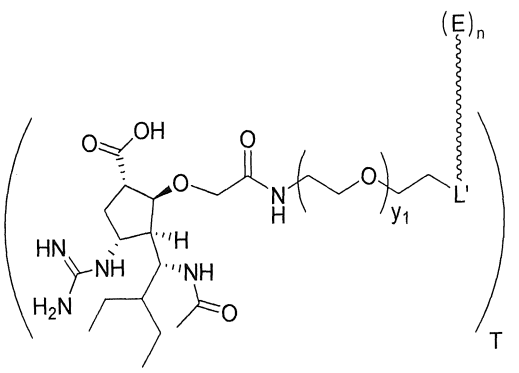
172. Thể liên hợp theo phương án 171, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-2):



(M-VIII-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

173. Thể liên hợp theo phương án 172, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-3):



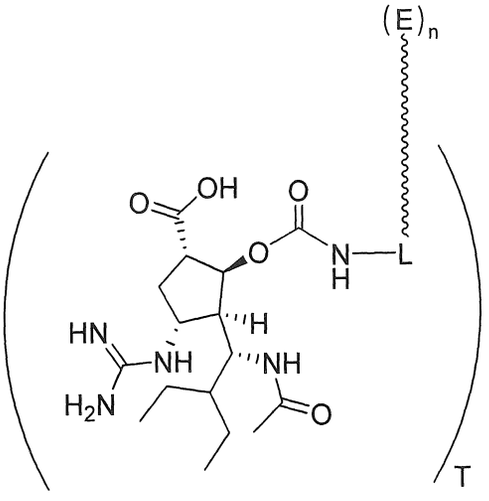
(M-VIII-3)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

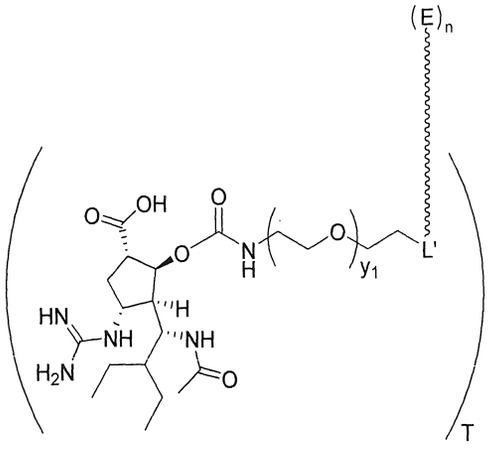
174. Thể liên hợp theo phương án 173, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-4):



(M-VIII-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

175. Thể liên hợp theo phương án 174, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-5):



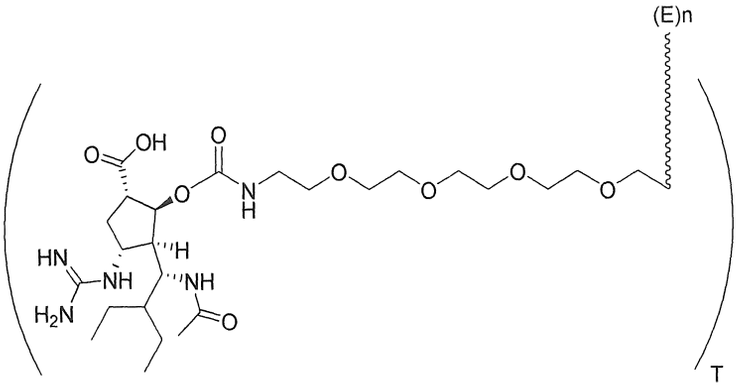
(M-VIII-5)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

y1 là số nguyên từ 1-20,

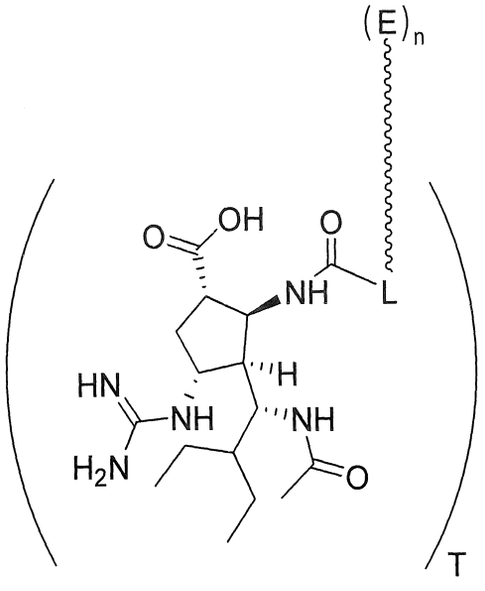
hoặc muối dược dụng của nó.

176. Thể liên hợp theo phương án 175, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

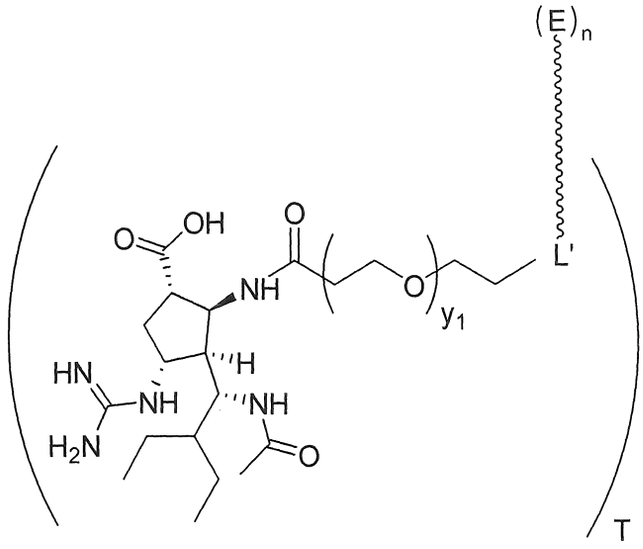
177. Thể liên hợp theo phương án 171, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-6):



(M-VIII-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

178. Thể liên hợp theo phương án 177, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-7):



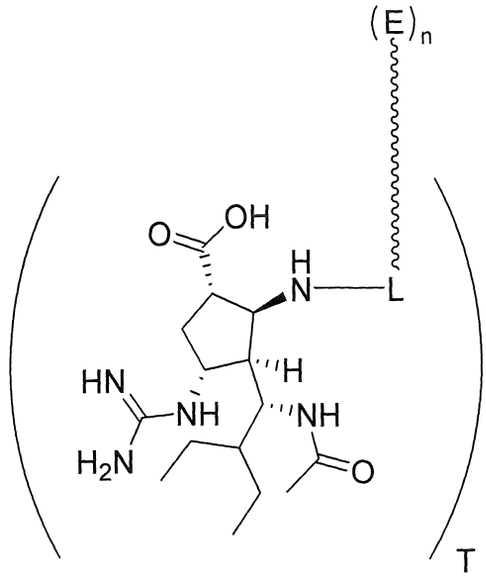
(M-VIII-7)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

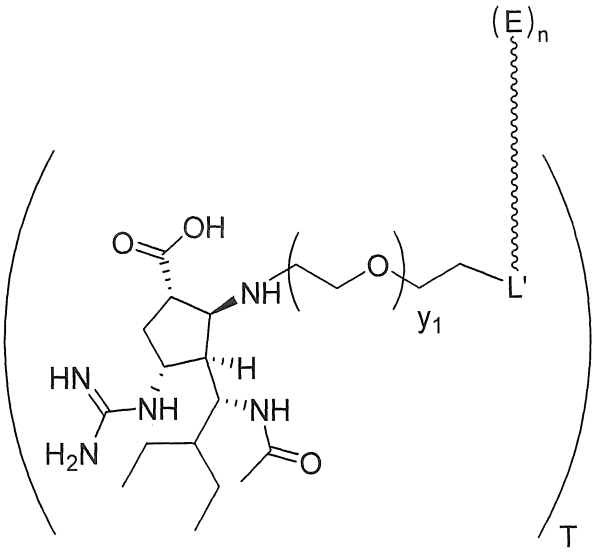
179. Thể liên hợp theo phương án 171, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-8):



(M-VIII-8)

hoặc muối dược dụng của nó.

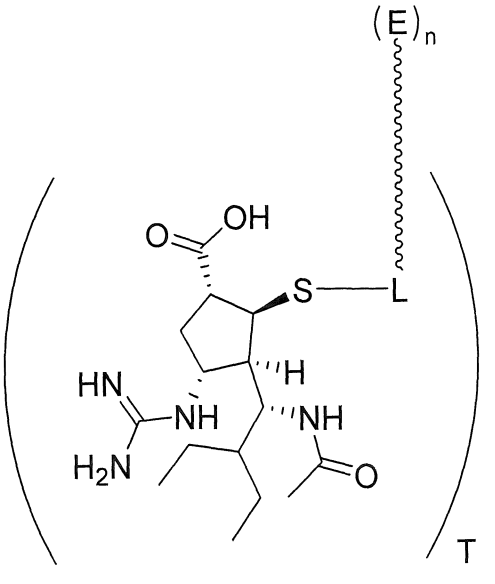
180. Thể liên hợp theo phương án 179, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-9):



(M-VIII-9)

trong đó L' là phần còn lại của L, và
mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,
hoặc muối dược dụng của nó.

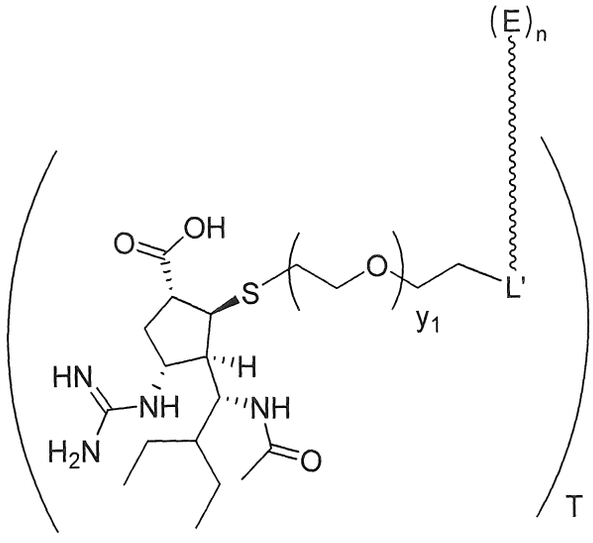
181. Thể liên hợp theo phương án 180, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-10):



(M-VIII-10)

hoặc muối dược dụng của nó.

182. Thể liên hợp theo phương án 181, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-VIII-11):



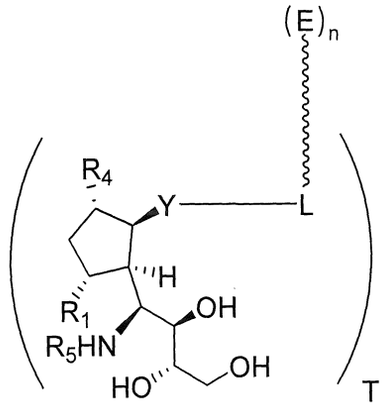
(M-VIII-11)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y1 và y2 độc lập là số nguyên từ 1-20,

hoặc muối dược dụng của nó.

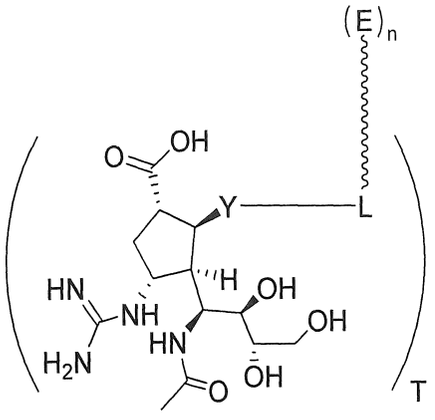
183. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX):



(M-IX)

hoặc muối dược dụng của nó.

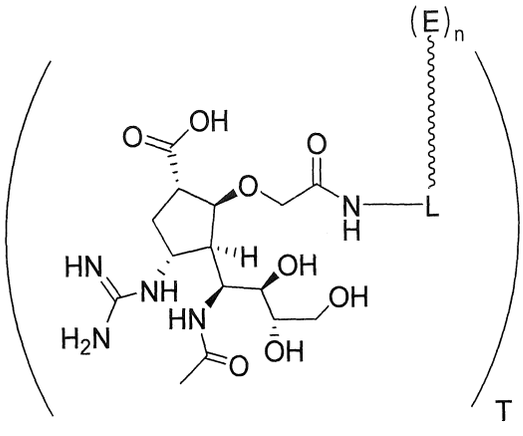
184. Thể liên hợp theo phương án 183, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-1):



(M-IX-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

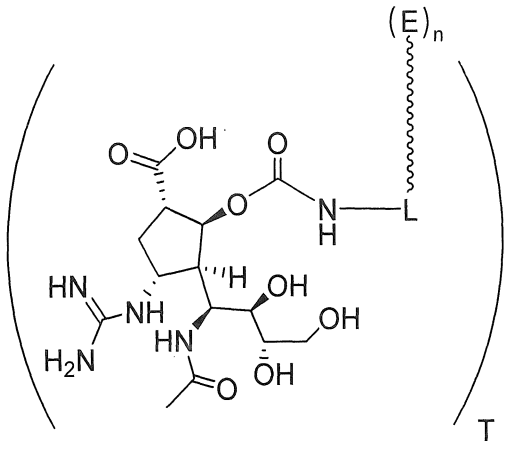
185. Thể liên hợp theo phương án 184, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-2):



(M-IX-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

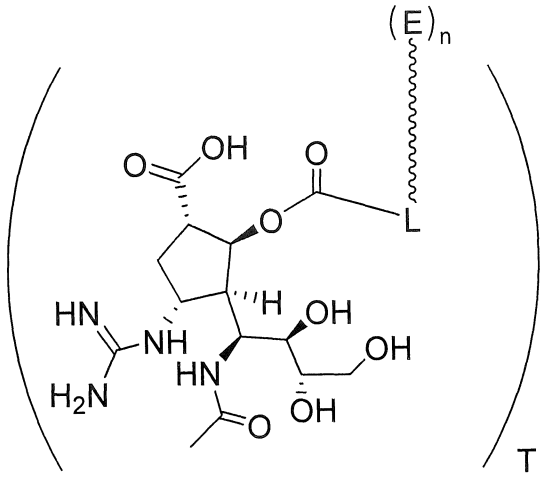
186. Thể liên hợp theo phương án 184, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-3):



(M-IX-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

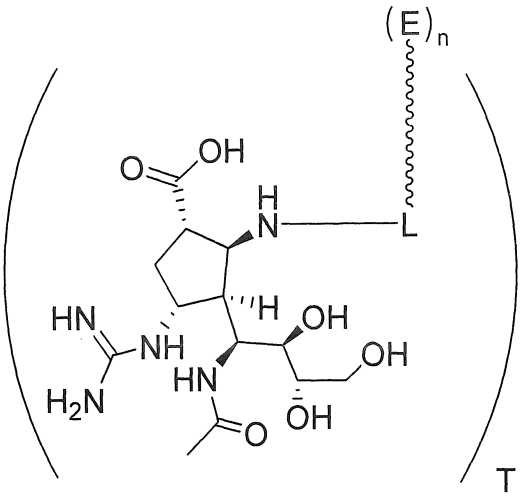
187. Thể liên hợp theo phương án 184, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-4):



(M-IX-4)

hoặc muối dược dụng của nó.

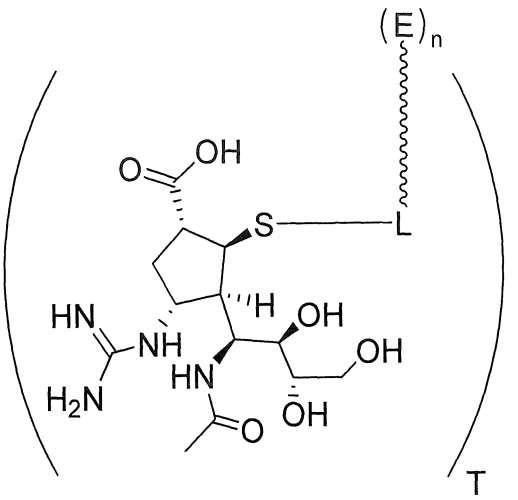
188. Thể liên hợp theo phương án 184, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-5):



(M-IX-5)

hoặc muối dược dụng của nó.

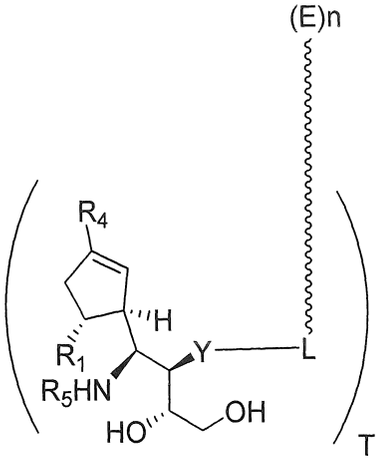
189. Thể liên hợp theo phương án 184, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-IX-6):



(M-IX-6)

hoặc muối dược dụng của nó.

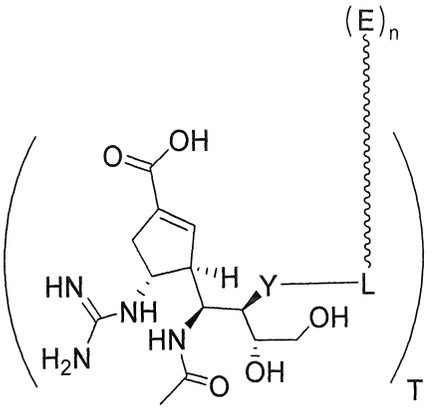
190. Thể liên hợp theo phương án 113, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-X):



(M-X)

hoặc muối dược dụng của nó.

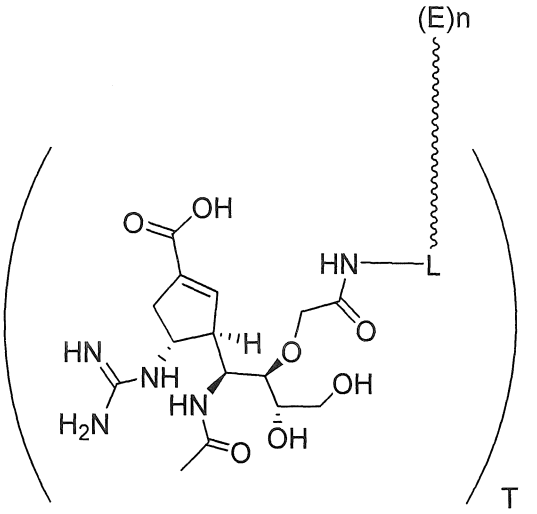
191. Thể liên hợp theo phương án 190, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-X-1):



(M-X-1)

hoặc muối dược dụng của nó.

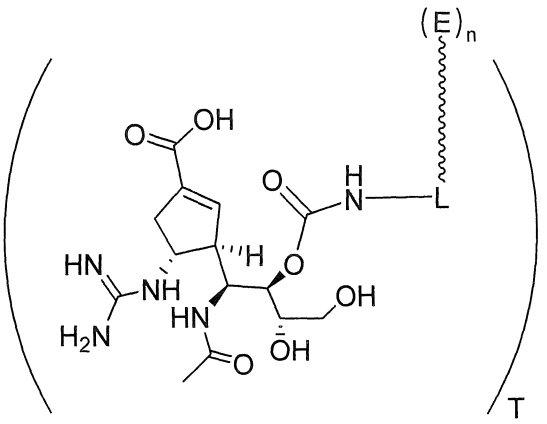
192. Thể liên hợp theo phương án 191, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-X-2):



(M-X-2)

hoặc muối dược dụng của nó.

193. Thể liên hợp theo phương án 190, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-X-3):



(M-X-3)

hoặc muối dược dụng của nó.

194. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-193, trong đó L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20

xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý, O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino,
trong đó Ri là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý.

195. Thể liên hợp theo phương án 194, trong đó khung của L hoặc L' bao gồm một hoặc nhiều C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý, O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino,
trong đó Ri là H, C1-C20 alkyl được thế tùy ý , C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý.

196. Thể liên hợp theo phương án 194 hoặc 195, trong đó L hoặc L' được thế oxo.

197. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-196, trong đó khung của L hoặc L' bao gồm không nhiều hơn 250 nguyên tử.

198. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-197, trong đó L hoặc L' có khả năng tạo thành liên kết amit, carbamat, sulfonyl, hoặc ure.

199. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-193, trong đó L hoặc L' là liên kết.

200. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-193, trong đó L hoặc L' là nguyên tử.

201. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-200, trong đó mỗi L được mô tả bằng công thức (M-L-I):

J1-(Q1)g-(T1)h-(Q2)i-(T2)j-(Q3)k-(T3)l-(Q4)m-(T4)n-(Q5)o-J2

trong đó J1 là liên kết được gắn A1;

J2 là liên kết được gắn vào E hoặc nhóm chức có khả năng phản ứng với nhóm chức được liên hợp với E (ví dụ, maleimit và xystein, amin và axit carboxylic hoạt hóa, thiol và maleimit, axit sulfonic hoạt hóa và amin, isoxyanat và amin, azit và alkyn, và alken và tetrazin);

mỗi Q1, Q2, Q3, Q4, và Q5 độc lập là C1-C20 alkylen được thế tùy ý, C1-C20 heteroalkylen được thế tùy ý, C2-C20 alkenylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenylen được thế tùy ý, C2-C20 alkynylen được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynylen được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkylen được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkylen được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenylen được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenylen được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynylen được thế tùy ý, C8-C20 heteroxycloalkynylen được thế tùy ý, C5-C15 arylen được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroarylen được thế tùy ý;

mỗi T1, T2, T3, T4 độc lập là O, S, NRi, P, cacbonyl, thiocacbonyl, sulfonyl, phosphat, phosphoryl, hoặc imino;

Ri là H, được thế tùy ý C1-C20 alkyl, C1-C20 heteroalkyl được thế tùy ý, C2-C20 alkenyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkenyl được thế tùy ý, C2-C20 alkynyl được thế tùy ý, C2-C20 heteroalkynyl được thế tùy ý, C3-C20 xycloalkyl được thế tùy ý, C3-C20 heteroxycloalkyl được thế tùy ý, C4-C20 xycloalkenyl được thế tùy ý, C4-C20 heteroxycloalkenyl được thế tùy ý, C8-C20 xycloalkynyl được thế tùy ý, C8-C20

heteroxycloalkynyl được thế tùy ý, C5-C15 aryl được thế tùy ý, hoặc C2-C15 heteroaryl được thế tùy ý; và mỗi g, h, i, j, k, l, m, n, và o độc lập bằng 0 hoặc 1.

202. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-201, trong đó R1 là -NHC(=NH)NH2.

203. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-202, trong đó R2 là -F.

204. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-203, trong đó R3 là -F.

205. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-204, trong đó R4 là –CO2H.

206. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-205, trong đó R5 là –COCH3.

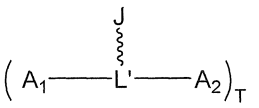
207. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-206, trong đó đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng L của mỗi A1-L hoặc mỗi A1-L-A2 được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc với dung môi của E.

208. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-206, trong đó đường lượn sóng được nối với E chỉ ra rằng L của mỗi A1-L hoặc mỗi A1-L-A2 L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc với dung môi của E.

209. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-208, trong đó mỗi E là monome miền Fc.

210. Thể liên hợp theo phương án 209, trong đó n bằng 2, và mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc.

211. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 2-4, trong đó n bằng 2, mỗi E là monome miền Fc, mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc, và thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-I-1):



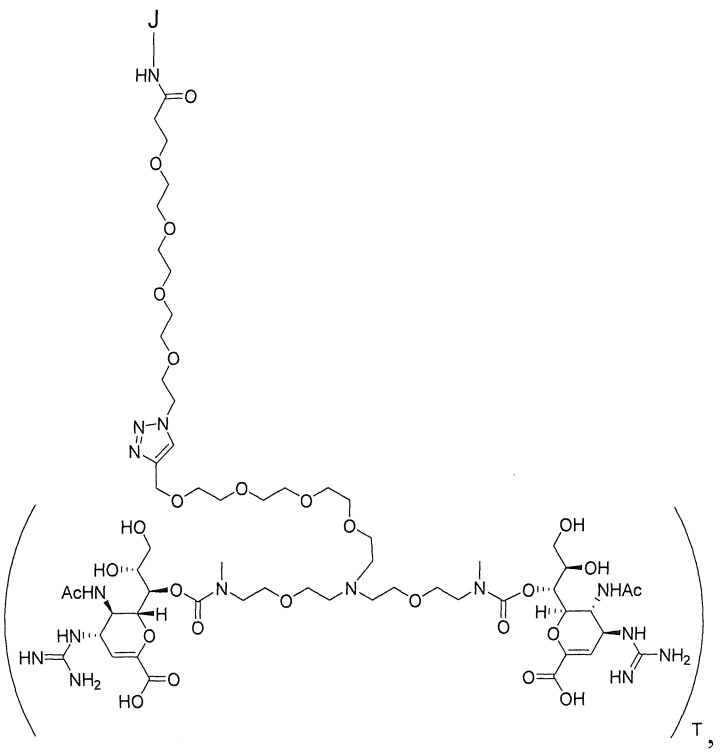
(D-I-1)

trong đó J là miền Fc; và

T là số nguyên từ 1 đến 20,

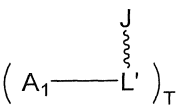
hoặc muối dược dụng của nó.

212. Thể liên hợp theo phương án 211, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

213. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 113-115, trong đó n bằng 2, mỗi E là monome miền Fc, mỗi E dime hóa để tạo thành miền Fc, và thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (M-I-1):



(M-I-1)

trong đó J là miền Fc; và
T là số nguyên từ 1 đến 20,
hoặc muối dược dụng của nó.

214. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 209-213, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-138.

215. Thể liên hợp theo phương án 214, trong đó mỗi E bao gồm và trình tự axit amin có ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95.

216. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62.

217. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

218. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64.

219. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

220. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68.

221. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72.

222. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73.

223. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

224. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

225. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80.

226. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 81.

227. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 82.

228. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 85.

229. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86.

230. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90.

231. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91.

232. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94.

233. Thể liên hợp theo phương án 215, trong đó mỗi E bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 95.

234. Thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 209-233, trong đó T bằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10.

235. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 209-233, trong đó giá trị trung bình của T là 1 đến 10.

236. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án 235, trong đó giá trị trung bình của T là 1 đến 5.

237. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án 235, trong đó giá trị trung bình của T là từ 3 đến 7.

238. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án 236 hoặc 237, trong đó giá trị trung bình của T là từ 3,5 đến 5.5.

239. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án 236 hoặc 237, trong đó giá trị trung bình của T là khoảng 4,5.

240. Tập hợp của các thể liên hợp theo phương án 235, trong đó giá trị trung bình của T là từ 5 đến 10.

241. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-234, hoặc tập hợp của các thể liên hợp theo các phương án 235-240, hoặc muối dược dụng của chúng, và tá dược dược dụng.

242. Phương pháp điều trị cho đối tượng bị nhiễm virut hoặc được cho là bị nhiễm virut, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của thể liên hợp hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-241.

243. Phương pháp điều trị phòng ngừa nhiễm virut ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của thể liên hợp hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-241.

244. Phương pháp theo phương án 242 hoặc 243, trong đó nhiễm virut gây ra bởi virut cúm hoặc virut á cúm.

245. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-244, trong đó nhiễm virut là virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

246. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-245, trong đó đối tượng bị suy giảm miễn dịch.

247. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-246, trong đó đối tượng đã được chẩn đoán thiếu hụt miễn dịch dịch thể, thiếu hụt tế bào T, giảm bạch cầu trung tính, thiếu lách, hoặc thiếu hụt bổ thể.

248. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-247, trong đó đối tượng đang được điều trị hoặc sắp được điều trị bằng liệu pháp ức chế miễn dịch.

249. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-248, trong đó đối tượng đã được chẩn đoán mắc bệnh gây ra ức chế miễn dịch.

250. Phương pháp theo phương án 249, trong đó bệnh là bệnh ung thư hoặc hội chứng rối loạn miễn dịch mắc phải.

251. Phương pháp theo phương án 250, trong đó bệnh ung thư là bệnh bạch cầu, u lympho, hoặc bệnh đa u tủy.

252. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-251, trong đó đối tượng đã trải qua hoặc sắp trải qua cấy ghép tế bào gốc máu tự thân.

253. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-252, trong đó đối tượng đã trải qua hoặc sắp trải qua cấy ghép cơ quan.

254. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-253, trong đó đối tượng có hoặc có nguy cơ phát triển nhiễm thứ cấp.

255. Phương pháp ngăn ngừa nhiễm thứ cấp ở đối tượng được chẩn đoán nhiễm cúm, trong đó phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng thể liên hợp hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-241.

256. Phương pháp theo các phương án 254 or 255, trong đó nhiễm thứ cấp là nhiễm đường hô hấp.

257. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 254-256, trong đó nhiễm thứ cấp có liên quan đến bệnh viêm phổi.

258. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 254-257, trong đó nhiễm thứ cấp là nhiễm khuẩn, lây nhiễm virut, hoặc nhiễm nấm.

259. Phương pháp theo phương án 258, trong đó nhiễm thứ cấp là nhiễm khuẩn.

260. Phương pháp theo phương án 259, trong đó nhiễm khuẩn là nhiễm *Staphylococcus aureus* kháng methixilin (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, hoặc *Haemophilus influenzae*.

261. Phương pháp theo phương án 260, trong đó nhiễm khuẩn là MRSA.

262. Phương pháp theo phương án 260, trong đó nhiễm khuẩn là *S. pneumoniae*.

263. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-262 trong đó thể liên hợp của dược phẩm được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong màng bụng, trong tổn thương, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong dịch kính, trong âm đạo, trong trực tràng, khu trú, trong khối u, màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong phế nang, trong niêm mạc, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, miệng, cục bộ, bằng cách xông, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách truyền.

264. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-263, trong đó đối tượng được điều trị bằng tác nhân trị liệu thứ hai.

265. Phương pháp theo phương án 264, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai là tác nhân kháng virut.

266. Phương pháp theo phương án 264, trong đó tác nhân kháng virut được chọn từ pimovidir, oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir, amantadin, hoặc rimantadin.

267. Phương pháp theo phương án 266, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai là vắc-xin kháng virut.

268. Phương pháp theo phương án 267, trong đó vắc-xin kháng virut gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng đối với virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

269. Phương pháp theo phương án 265, trong đó tác nhân kháng virut là baloxavir.

270. Phương pháp theo phương án 265, trong đó thể liên hợp và baloxavir được dùng lần lượt.

271. Phương pháp theo phương án 265, trong đó thể liên hợp và baloxavir được dùng đồng thời.

272. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-271, trong đó thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-6).

273. Phương pháp theo phương án 272, trong đó R7 được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

274. Phương pháp theo phương án 272 hoặc 273, trong đó R7 được chọn từ metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

275. Phương pháp theo các phương án 272-274, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-7).

276. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-275, trong đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63-68.

277. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-275, trong đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, hoặc SEQ ID NO: 73.

278. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-275, trong đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, hoặc SEQ ID NO: 77.

279. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 242-275, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp 45 hoặc thể liên hợp 46.

280. Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa nhiễm virut ở đối tượng, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng:

a) thể liên hợp hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-241; và

b) tác nhân trị liệu thứ hai.

281. Phương pháp theo phương án 280, trong đó thể liên hợp được dùng cho đối tượng sau khi đối tượng đã bị nhiễm virut, được cho là bị nhiễm virut, hoặc đã được tiếp xúc với virut.

282. Phương pháp theo phương án 280, trong đó thể liên hợp được dùng cho đối tượng để phòng ngừa.

283. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 278-282, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai được dùng cho đối tượng sau khi đối tượng đã bị nhiễm virut, được cho là bị nhiễm virut, hoặc đã được tiếp xúc với virut.

284. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 278-283, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai được dùng cho đối tượng để phòng ngừa.

285. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 278-284, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai được dùng thể liên hợp trong vòng 2 ngày.

286. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 278-285, trong đó tác nhân trị liệu thứ hai là tác nhân kháng virut.

287. Phương pháp theo phương án 286, trong đó tác nhân kháng virut là pimovidir, oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir, amantadin, baloxavir marboxil, axit baloxavir, rimantadin, hoặc muối dược dụng của chúng.

288. Phương pháp theo phương án 287, trong đó tác nhân kháng virut là baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng.

289. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 288, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 20 mg đến 90 mg.

290. Phương pháp theo phương án 286, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng qua đường miệng.

291. Phương pháp theo phương án 289 hoặc 290, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng dưới dạng một liều đơn.

292. Phương pháp theo phương án 289 hoặc 290, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng dưới dạng nhiều hơn một liều đơn.

293. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 289-292, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 20 mg đến 40 mg.

294. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 289-292, trong đó baloxavir marboxil, axit baloxavir, hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 80 mg.

295. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 278-294, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-6).

296. Phương pháp theo phương án 295, trong đó R7 được chọn từ C1-C20 alkyl, C3-C20 xycloalkyl, C3-C20 heteroxycloalkyl; C5-C15 aryl, và C2-C15 heteroaryl.

297. Phương pháp theo phương án 295 hoặc 296, trong đó R7 được chọn từ metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

298. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 295-297, trong đó thể liên hợp này được mô tả bằng công thức (D-II-7).

299. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 280-298, trong đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63-68.

300. Phương pháp theo phương án 299, trong đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, hoặc SEQ ID NO: 73.

301. Phương pháp theo phương án 300, trọng đó mỗi E có trình tự ít nhất 95% giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, hoặc SEQ ID NO: 77.

302. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 280-298, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp 45 hoặc thể liên hợp 46.

303. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 280-302, trong đó thể liên hợp được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong màng bụng, trong tổn thương, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong dịch kính, trong âm đạo, trong trực tràng, khu trú, trong khối u, màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong phế nang, trong niêm mạc, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, bằng đường miệng, cục bộ, bằng cách xông, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách truyền.

304. Phương pháp theo phương án 303, trong đó thể liên hợp được dùng trong tĩnh mạch.

305. Phương pháp theo phương án 303, trong đó thể liên hợp được dùng dưới da.

306. Phương pháp theo phương án 303, trong đó thể liên hợp được dùng trong cơ.

307. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 280-306, trong đó nhiễm virut gây ra bởi virut cúm hoặc virut á cúm.

308. Phương pháp theo phương án 307, trong đó virut là virut cúm A, B, hoặc C, hoặc virut á cúm.

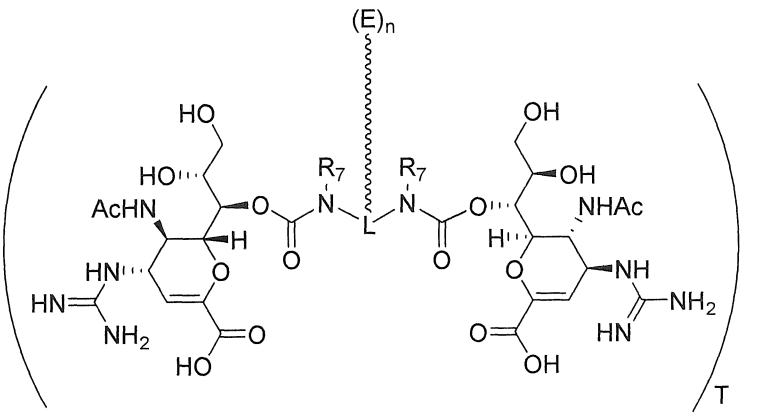
Các phương án khác

Mặc dù sáng chế đã được mô tả liên quan đến các phương án cụ thể của nó, nhưng cần hiểu rằng nó có khả năng được cải biến thêm và đơn sáng chế này nhằm mục đích bao hàm biến thể, cách sử dụng hoặc điều chỉnh bất kỳ của sáng chế theo, nói chung, các nguyên tắc của sáng chế và bao gồm các sự khác biệt so với sáng chế nằm trong thông lệ đã biết hoặc thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế liên quan đến và có thể được áp dụng cho các dấu hiệu thiết yếu được nêu ở trên, và tuân theo phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Tất cả các ấn phẩm, bằng sáng chế và đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế được đề cập trong bản mô tả trên đây đều được đưa vào đây bằng cách tham khảo ở cùng mức độ như thể mỗi ấn phẩm, bằng sáng chế hoặc đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế riêng lẻ được chỉ định cụ thể và riêng lẻ để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn trong toàn bộ.

Phần mô tả chi tiết về một hoặc nhiều phương án được ưa tiên được cung cấp ở đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới nhiều hình thức khác nhau. Do đó, các chi tiết cụ thể được bộc lộ ở đây không được hiểu là giới hạn, mà là cơ sở cho các điểm yêu cầu bảo hộ và là cơ sở đại diện để hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng sáng chế theo cách thức phù hợp bất kỳ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-6):



(D-II-6)

trong đó mỗi E chứa monome miền Fc;

n là 1 hoặc 2;

T là số nguyên từ 1 đến 20;

L là phần tử liên kết;

R_7 được chọn từ C_1-C_{20} alkyl; và

đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn cộng hóa trị với E,

hoặc muối dược dụng của nó.

2. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc với dung môi của E.

3. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc với dung môi của E.

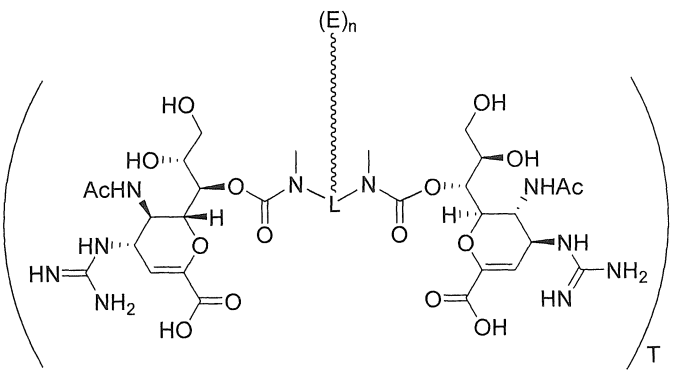
4. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó n là 2, và hai E dime hóa với nhau để tạo thành miền Fc.

5. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10.

6. Tập hợp của các thể liên hợp theo điểm 1, trong đó giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

7. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó R_7 là metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

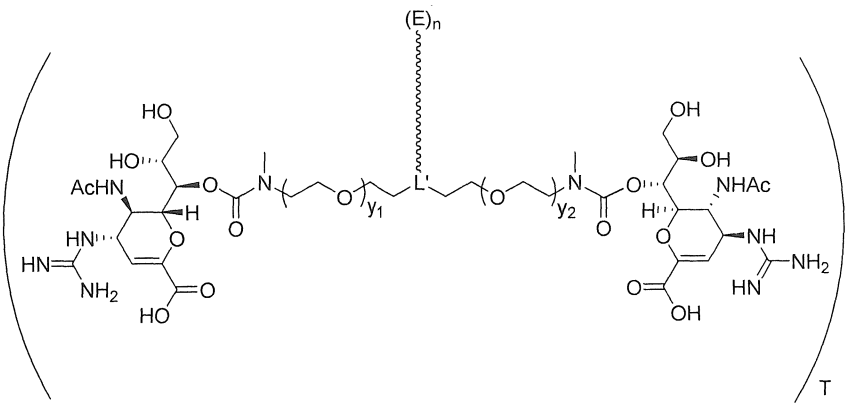
8. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-7):



(D-II-7)

hoặc muối dược dụng của nó.

9. Thể liên hợp theo điểm 8, trong đó thể liên hợp được mô tả bằng công thức (D-II-8):



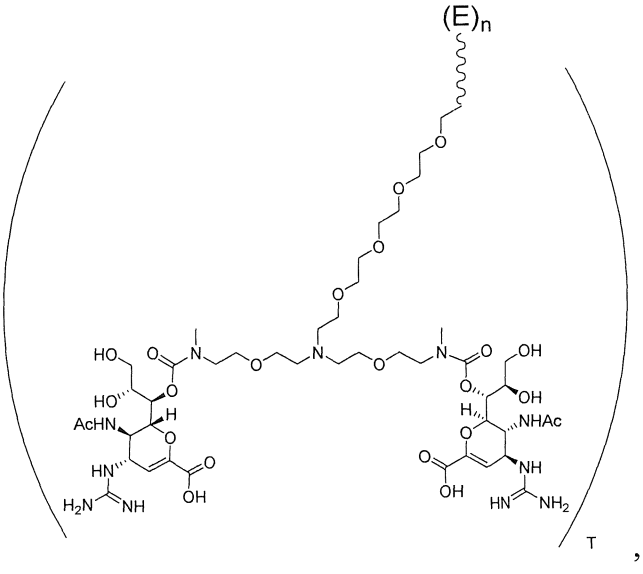
(D-II-8)

trong đó L' là phần còn lại của L, và

mỗi y_1 và y_2 độc lập là số nguyên từ 1 đến 20,

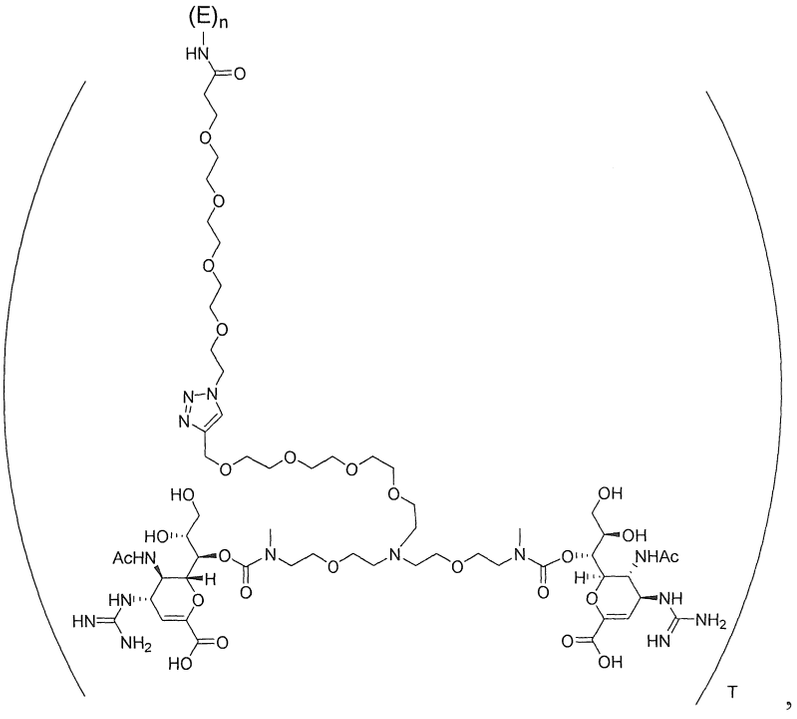
hoặc muối dược dụng của nó.

10. Thể liên hợp theo điểm 9, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

11. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

12. Thể liên hợp theo điểm 11, trong đó n là 2, và hai E dime hóa với nhau để tạo thành miền Fc.

13. Thể liên hợp theo điểm 11, trong đó T là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10.

14. Tập hợp của các thể liên hợp theo điểm 11, trong đó giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

15. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin được chọn độc lập từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 138.

16. Thể liên hợp theo điểm 1, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin được chọn độc lập từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, và SEQ ID NO: 77.

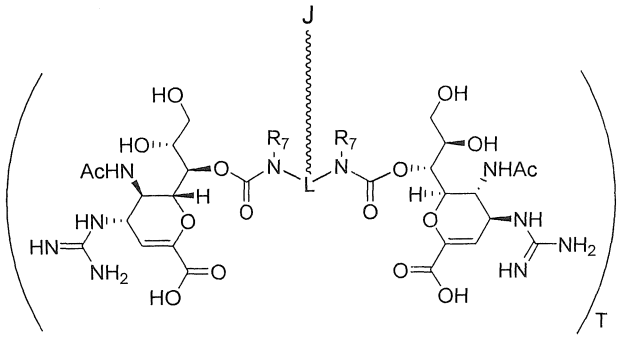
17. Thể liên hợp theo điểm 16, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72.

18. Thể liên hợp theo điểm 16, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73.

19. Thể liên hợp theo điểm 16, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

20. Thể liên hợp theo điểm 16, trong đó mỗi E chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

21. Thể liên hợp được mô tả bằng cấu trúc:



trong đó J là miền Fc chứa hai monome miền Fc;

T là số nguyên từ 1 đến 20,

L là phần tử liên kết;

R_7 được chọn từ C_1-C_{20} alkyl; và

đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn cộng hóa trị với J,

hoặc muối dược dụng của nó.

22. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của lysin tiếp xúc với dung môi của J.

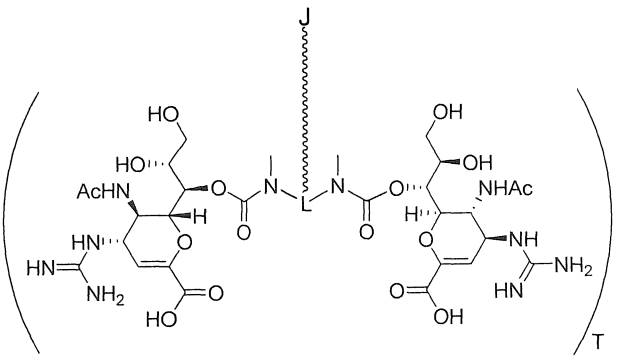
23. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó đường lượn sóng biểu thị rằng L được gắn

cộng hóa trị với nguyên tử lưu huỳnh của xystein tiếp xúc với dung môi của J.

24. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó R_7 là metyl, etyl, propyl, hoặc butyl.

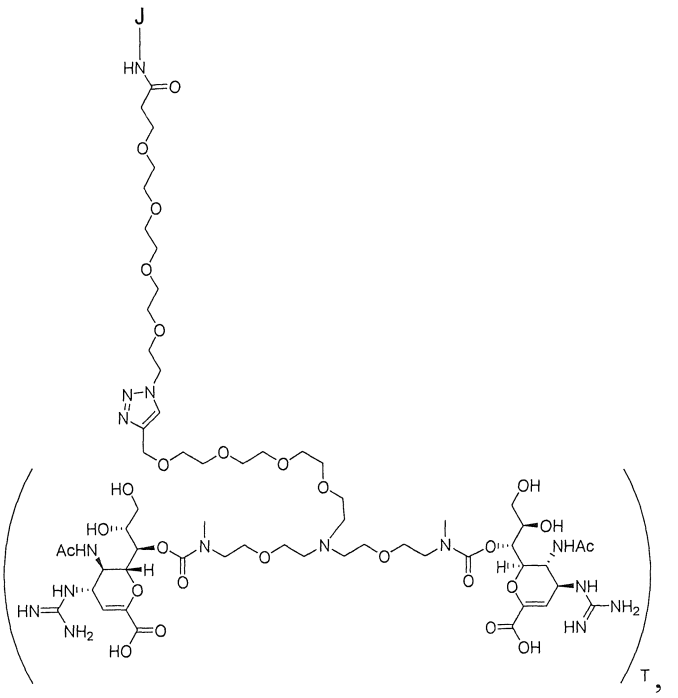
25. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó T là số nguyên từ 1 đến 10.

26. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

27. Thể liên hợp theo điểm 26, trong đó thể liên hợp này có cấu trúc:



hoặc muối dược dụng của nó.

28. Thể liên hợp theo điểm 26, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin được chọn độc lập từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 138.

29. Thể liên hợp theo điểm 28, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin được chọn độc lập từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, và SEQ ID NO: 77.

30. Thể liên hợp theo điểm 29, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72.

31. Thể liên hợp theo điểm 29, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73.

32. Thể liên hợp theo điểm 29, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

33. Thể liên hợp theo điểm 29, trong đó mỗi monome miền Fc chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 77.

34. Thể liên hợp theo điểm 27, trong đó T là số nguyên từ 1 đến 10.

35. Tập hợp của các thể liên hợp theo điểm 27, trong đó giá trị trung bình của T nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

FIG. 1

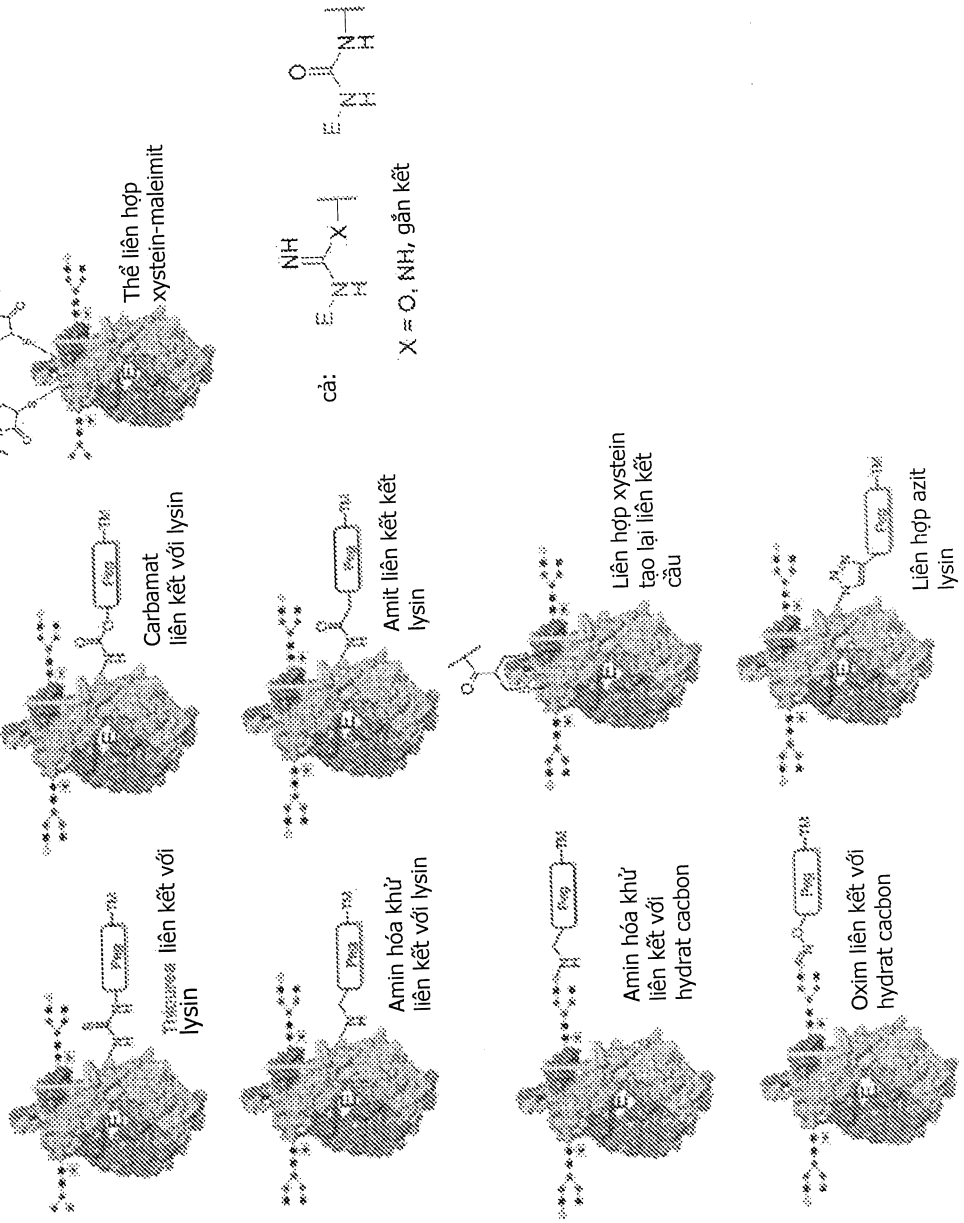

Thioether liên kết với lysin
Carbamat liên kết với lysin
Thể liên hợp xystein-maleimit
Amin hóa khử liên kết với lysin
Amit liên kết kết lysin
cả:
X = O, NH, gắn kết
Amin hóa khử liên kết với hydrat cacbon
Liên hợp xystein tạo lại liên kết cầu
Oxim liên kết với hydrat cacbon
Liên hợp azit lysin

FIG. 2

(SEQ ID NO: 1: Fc-IgG2a của chuột với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N)

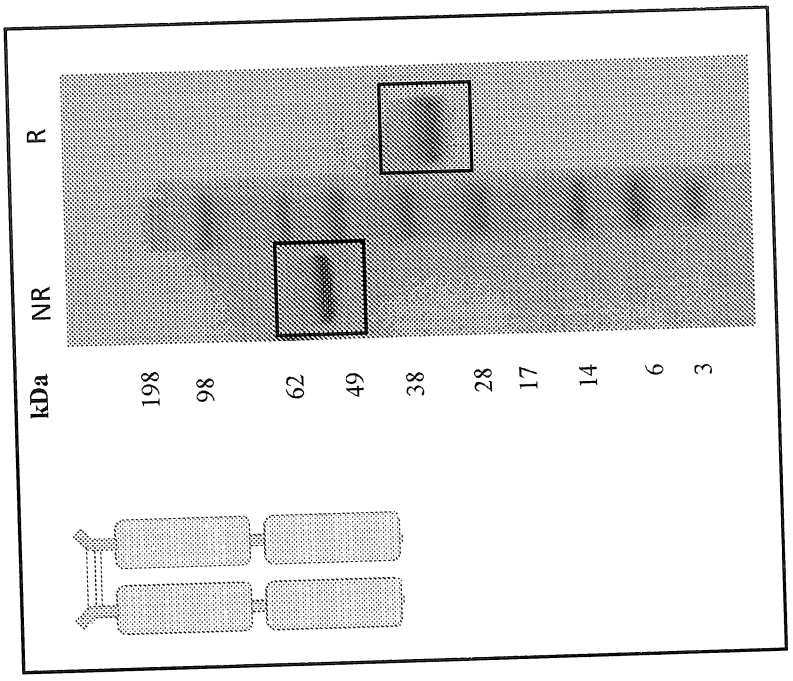


FIG. 3

(SEQ ID NO: 3: Fc-IgG của người với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N)

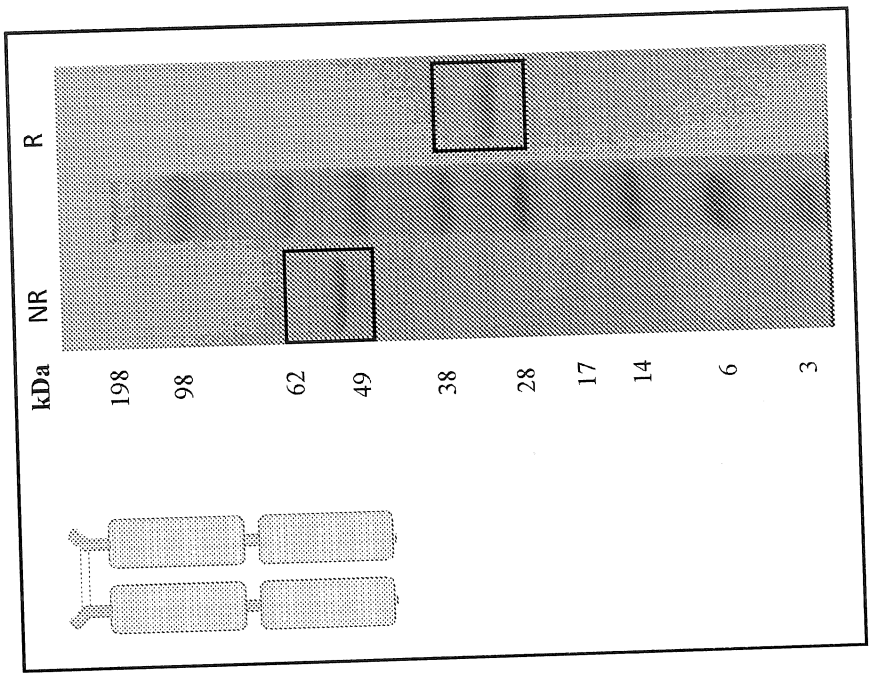


FIG. 4

(SEQ ID NO: 5: Fc-IgG2a của chuột với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N và hexa-histidin peptit ở đầu tận cùng C)

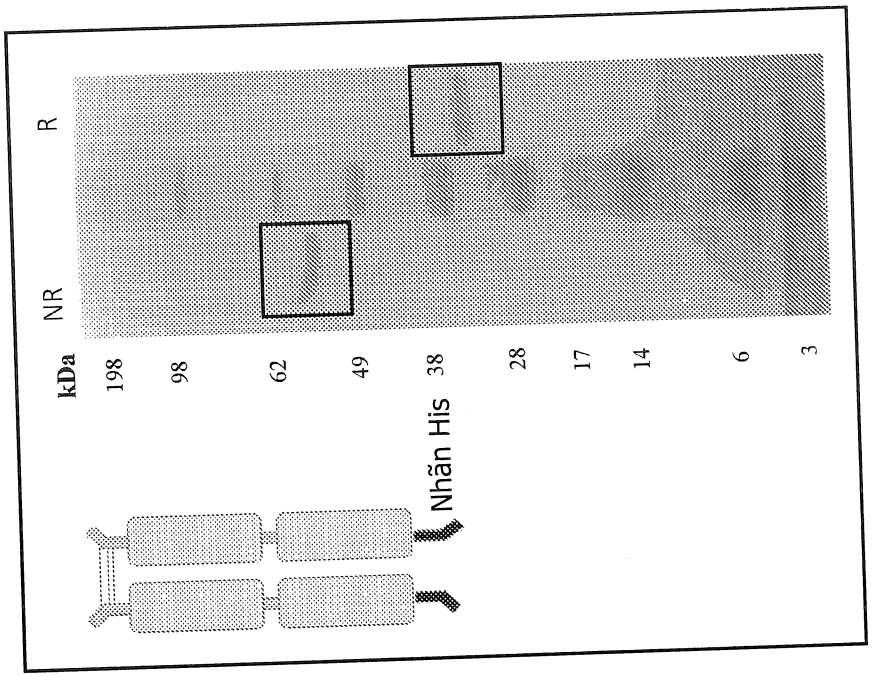


FIG. 5

(SEQ ID NO: 7 : Fc-IgG1 của người với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N và hexa-histidin peptit ở đầu tận cùng C)

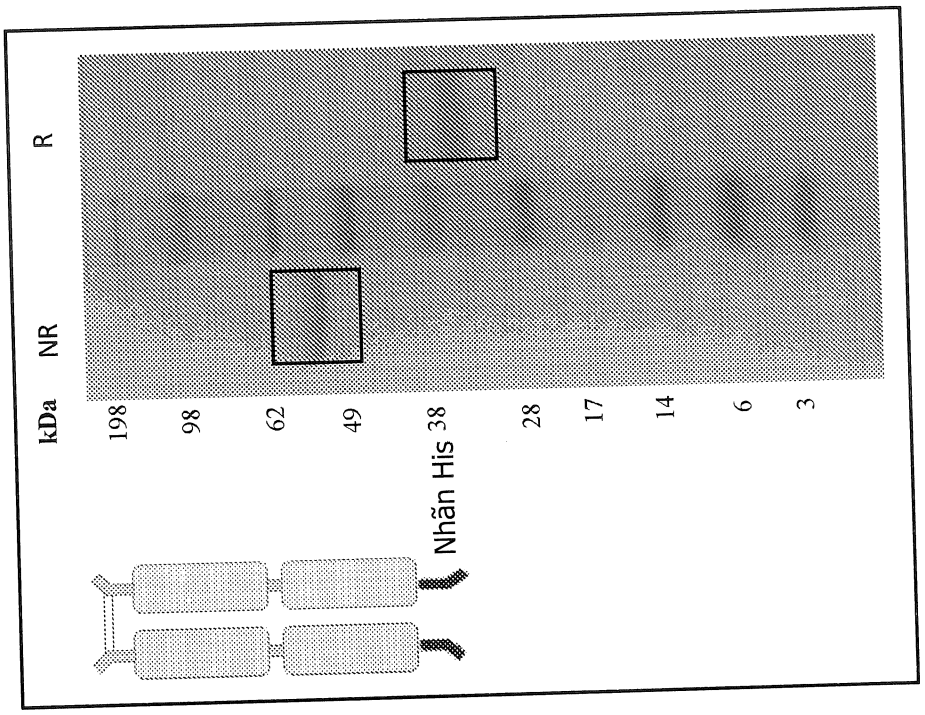


FIG. 6
(SEQ ID NO: 9: Fc-IgG1 của người với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N, hai xystein bổ sung ở vùng bản lề, và hexa-histidin peptit ở đầu tận cùng C)

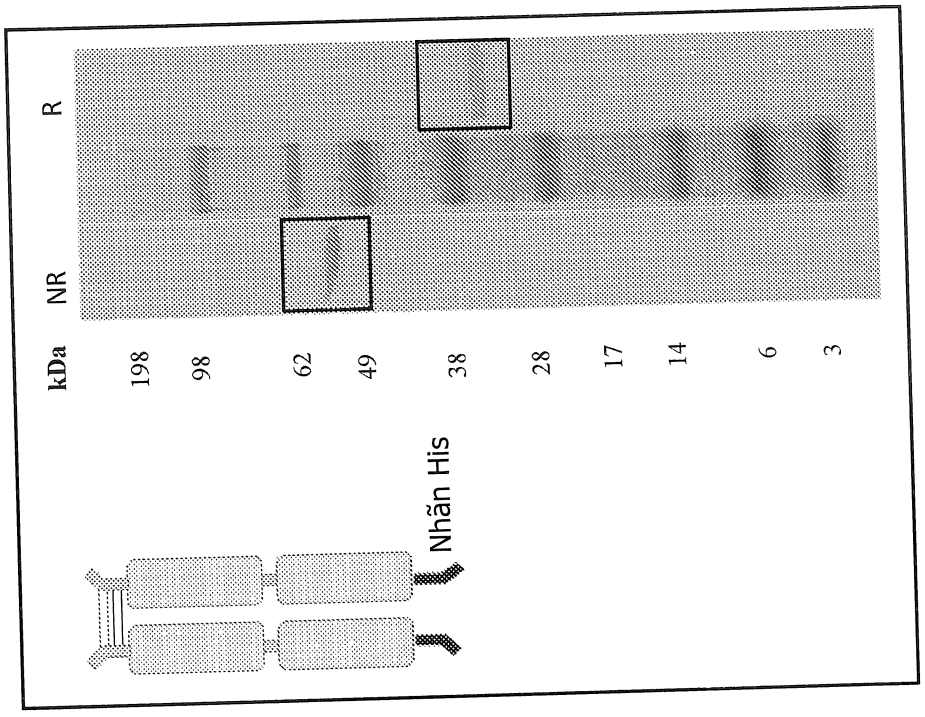


FIG. 7

(SEQ ID NO: 12: Fc-IgG2a của chuột với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N, thay thế Asn thành Ala, và hexa-histidin peptit ở đầu tận cùng C)

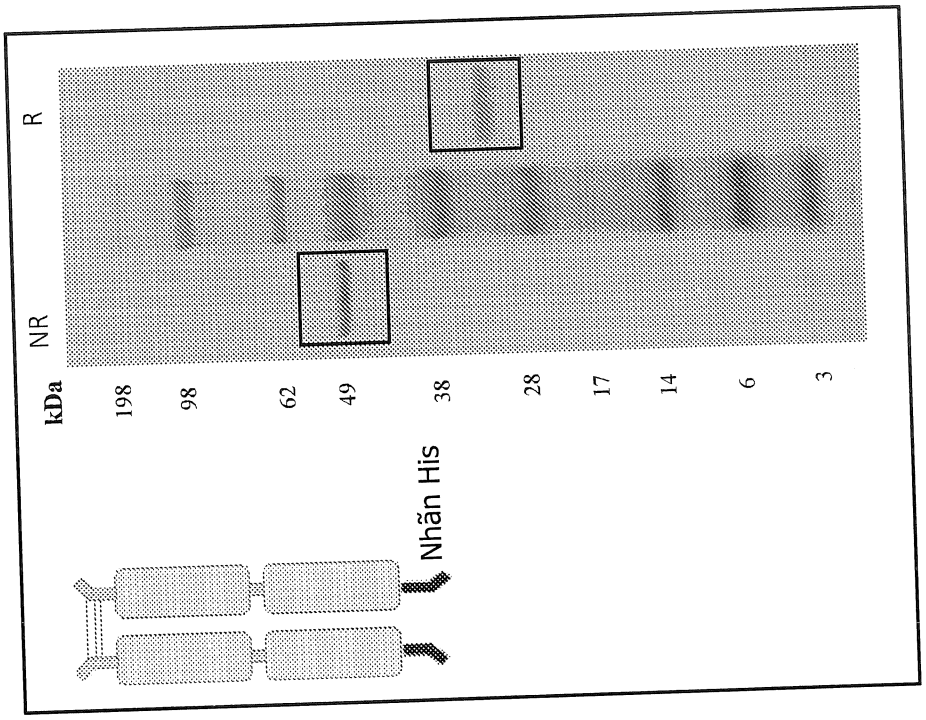


FIG. 8

(SEQ ID NO: 14: Fc-IgG1 của người với trình tự tín hiệu IL2 ở đầu tận cùng N, thay thế Asn thành Ala, và hexa-histidin peptit ở đầu tận cùng C)

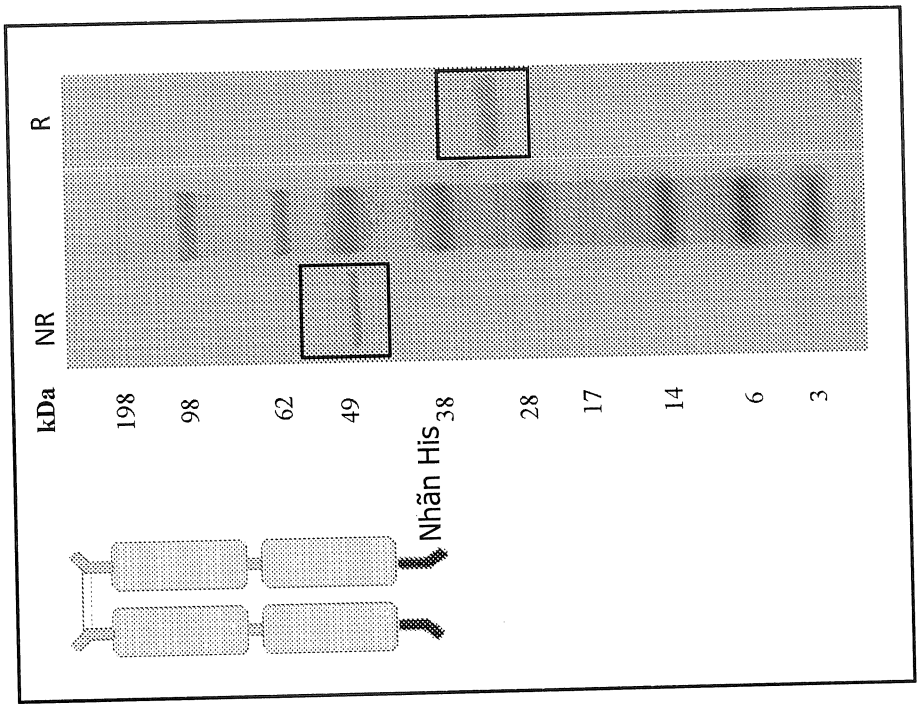


FIG. 9

Thể liên hợp 1

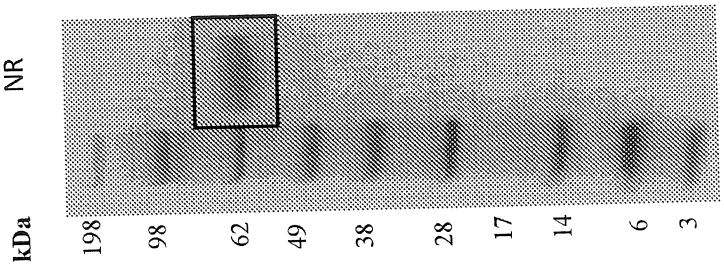


FIG. 10
Thể liên hợp 2

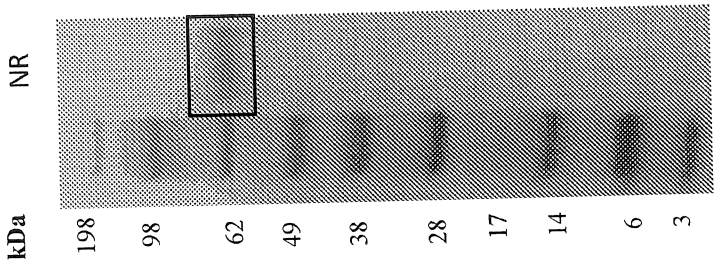


FIG. 11
Thể liên hợp 3

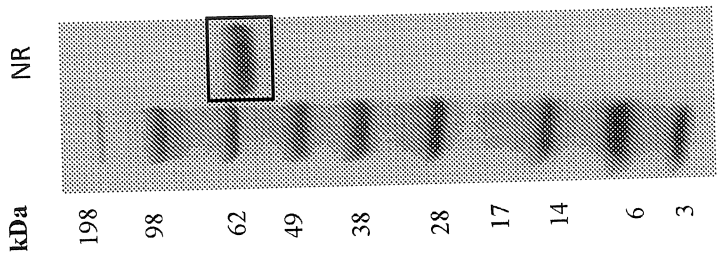


FIG. 12
Thể liên hợp 4

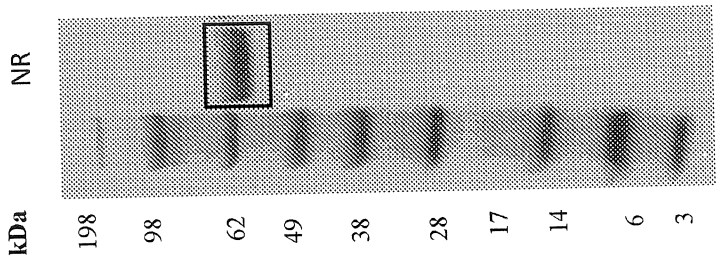


FIG. 13
Thể liên hợp 5

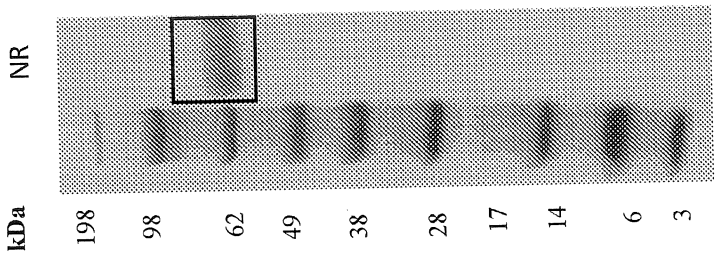


FIG. 14
Thể liên hợp 6

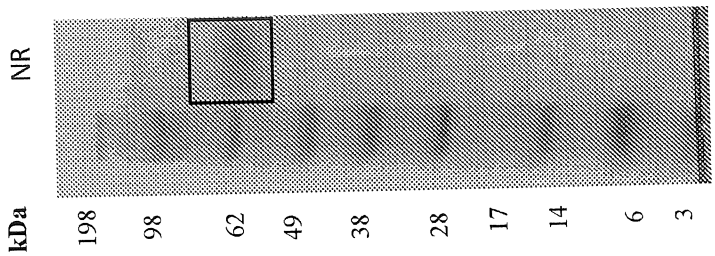


FIG. 15

IC_{50} đối với neuraminidaza của H1N1 (uM)

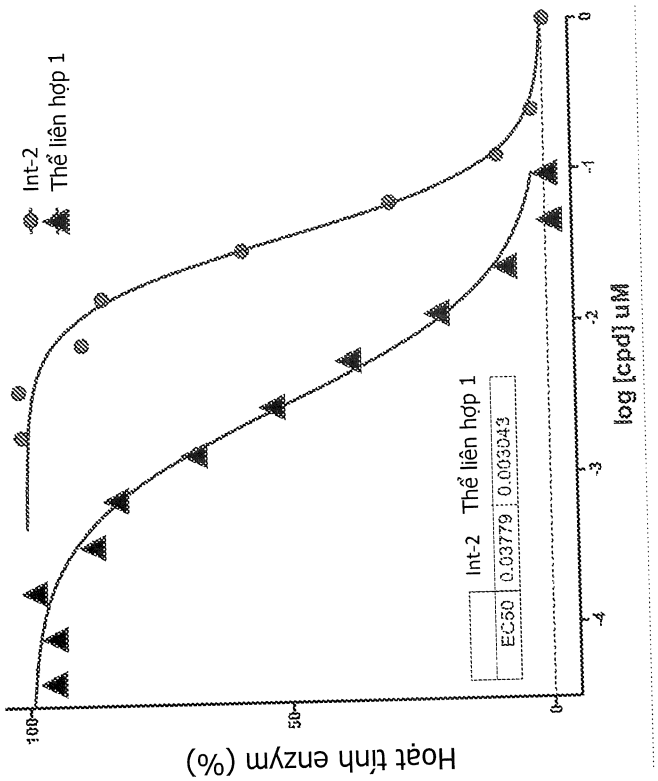


FIG. 16

IC_{50} đối với neuraminidaza của H1N1 (uM)

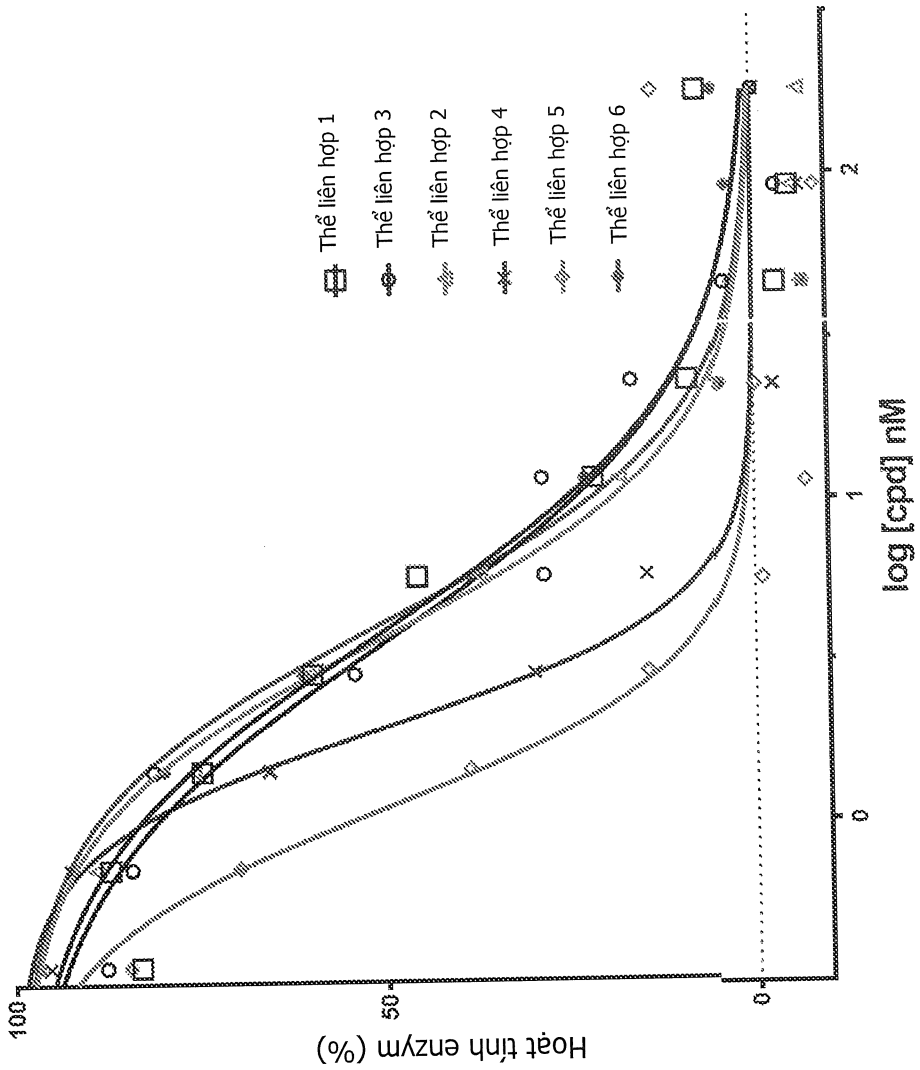


FIG. 17

IC_{50} đối với neuraminidaza của H3N2 (uM)

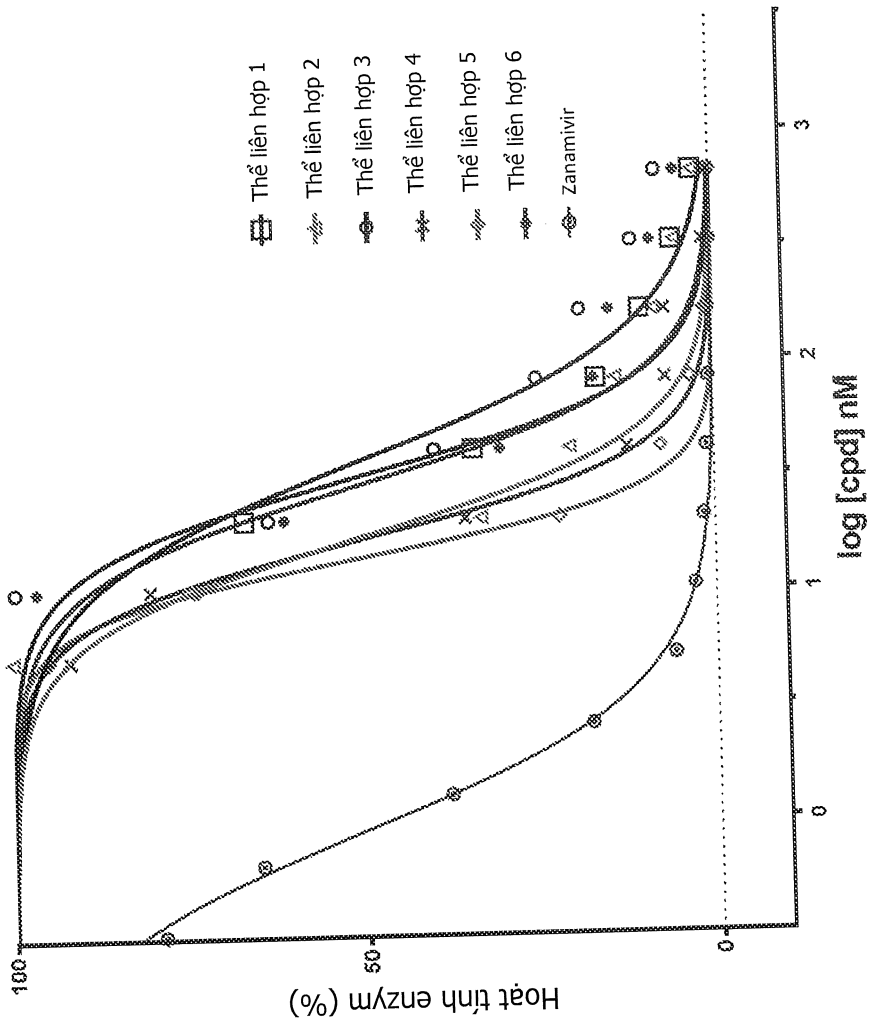


FIG. 18A

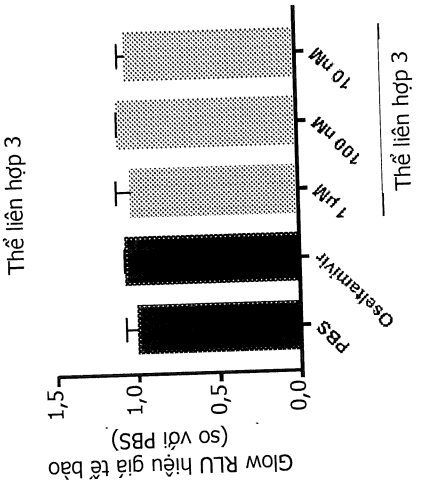


FIG. 18B

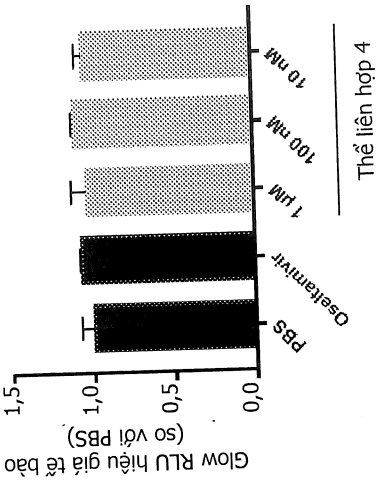


FIG. 18C

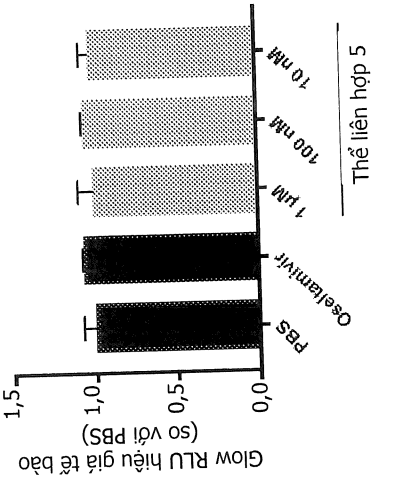


FIG. 19B

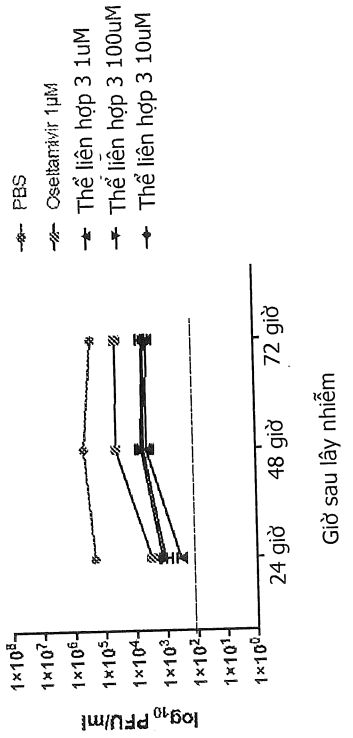


FIG. 19A

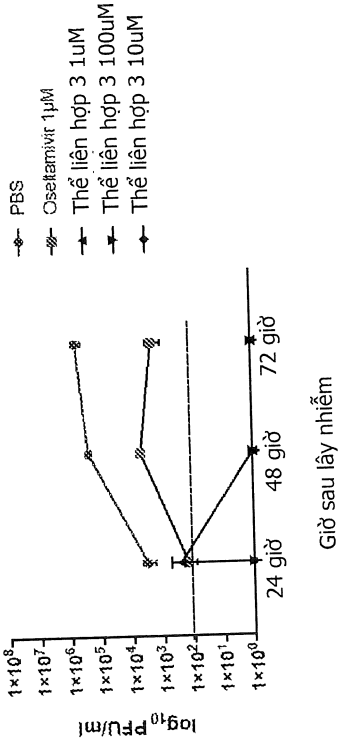


FIG. 19C

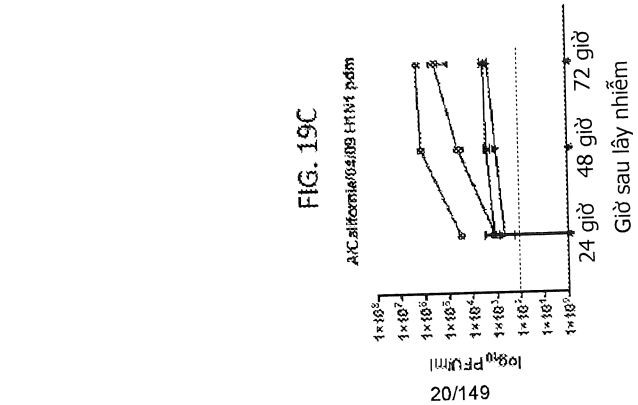


FIG. 19D

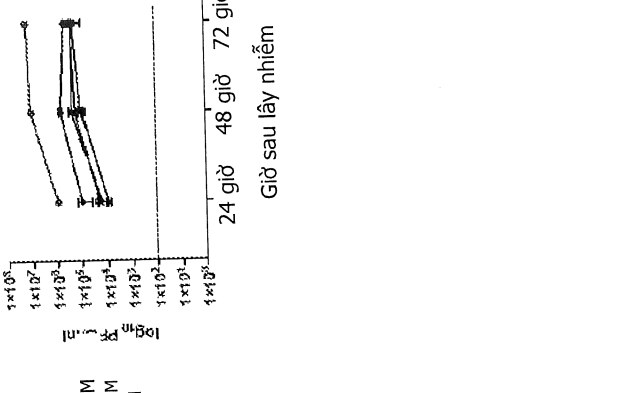


FIG. 19E

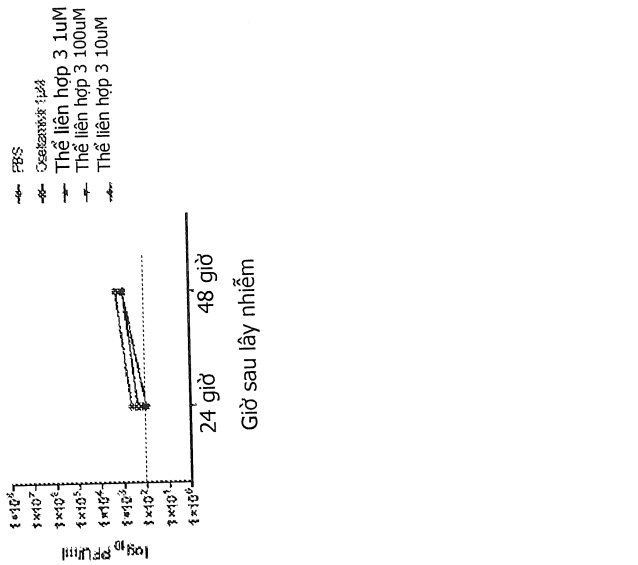


FIG. 20B

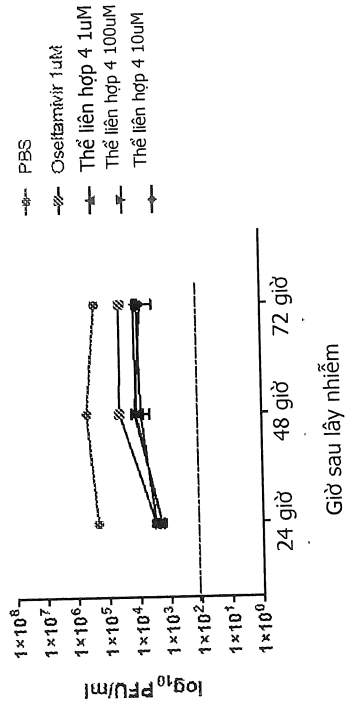
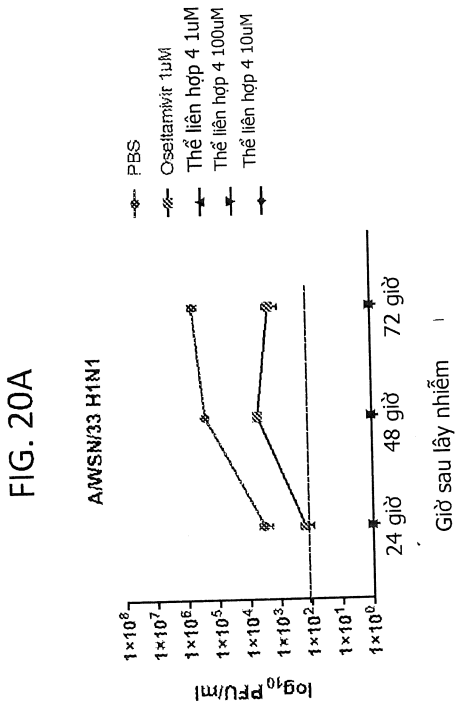


FIG. 20A



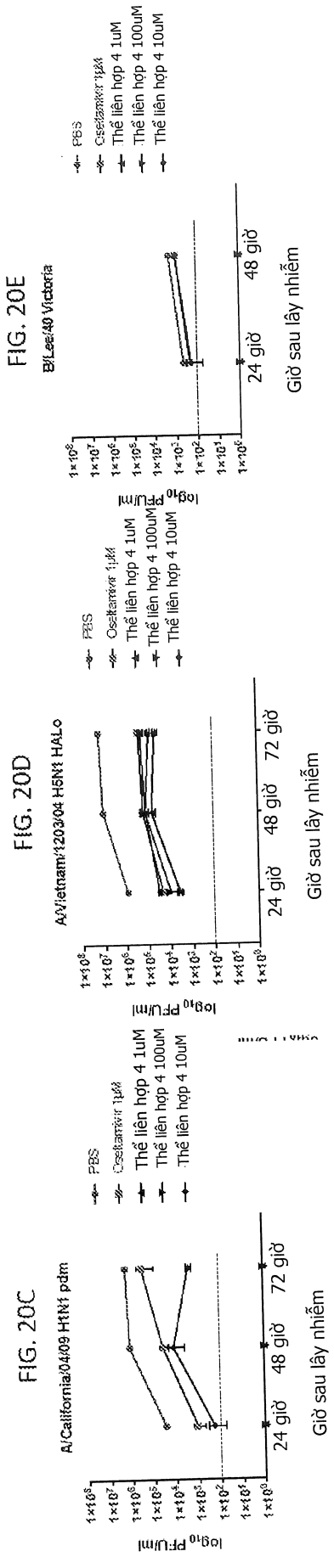

FIG. 20C
A/California/04/09 H1N1 pdm
FIG. 20D
A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo
FIG. 20E
B/Lee/40 Victoria
PBS
Oseltamivir 1μM
Thể liên hợp 4 1uM
Thể liên hợp 4 100uM
Thể liên hợp 4 10uM
log10 PFU/ml
24 giờ
48 giờ
72 giờ
Giờ sau lây nhiễm

FIG. 21B

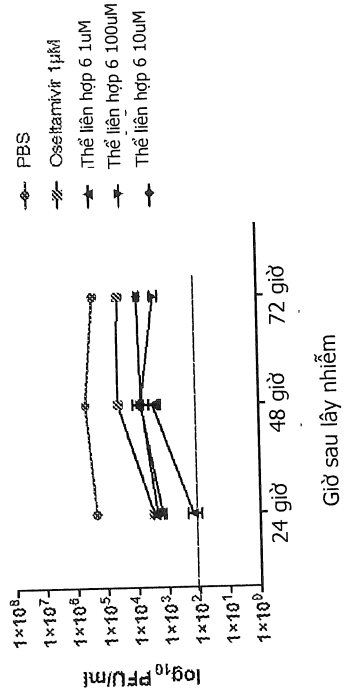
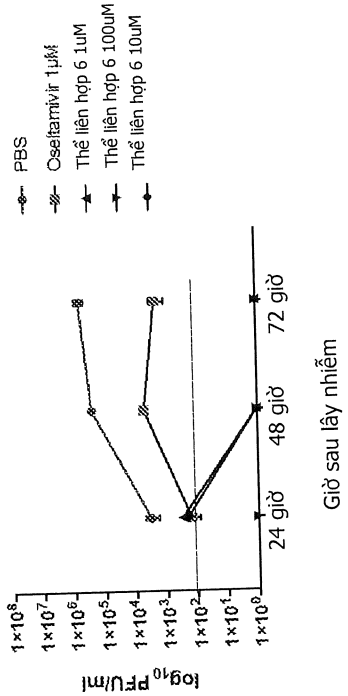
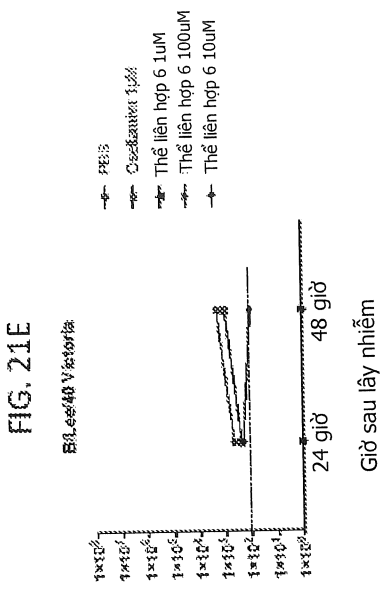
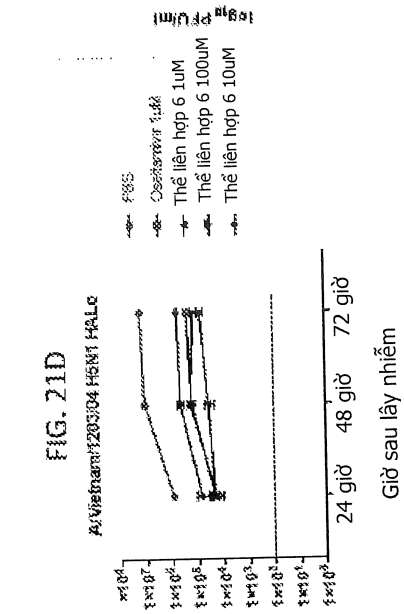


FIG. 21A




FIG. 21E
PBS
Oseltamivir 1μM
Thể liên hợp 6 1uM
Thể liên hợp 6 100uM
Thể liên hợp 6 10uM
24 giờ
48 giờ
Giờ sau lây nhiễm


FIG. 21D
PBS
Oseltamivir 1μM
Thể liên hợp 6 1uM
Thể liên hợp 6 100uM
Thể liên hợp 6 10uM
24 giờ
48 giờ
72 giờ
Giờ sau lây nhiễm

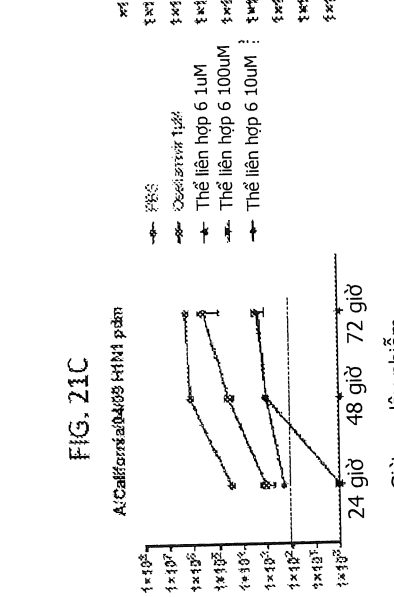

FIG. 21C
PBS
Oseltamivir 1μM
Thể liên hợp 6 1uM
Thể liên hợp 6 100uM
Thể liên hợp 6 10uM
24 giờ
48 giờ
72 giờ
Giờ sau lây nhiễm

FIG. 22A

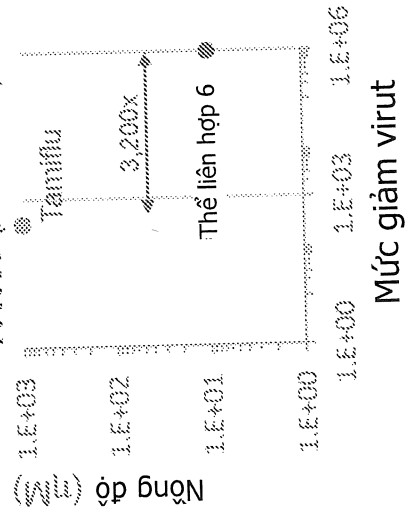


FIG. 22B

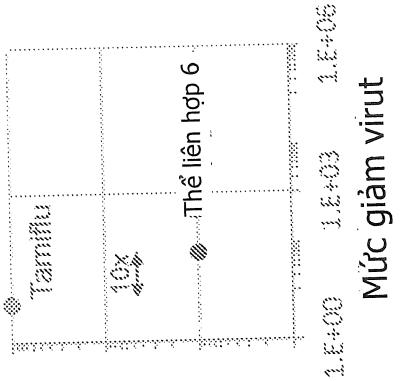


FIG. 22C

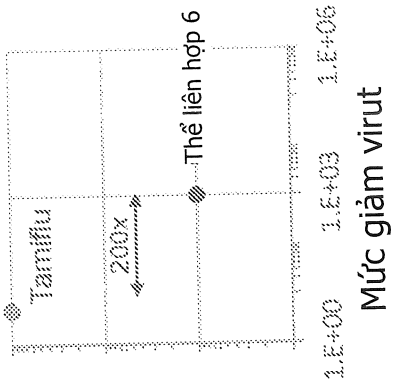


FIG. 22E

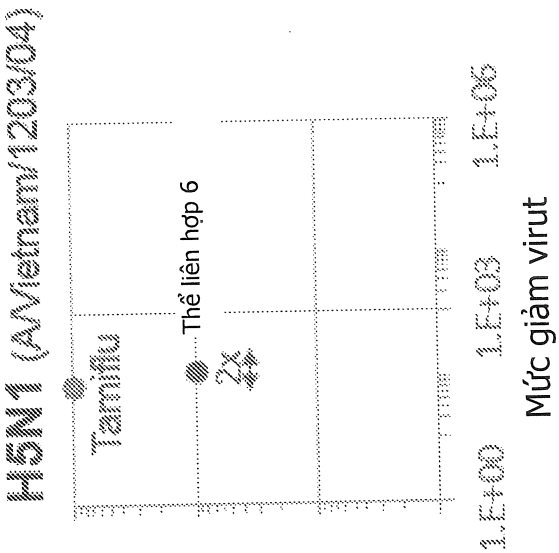


FIG. 22D

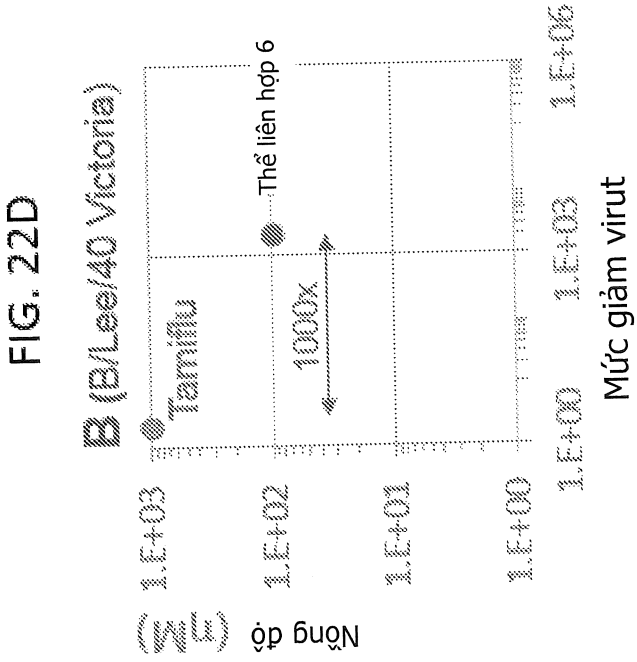


FIG. 23

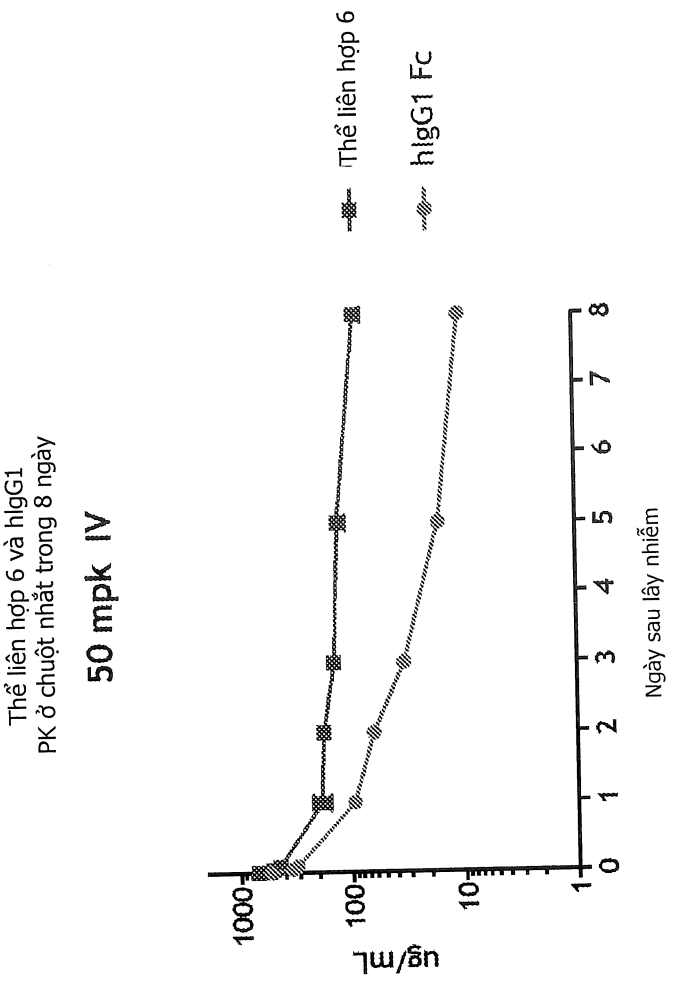

Thể liên hợp 6 và hIgG1
PK ở chuột nhắt trong 8 ngày
50 mpk IV
Thể liên hợp 6
hIgG1 Fc
µg/mL
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Ngày sau lây nhiễm

FIG. 24

Cân nặng của chuột

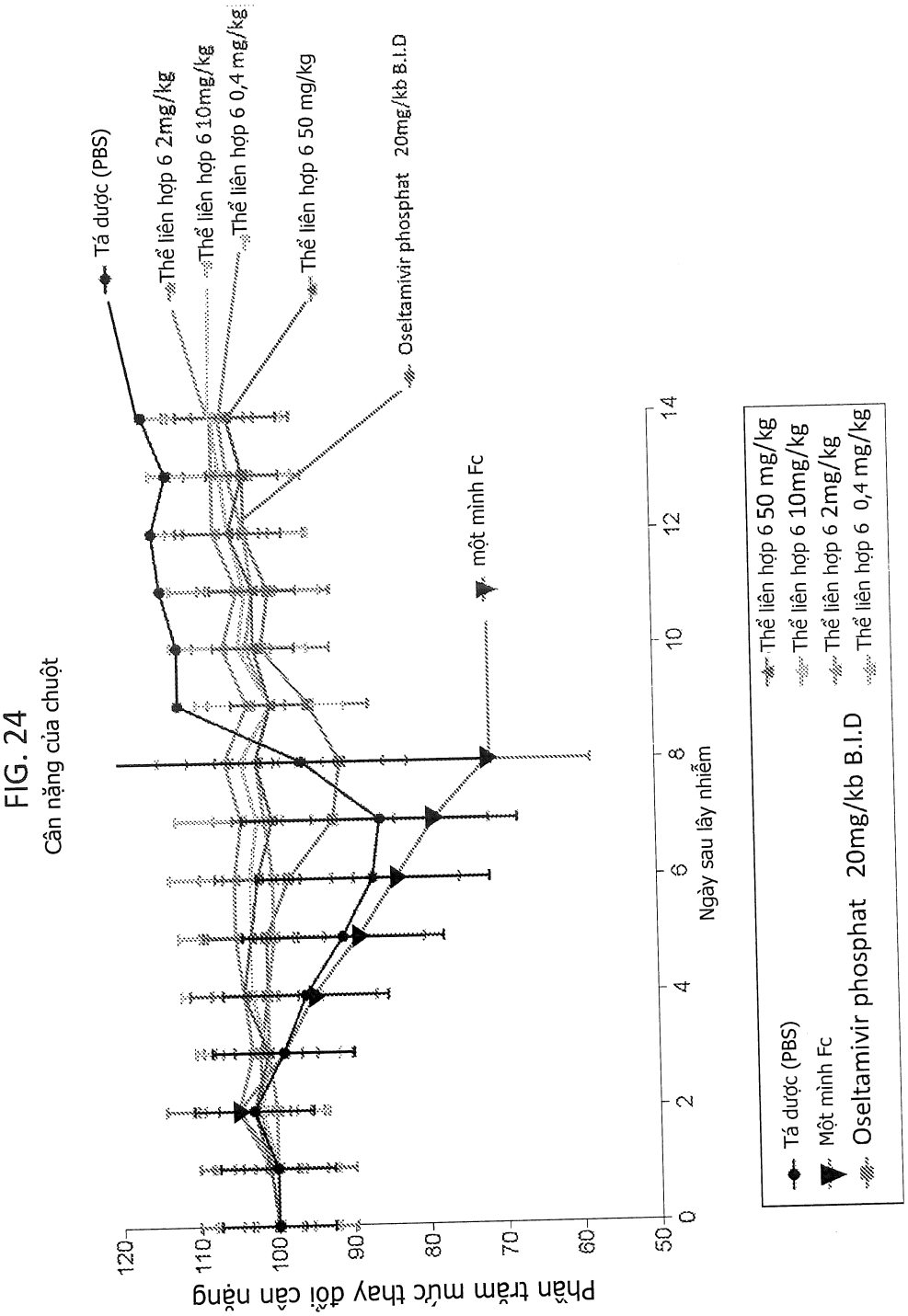


FIG. 25

Mức sống sót của chuột

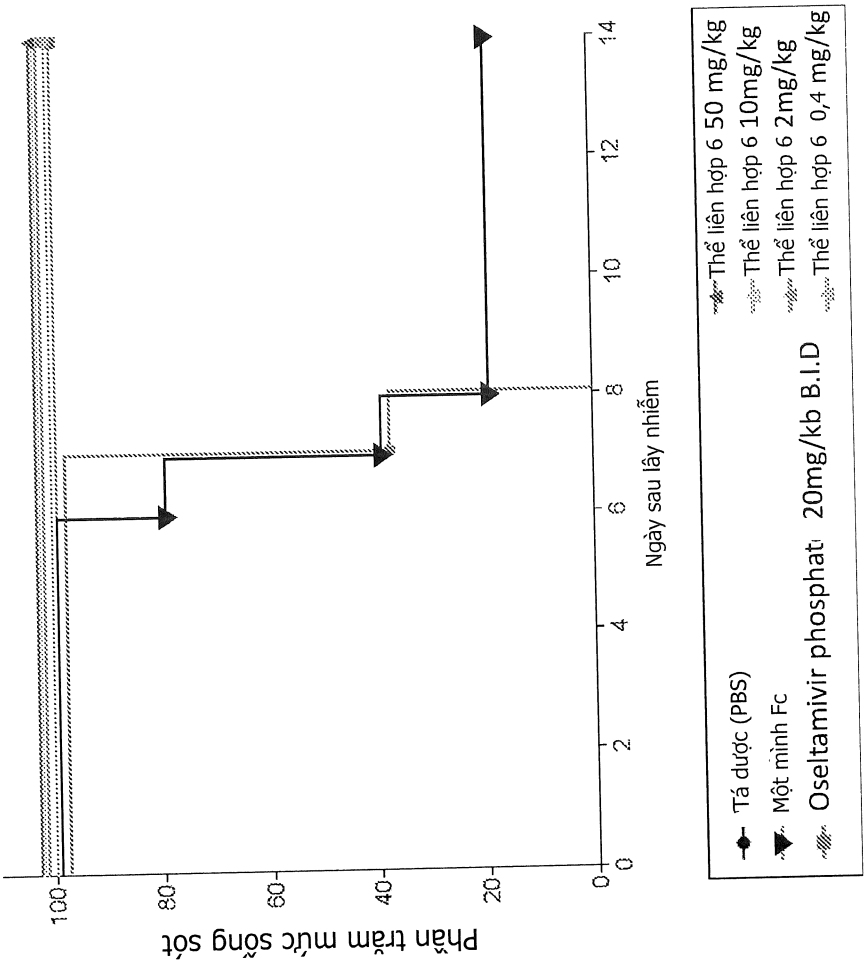


FIG. 26

Cân nặng của chuột

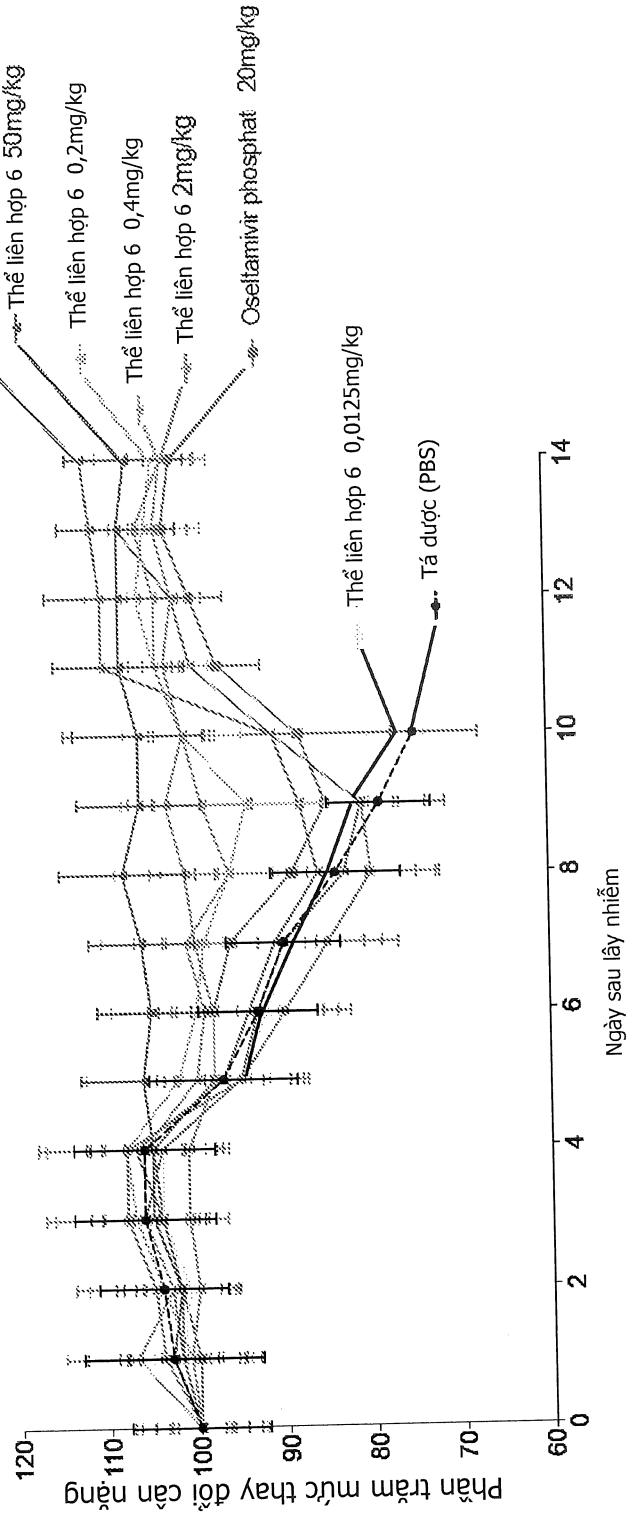


FIG. 27

Mức sống sót của chuột

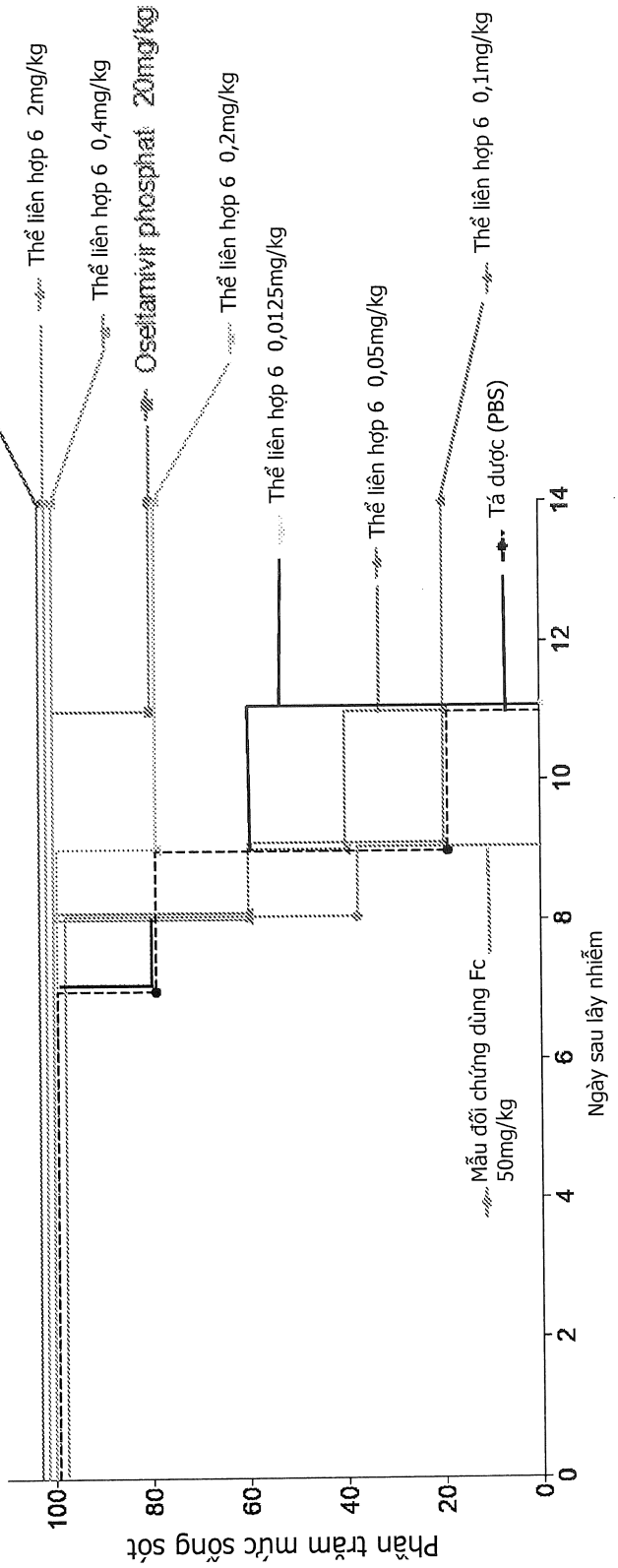


FIG. 28

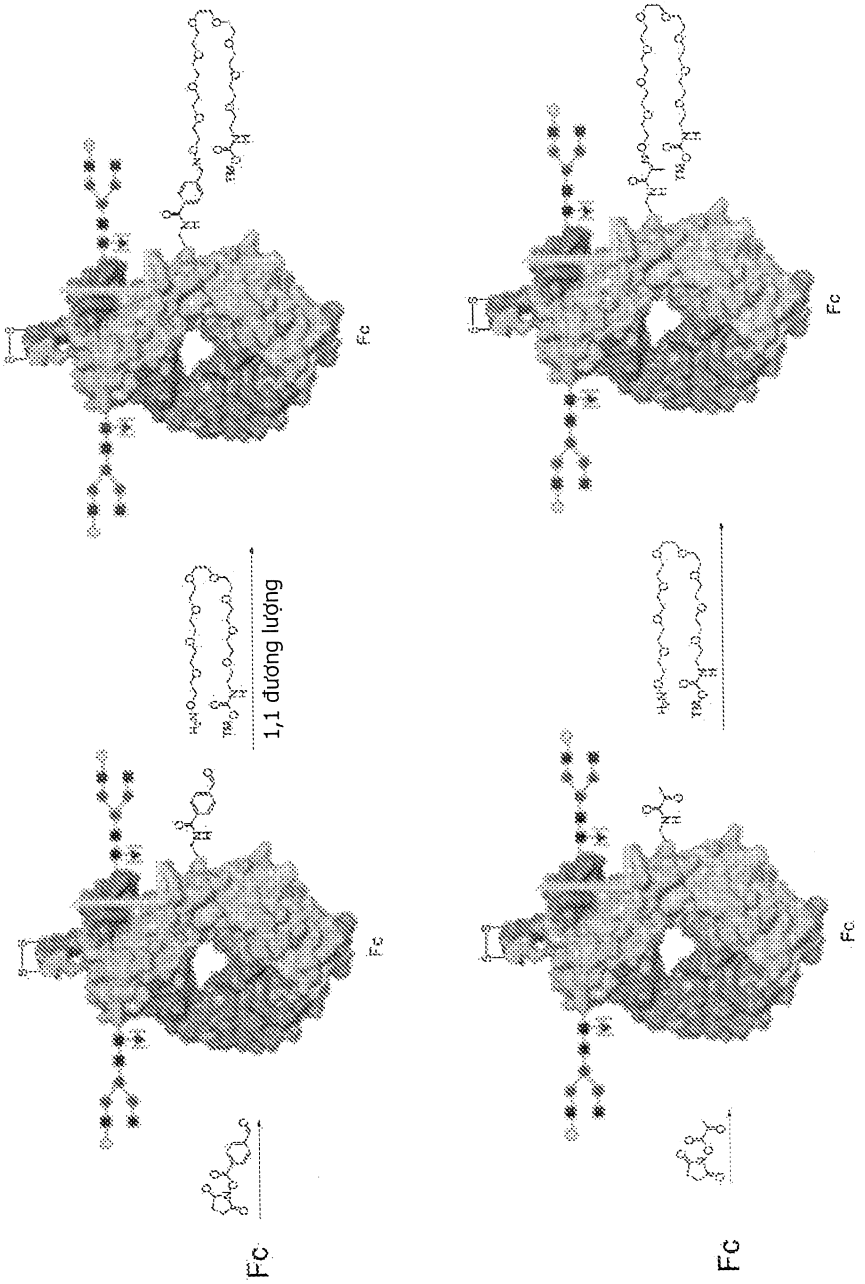


FIG. 29

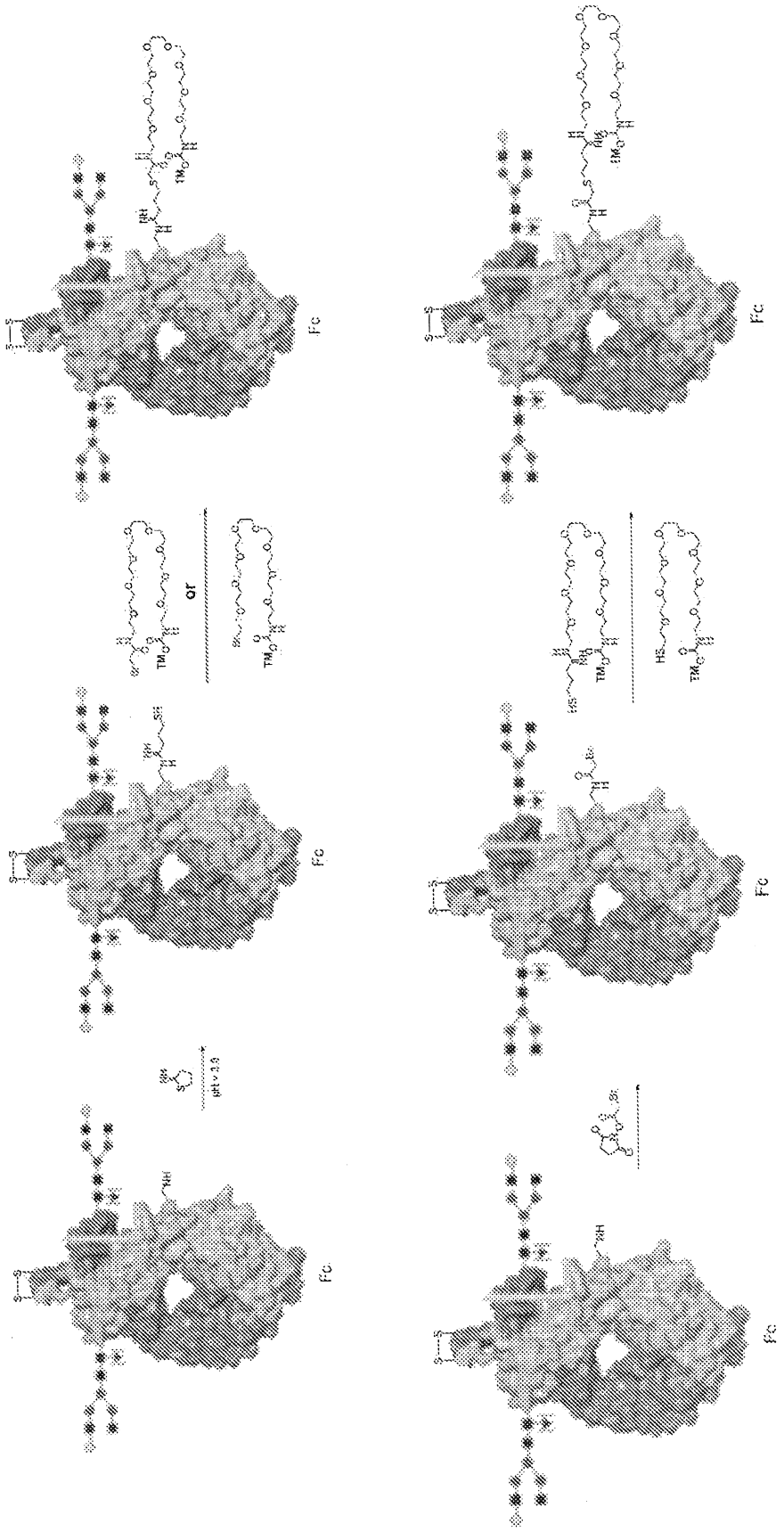


FIG. 30

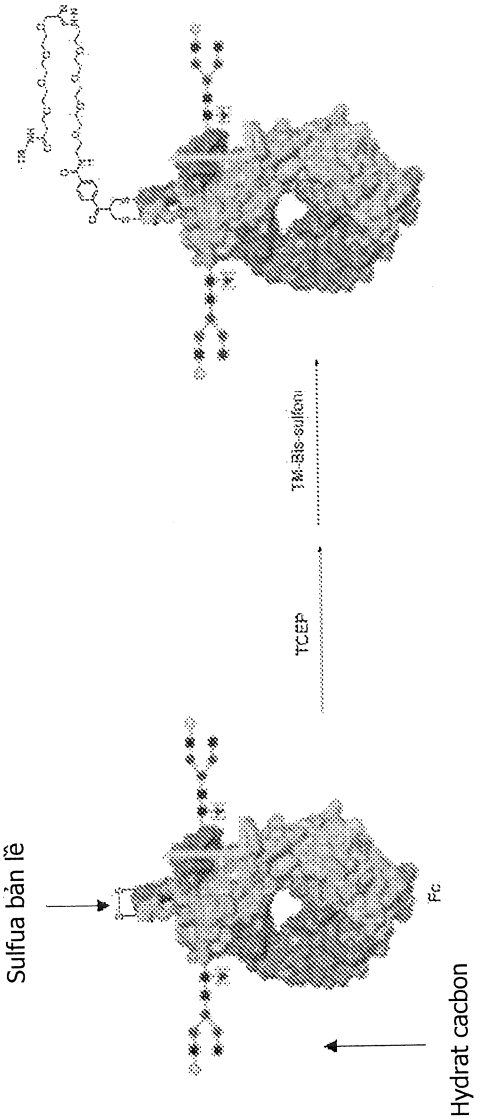


FIG. 31A

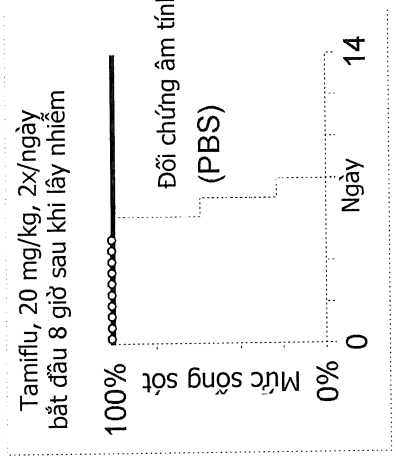


FIG. 31B

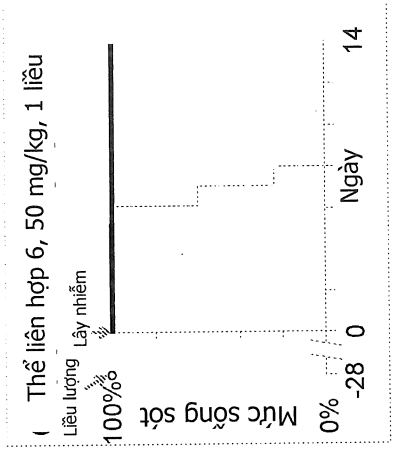


FIG. 31C

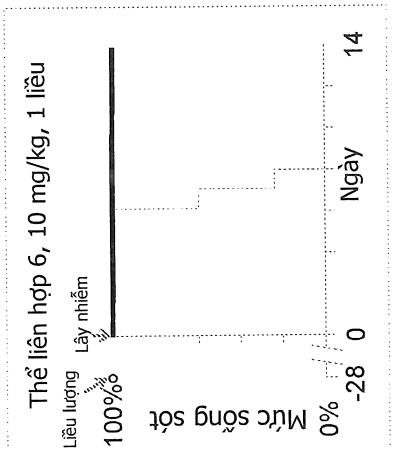


FIG. 31D

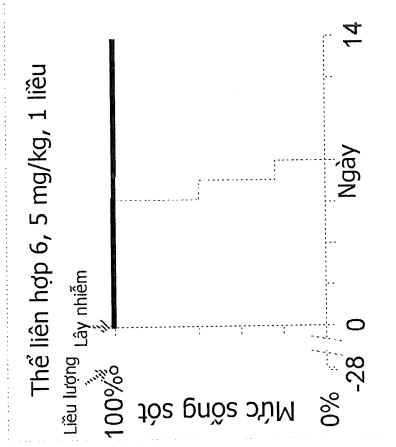


FIG. 31E

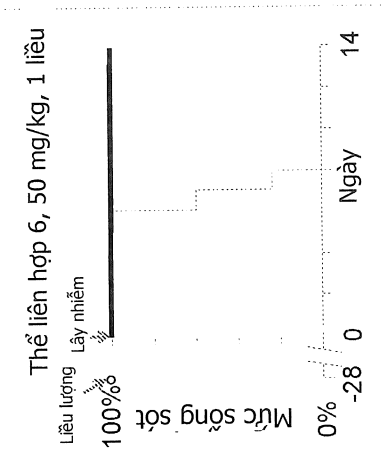


FIG. 31F

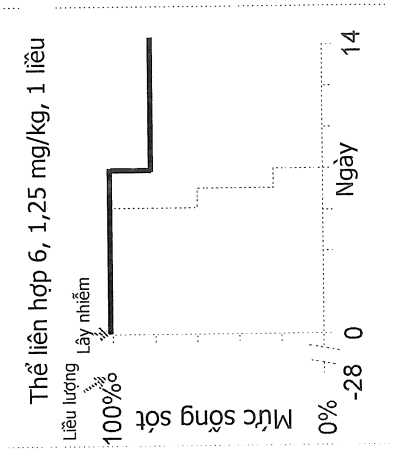


FIG. 32A

Các mẫu đối chứng (Dùng liều 4 giờ trước khi lây nhiễm)

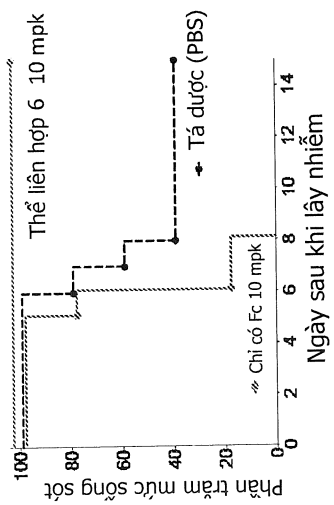


FIG. 32B

Dùng liều 8 giờ sau khi lây nhiễm
Thể liên hợp 6 10 mpk

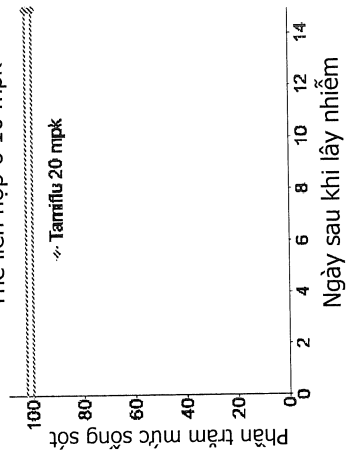


FIG. 32C

Dùng liều 24 giờ sau khi lây nhiễm
Thể liên hợp 6 10 mpk

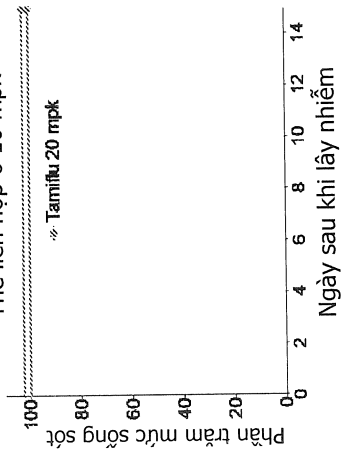


FIG. 32D

Dùng liều 48 giờ sau khi lây nhiễm

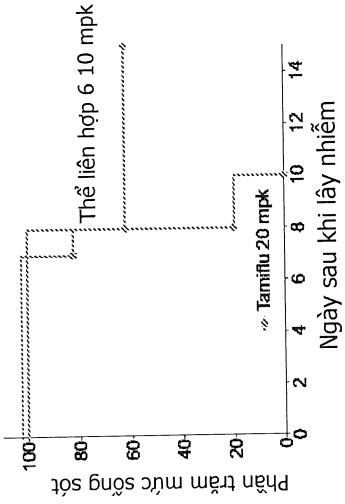


FIG. 32E

Dùng liều 72 giờ sau khi lây nhiễm

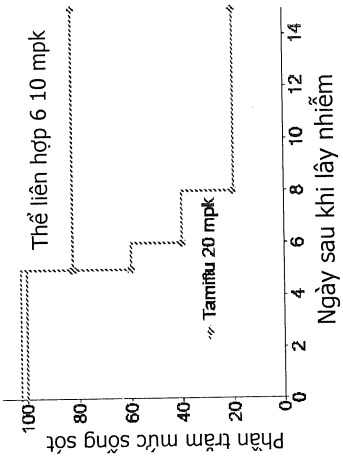


FIG. 32F

Dùng liều 96 giờ sau khi lây nhiễm
Thể liên hợp 6 10 mpk

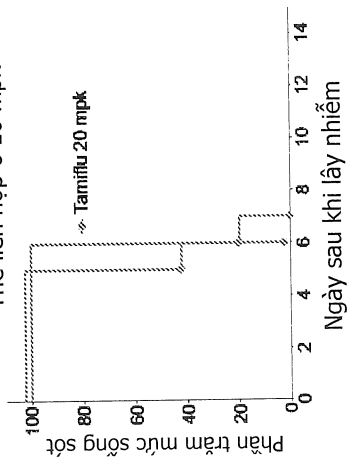


FIG. 33

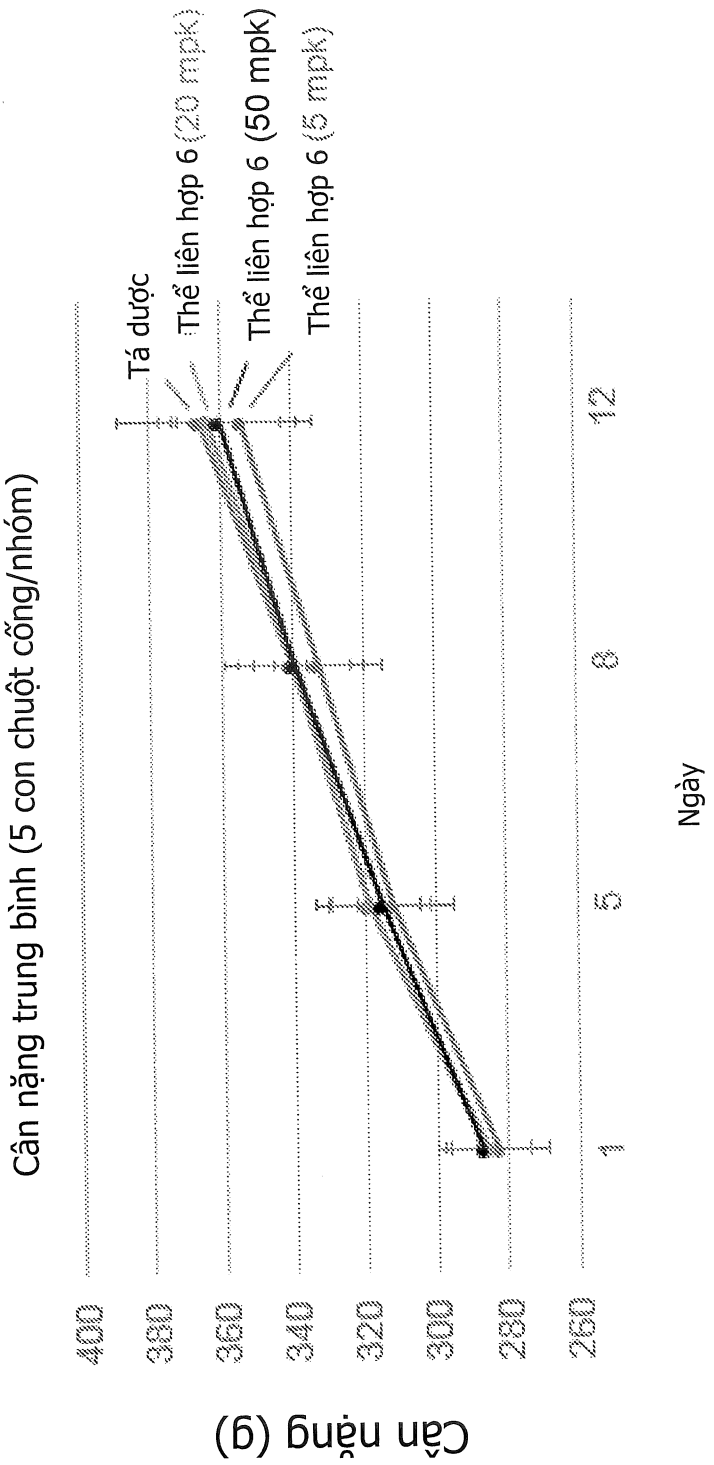

Cân nặng trung bình (5 con chuột cống/nhóm)
Tá dược
Thể liên hợp 6 (20 mpk)
Thể liên hợp 6 (50 mpk)
Thể liên hợp 6 (5 mpk)
Cân nặng (g)
400
380
360
340
320
300
280
260
1
5
8
12
Ngày

FIG. 34A

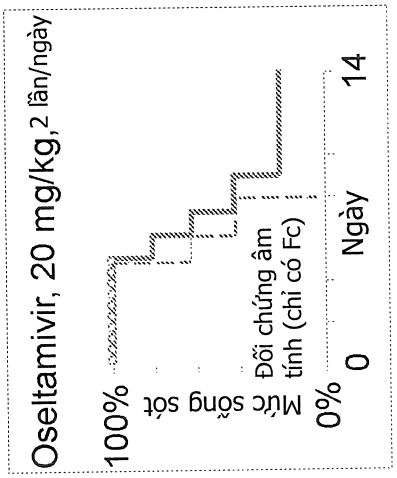


FIG. 34B

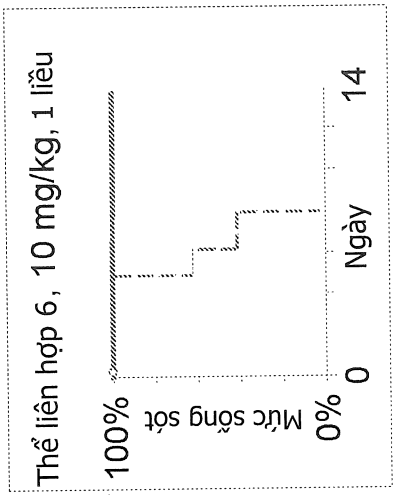


FIG. 34C

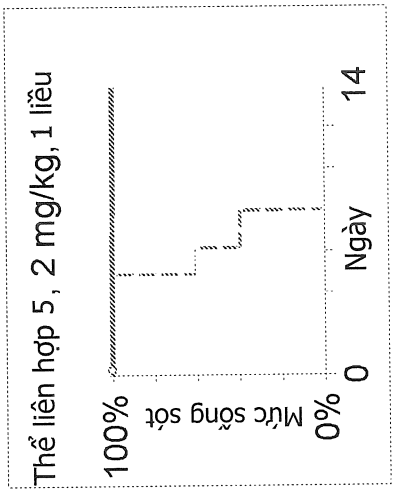


FIG. 34D

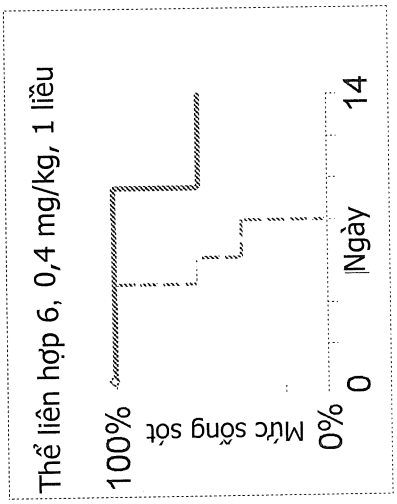


FIG. 35

Cân nặng của chuột nhắt

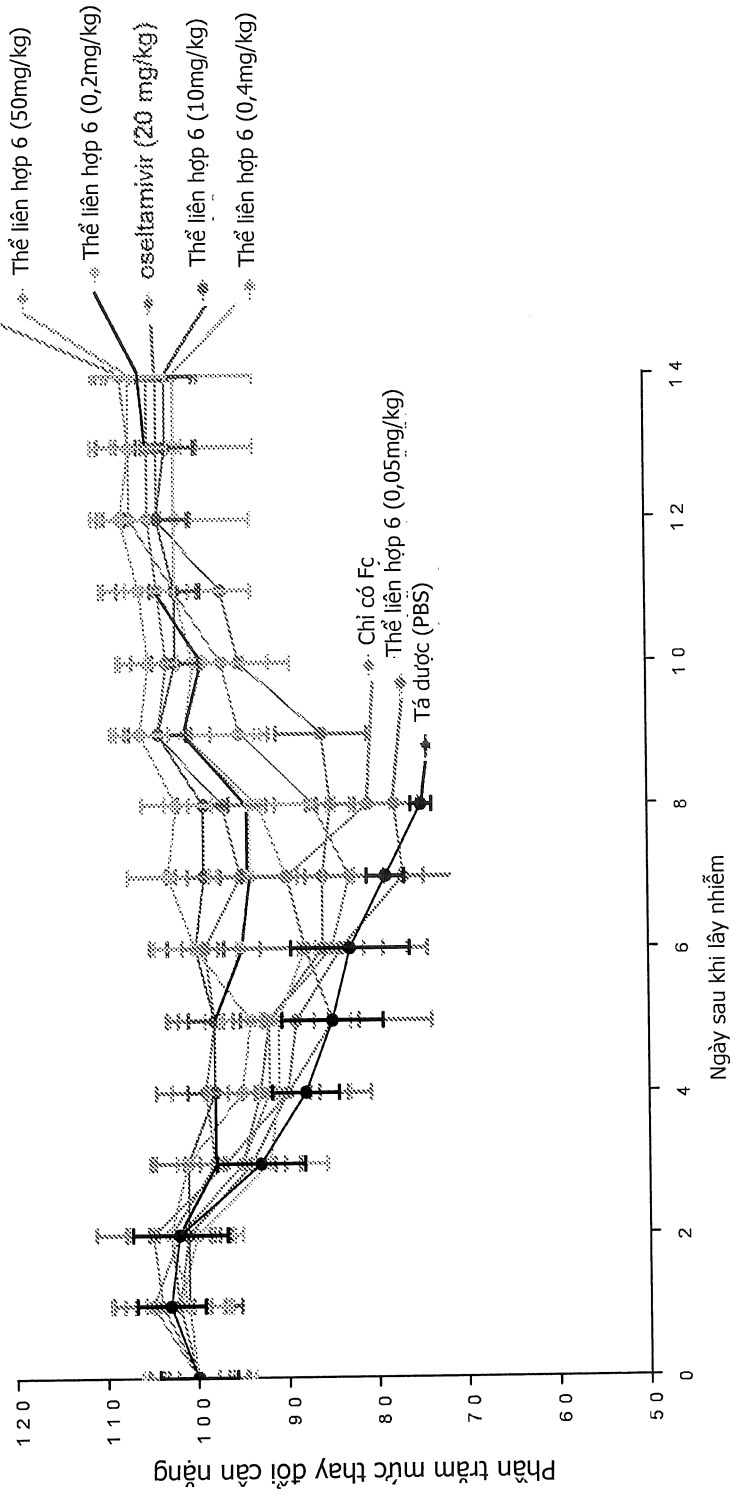


FIG. 36

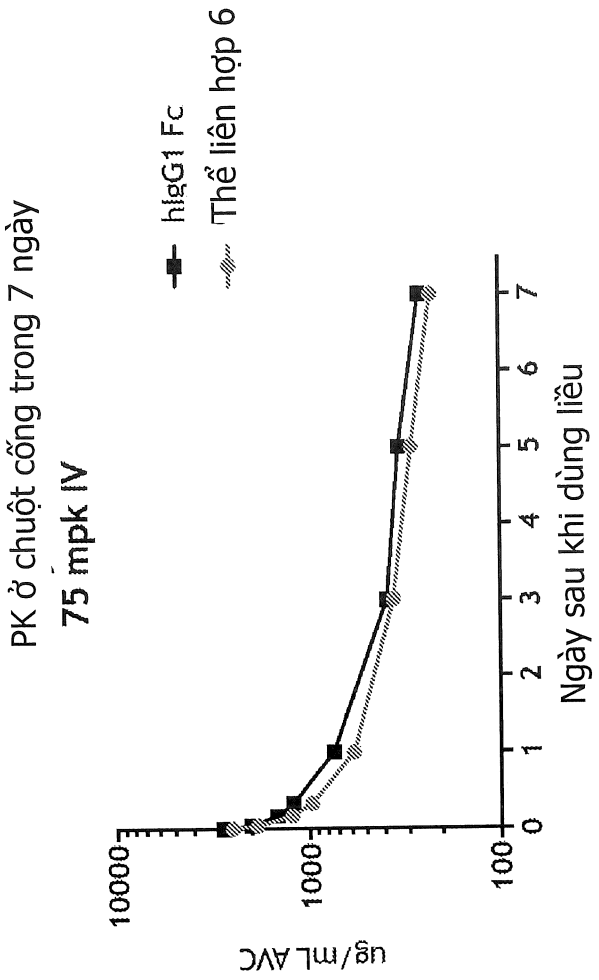

PK ở chuột cống trong 7 ngày
75 mpk IV
hIgG1 Fc
Thể liên hợp 6
ug/mL AVC
10000
1000
100
0
1
2
3
4
5
6
7
Ngày sau khi dùng liều

FIG. 37

Thể liên hợp 6
PK chuột cống trong 14 ngày
5, 20, 50 mpk IV

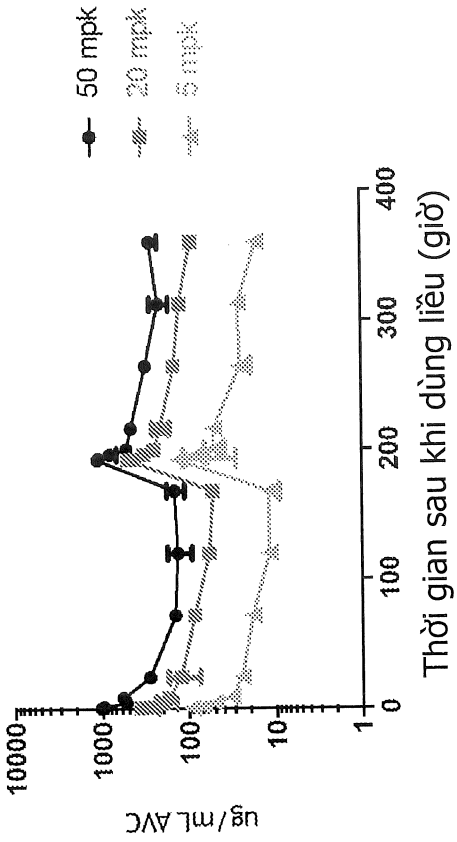


FIG. 38

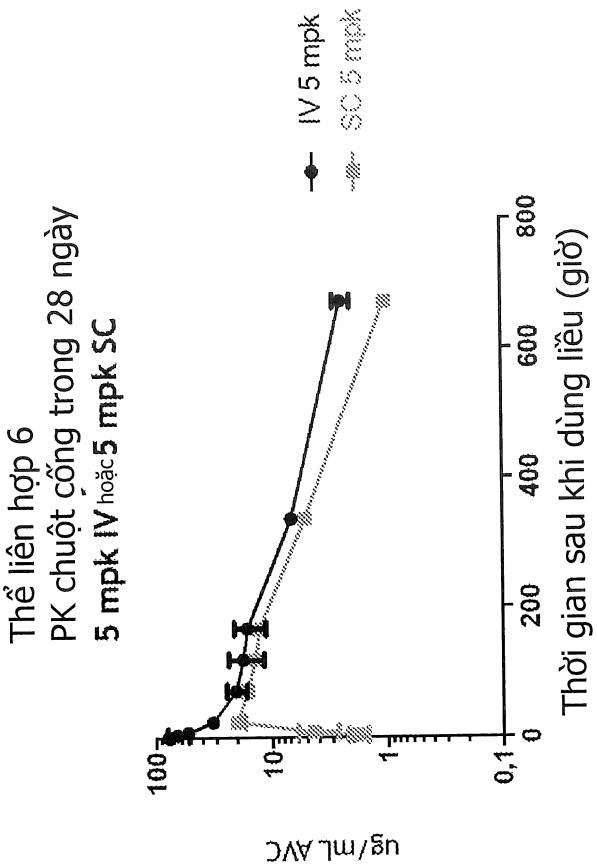

Thể liên hợp 6
PK chuột cống trong 28 ngày
5 mpk IV hoặc 5 mpk SC
IV 5 mpk
SC 5 mpk
µg/mL AVC
100
10
1
0,1
0
200
400
600
800
Thời gian sau khi dùng liều (giờ)

FIG. 39

Thể liên hợp 6
PK ở khi cyno trong 28 ngày
5 và 20 mpk tiêm tĩnh mạch

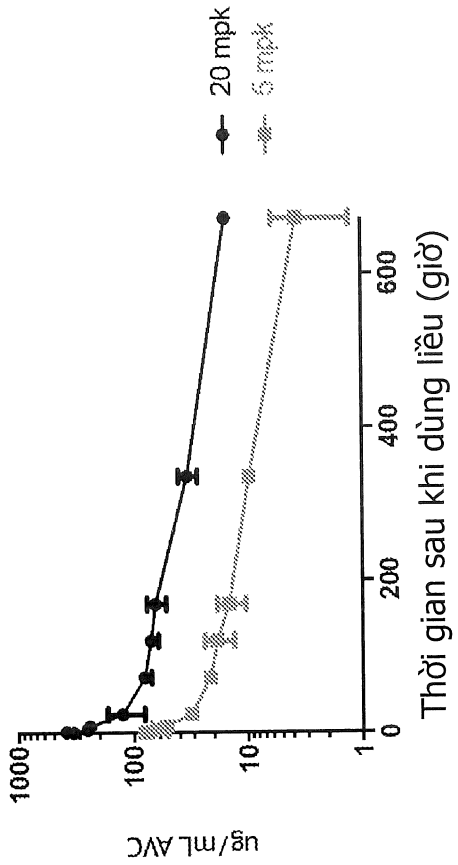


FIG. 40

Mức thể liên hợp 6 trong huyết tương và phổi

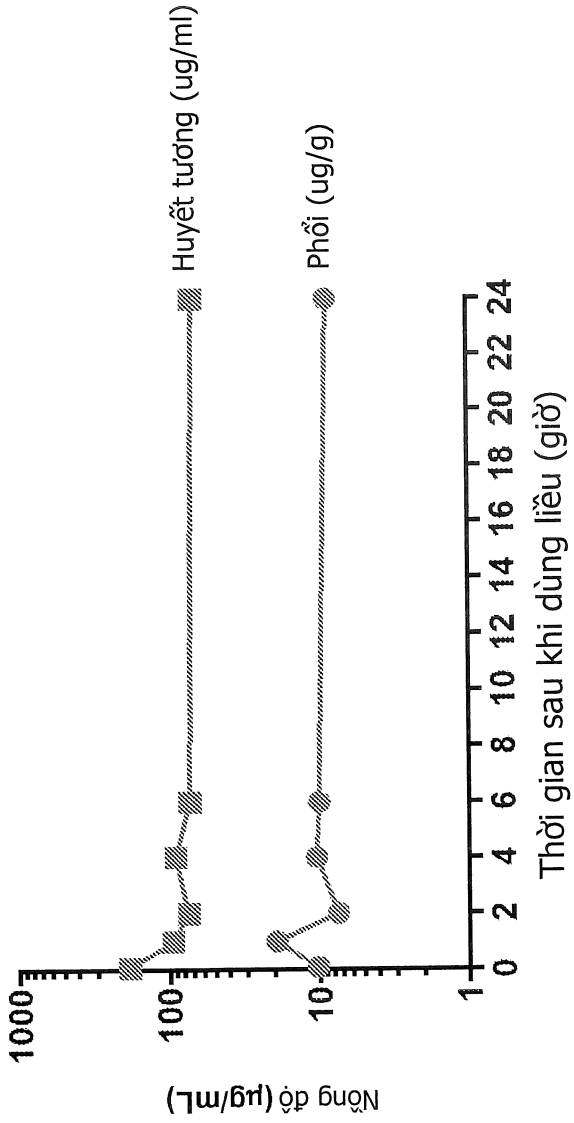


FIG. 41

Dùng thể liên hợp 6 bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, và tiêm bắp

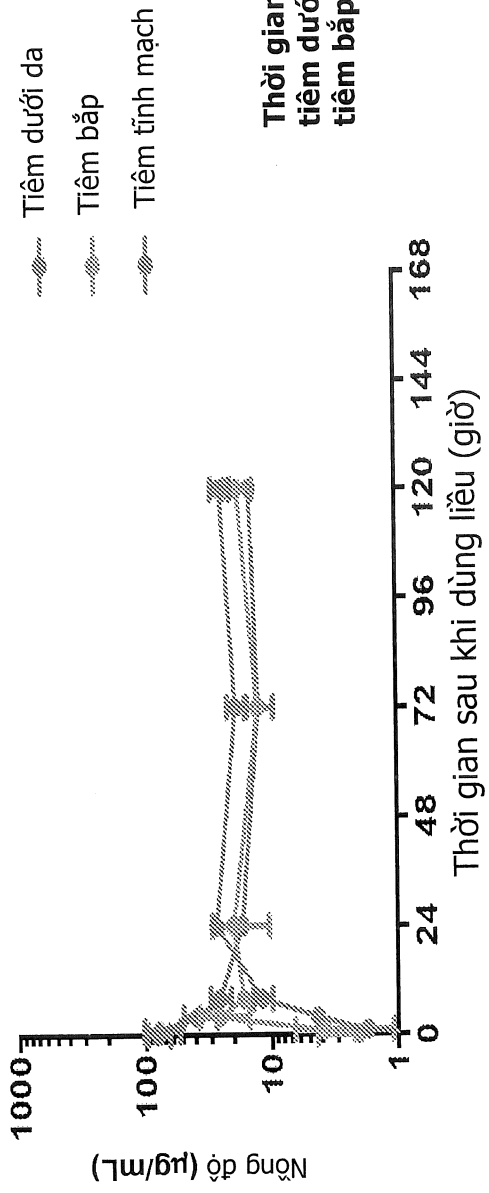


FIG. 42
Thể liên hợp 8

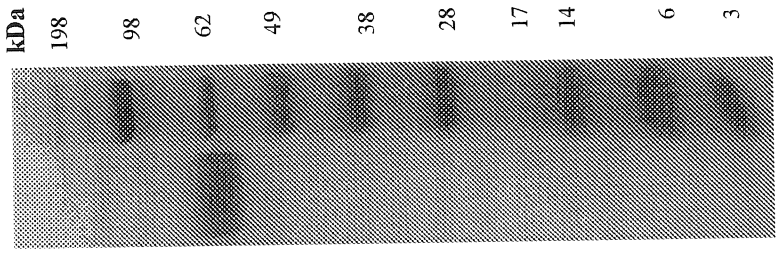


FIG. 43
Thể liên hợp 6

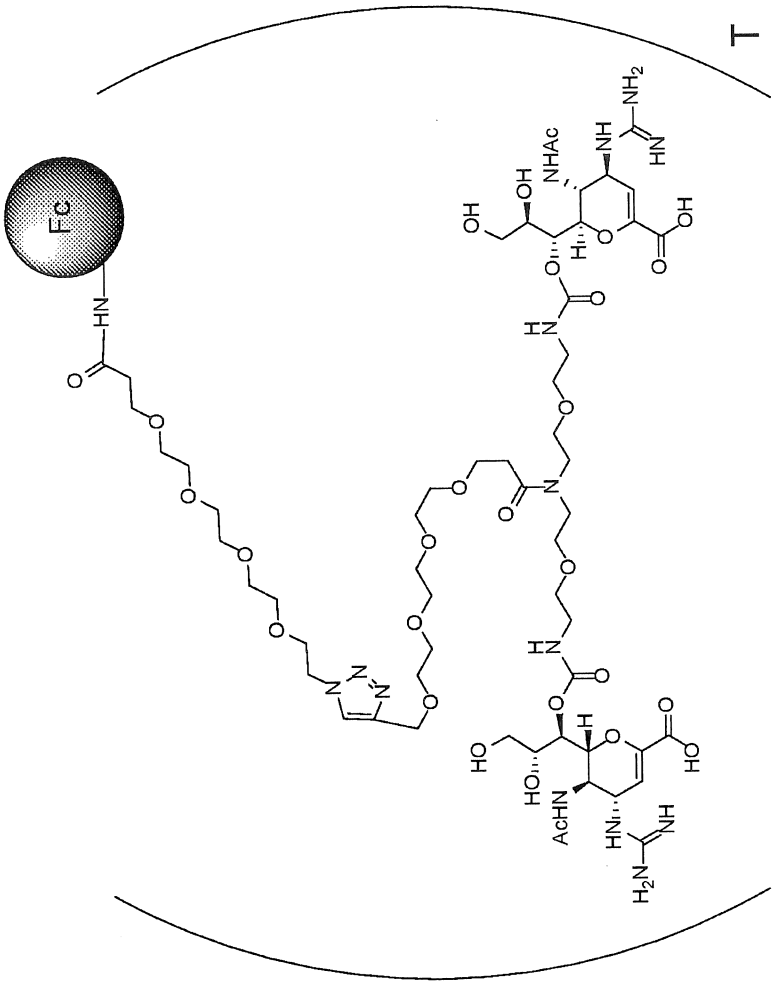


FIG. 44
Thể liên hợp 6 in vitro trong huyết tương của chuột nhắt

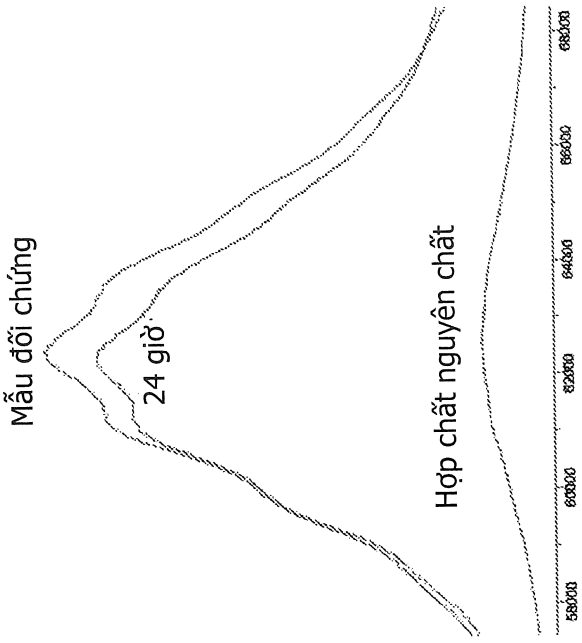


FIG. 45
Thể liên hợp 6 in vitro trong huyết tương của người

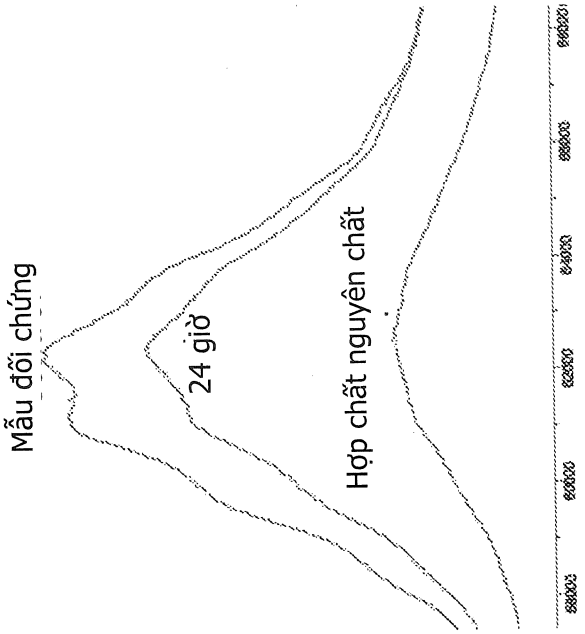


FIG. 46

Độ ổn định của thể liên hợp 6 trong vi thể gan của chuột nhắt

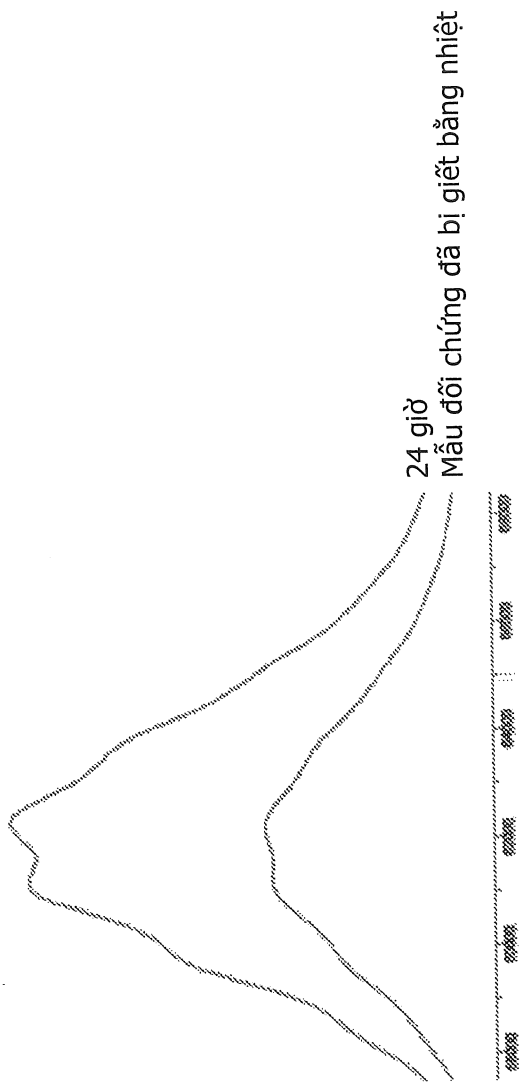


FIG. 47

Độ ổn định của thể liên hợp 6 trong vi thể gan của người

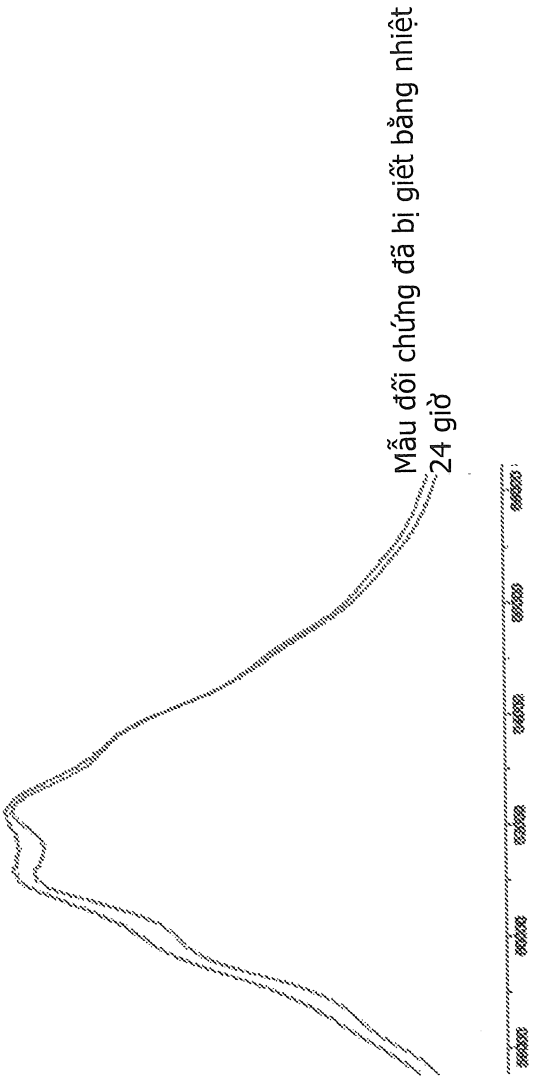


FIG. 48

Hiệu quả của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12 in vivo

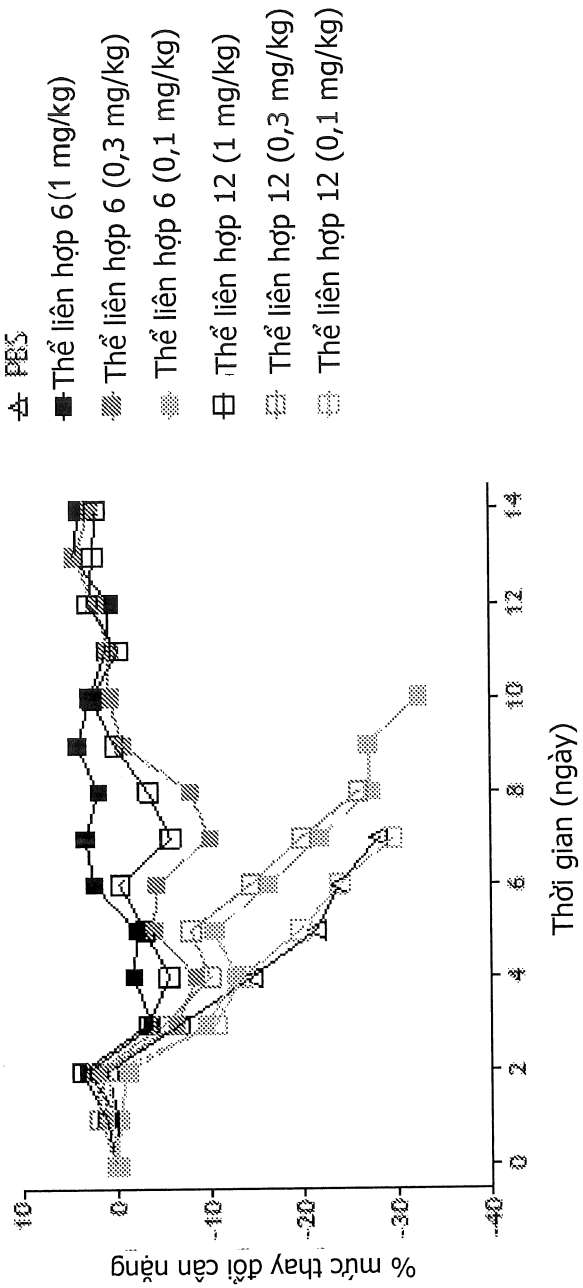


FIG. 49
Hiệu quả của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12 in vivo

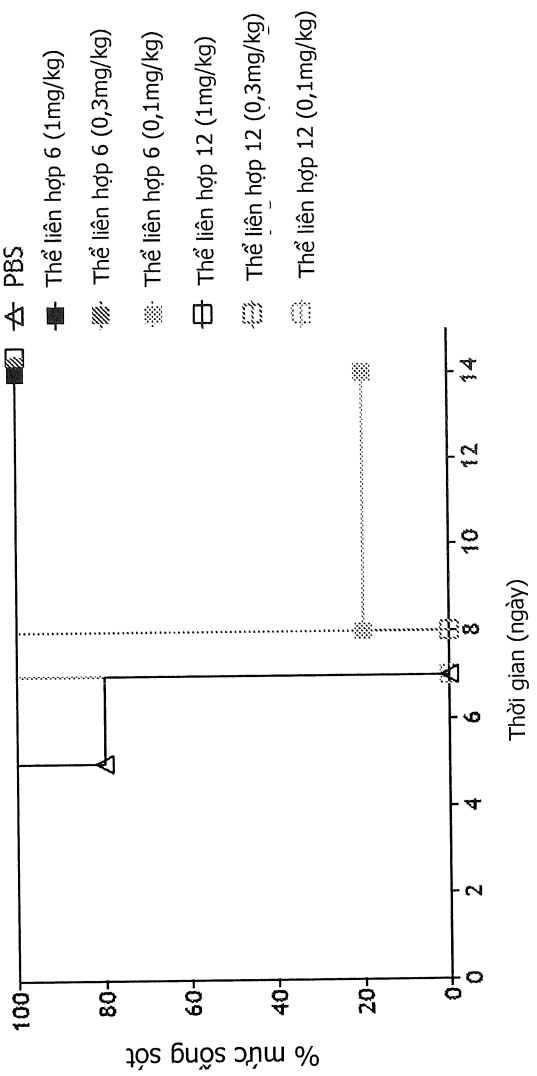


FIG. 50

Gắn kết IIIA của thụ thể Fcγ in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12

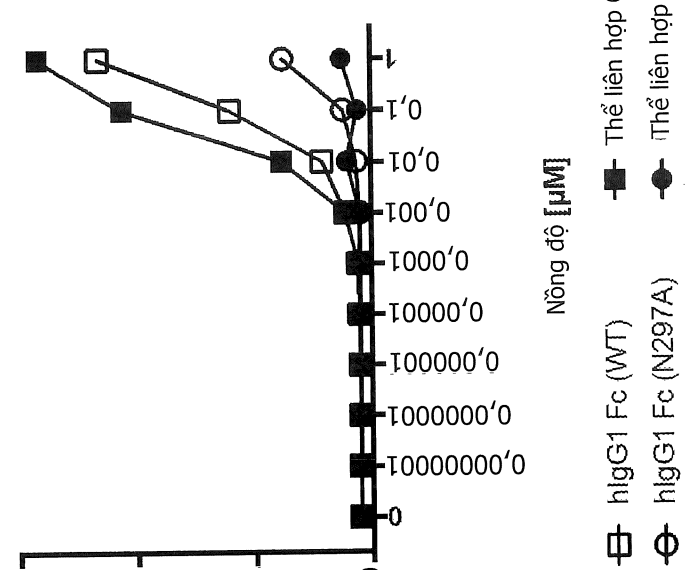


FIG. 51

Gắn kết IIIA của thụ thể Fcγ in vitro của thể liên hợp 6 và thể liên hợp 12

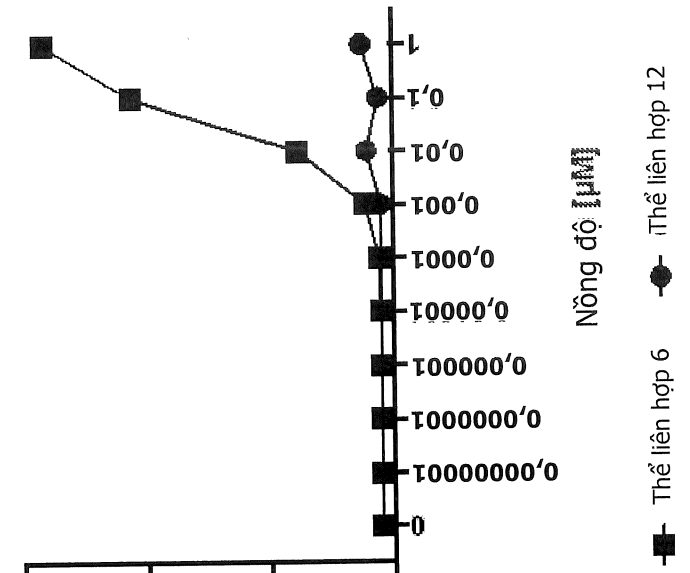


FIG. 52
Độc chất động học vào các ngày 1 và 8

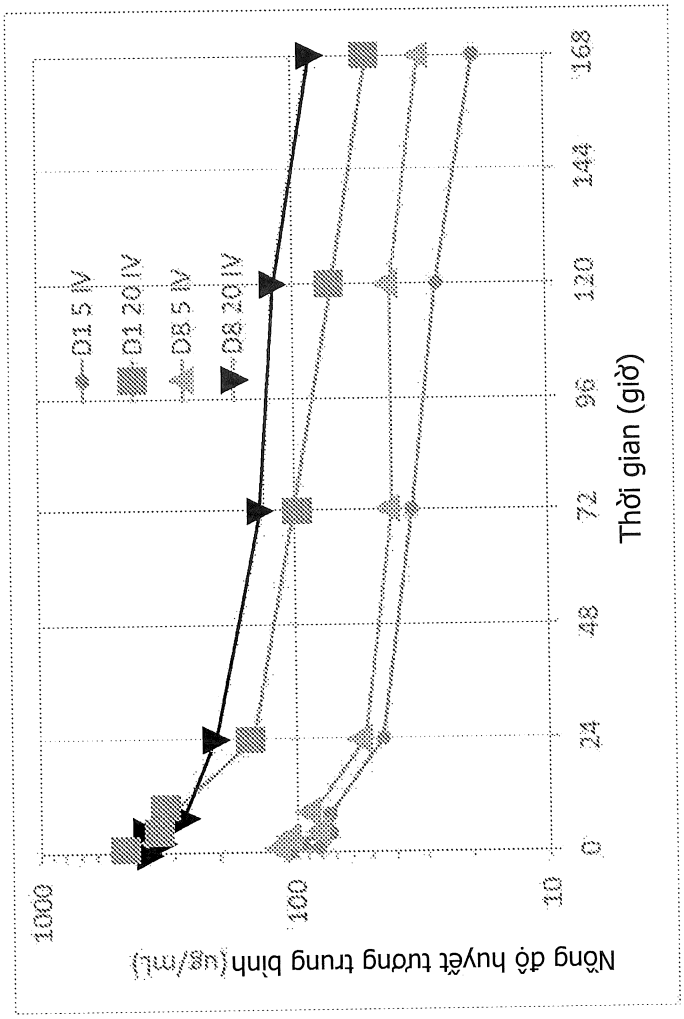


FIG. 53
Nồng độ huyết tương trung bình sau khi tiêm tĩnh mạch và tiêm dưới da 5 mg/kg

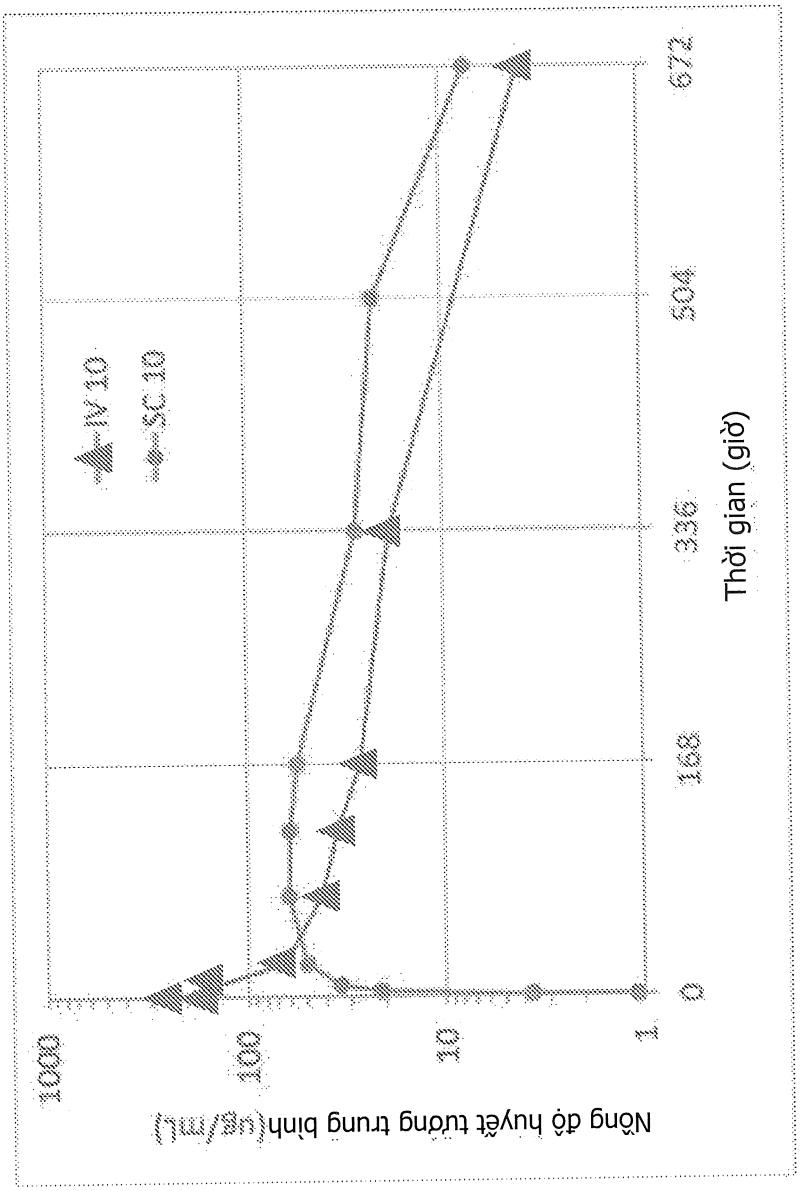


FIG. 54
Thể liên hợp 12

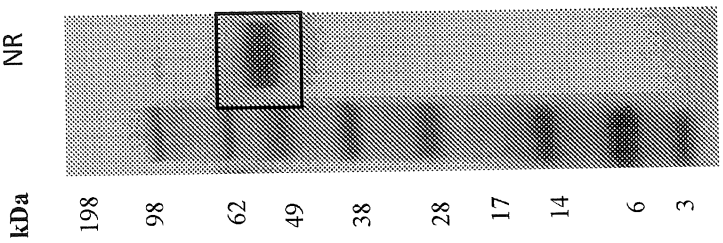


FIG. 55
Thể liên hợp 13a-13g

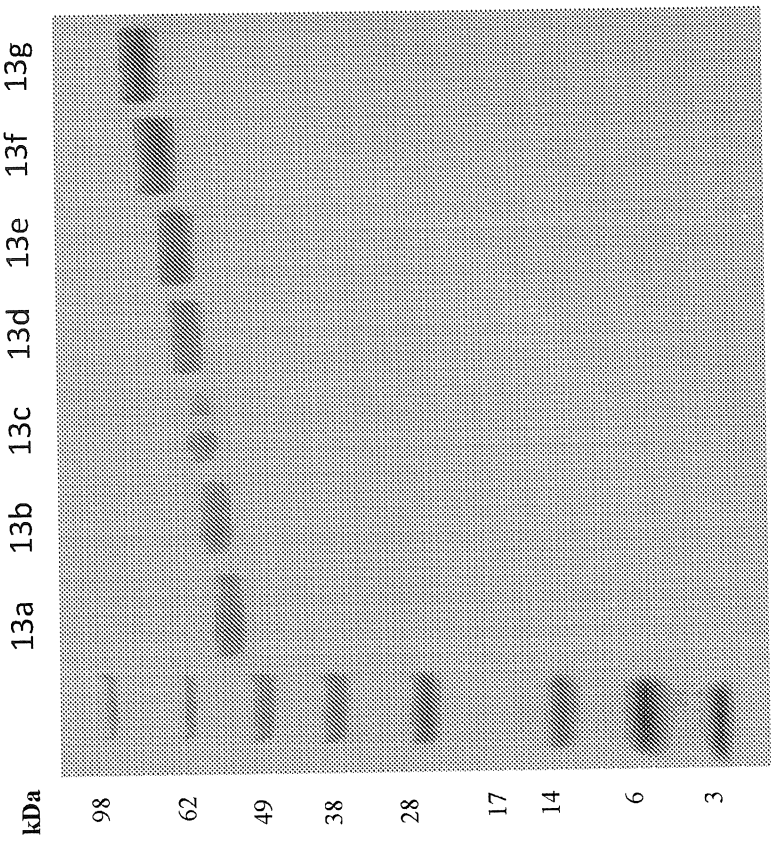


FIG. 56

Hiệu quả của thể liên hợp 6 in vivo ở chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch

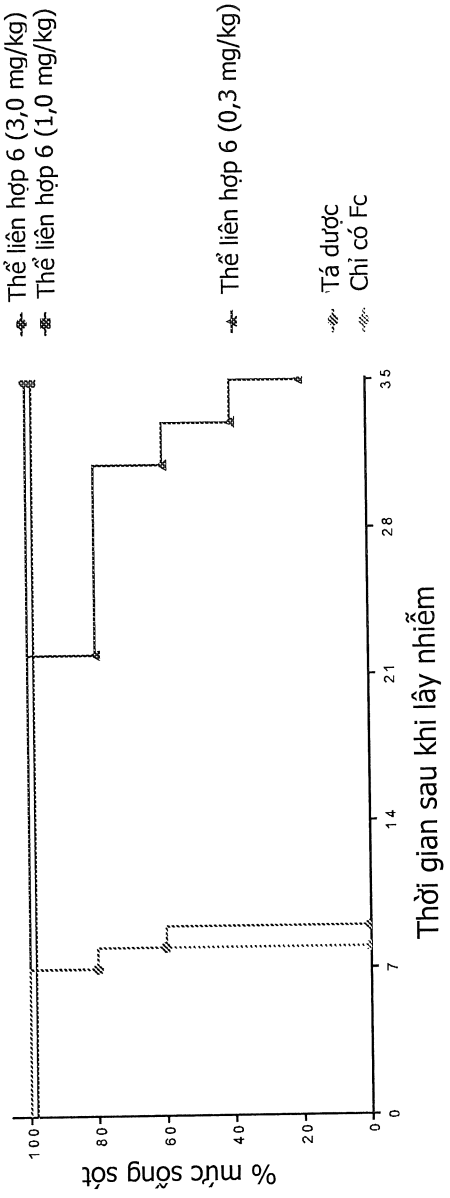


FIG. 57

Hiệu quả của thể liên hợp 6 in vivo ở chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch

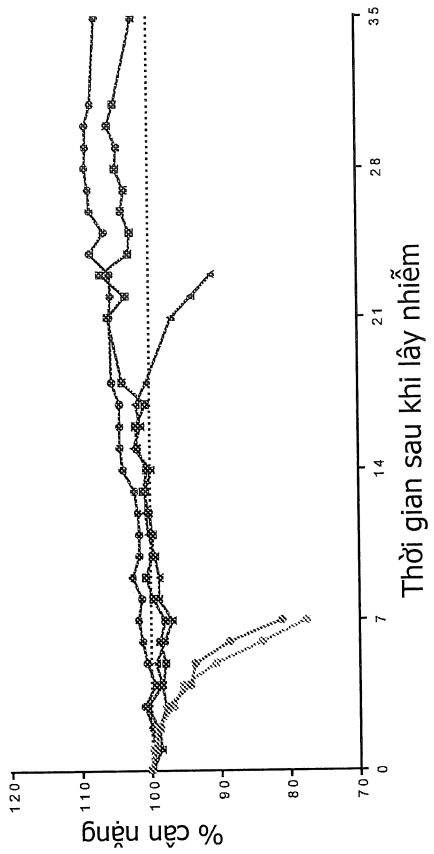


FIG. 58
Mức thanh thải virut phụ thuộc vào liều lượng thể liên hợp 6 ở phổi

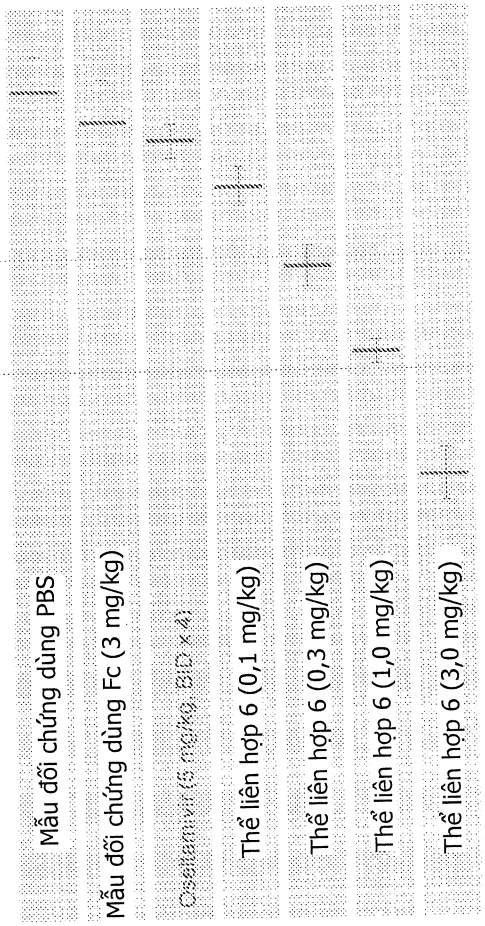


FIG. 59
Mức giảm xytokin gây viêm phụ thuộc vào liều lượng thể liên hợp 6 ở phổi

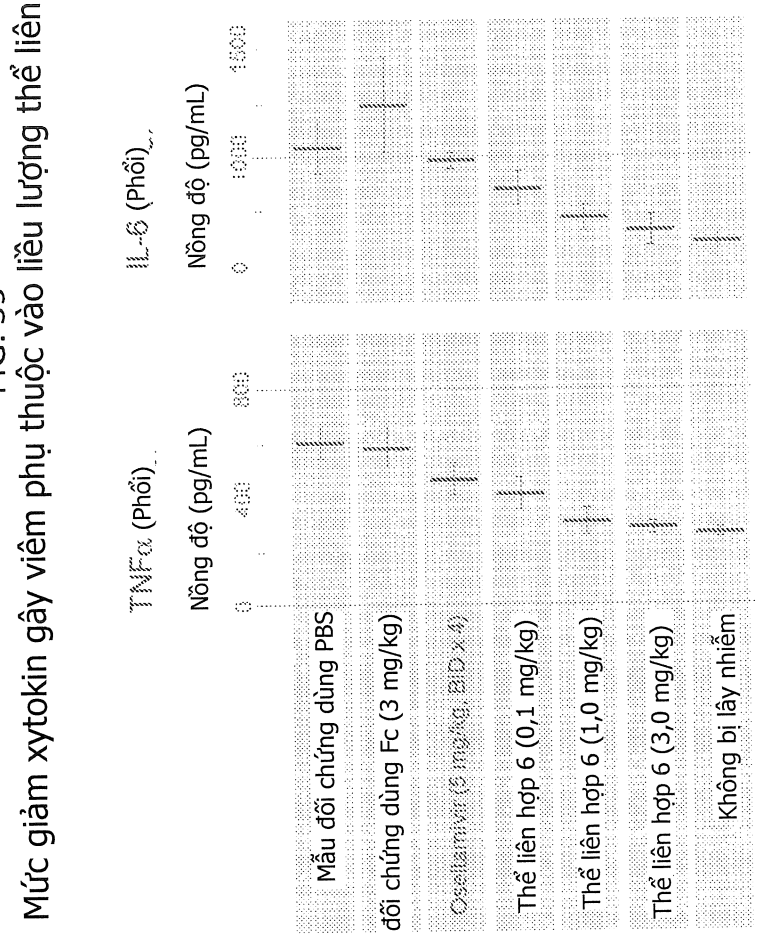


FIG. 60
Dược động học của thể liên hợp 6 ở chuột BALB/c SCID và chuột CD-1
5 mg/kg tiêm tĩnh mạch, một liều duy nhất

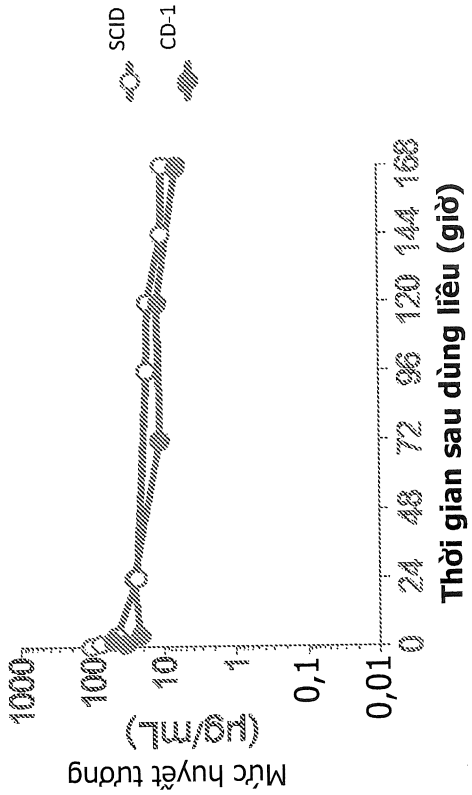


FIG. 61
Thể liên hợp 33

SEQ ID NO: 73

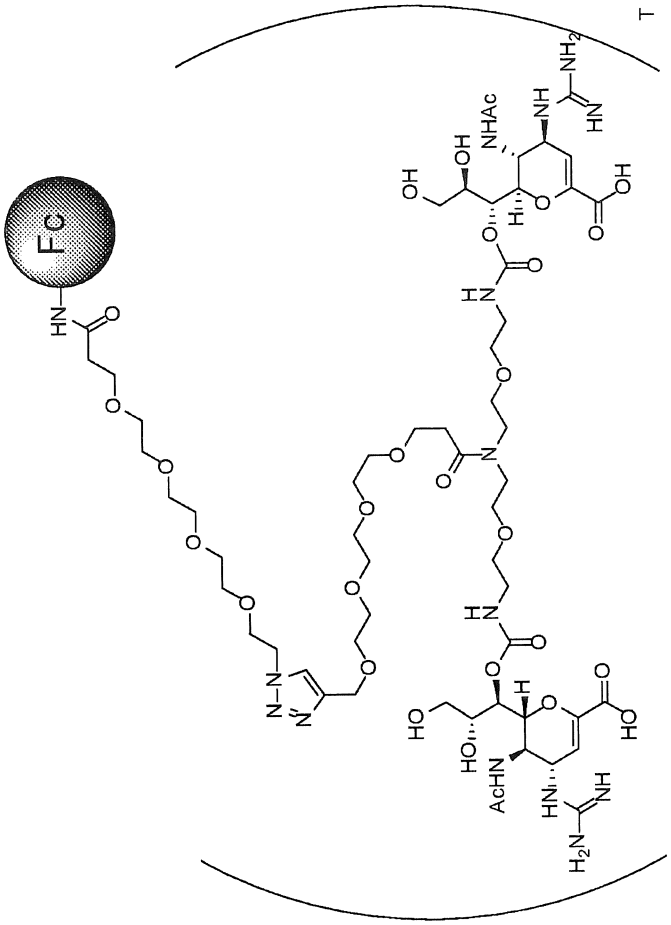


FIG. 62A

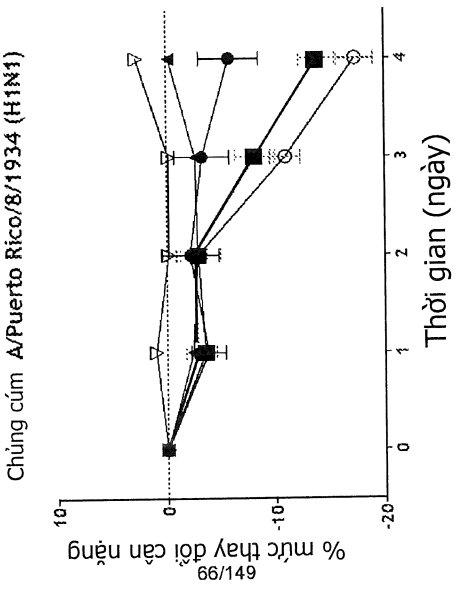


FIG. 62B

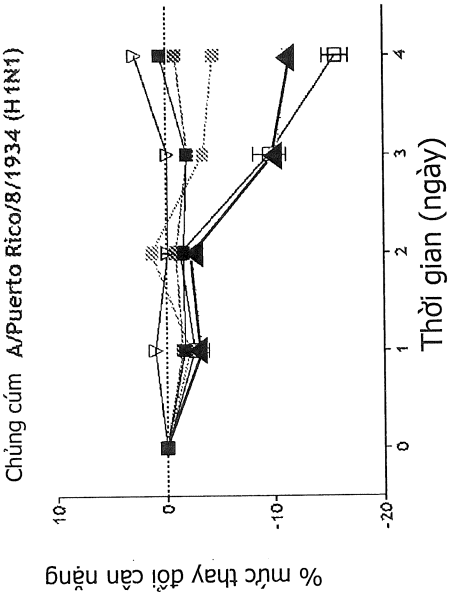


FIG. 63A

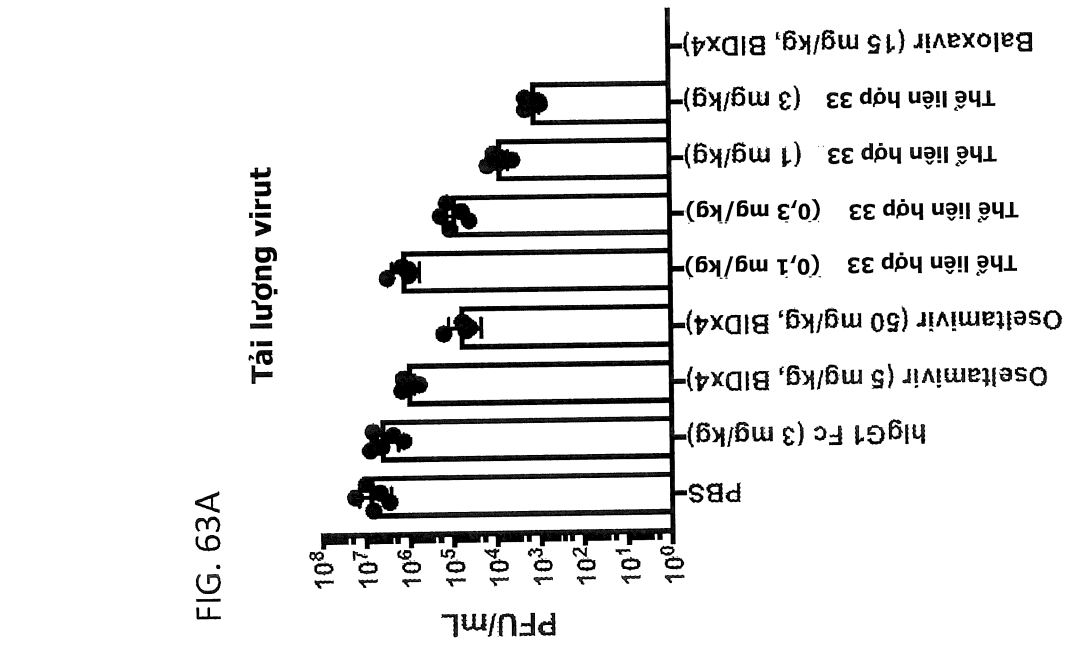


FIG. 63B

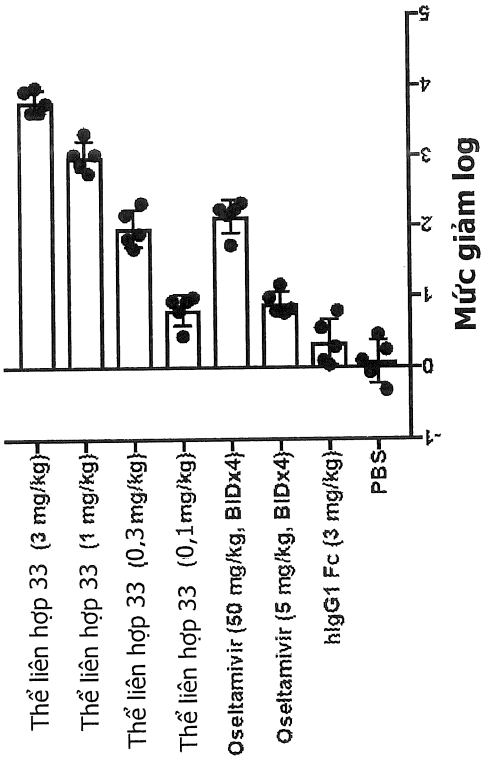


FIG. 64A

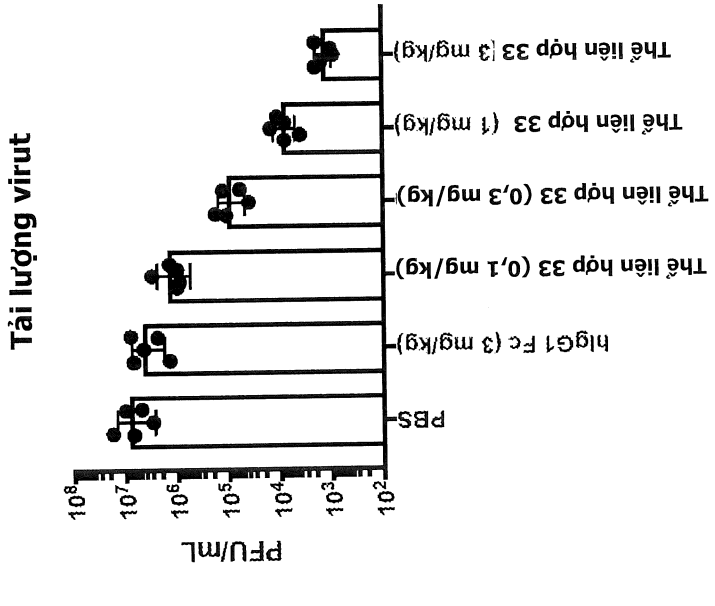


FIG. 64B

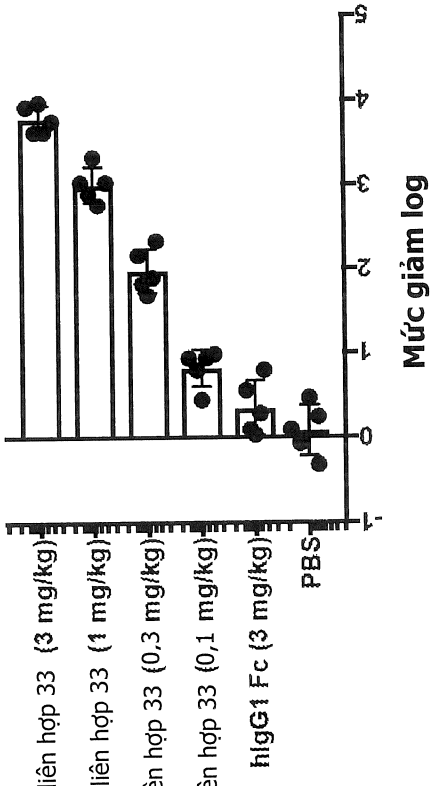


FIG. 65A

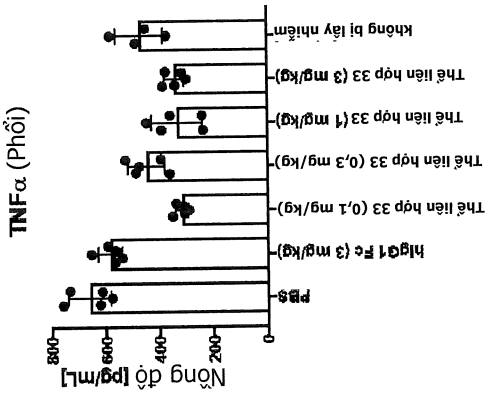


FIG. 65B

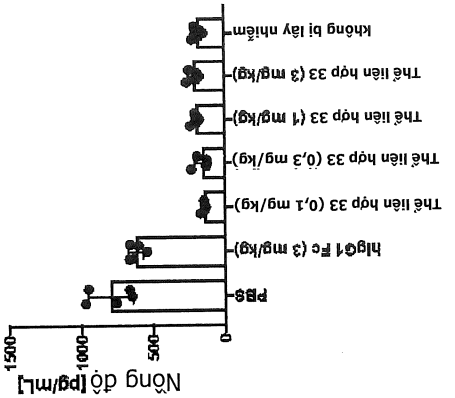


FIG. 65C

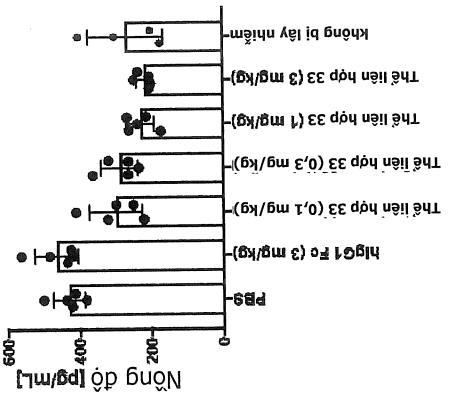


FIG. 65D

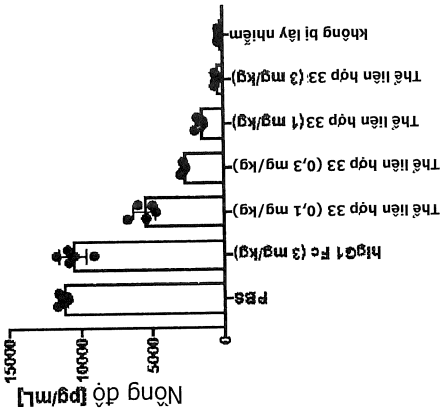


FIG. 65E

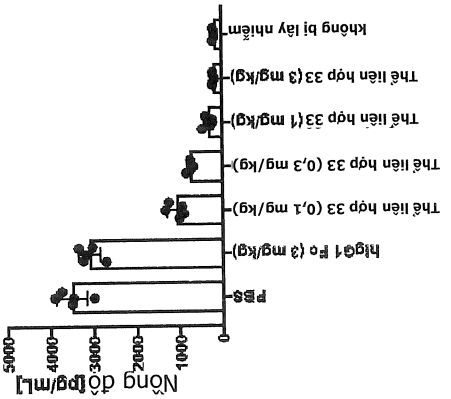


FIG. 66

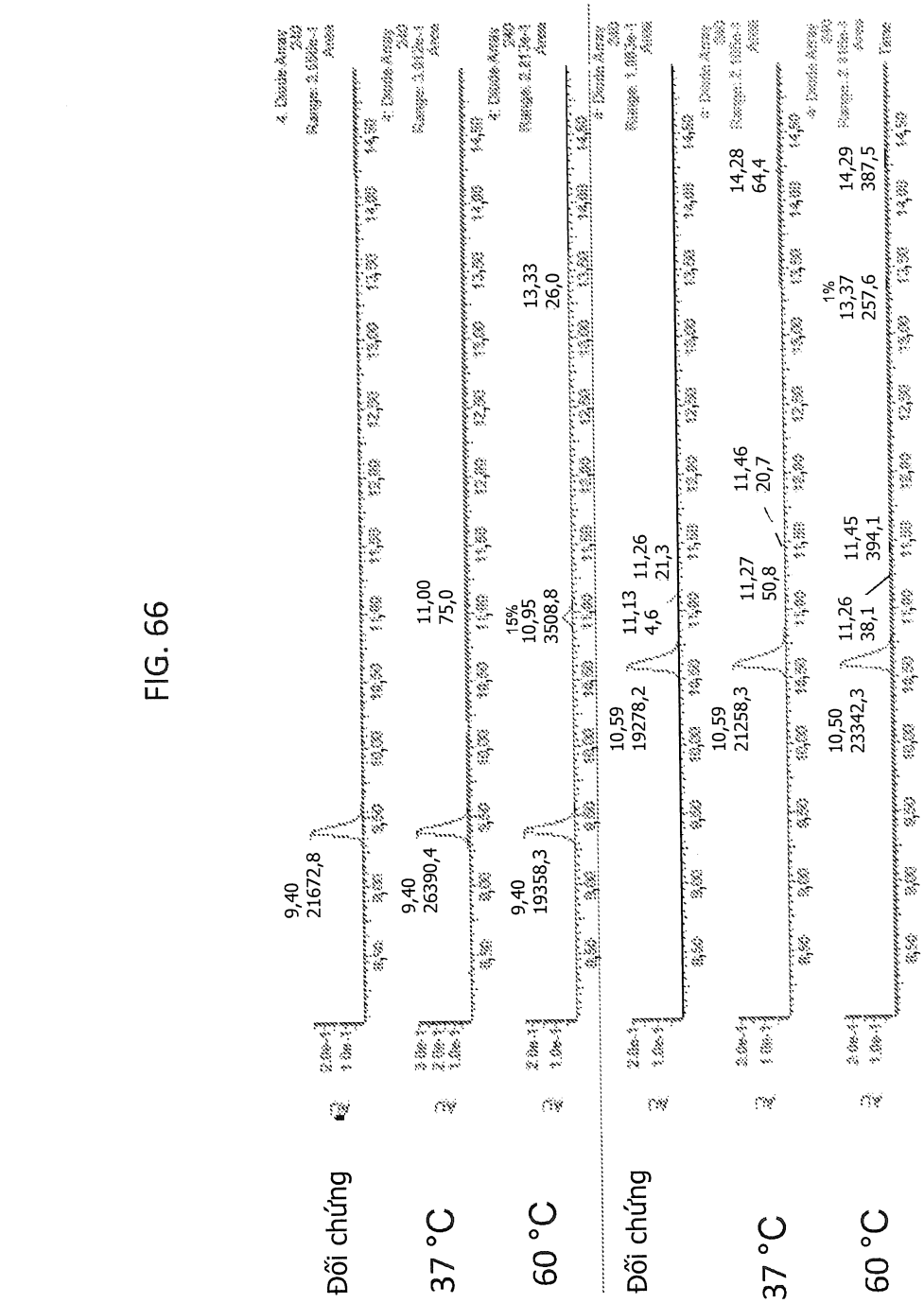

Int-4
Đối chứng
9,40
21672,8
37 °C
9,40
26390,4
11,00
75,0
60 °C
9,40
19358,3
15%
10,95
3508,8
13,33
26,0
Int-80
Đối chứng
10,59
19278,2
11,13
4,6
11,26
21,3
37 °C
10,59
21258,3
11,27
50,8
11,46
20,7
14,28
64,4
60 °C
10,50
23342,3
11,26
38,1
11,45
394,1
1%
13,37
257,6
14,29
387,5

FIG. 67

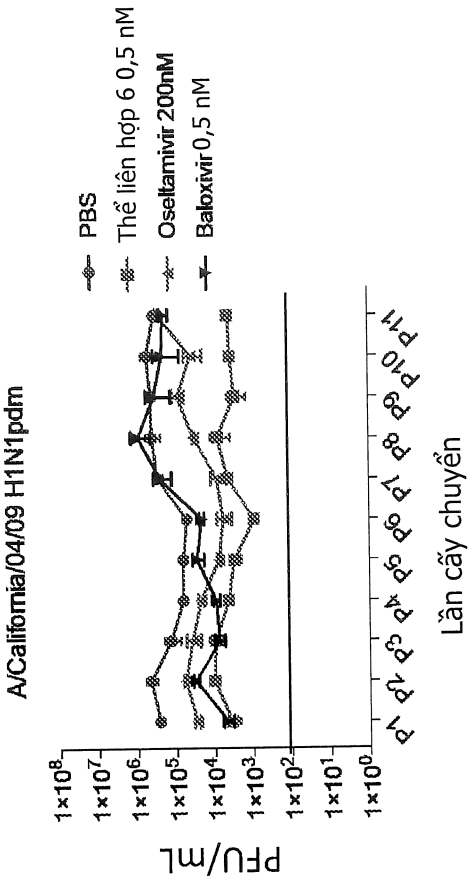

A/California/04/09 H1N1pdm
PBS
Thể liên hợp 6 0,5 nM
Oseltamivir 200nM
Baloxivir 0,5 nM
PFU/mL
1×10^8
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
1×10^0
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P11
Lần cấy chuyển

FIG. 68

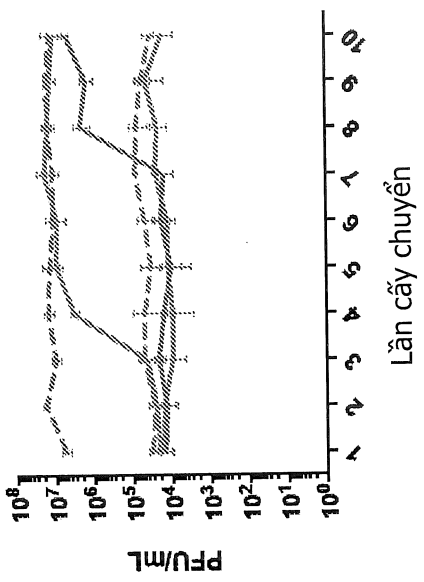

PBS
Baloxivir 4 nM
Oseltamivir 50 nM
Thể liên hợp 6 4 nM
Thể liên hợp 32 2 nM
PFU/mL
Lần cấy chuyển

FIG. 69

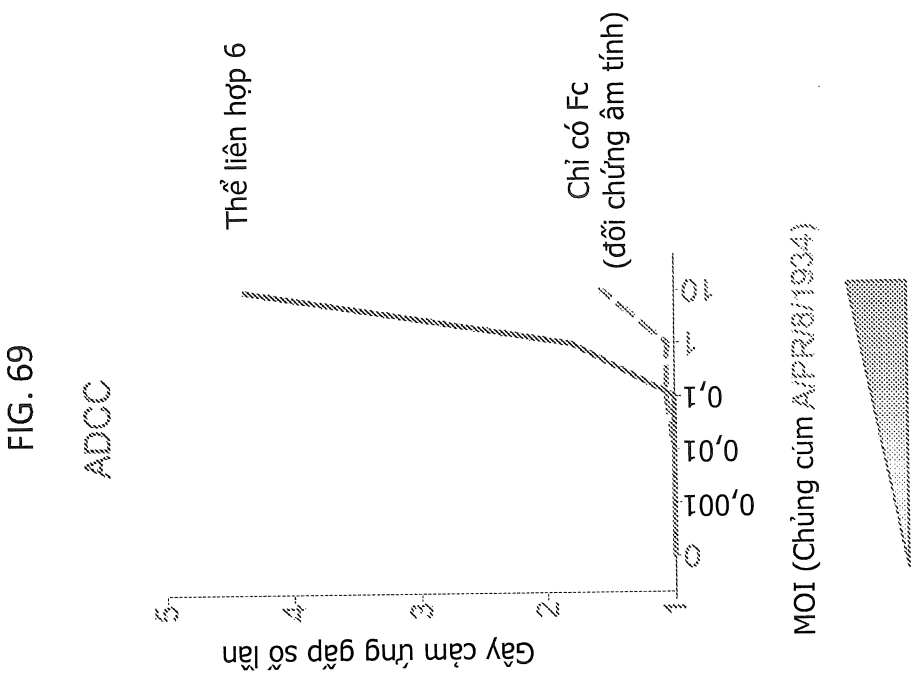

ADCC
Gấy cảm ứng gấp số lần
5
4
3
2
1
0
0,001
0,01
0,1
MOI (Chủng cúm A/PR/8/1934)
Thể liên hợp 6
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)

FIG. 70

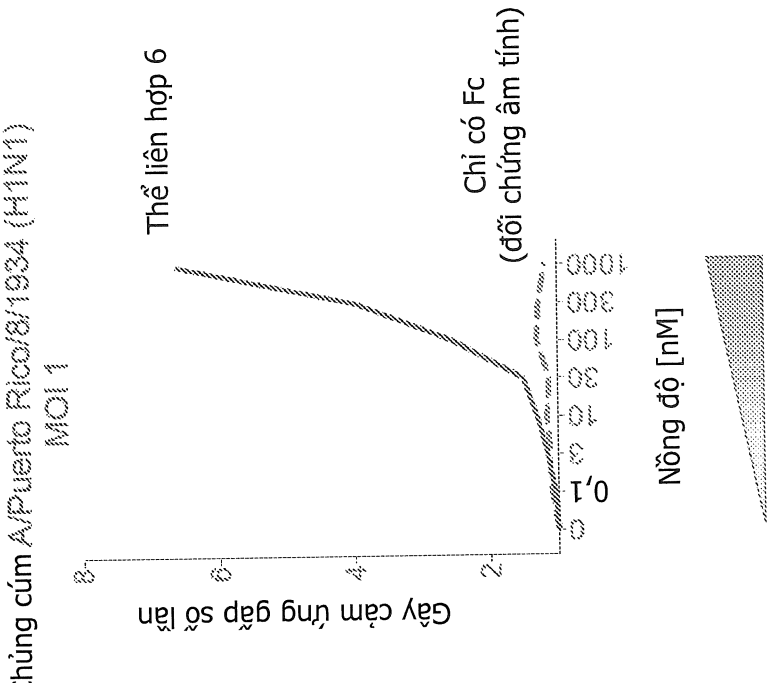

Chủng cúm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
MOI 1
Thể liên hợp 6
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
Gấy cảm ứng gấp số lần
8
6
4
2
0
0,1
3
10
30
100
300
1000
Nồng độ [nM]

FIG. 71A

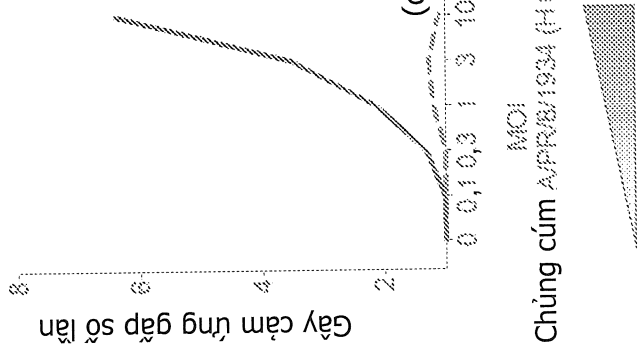


FIG. 71B

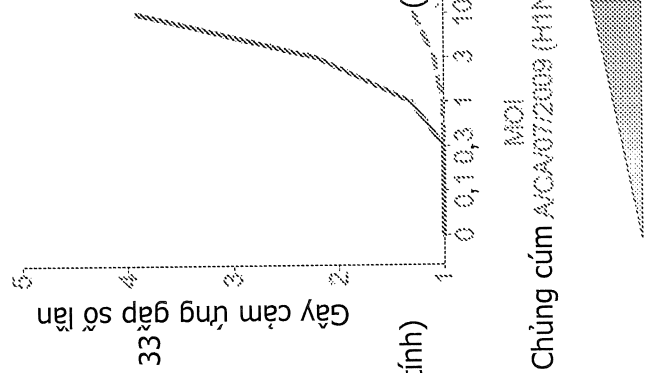


FIG. 71C

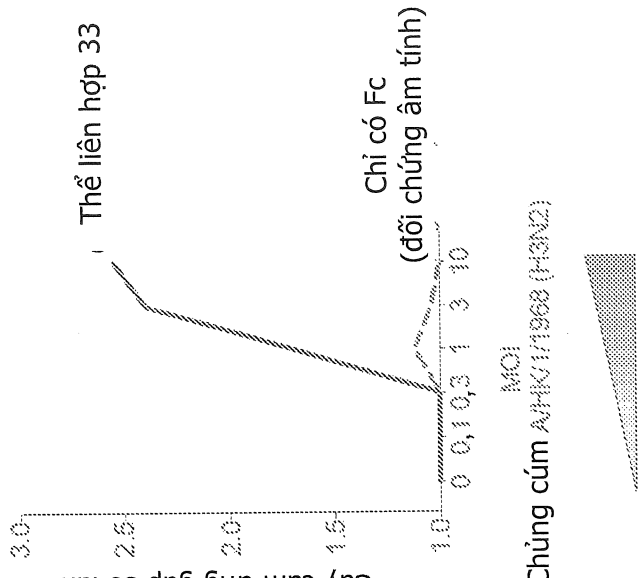


FIG. 72

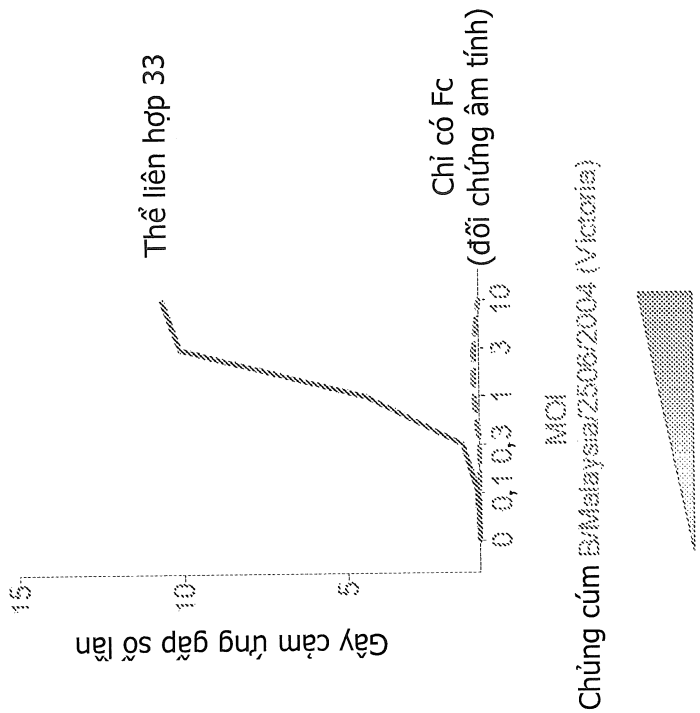

ADCC
Thể liên hợp 33
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
Gây cảm ứng gấp số lần
15
10
5
0
0,1
0,3
1
3
10
MOI
Chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria)

FIG. 73B

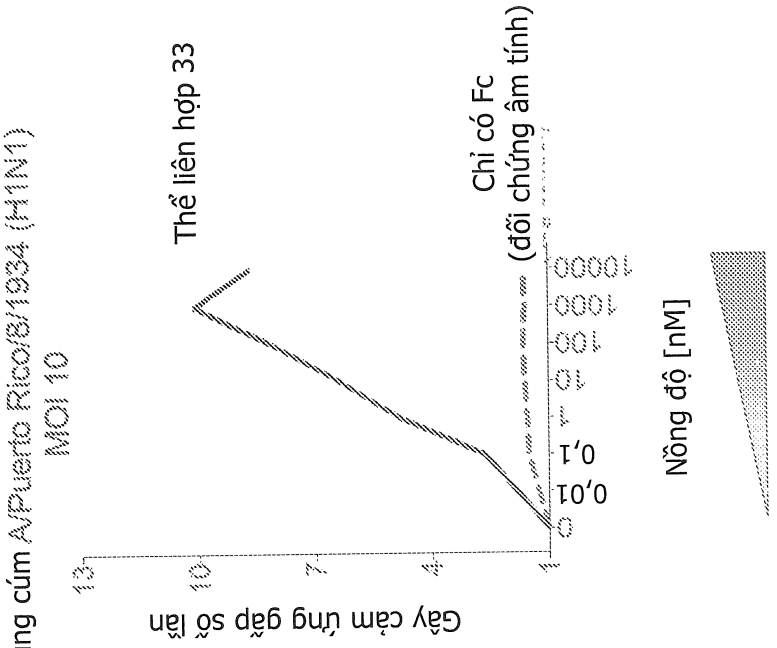


FIG. 73A

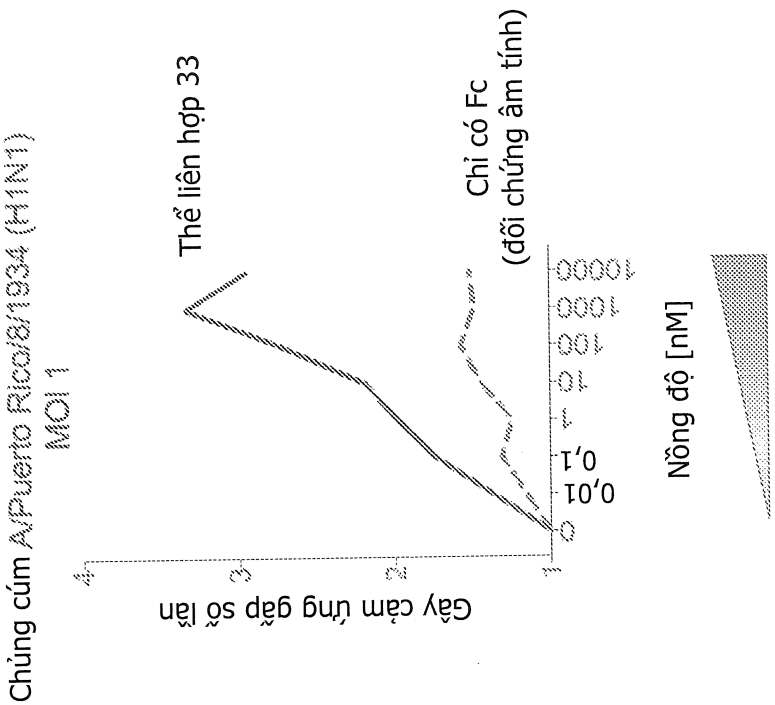


FIG. 74

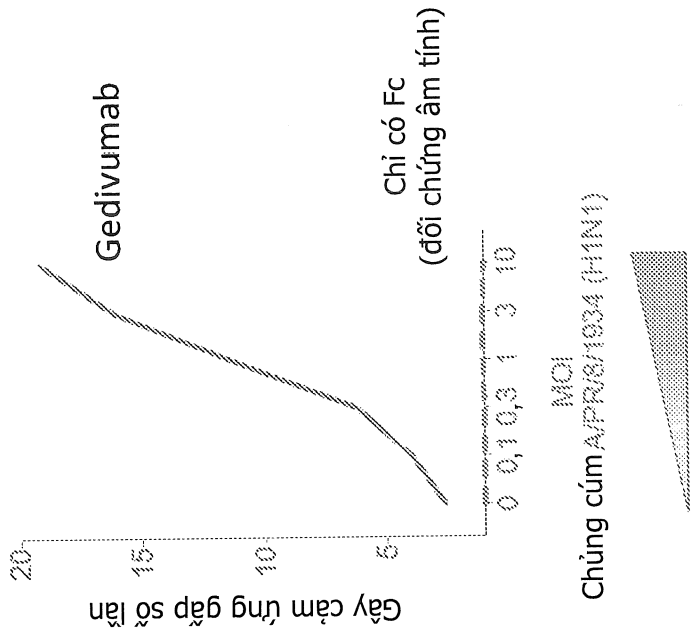

ADCC
Gedivumab
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
Gây cảm ứng gấp số lần
20
15
10
5
0 0,1 0,3 1 3 10
MOI
Chủng cúm A/PR8/1934 (H1N1)

FIG. 75B

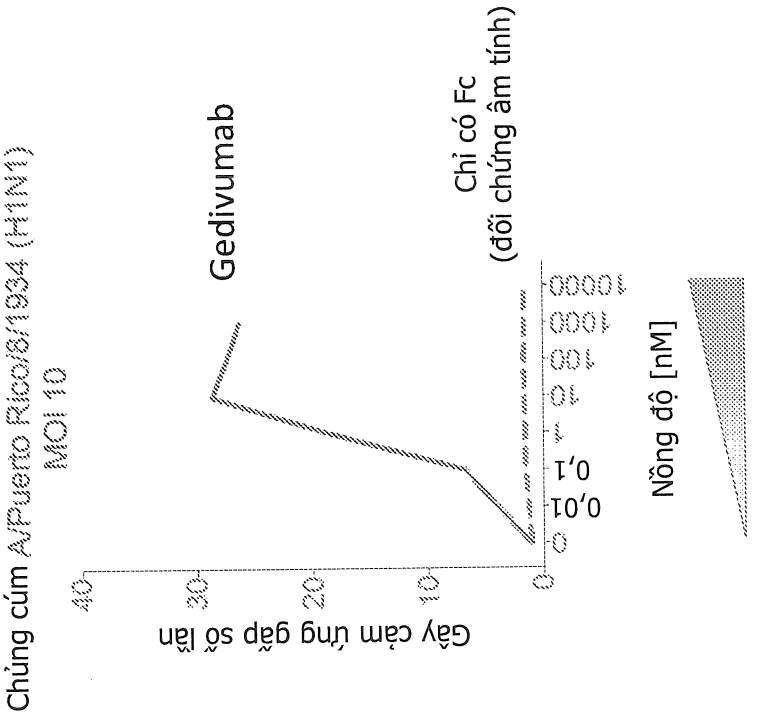


FIG. 75A

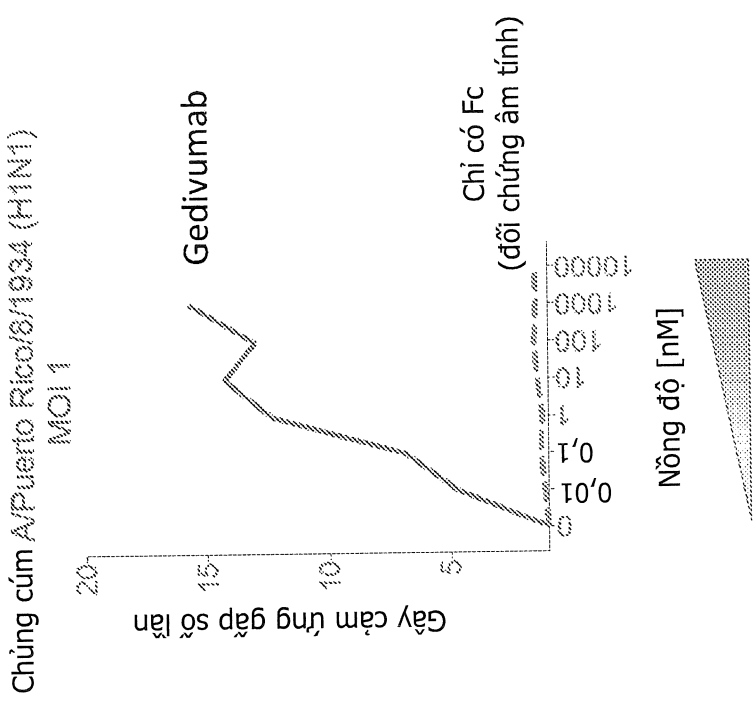


FIG. 76

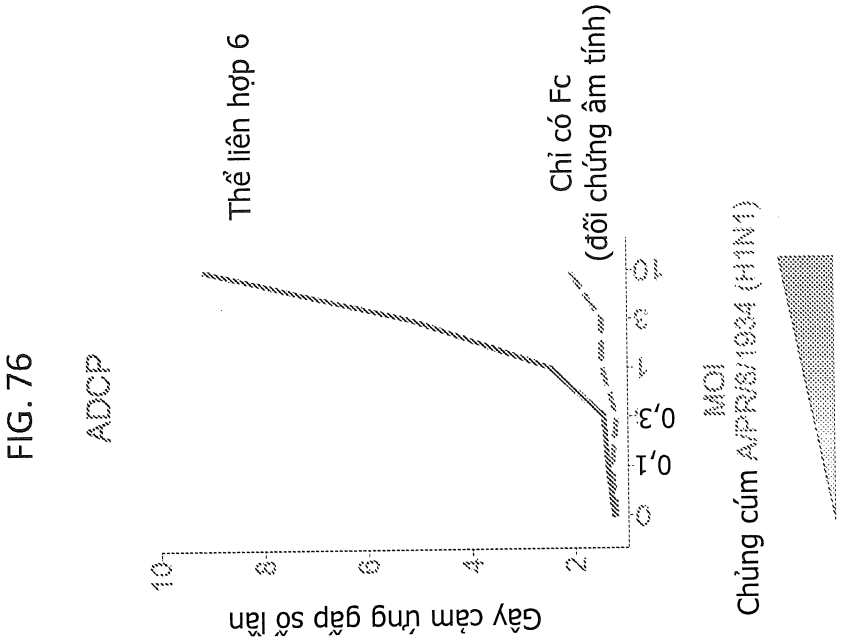

ADCP
Thể liên hợp 6
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
Gây cảm ứng gấp số lần
10
8
6
4
2
0
0,1
0,3
1
3
10
MOI
Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1)

FIG. 77A

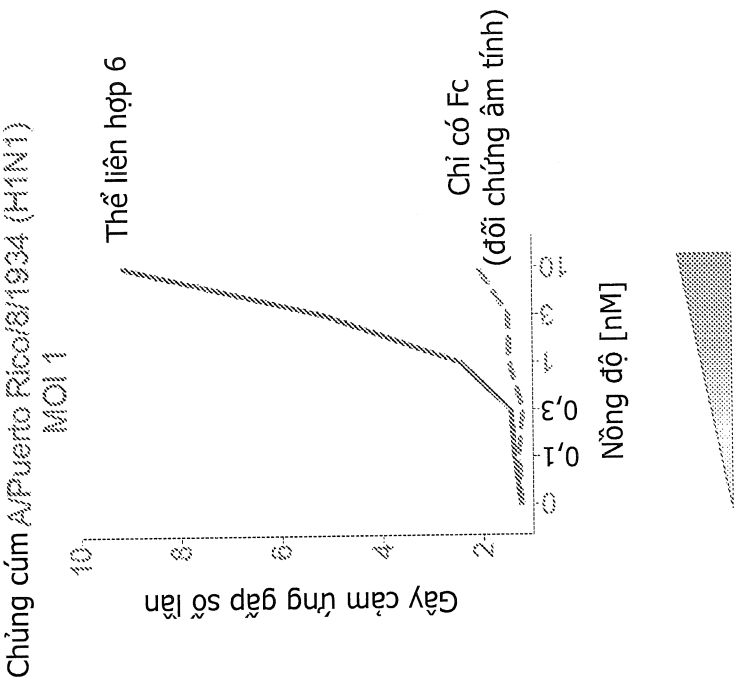
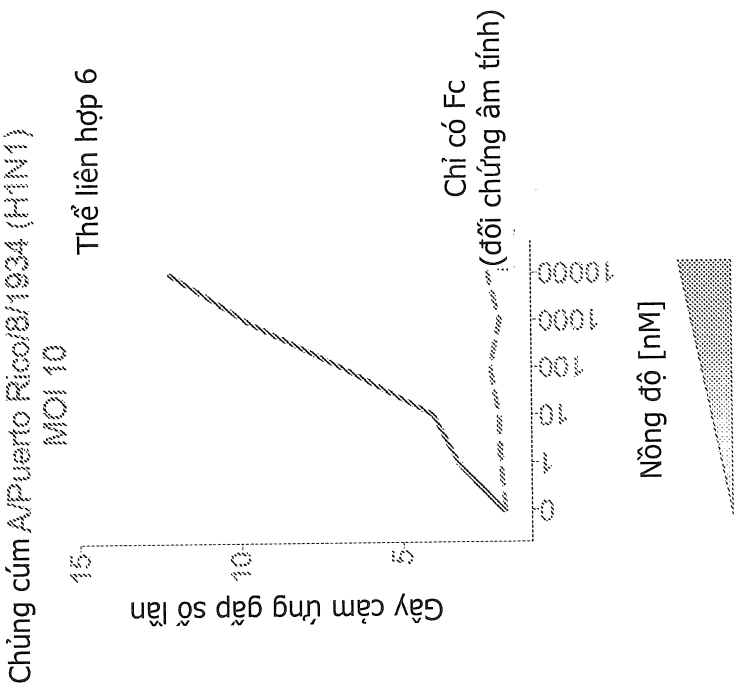


FIG. 77B



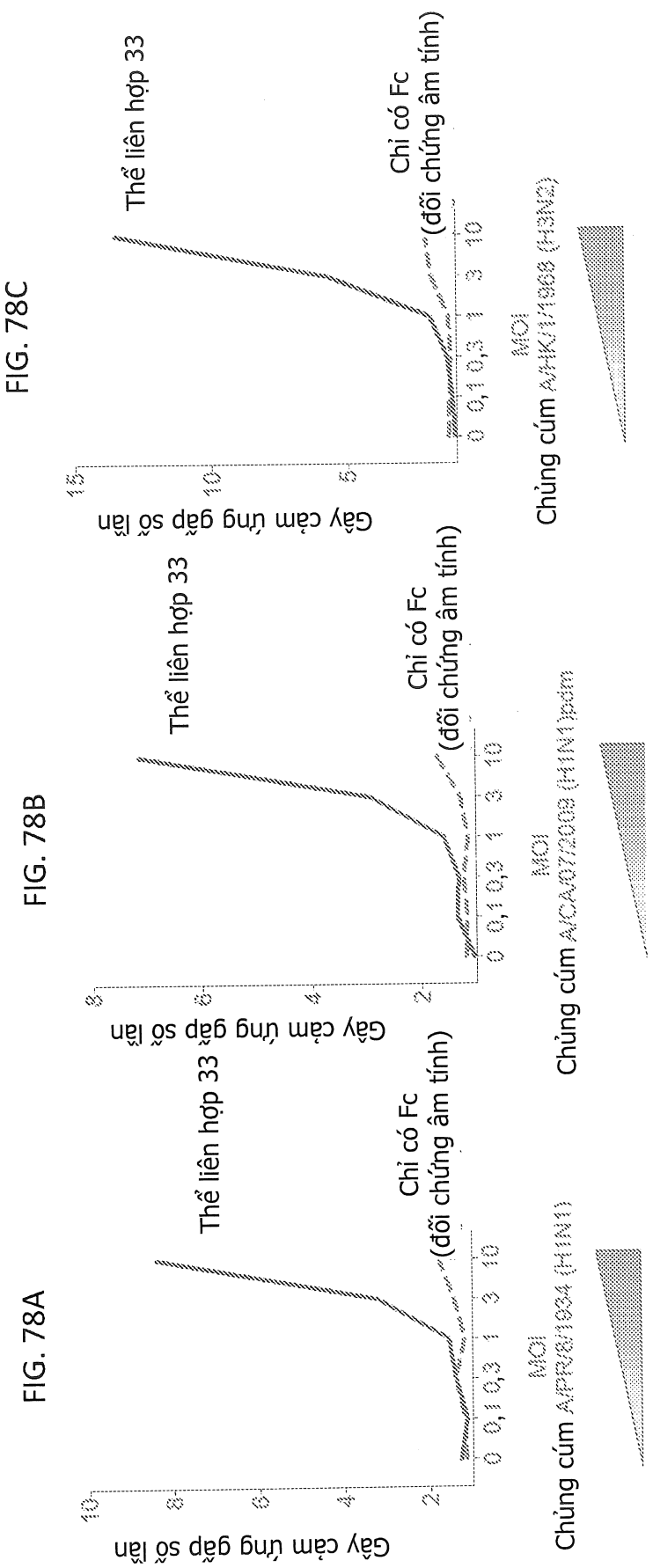

FIG. 78A
Gấy cảm ứng gấp số lần
Thể liên hợp 33
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
MOI
Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1)
FIG. 78B
Gấy cảm ứng gấp số lần
Thể liên hợp 33
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
MOI
Chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm
FIG. 78C
Gấy cảm ứng gấp số lần
Thể liên hợp 33
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
MOI
Chủng cúm A/HK/1/1968 (H3N2)

FIG. 79

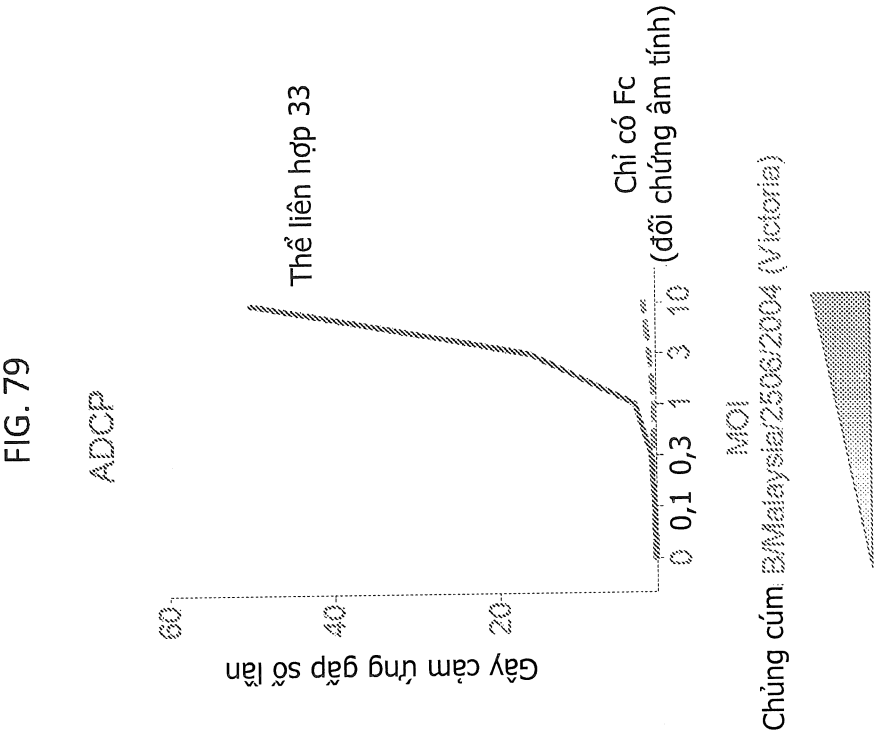

ADCP
Gấy cảm ứng gấp số lần
60
40
20
Thể liên hợp 33
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
0 0,1 0,3 1 3 10
MOI
Chủng cúm B/Malaysia/2506/2004 (Victoria)

FIG. 80A

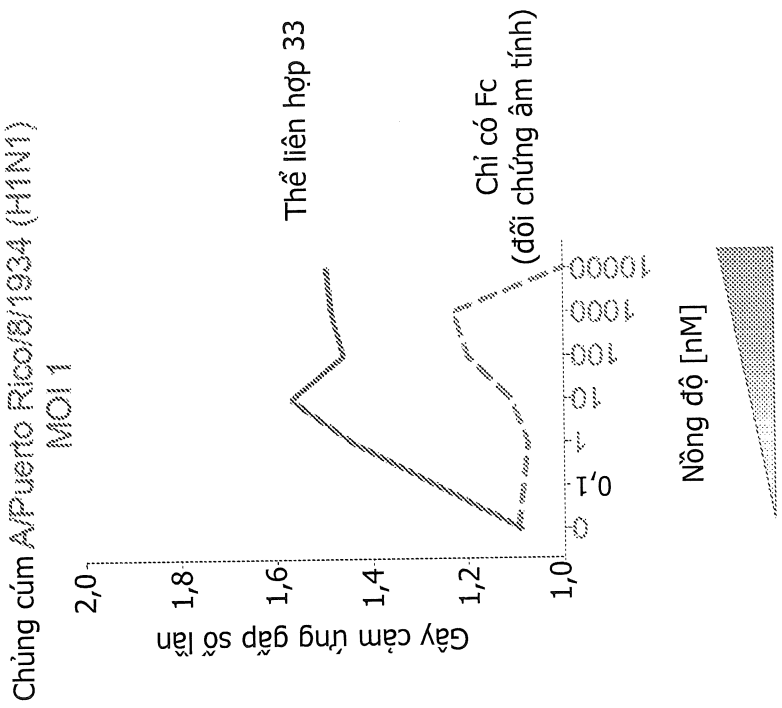


FIG. 80B

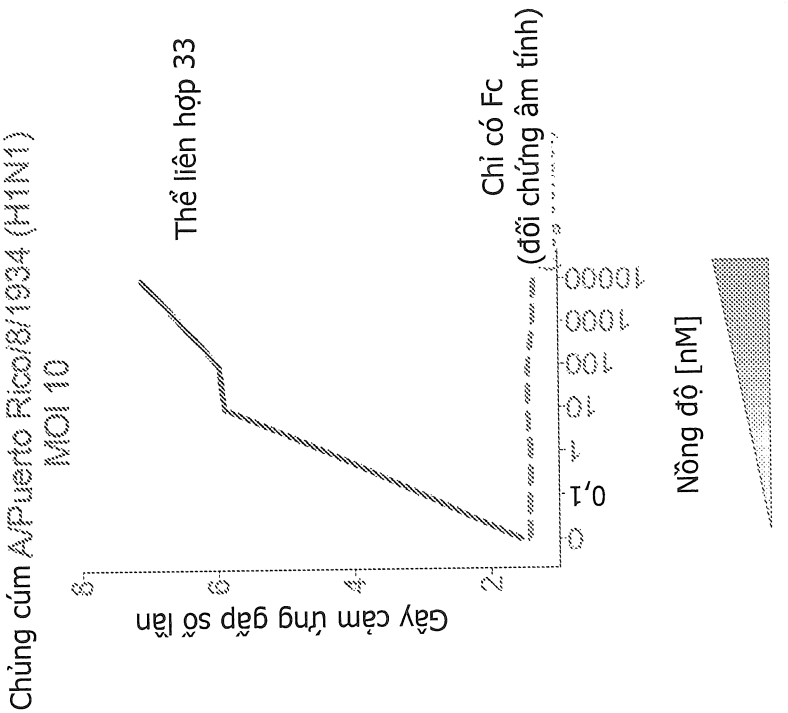


FIG. 81

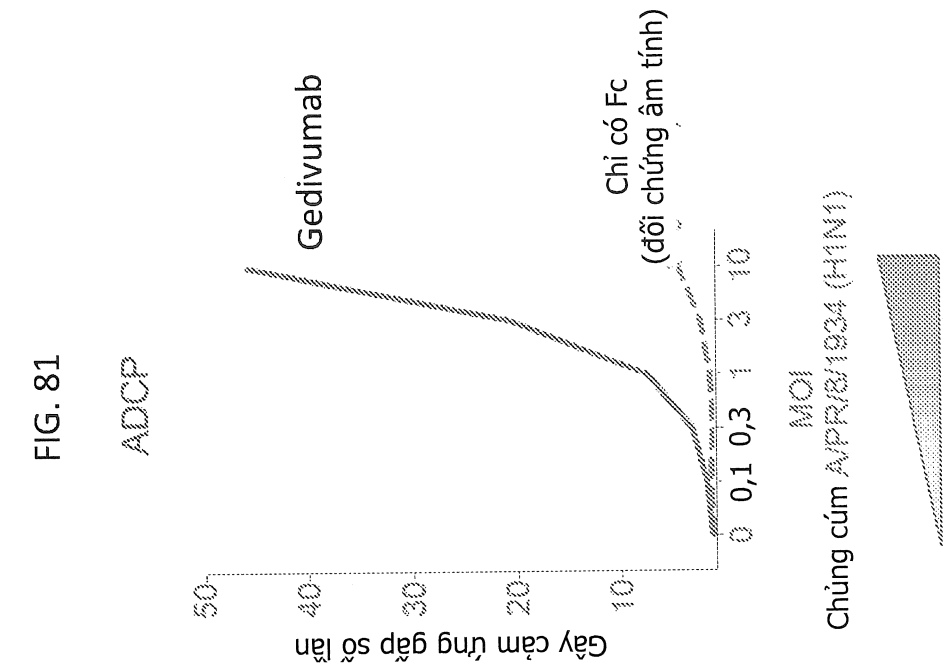

ADCP
Gây cảm ứng gấp số lần
50
40
30
20
10
Gedivumab
Chỉ có Fc
(đối chứng âm tính)
0
0,1
0,3
1
3
10
MOI
Chủng cúm A/PR/8/1934 (H1N1)

FIG. 82B

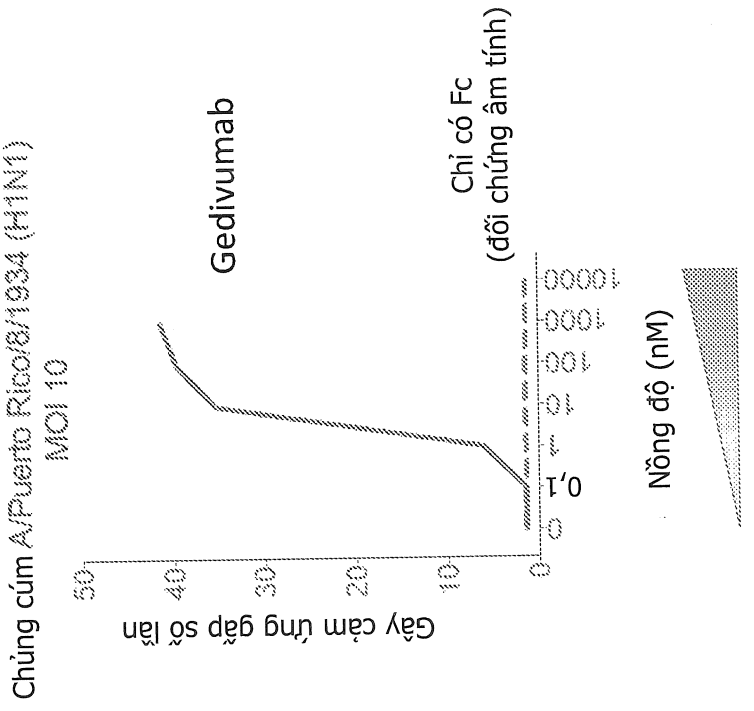


FIG. 82A

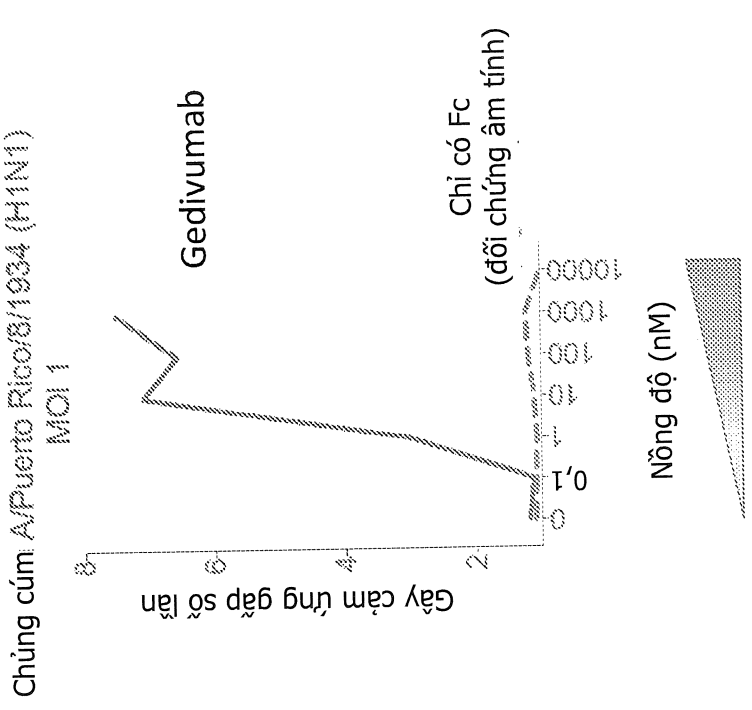


FIG. 83

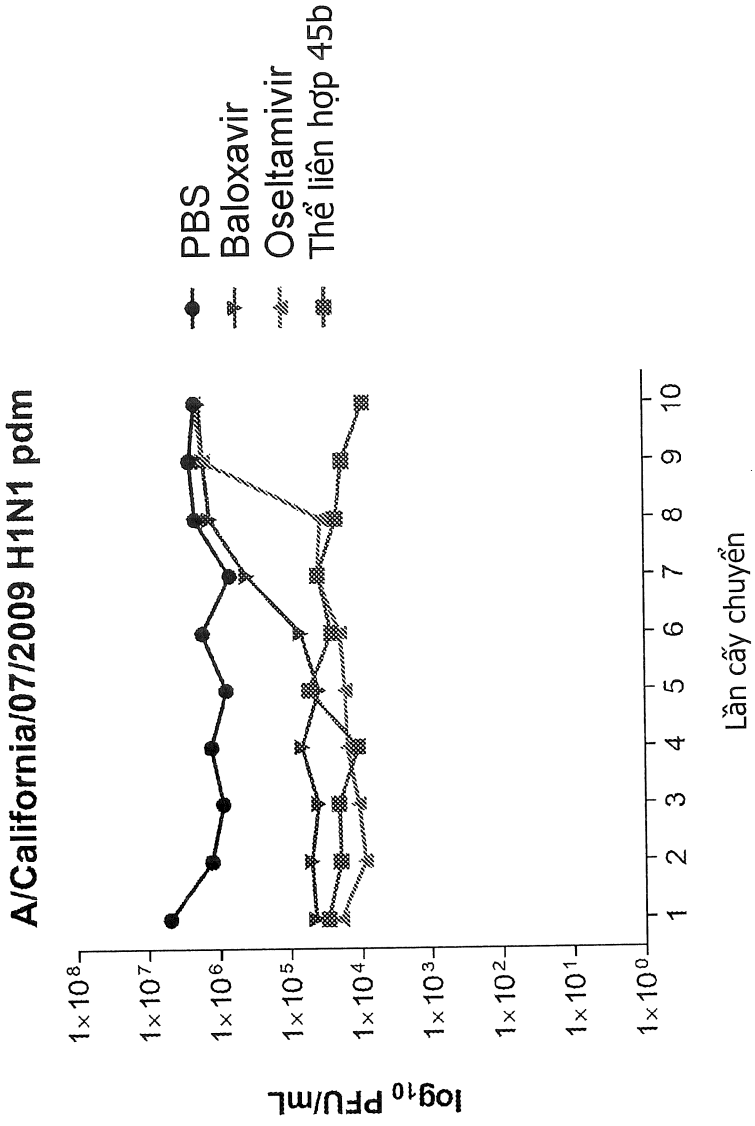
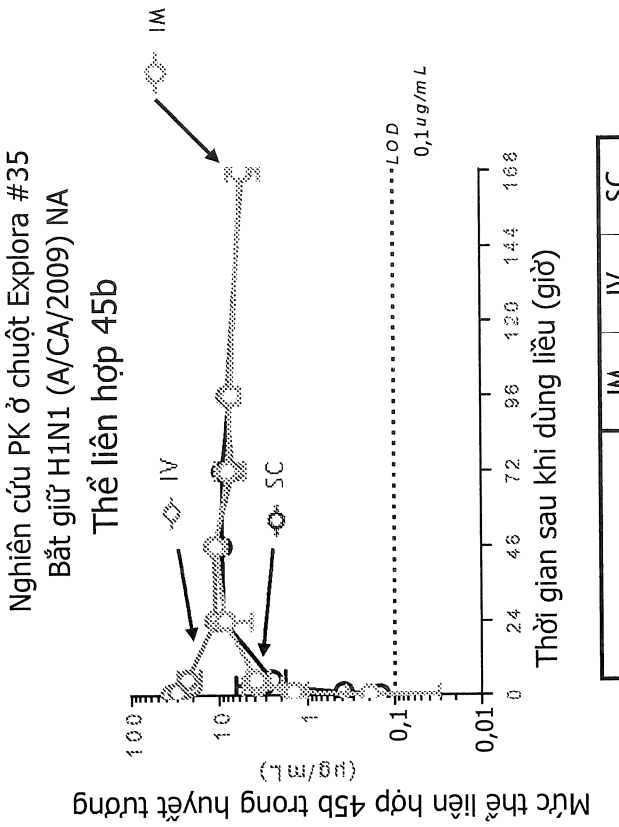
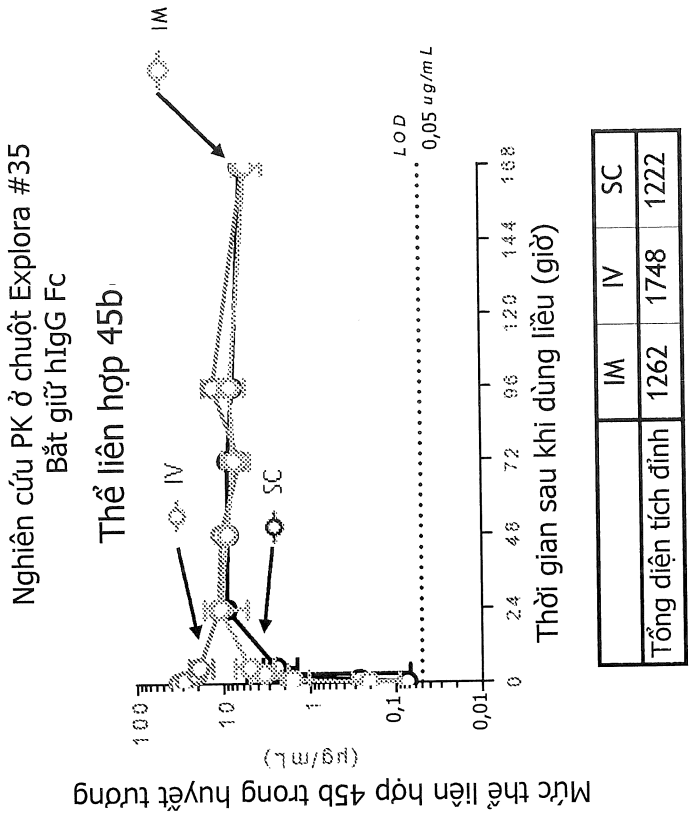

A/California/07/2009 H1N1 pdm
PBS
Baloxavir
Oseltamivir
Thể liên hợp 45b
log10 PFU/mL
1×10^8
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
1×10^0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Lần cấy chuyển

FIG. 84



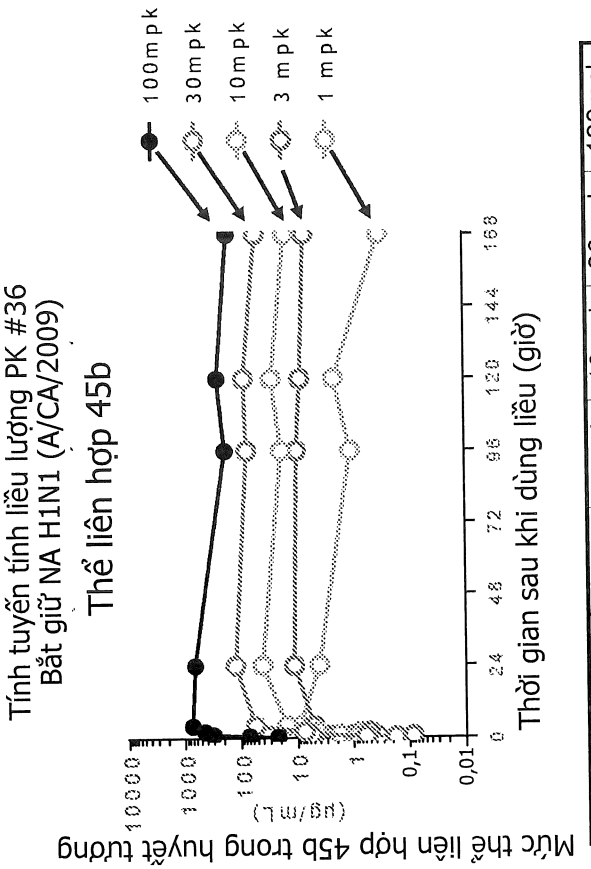
	IM	IV	SC
Tổng diện tích đỉnh	1238	1590	1223

FIG. 85



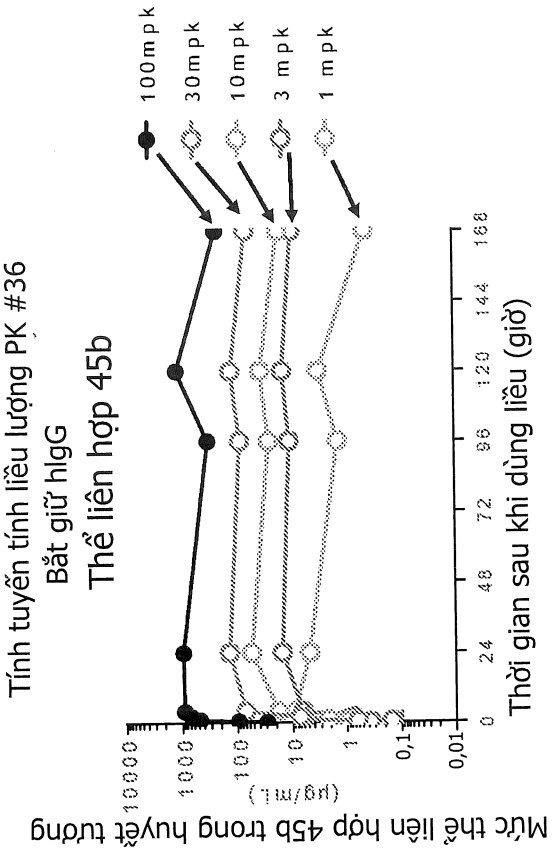
	IM	IV	SC
Tổng diện tích đỉnh	1262	1748	1222

FIG. 86



	1 mpk	3 mpk	10mpk	30mpk	100mpk
Tổng diện tích đỉnh	435,9	1519	4281	14187	60701

FIG. 87



	1 mpk	3 mpk	10mpk	30mpk	100mpk
Tổng diện tích đỉnh	520,5	2023	5615	17270	118165

FIG. 88

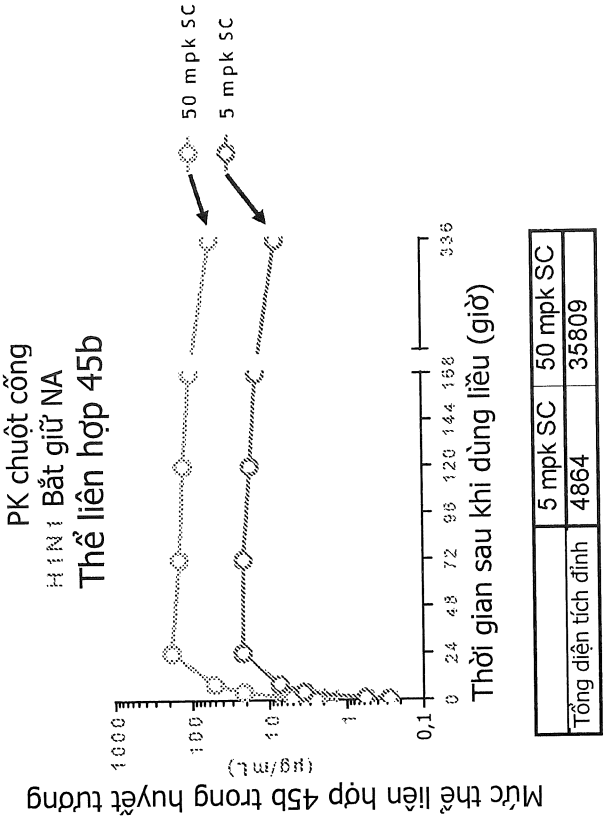
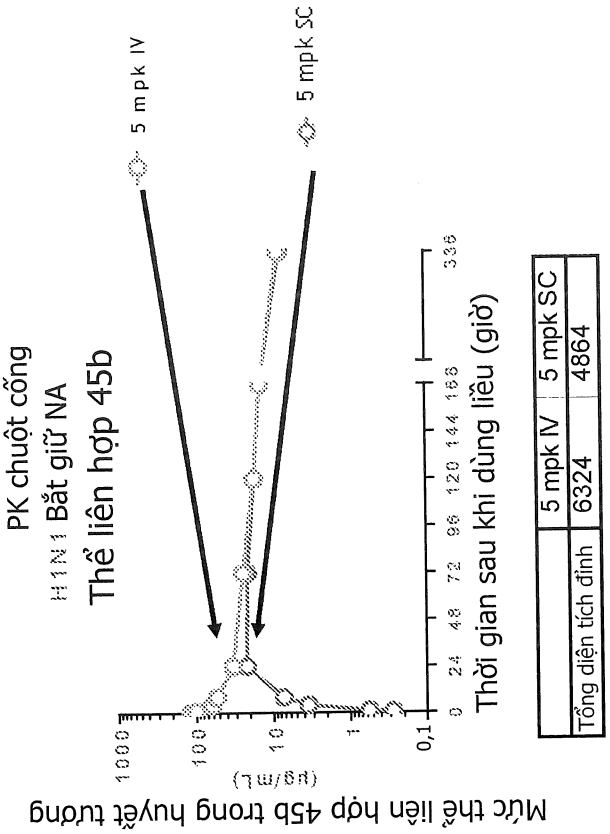
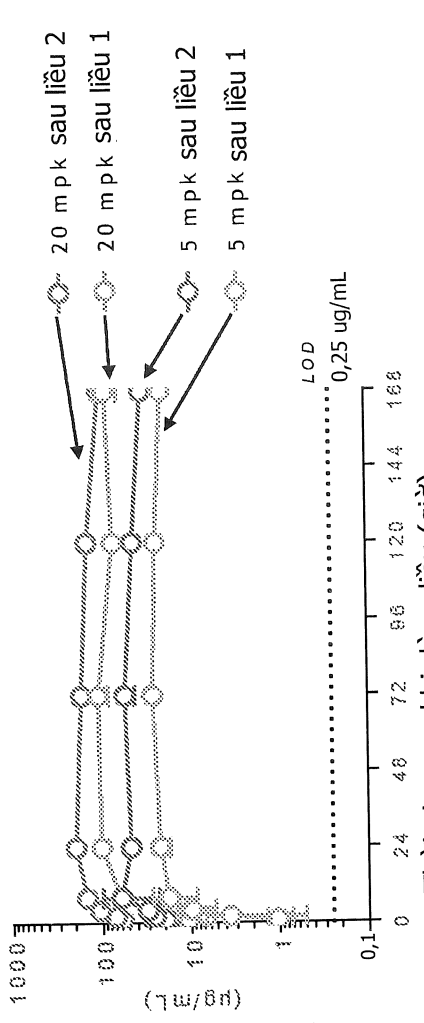

PK chuột cống
H1N1 Bắt giữ NA
Thể liên hợp 45b
50 mpk SC
5 mpk SC
Mức thể liên hợp 45b trong huyết tương
(µg/mL)
1000
100
10
1
0,1
0
24
48
72
96
120
144
168
336
Thời gian sau khi dùng liều (giờ)
5 mpk SC
50 mpk SC
Tổng diện tích đỉnh
4864
35809

FIG. 89



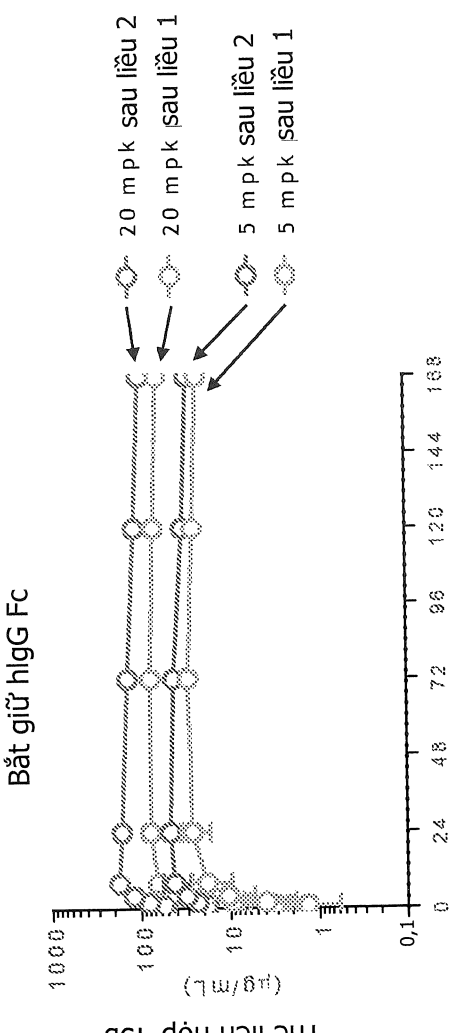
	5 mpk IV	5 mpk SC
Tổng diện tích đỉnh	6324	4864

FIG. 90



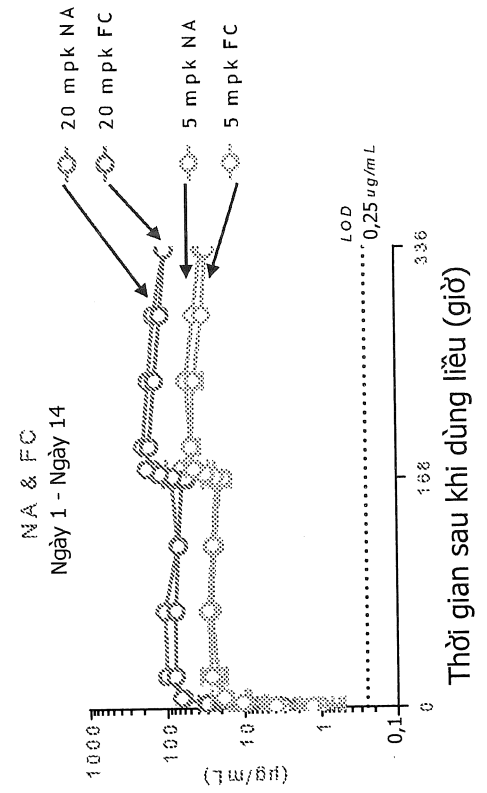
	5 mpk sau liều 1	5 mpk sau liều 2	20 mpk sau liều 1	20 mpk sau liều 2
Tổng diện tích đỉnh	3800	7738	14583	25363

FIG. 91



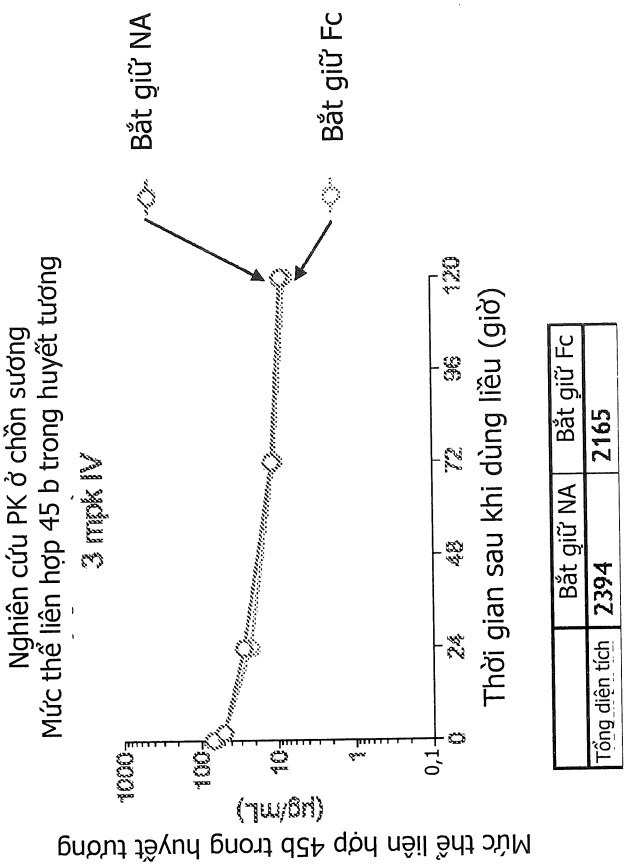
	5 mpk sau liều 1	5 mpk sau liều 2	20 mpk sau liều 1	20 mpk sau liều 2
Tổng diện tích đỉnh	4240	6394	11853	22089

FIG. 92



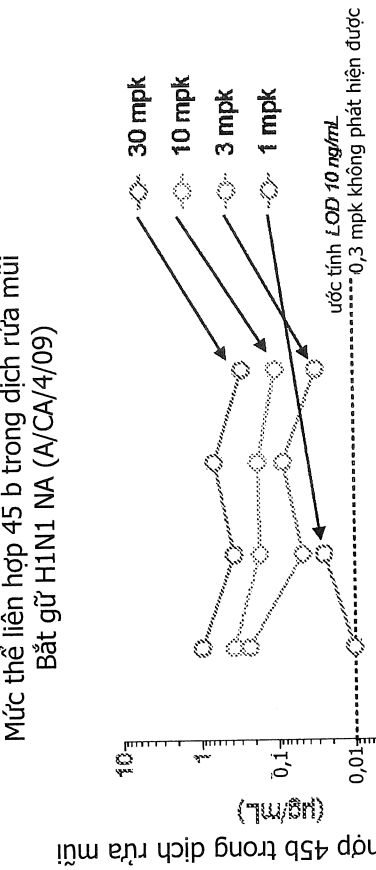
	5 mpk FC	20 mpk FC	5 mpk NA	20 mpk NA
Tổng diện tích đỉnh	10636	33946	11540	39952

FIG. 93



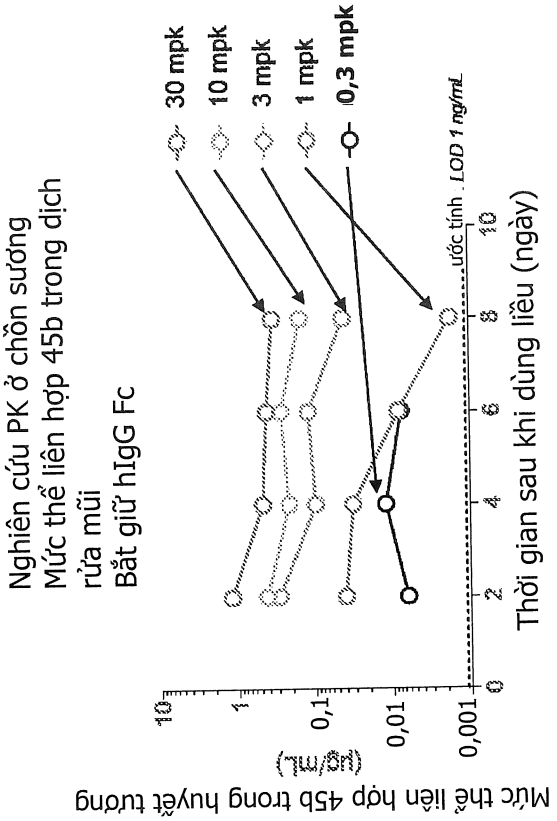
	Bắt giữ NA	Bắt giữ Fc
Tổng diện tích	2394	2165

FIG. 94



	30 mpk	10 mpk	3 mpk	1 mpk	0,3 mpk
Tổng diện tích	3,260	1,167	0,5265	0,03521	

FIG. 95



	30 mpk	10 mpk	3 mpk	1 mpk	0,3 mpk
Tổng diện tích đỉnh	3,375	1,559	0,7713	0,1233	0,03827

FIG. 96

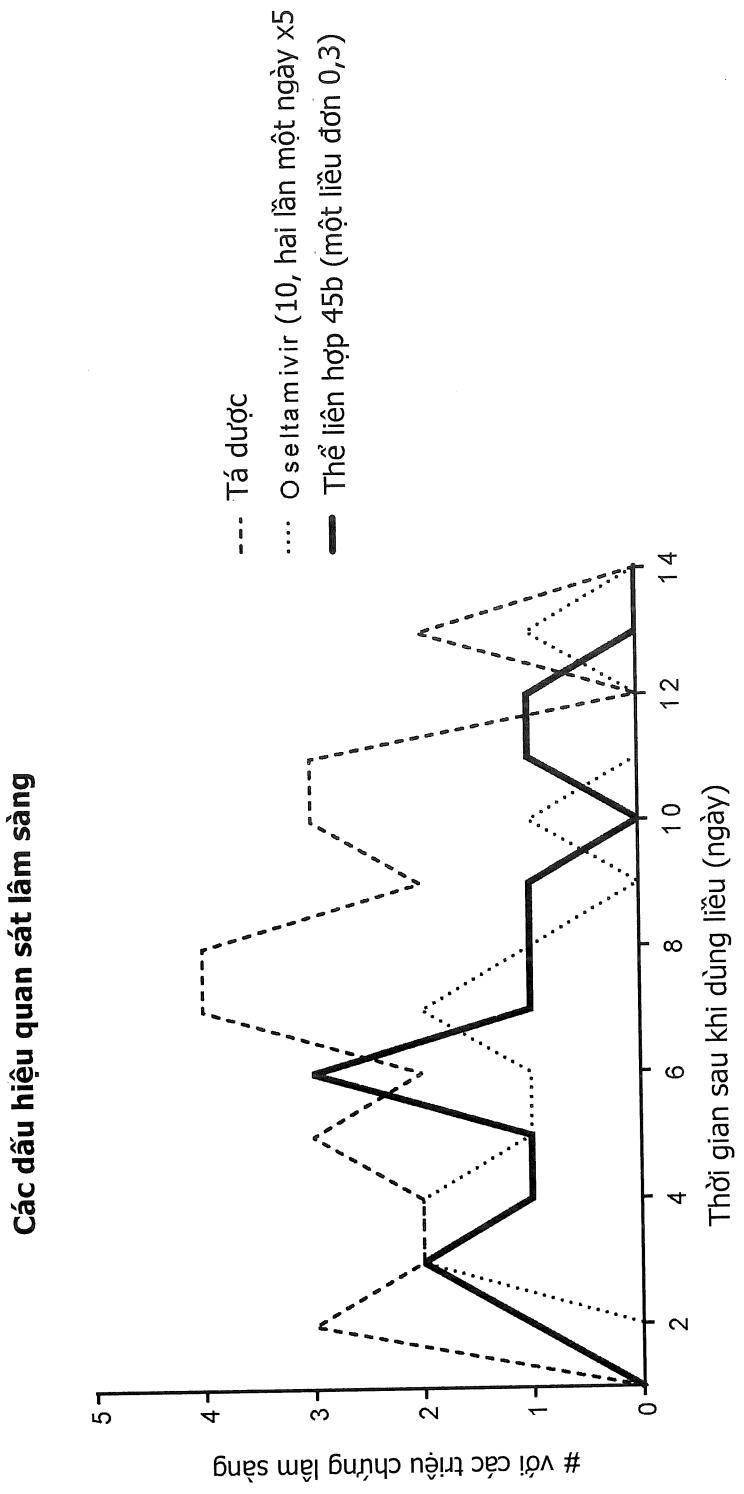

Các dấu hiệu quan sát lâm sàng
Tá dược
Oseltamivir (10, hai lần một ngày x5
Thể liên hợp 45b (một liều đơn 0,3)
với các triệu chứng lâm sàng
0
1
2
3
4
5
2
4
6
8
10
12
14
Thời gian sau khi dùng liều (ngày)

FIG. 97

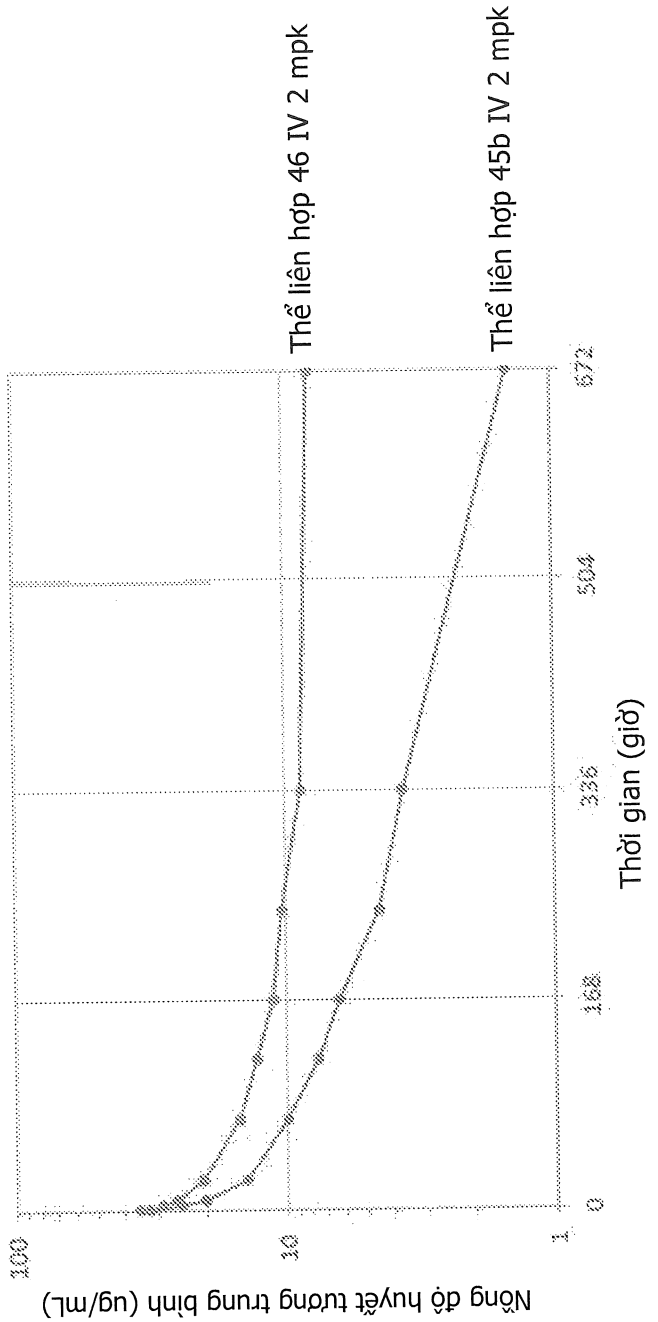
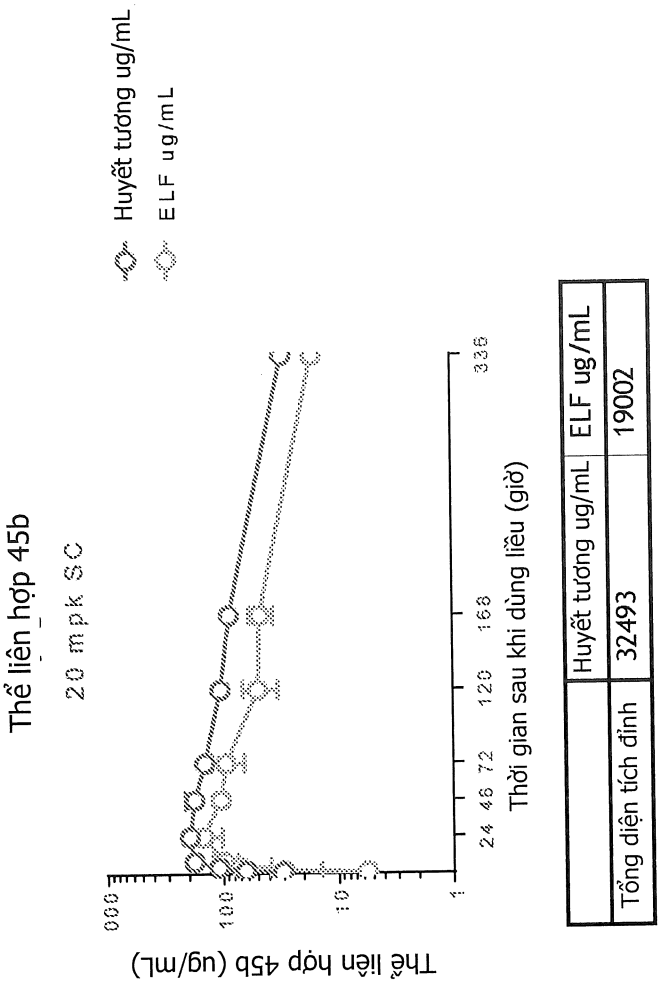
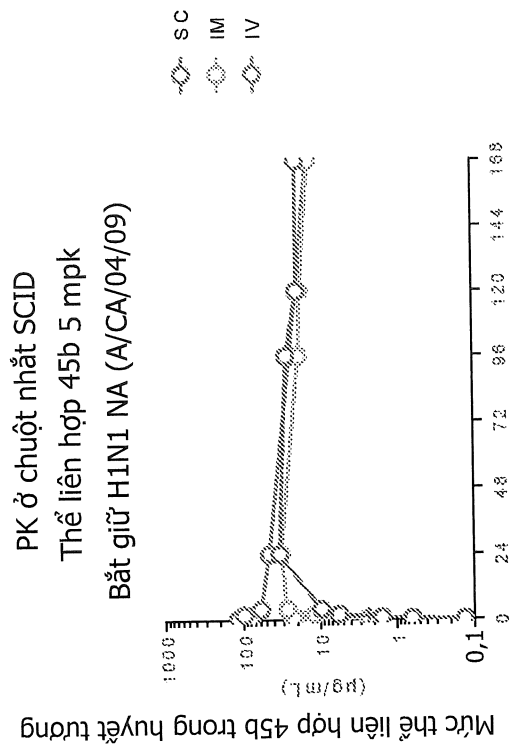

Thể liên hợp 46 IV 2 mpk
Thể liên hợp 45b IV 2 mpk
Nồng độ huyết tương trung bình (ug/mL)
100
10
1
0
168
336
504
672
Thời gian (giờ)

FIG. 98



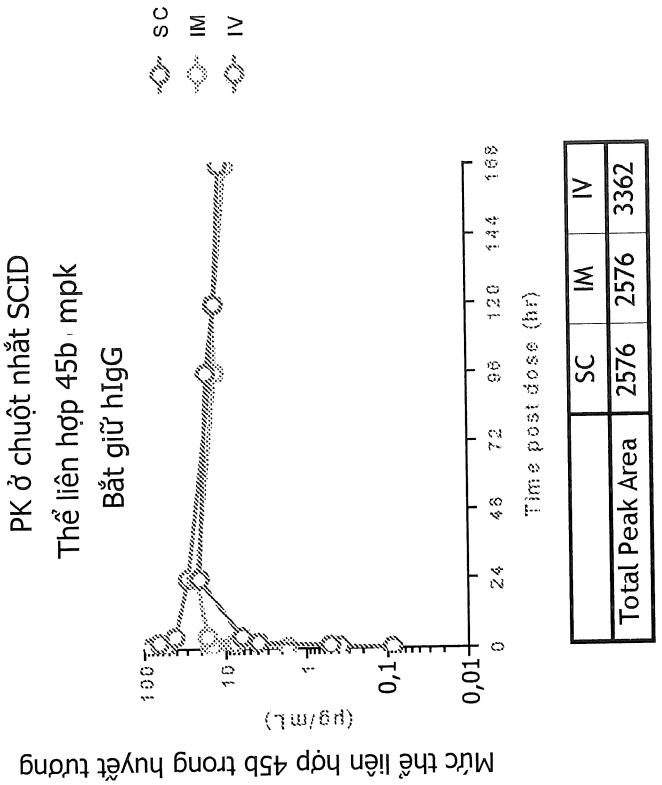
	Huyết tương ug/mL	ELF ug/mL
Tổng diện tích đỉnh	32493	19002

FIG. 99



	SC	IM	IV
Tổng diện tích đỉnh	4123	3658	5226

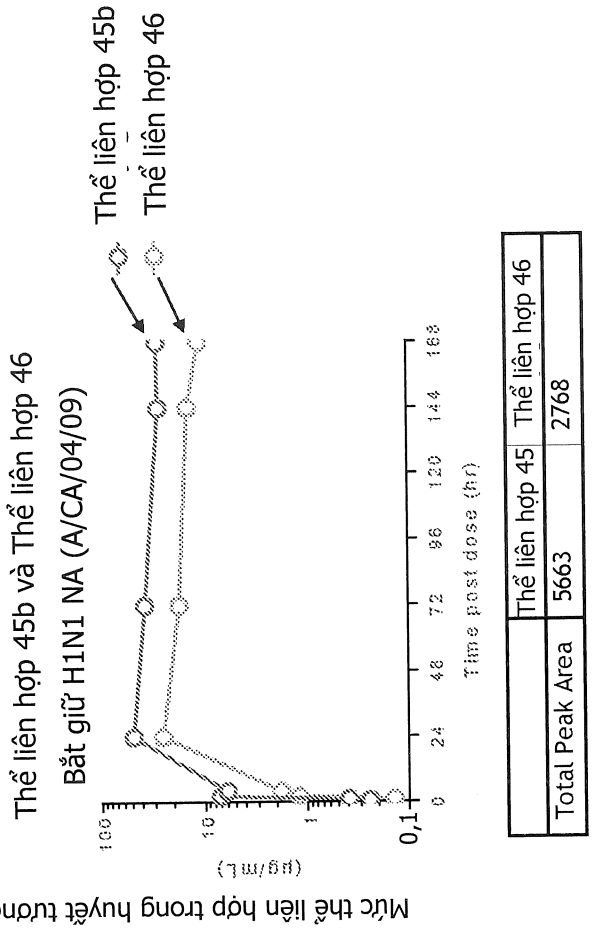
FIG. 100



	SC	IM	IV
Total Peak Area	2576	2576	3362

Mức thể liên hợp 45b trong huyết tương

FIG. 101



	Thể liên hợp 45	Thể liên hợp 46
Total Peak Area	5663	2768

FIG. 102
Thể liên hợp 45 và 46

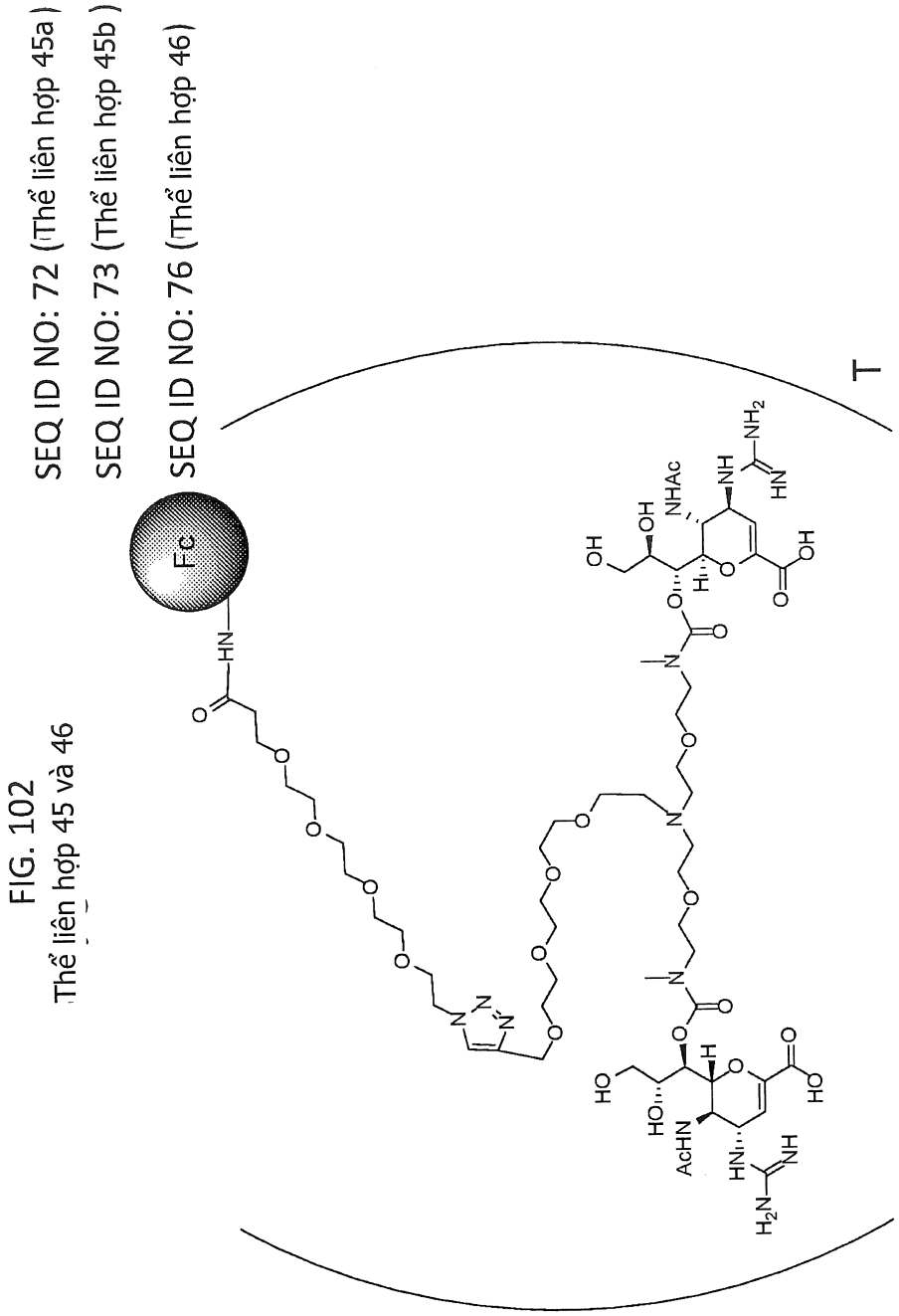


FIG. 103

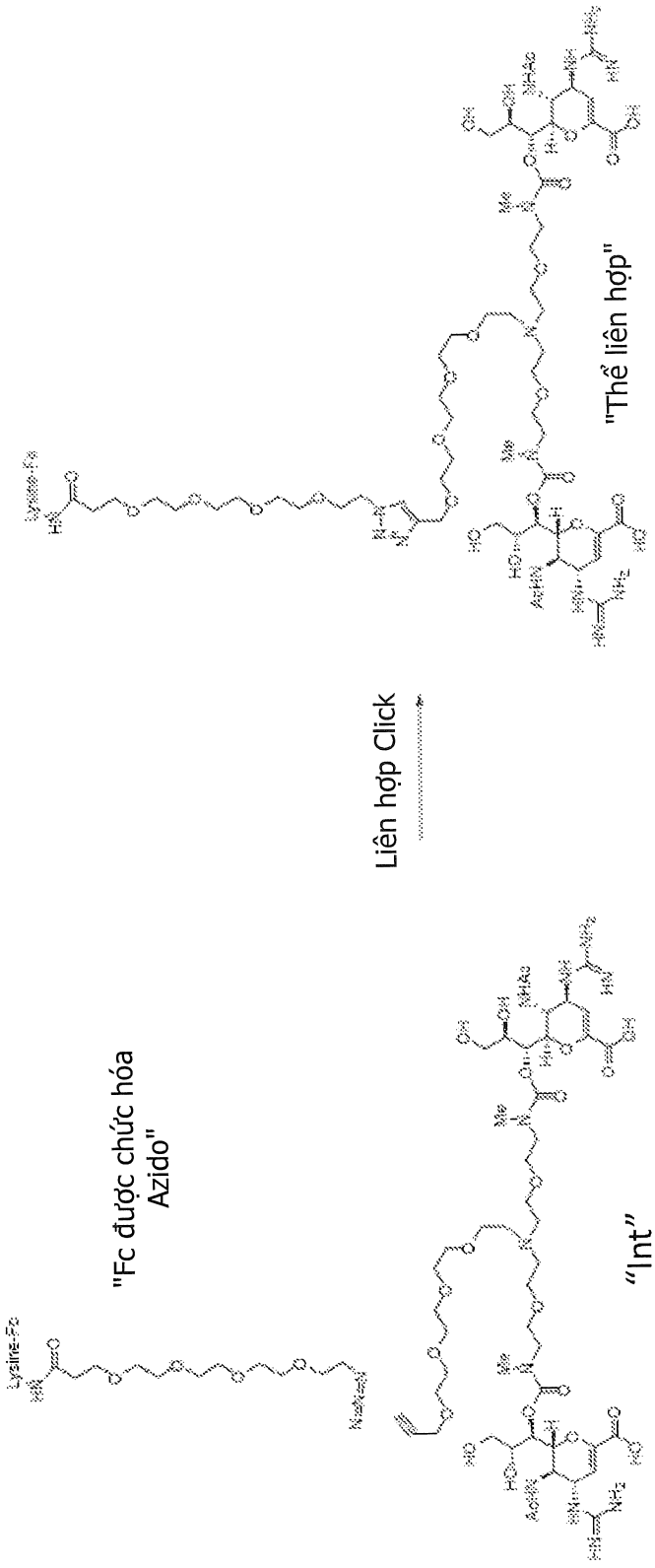

"Fc được chức hóa Azido"
Liên hợp Click
"Thể liên hợp"
"Int"
(Sản phẩm trung gian tiền liên hợp)

FIG. 104

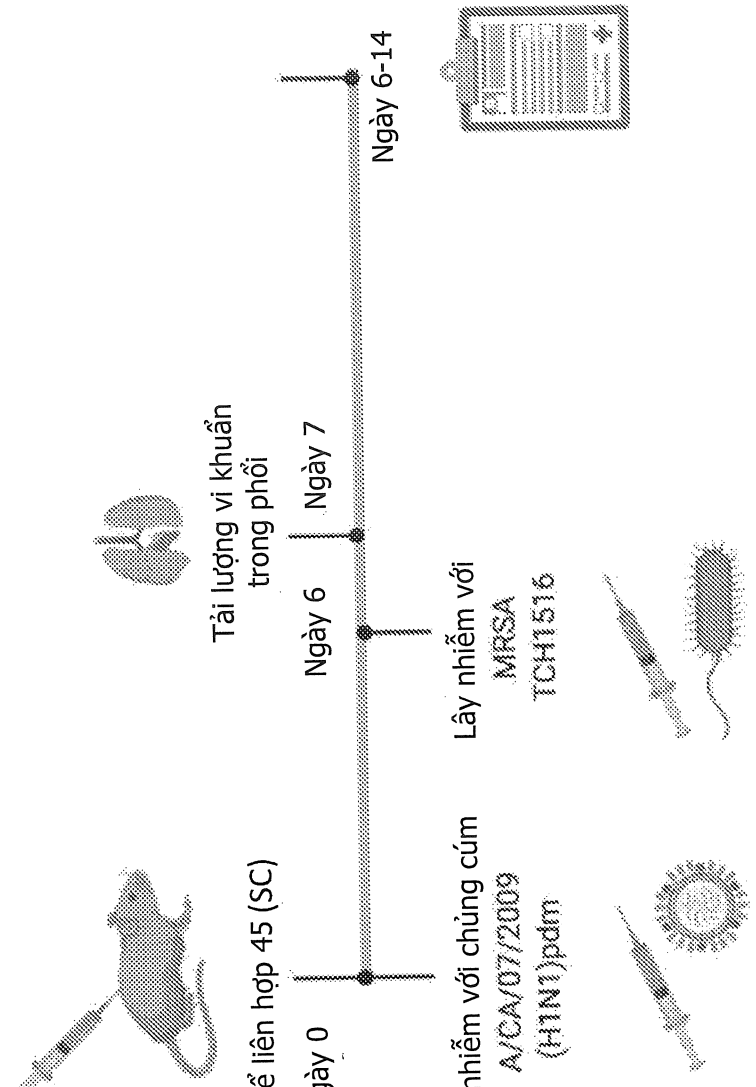

Thể liên hợp 45 (SC)
Ngày 0
Lây nhiễm với chủng cúm
A/CA/07/2009
(H1N1)pdm
Ngày 6
Lây nhiễm với
MRSA
TCH1516
Ngày 7
Tải lượng vi khuẩn
trong phổi
Ngày 6-14

FIG. 105A

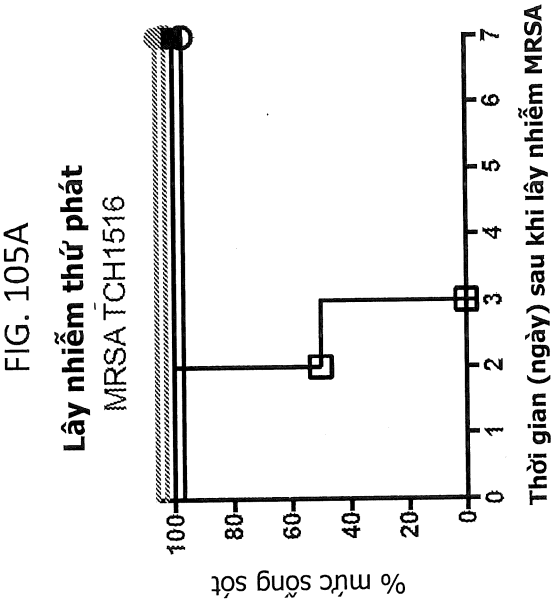


FIG. 105B

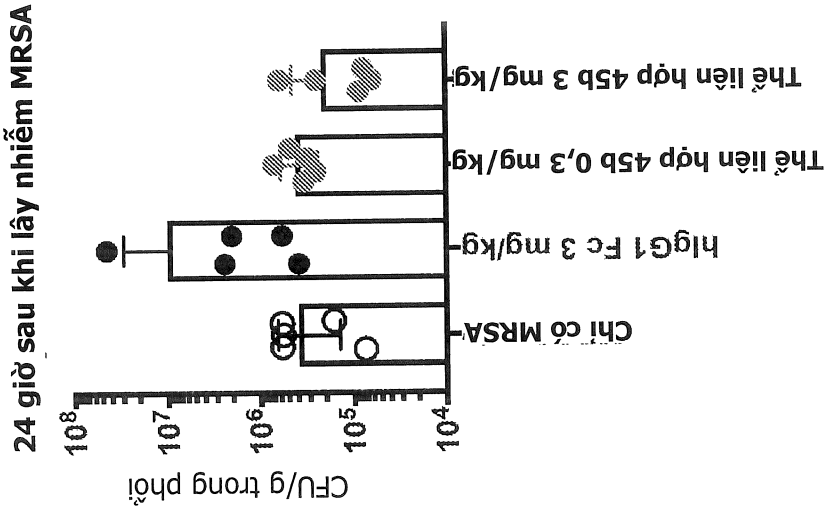


FIG. 106

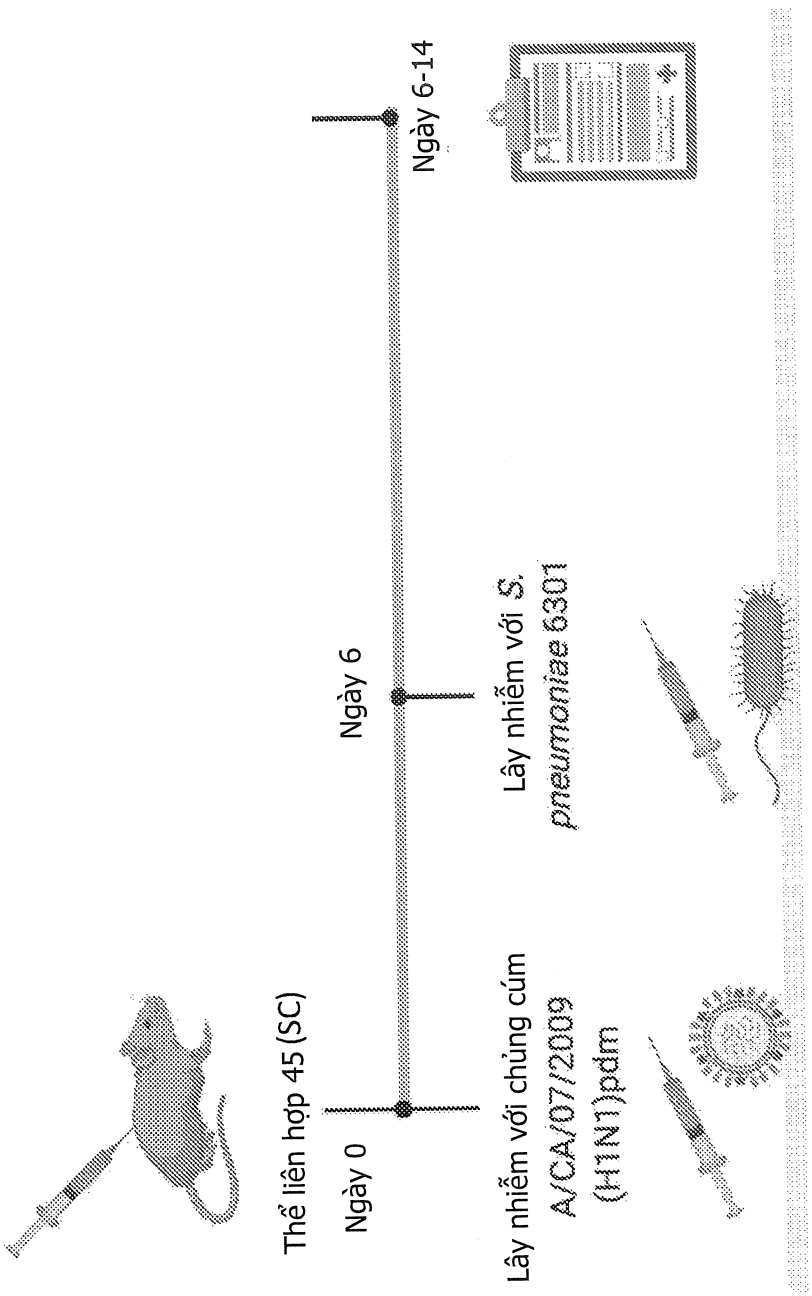

Thể liên hợp 45 (SC)
Ngày 0
Ngày 6
Lây nhiễm với chủng cúm A/CA/07/2009 (H1N1)pdm
Lây nhiễm với S. pneumoniae 6301
Ngày 6-14

FIG. 107

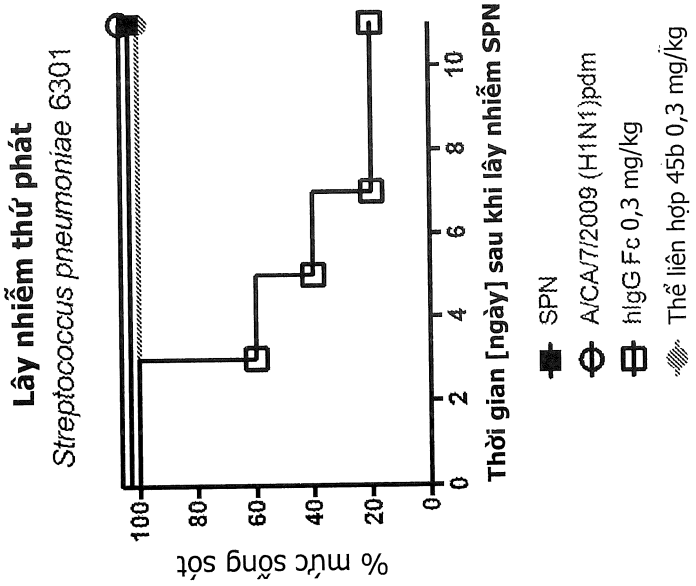

Lây nhiễm thứ phát
Streptococcus pneumoniae 6301
% mức sống sót
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Thời gian [ngày] sau khi lây nhiễm SPN
SPN
A/CA/7/2009 (H1N1)pdm
hIgG Fc 0,3 mg/kg
Thể liên hợp 45b 0,3 mg/kg

FIG. 108A

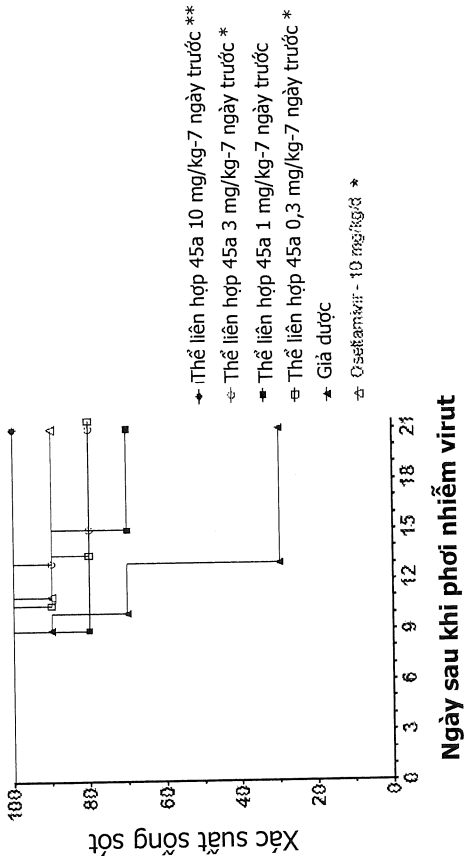


FIG. 108B

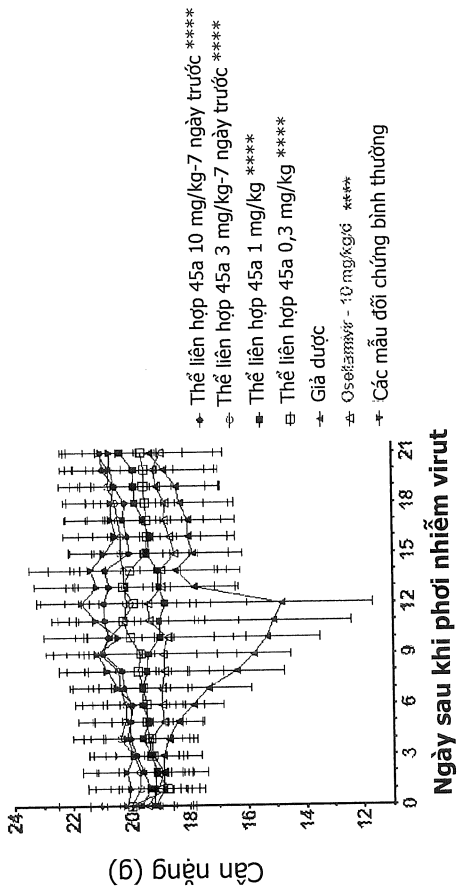


FIG. 109A

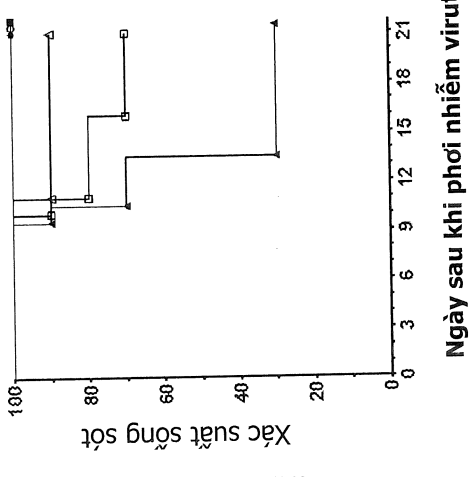
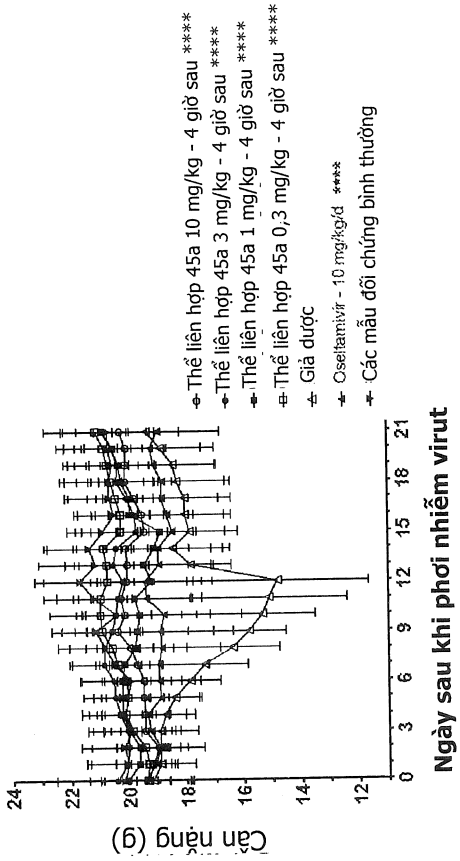


FIG. 109B



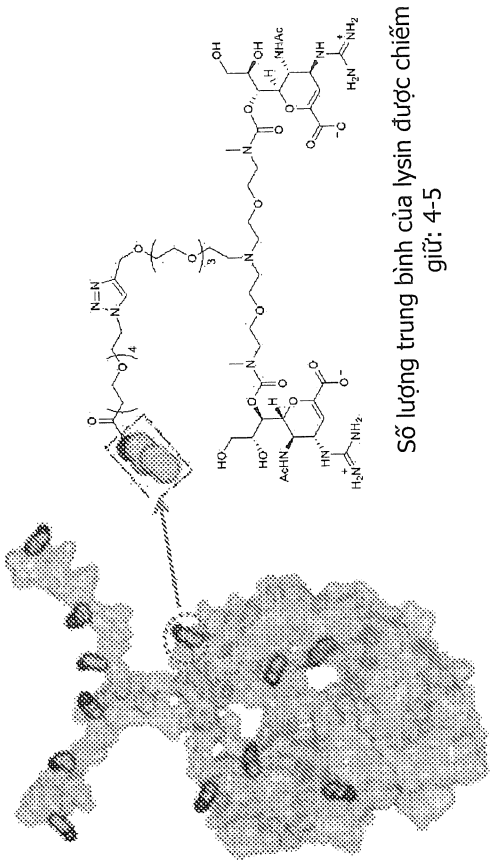


FIG. 110B

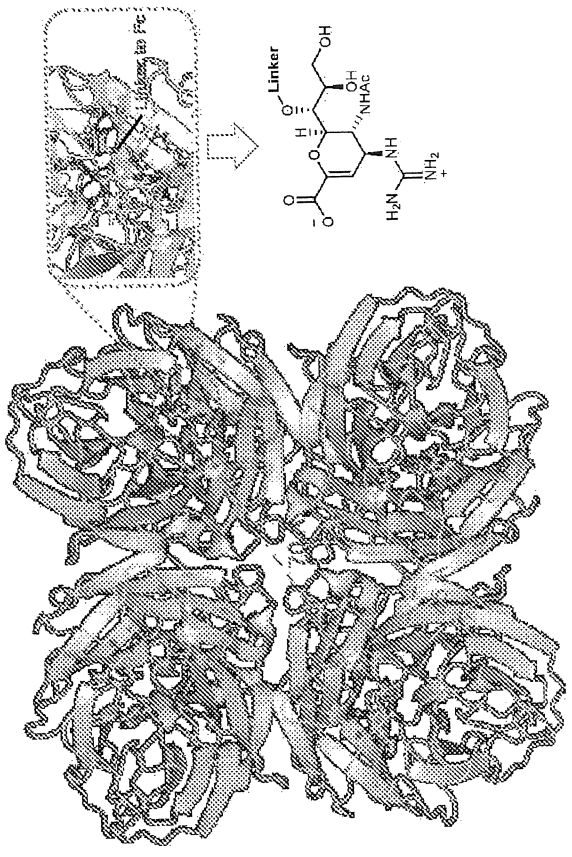


FIG. 110A

FIG. 111A

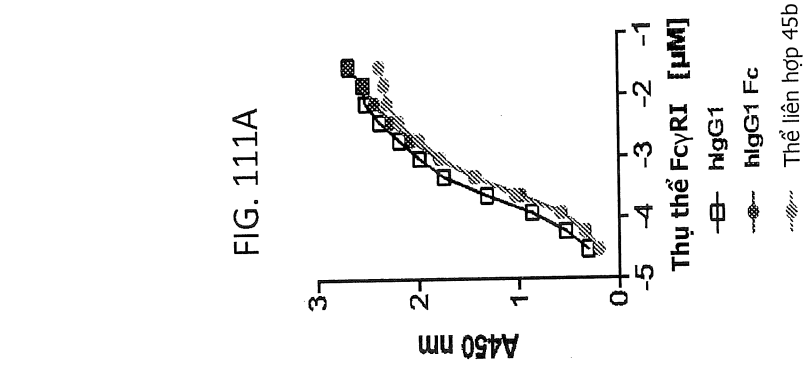


FIG. 111B

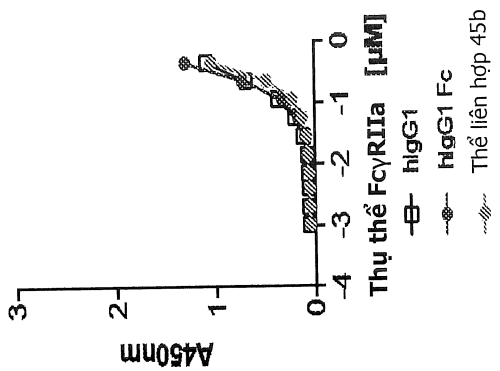


FIG. 111C

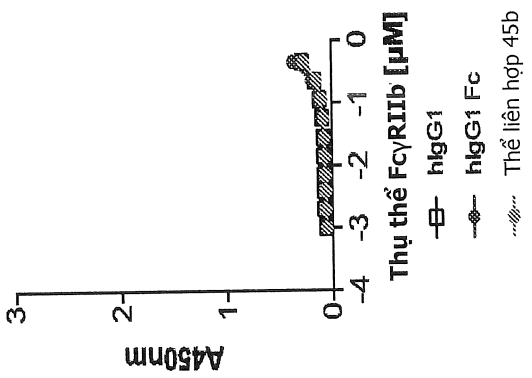


FIG. 111E

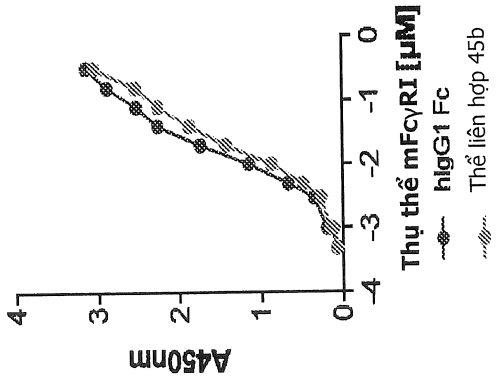


FIG. 111D

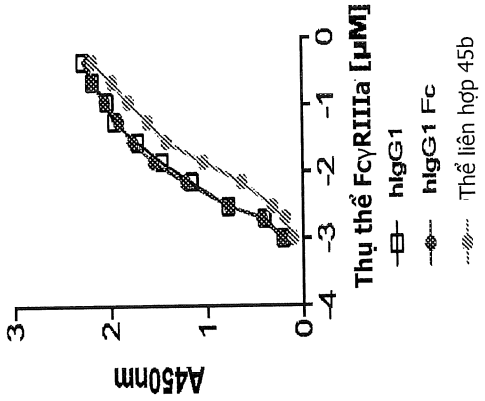


FIG. 111H

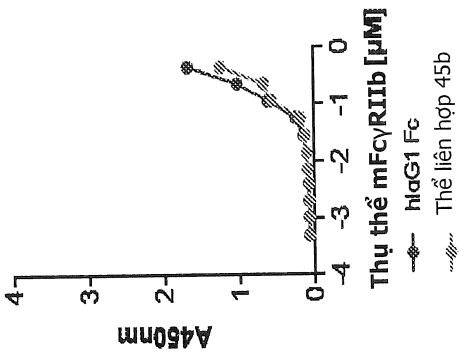


FIG. 111G

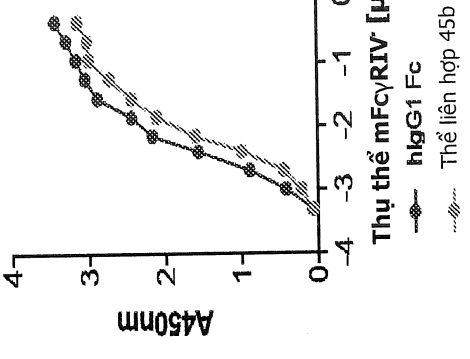


FIG. 111F

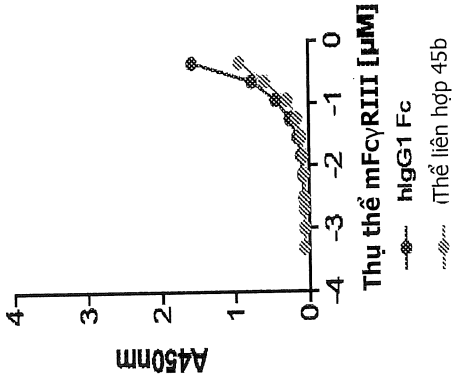


FIG. 111J

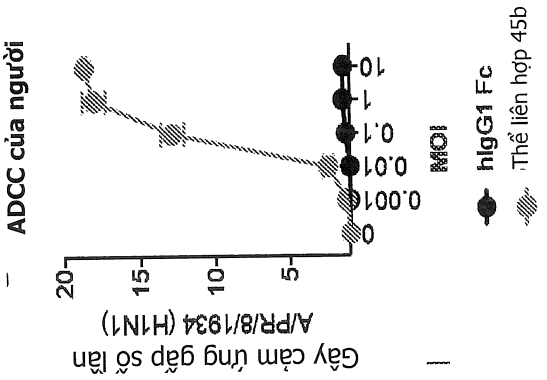


FIG. 111I

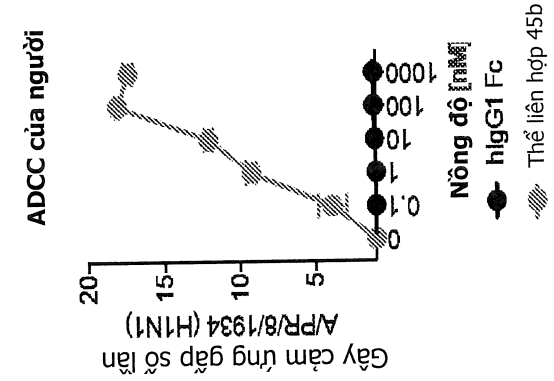


FIG. 112A

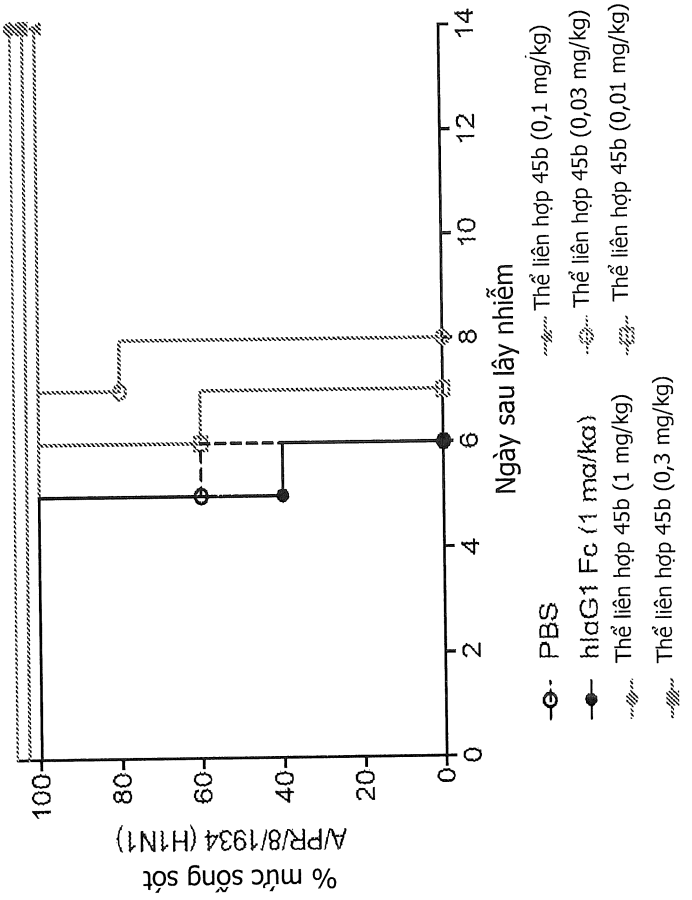

% mức sống sót
A/PR/8/1934 (H1N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm
PBS
hIgG1 Fc (1 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (1 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (0,1 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (0,03 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (0,01 mg/kg)

FIG. 112B

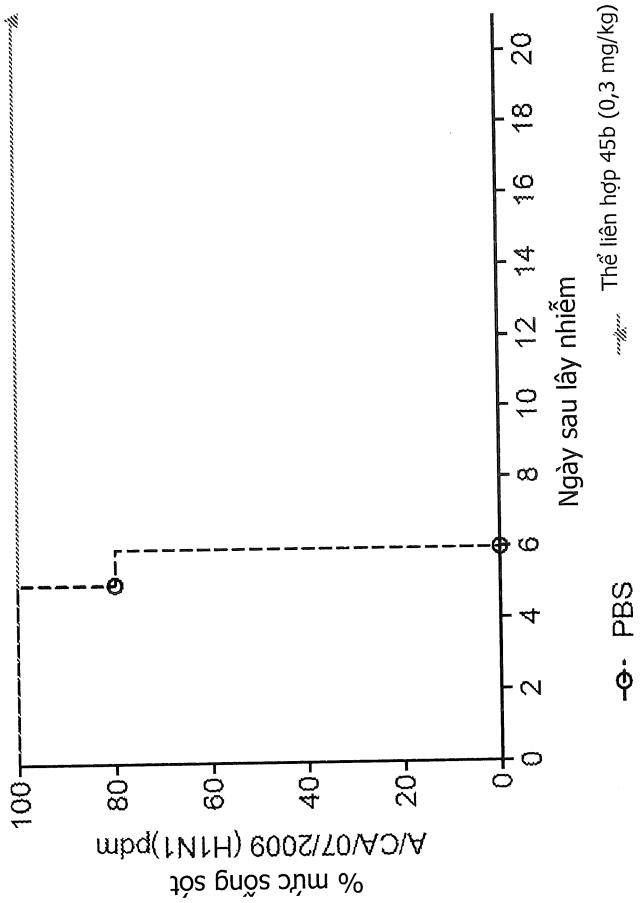

% mức sống sót
A/CA/07/2009 (H1N1)pdm
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)

FIG. 112C

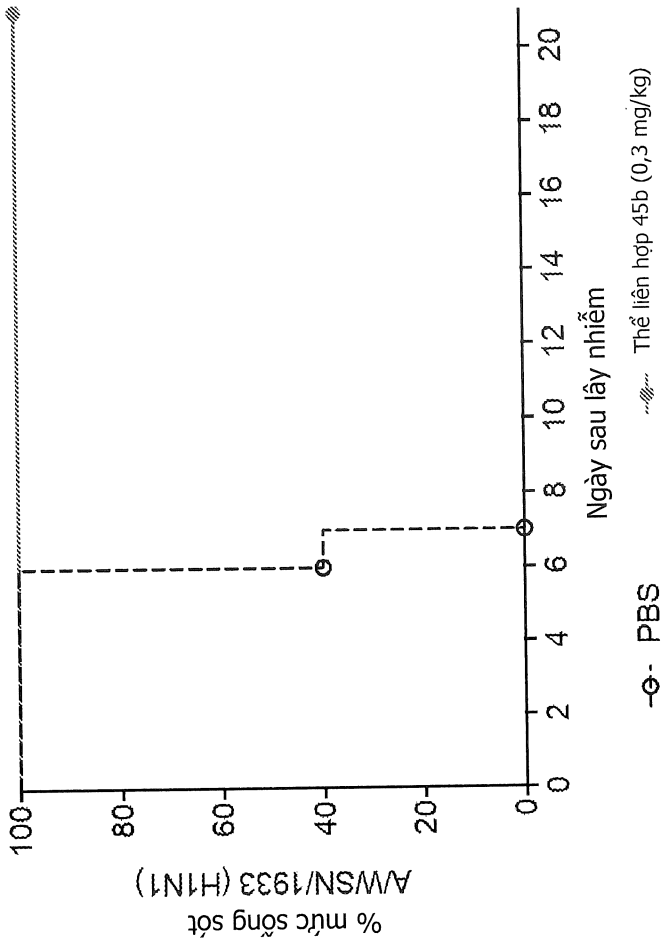

% mức sống sót
A/WSN/1933 (H1N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)

FIG. 112D

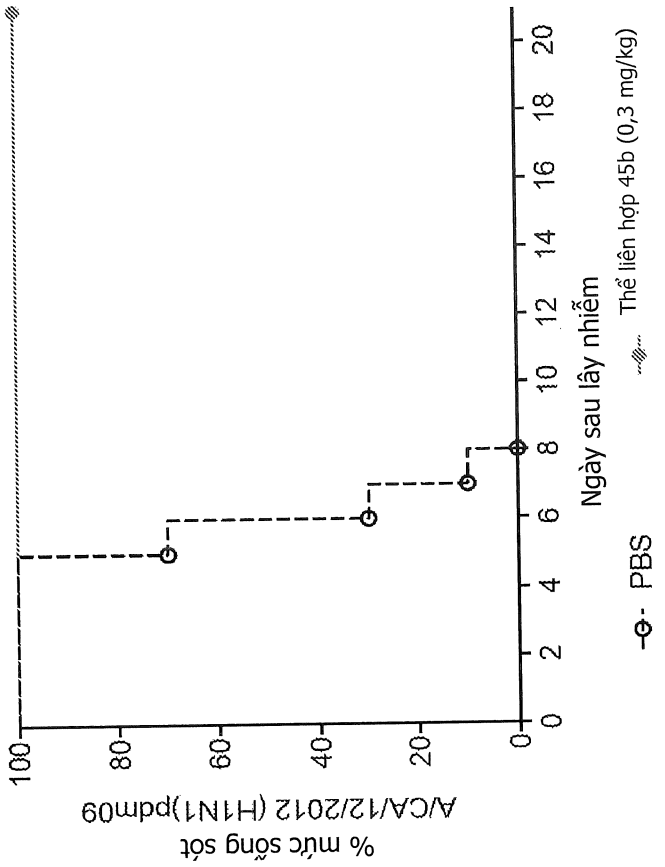

% mức sống sót
A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)

FIG. 112E

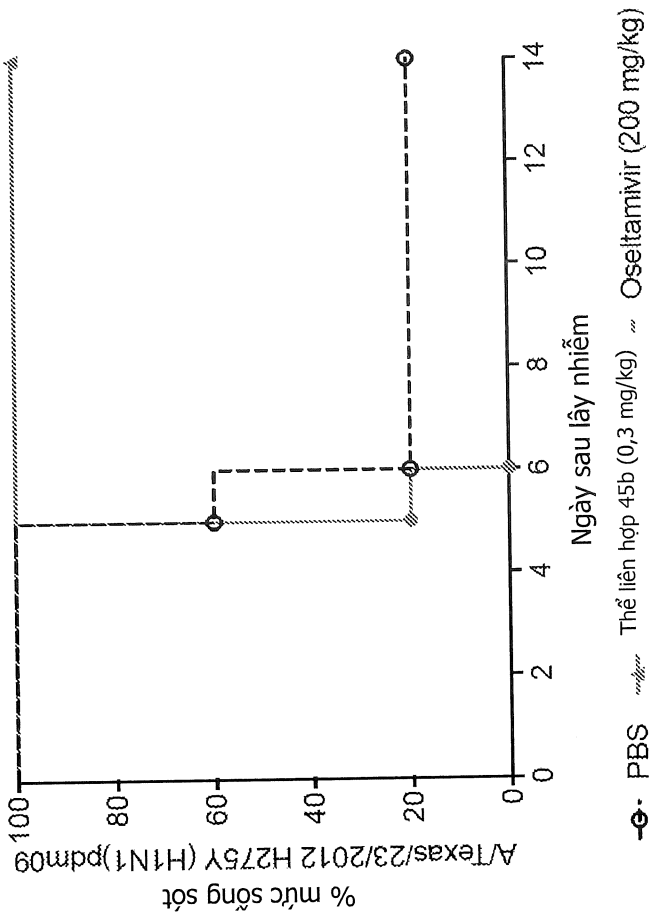

% mức sống sót
A/Texas/23/2012 H275Y (H1N1)pdm09
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)
Oseltamivir (200 mg/kg)

FIG. 112F

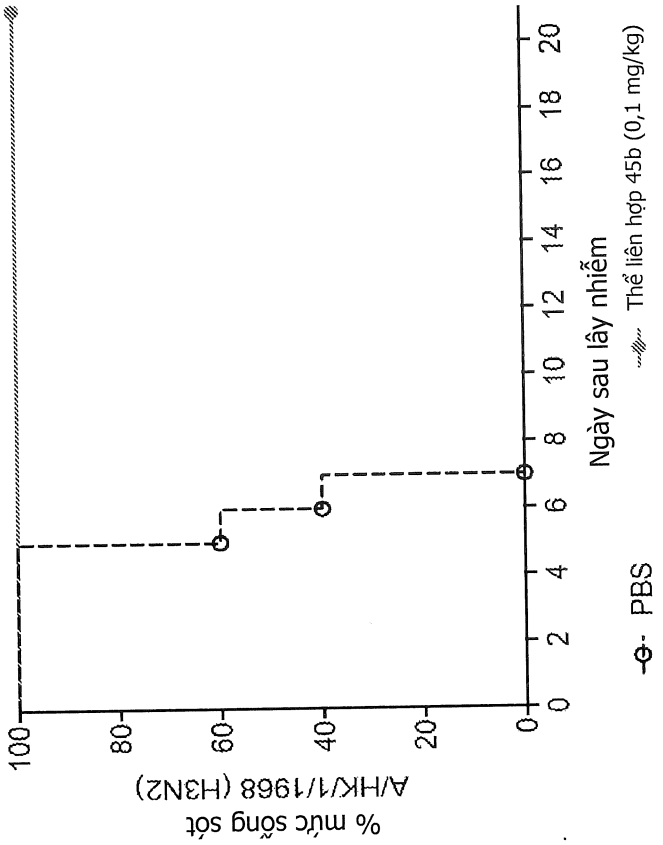

% mức sống sót
A/HK/1/1968 (H3N2)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,1 mg/kg)

FIG. 112G

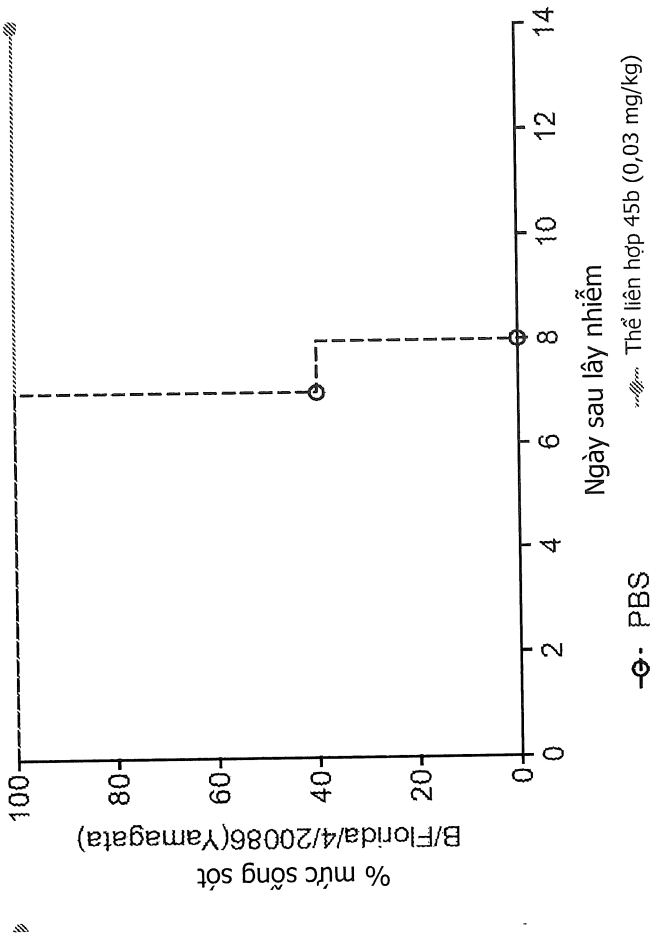

% mức sống sót
B/Florida/4/2008(Yamagata)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,03 mg/kg)

FIG. 112H

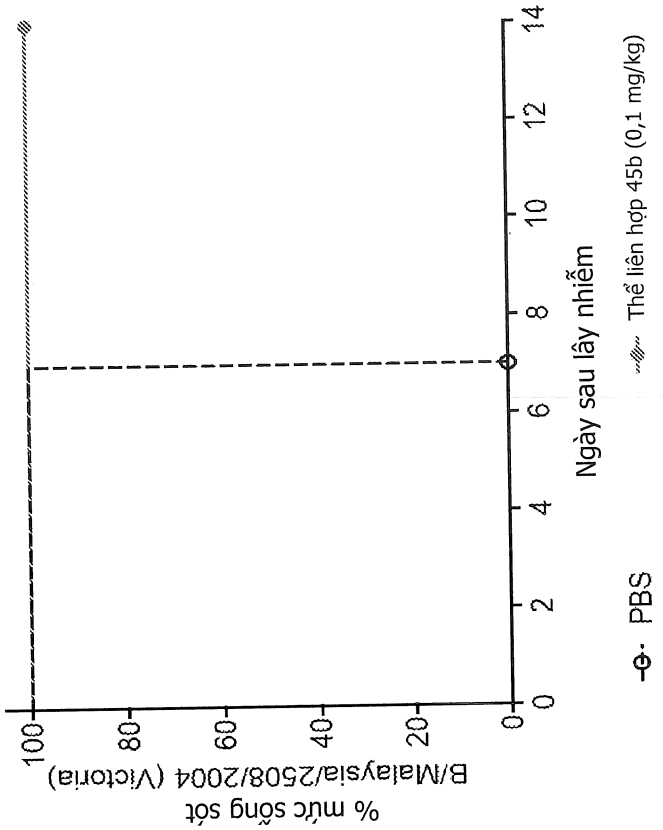

% mức sống sót
B/Malaysia/2508/2004 (Victoria)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,1 mg/kg)

FIG. 112I

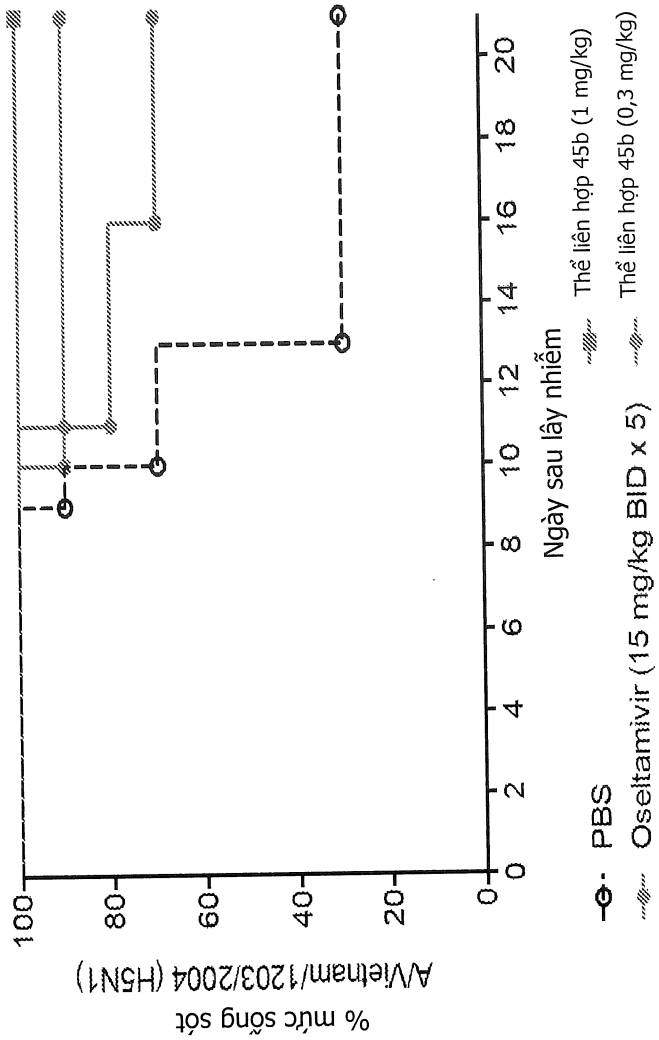

% mức sống sót
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Oseltamivir (15 mg/kg BID x 5)
Thể liên hợp 45b (1 mg/kg)
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)

FIG. 112K

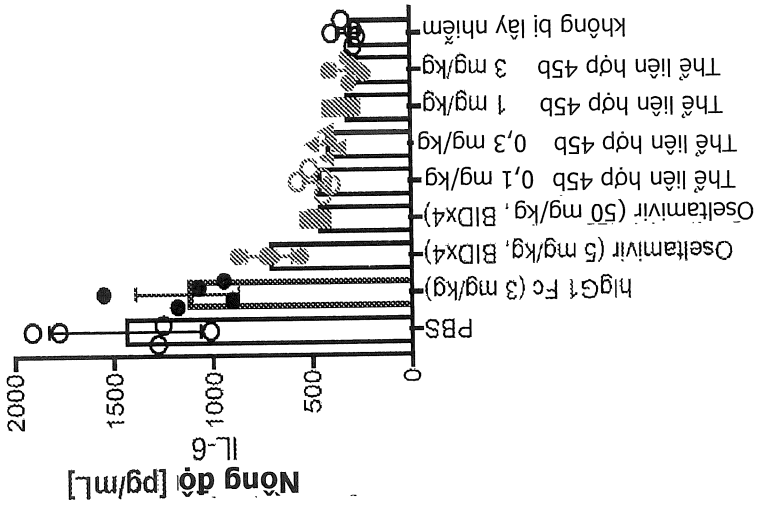


FIG. 112J

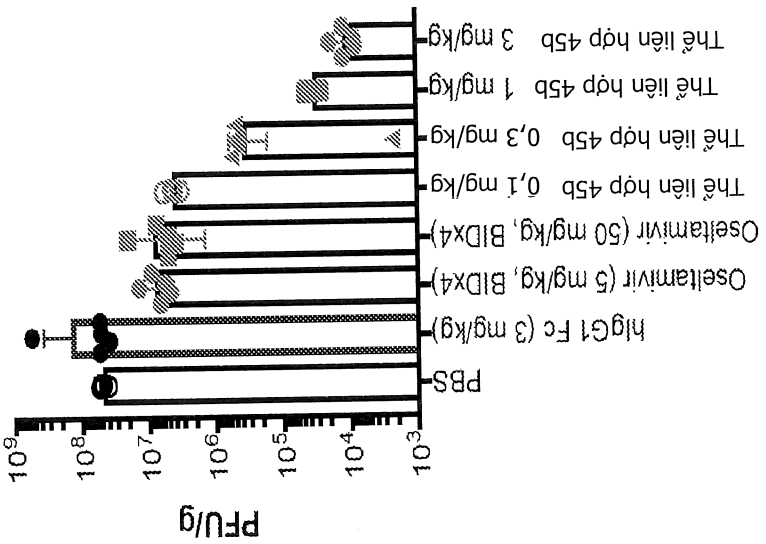


FIG. 112L

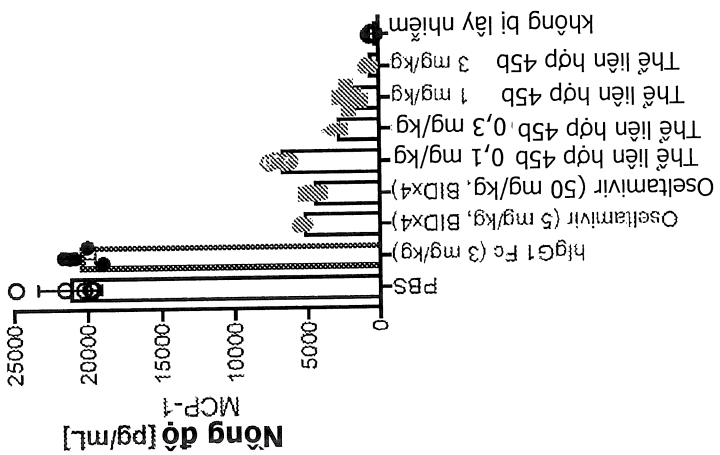


FIG. 112M

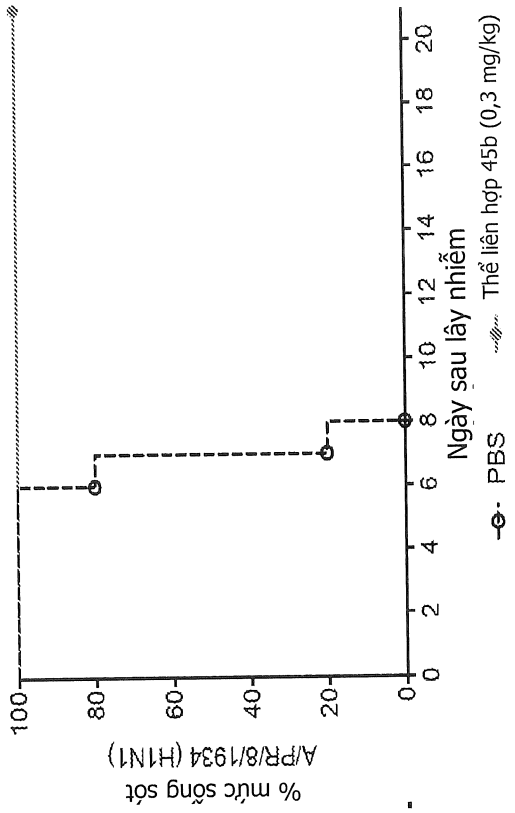


FIG. 113B

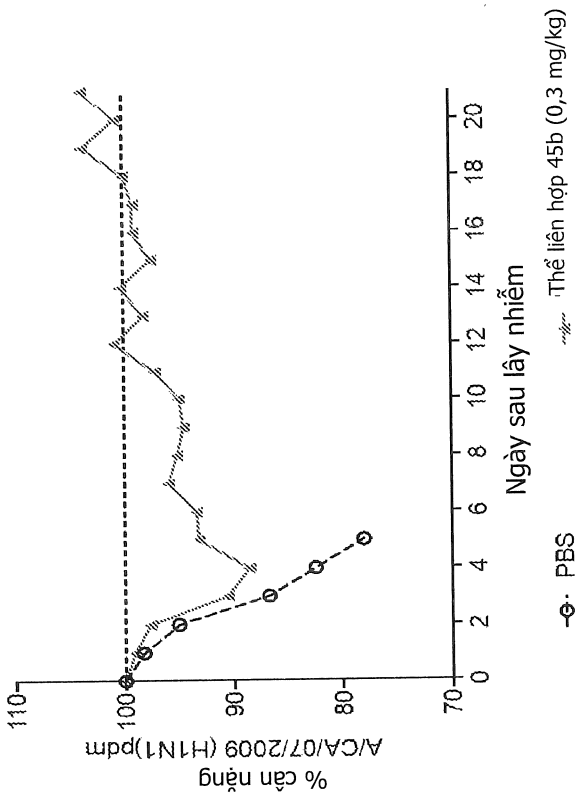


FIG. 113A

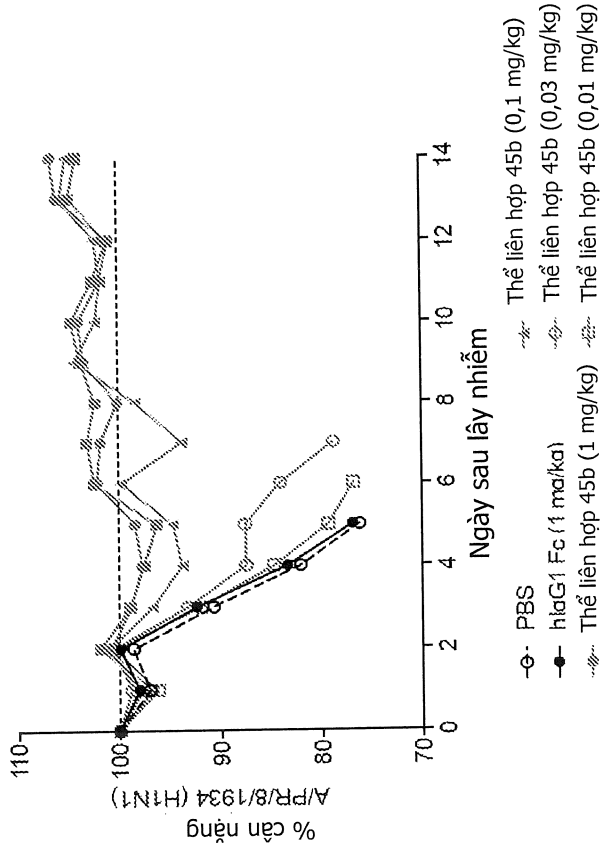


FIG. 113C

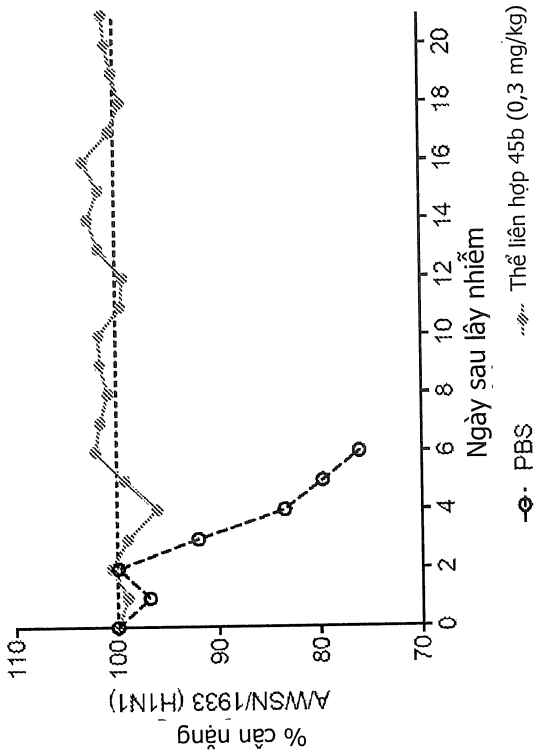

% cân nặng
A/WSN/1933 (H1N1)
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,3 mg/kg)

FIG. 113E

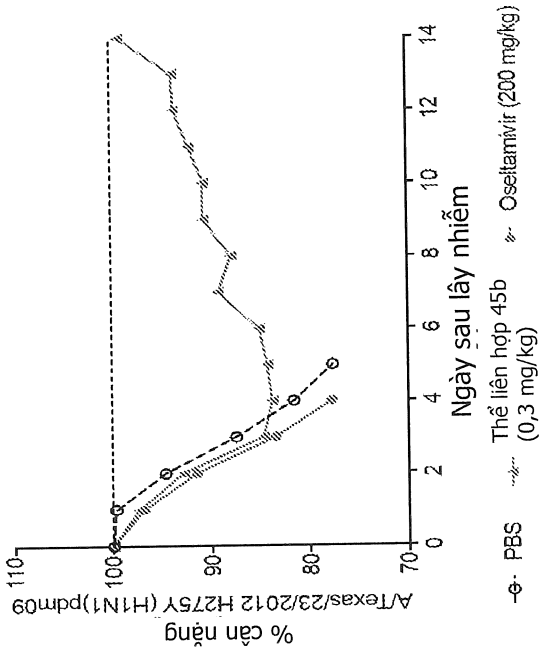


FIG. 113D

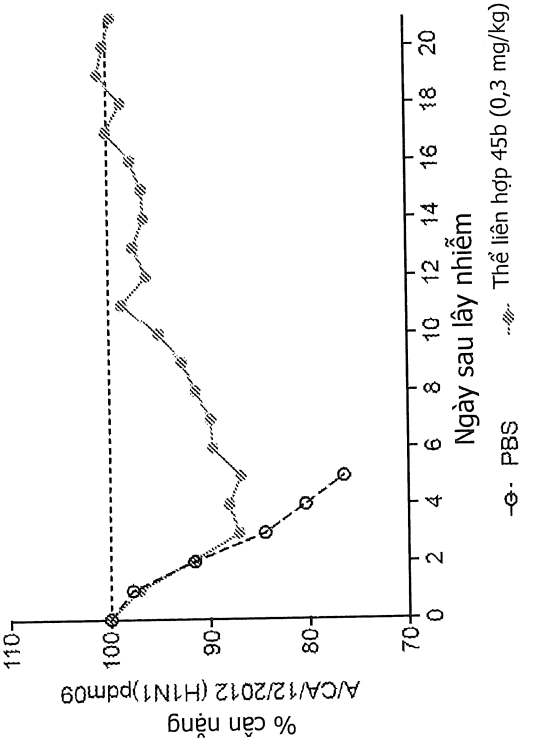


FIG. 113G

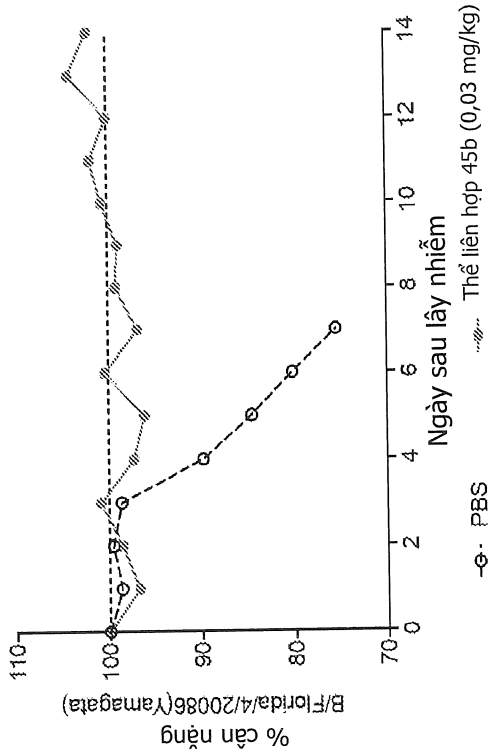


FIG. 113F

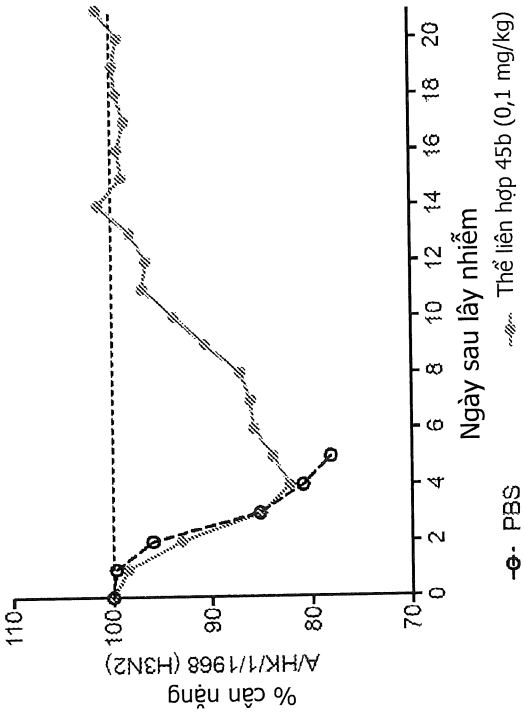


FIG. 113H

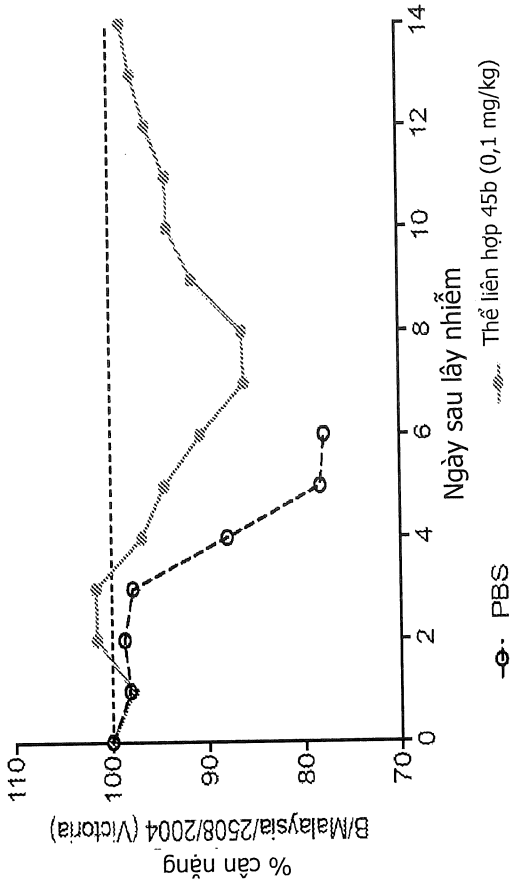

% cân nặng
B/Malaysia/2508/2004 (Victoria)
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm
PBS
Thể liên hợp 45b (0,1 mg/kg)

FIG. 113I

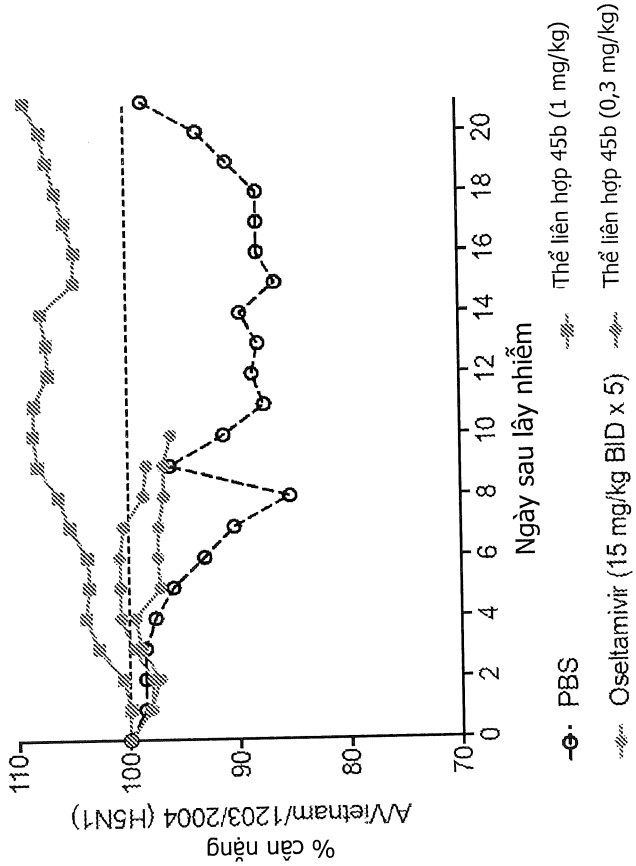


FIG. 113J

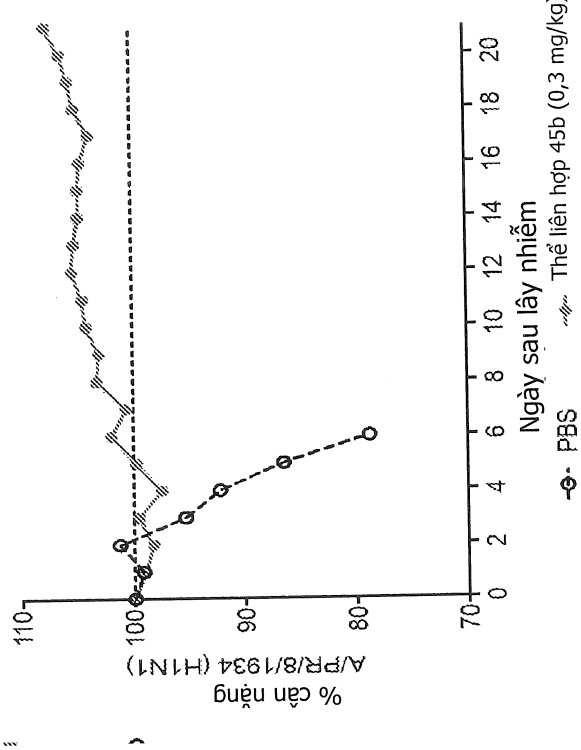


FIG. 114B

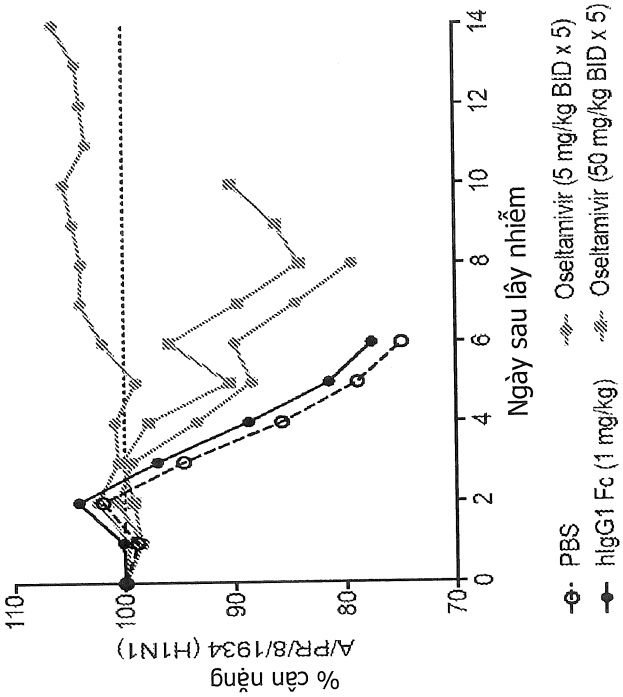
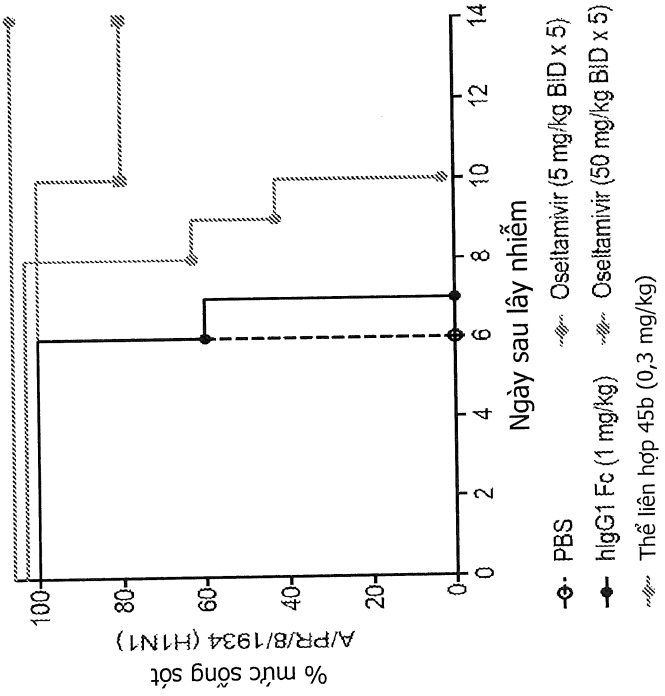


FIG. 114A



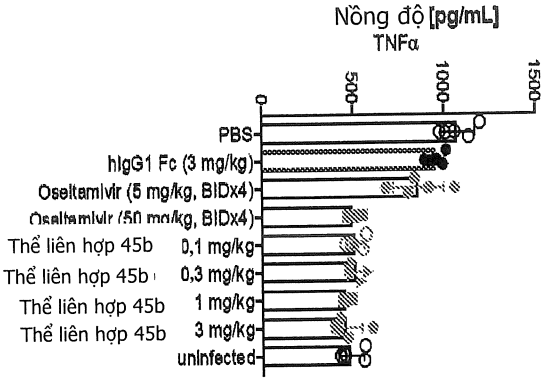


FIG. 115A

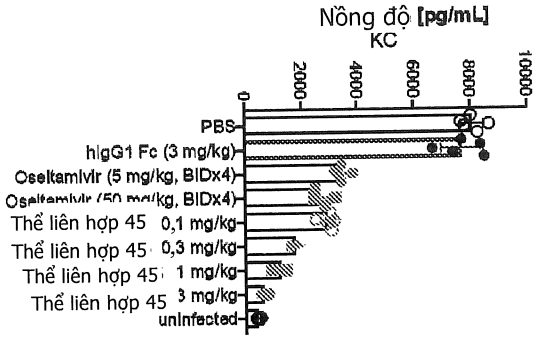


FIG. 115B

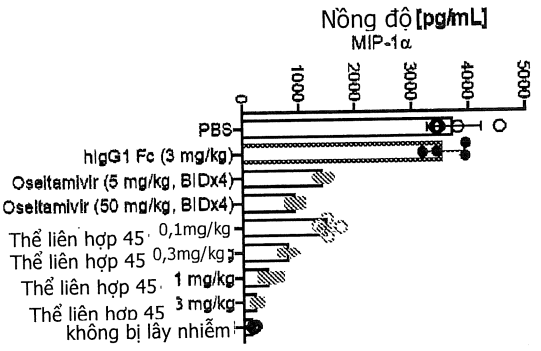


FIG. 115C

FIG. 116A

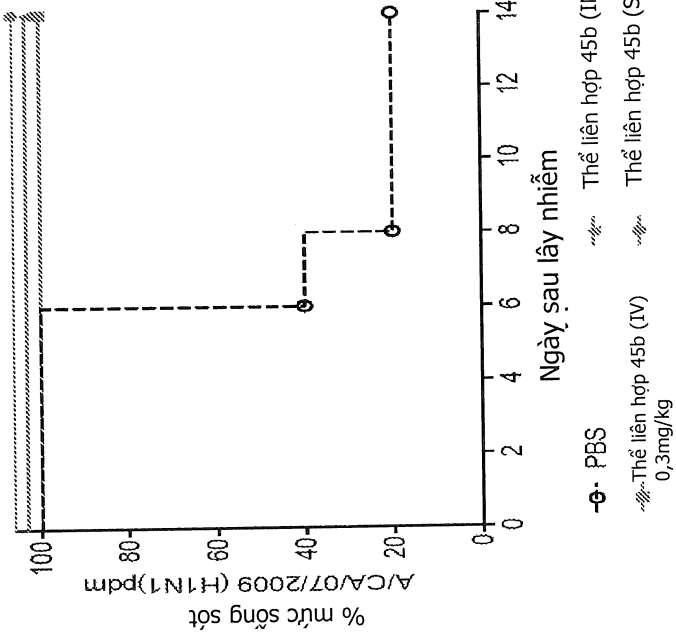


FIG. 116B

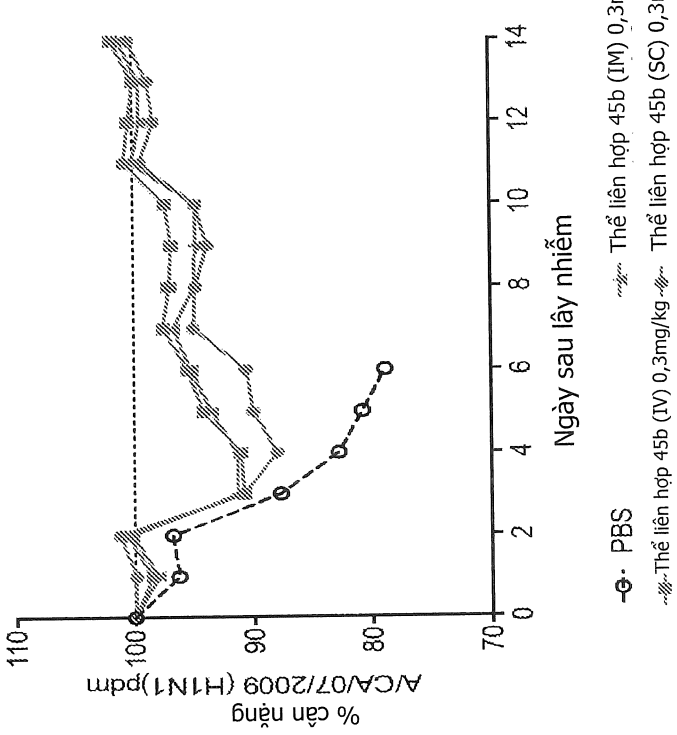


FIG. 116C

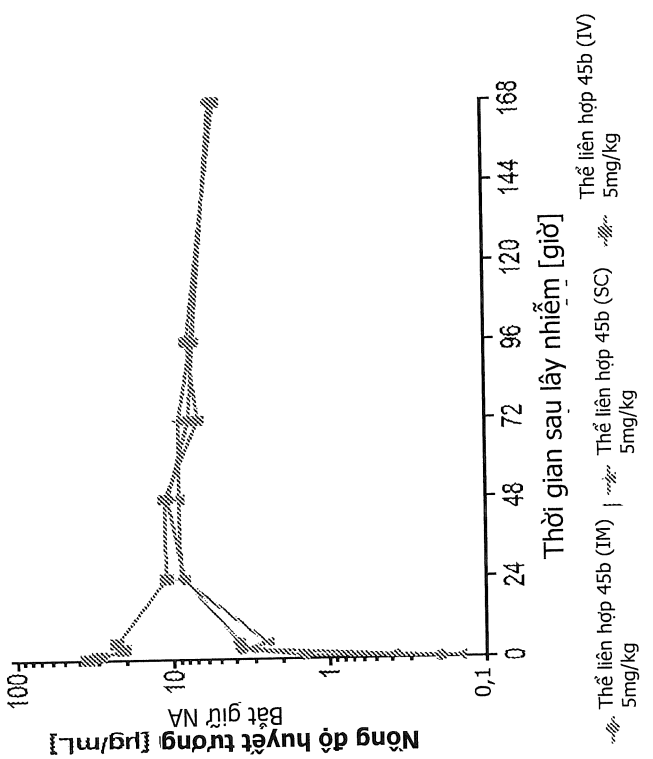


FIG. 116D

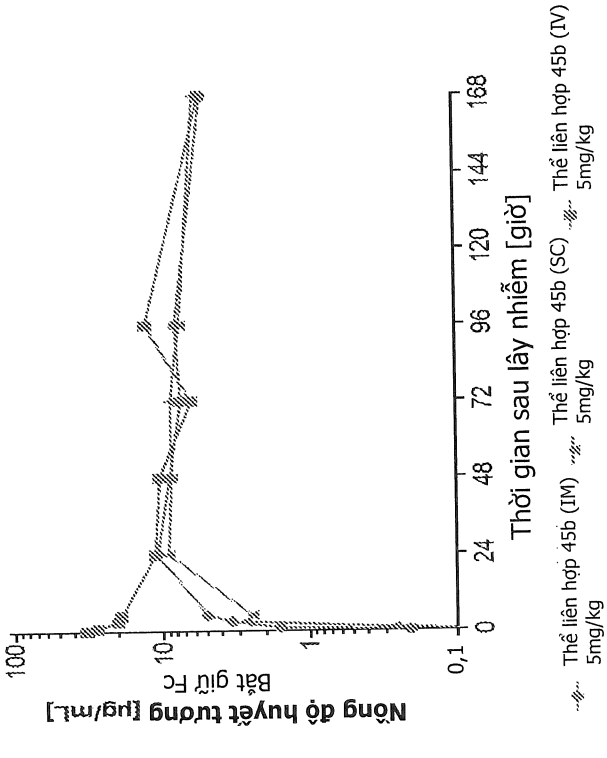


FIG. 117A

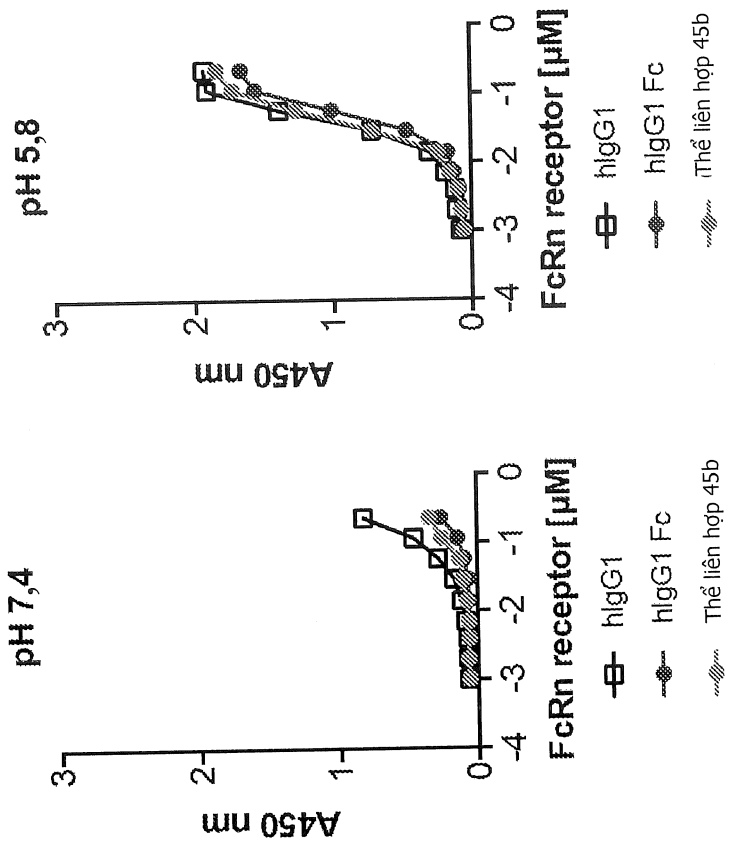

pH 7,4
pH 5,8
A450 nm
FcRn receptor [µM]
hIgG1
hIgG1 Fc
Thể liên hợp 45b

FIG. 117B

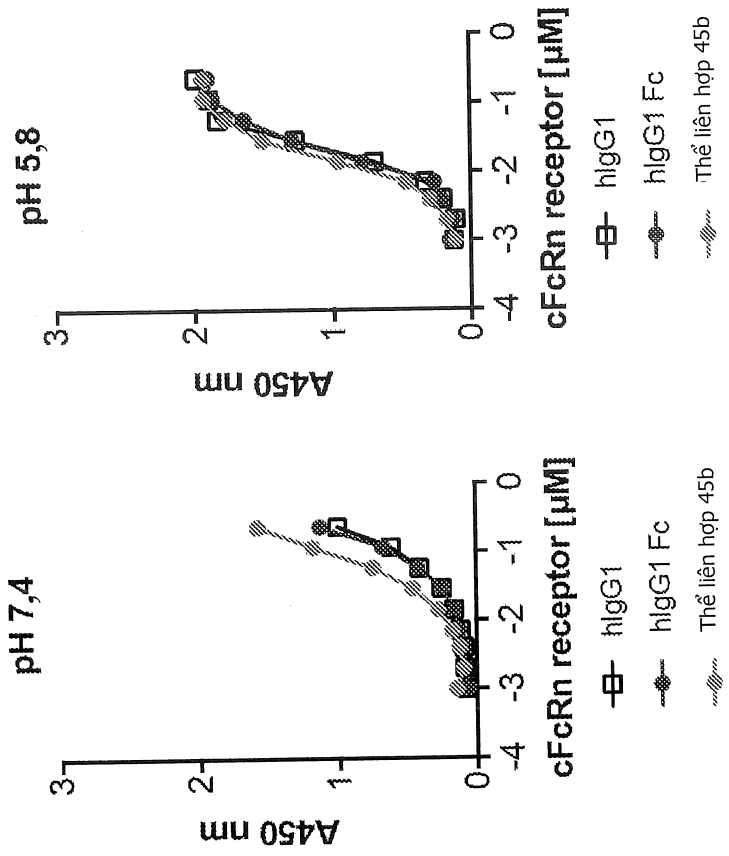

pH 7,4
pH 5,8
A450 nm
0
1
2
3
-4
-3
-2
-1
0
cFcRn receptor [µM]
hIgG1
hIgG1 Fc
Thể liên hợp 45b

FIG. 117C

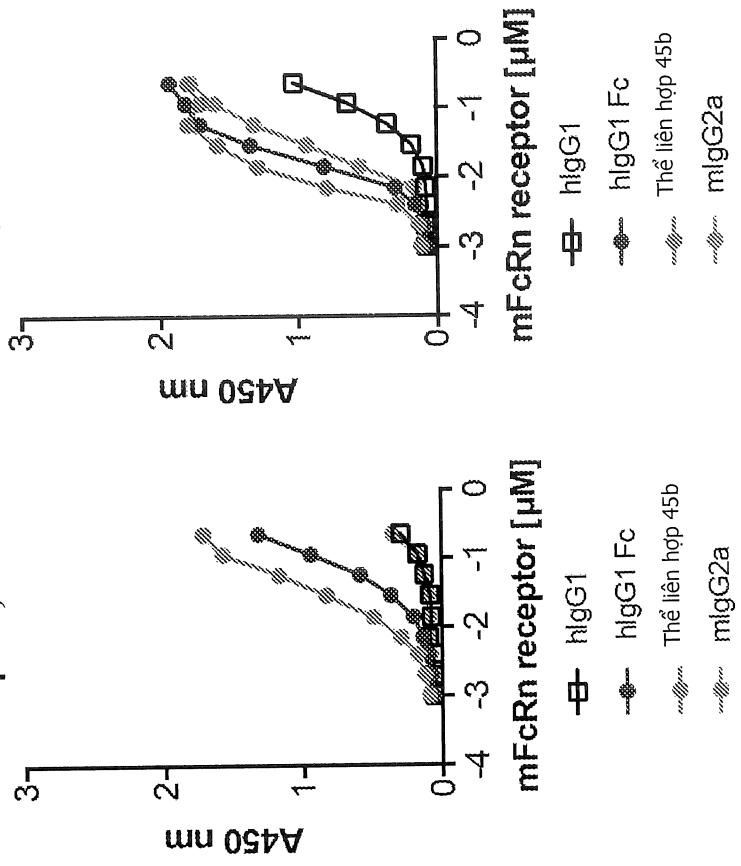

pH 7,4
pH 5,8
A450 nm
0
1
2
3
-4
-3
-2
-1
0
mFcRn receptor [µM]
hIgG1
hIgG1 Fc
Thể liên hợp 45b
mIgG2a

FIG. 118B

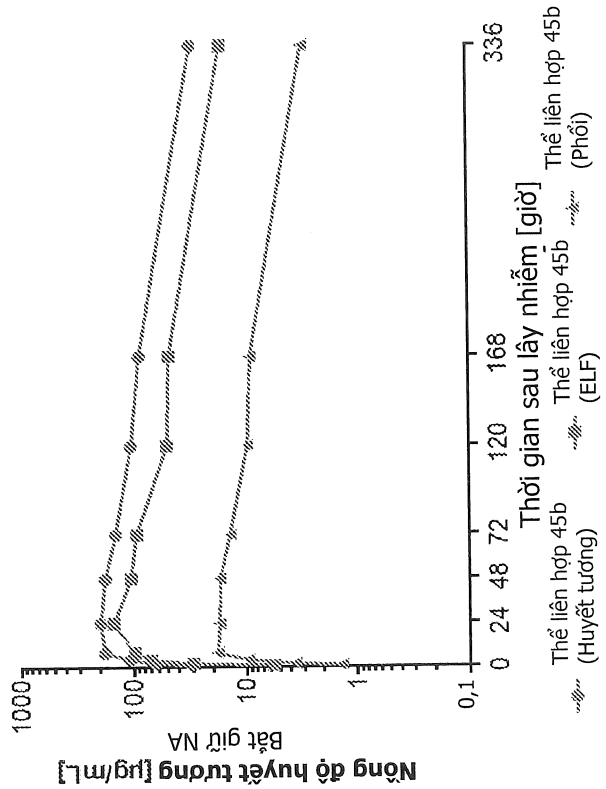


FIG. 118A

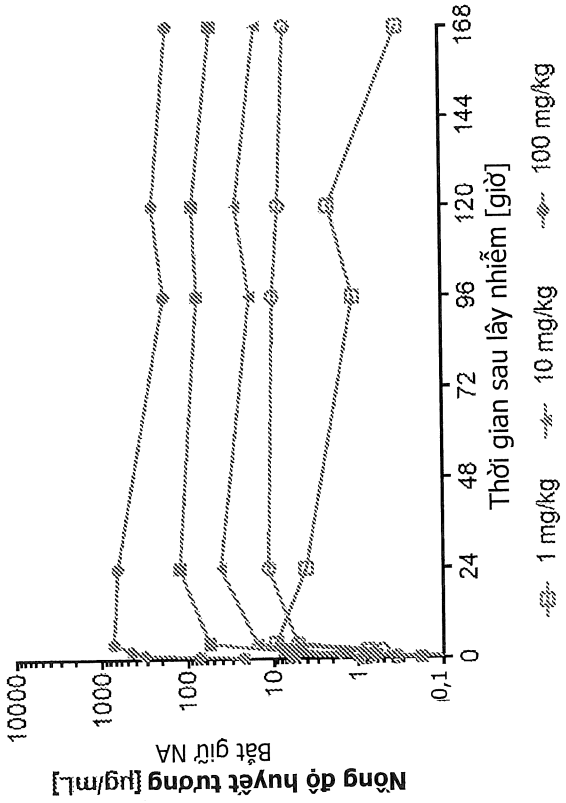


FIG. 118D

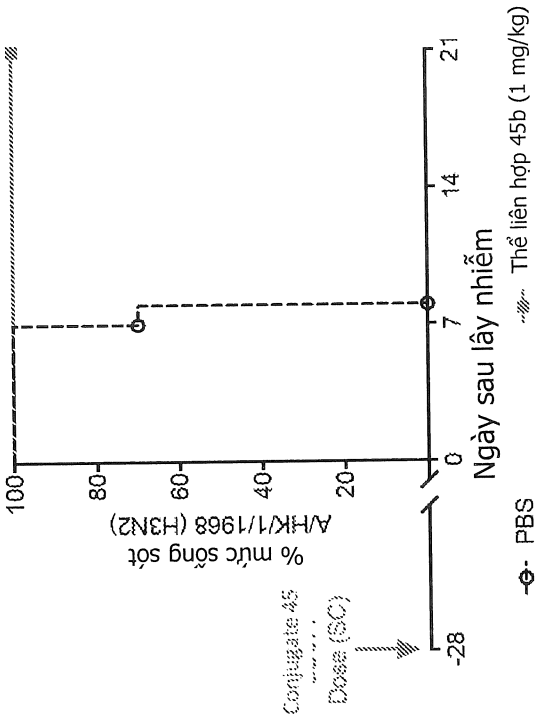


FIG. 118C

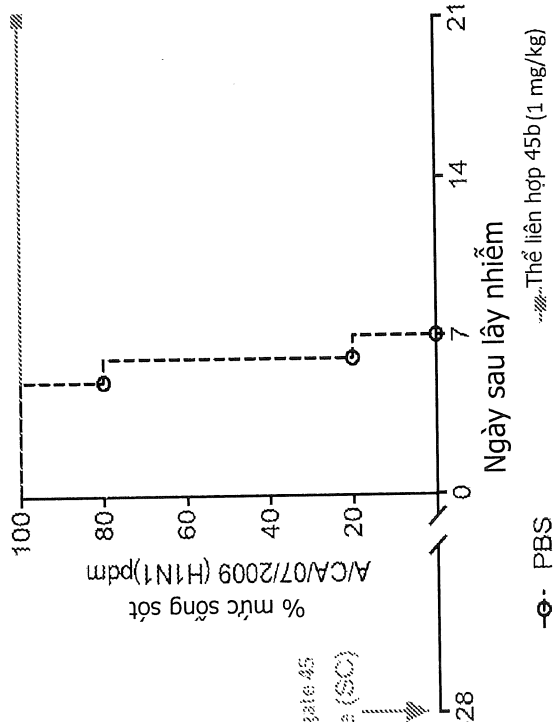


FIG. 118E

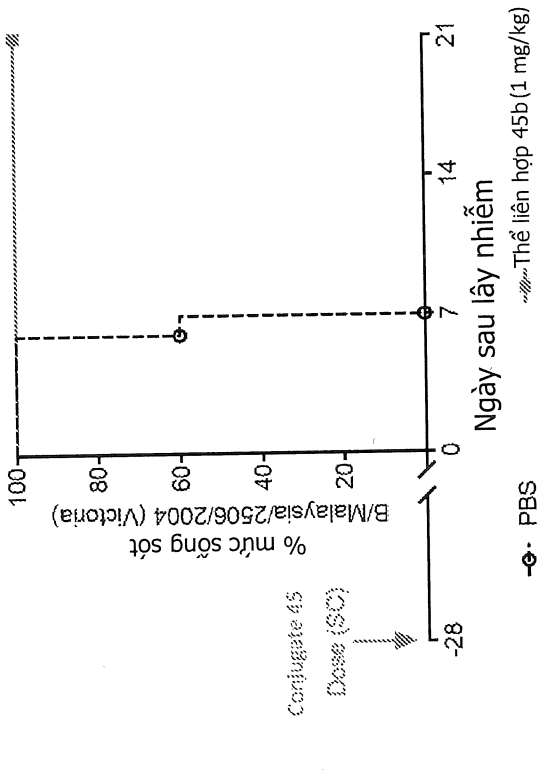


FIG. 118F

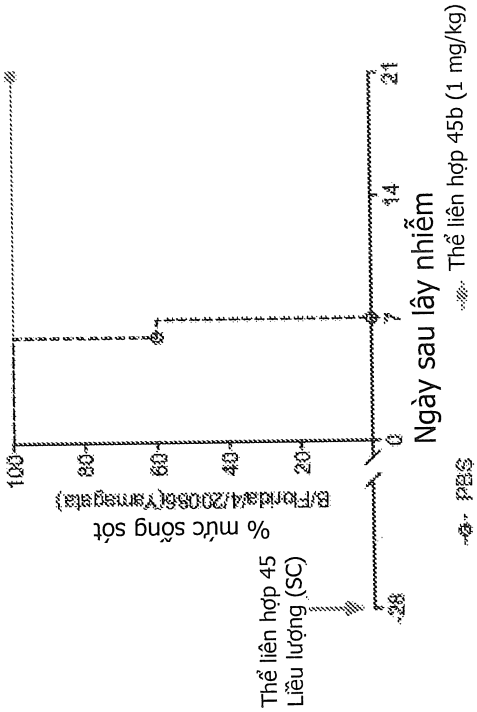


FIG. 119

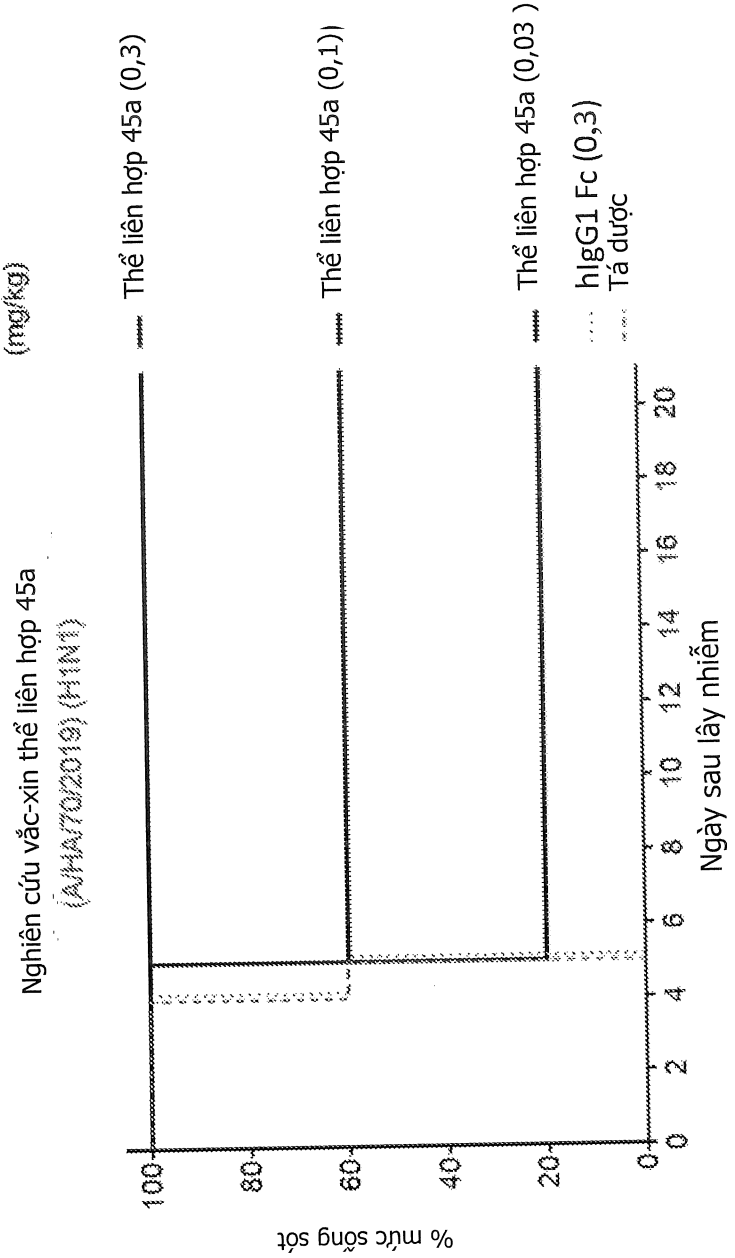

Nghiên cứu vắc-xin thể liên hợp 45a
(AHA70/2019) (H1N1)
(mg/kg)
Thể liên hợp 45a (0,3)
Thể liên hợp 45a (0,1))
Thể liên hợp 45a (0,03)
hIgG1 Fc (0,3)
Tá dược
% mức sống sót
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm

FIG. 120

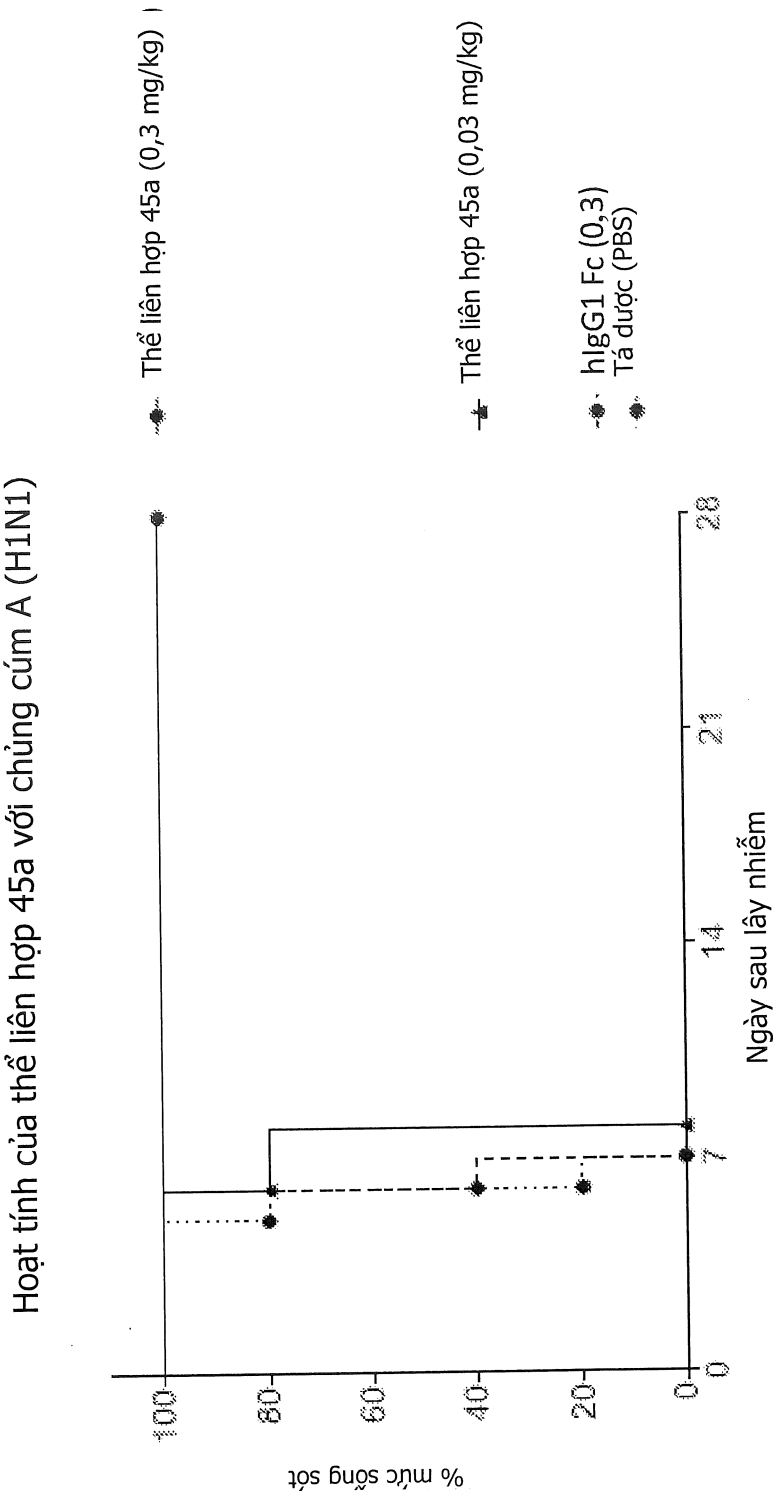

Hoạt tính của thể liên hợp 45a với chủng cúm A (H1N1)
Thể liên hợp 45a (0,3 mg/kg)
Thể liên hợp 45a (0,03 mg/kg)
hIgG1 Fc (0,3)
Tá dược (PBS)
% mức sống sót
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
Ngày sau lây nhiễm

FIG. 121

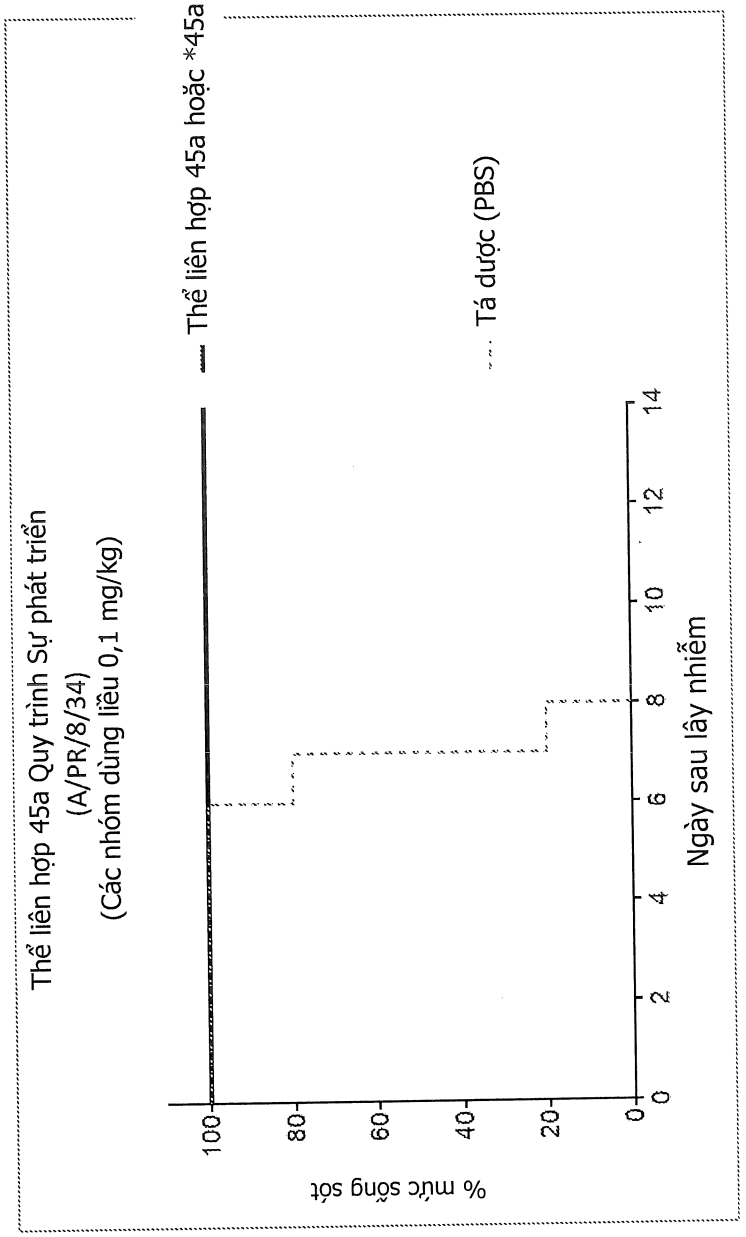
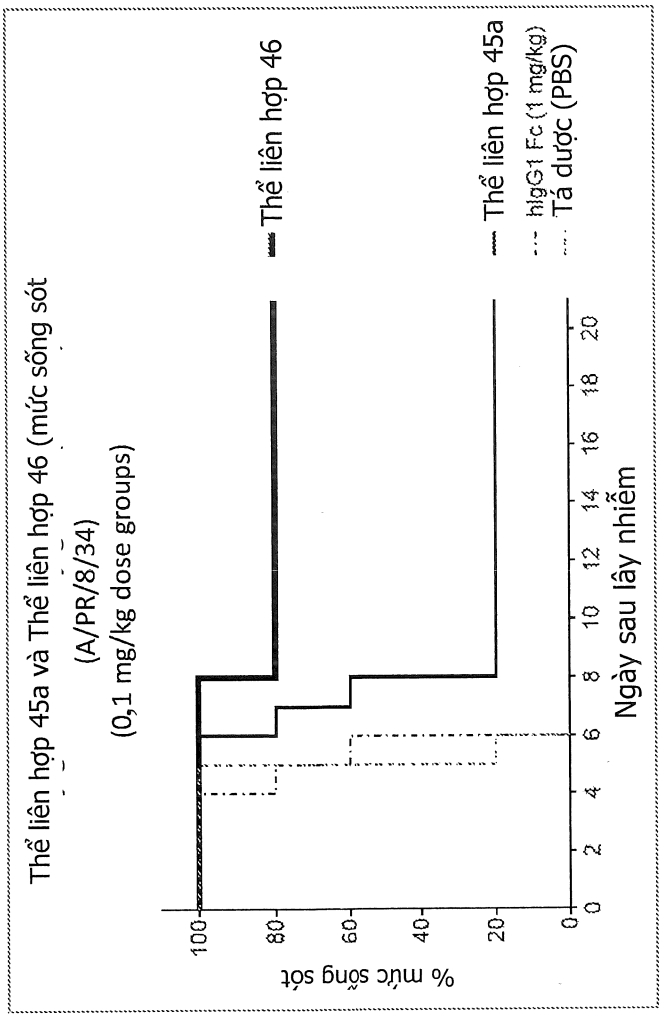

Thể liên hợp 45a Quy trình Sự phát triển
(A/PR/8/34)
(Các nhóm dùng liều 0,1 mg/kg)
Thể liên hợp 45a hoặc *45a
Tá dược (PBS)
% mức sống sót
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày sau lây nhiễm

FIG. 122


Thể liên hợp 45a và Thể liên hợp 46 (mức sống sót
(A/PR/8/34)
(0,1 mg/kg dose groups)
Thể liên hợp 46
Thể liên hợp 45a
hIgG1 Fc (1 mg/kg)
Tá dược (PBS)
% mức sống sót
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Ngày sau lây nhiễm