(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) **1-0025756**

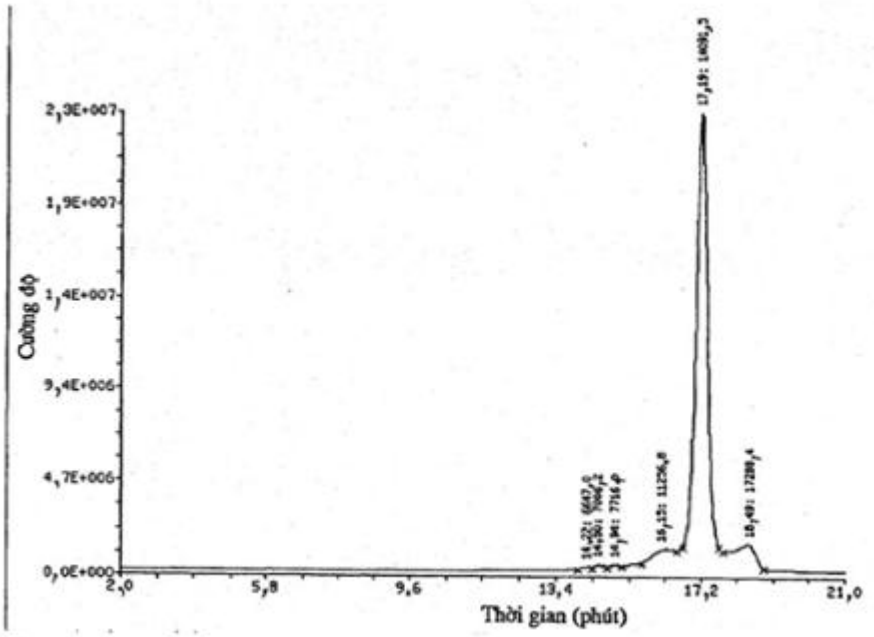
(51)[7] A61K 31/7088; A61K 9/00; A61K 38/22; A61K 38/21

(13) **B**

(21) 1-2014-04024 (22) 17/05/2013
(86) PCT/CA2013/050379 17/05/2013 (87) WO2013/170386 21/11/2013
(30) 61/648,711 18/05/2012 US; 61/695,035 30/08/2012 US
(45) 26/10/2020 391 (43) 25/02/2015 323A
(73) REPLICOR INC. (CA)
Suite D-101, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada
(72) BAZINET Michel (CA); VAILLANT Andrew (CA).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC CHẤT CHELAT OLIGONUCLEOTIT-POLYPEPTIT

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa oligonuclelotit và ít nhất một polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm bổ sung dùng để điều trị các bệnh bao gồm bệnh nhiễm virut, phương pháp bào chế dược phẩm và kit chứa dược phẩm này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa phức chất chelat oligonucleotit (ON) và một hoặc nhiều polypeptit khác nhau hoặc polypeptit đã pegyl hóa, các phương pháp bào chế dược phẩm chứa phức chất chelat ON và một hoặc nhiều polypeptit khác nhau hoặc polypeptit đã pegyl hóa và mô tả các phương pháp điều trị các bệnh khác nhau bằng dược phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phức chất chelat ON bao gồm hai hoặc nhiều ON liên kết các phân tử với nhau bởi một cation kim loại hoá trị hai hoặc đa hóa trị. Các phức chất chelat ON làm vô hiệu các tính chất chelat hóa vốn có của các ON có thể tạo ra các tác dụng phụ liên quan tới việc dùng thuốc bằng các hợp chất này. Việc áp dụng các phức chất chelat ON là một phương pháp mới áp dụng ON cho đối tượng khi các tác dụng phụ liên quan tới việc dùng thuốc đi kèm với các ON chưa được chelat hóa (gồm các ON được dùng dưới dạng các muối natri thường được áp dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này) được giảm nhẹ. Các tác dụng phụ này có thể bao gồm các triệu chứng run, sốt và ớn lạnh cùng với việc hóa cứng hoặc tiêm truyền tĩnh mạch, viêm và đau ở vị trí tiêm cùng với việc dùng dược phẩm này dưới da. Hơn nữa, bằng cách bào chế các ON dưới dạng các phức chất đã chelat hóa, tính năng dược động học của chúng có thể được cải thiện, cho phép nâng cao tính năng trị liệu với liều dùng tương đương với các ON chưa được chelat hóa như được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế số WO 2012/021985 và Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0046348.

Các phức chất chelat ON tạo ra một phương pháp cải tiến để dùng các ON ít các tác dụng phụ mà không ảnh hưởng tới hoạt tính sinh hóa của ON khi được dùng dưới dạng muối natri đơn.

Các phức chất chelat ON chứa ON mà hoạt động bởi cơ chế phụ thuộc vào trình tự hoặc không phụ thuộc vào trình tự có thể có tác dụng trị liệu đối với tình

trạng bệnh lý có thể không cho một kết quả trị liệu tối ưu ở đối tượng có bệnh đang được điều trị bằng phức chất chelat ON.

Do đó, trong lĩnh vực kỹ thuật này có nhu cầu tạo ra một chế phẩm mới cải tiến chứa phức chất chelat ON như dưới dạng chế phẩm kết hợp.

Các phức chất chelat ON kháng virut chứa ON kháng virut có tác động bởi các cơ chế phụ thuộc vào trình tự hoặc không phụ thuộc vào trình tự có thể có tác dụng kháng virut đối với các ca nhiễm virut khác nhau. Các tác dụng kháng virut này có thể không cho kết quả trị liệu tối ưu ở đối tượng hiện đang nhiễm virut đã được điều trị bằng chelat ON. Một kết quả trị liệu được cải thiện hơn có thể đạt được bằng cách sử dụng đồng thời phức chất chelat ON kháng virut và một trị liệu miễn dịch trên cơ sở polypeptit có hoạt tính kháng virut đã biết.

Do đó, trong lĩnh vực kỹ thuật này có nhu cầu tạo ra một dược phẩm mới chứa phức chất chelat ON kháng virut và polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut ở dạng kết hợp. Lý tưởng là polypeptit kháng virut mà có thể cũng có hoạt tính đối với bệnh nhiễm virut được đề cập, hoặc là bởi việc tác động cùng đích/đường sinh hóa dưới dạng chelat ON kháng virut được đề cập hoặc bởi việc tác động hướng đích/đường sinh hóa khác với đích/đường sinh hóa bị tác động bởi phức chất chelat ON kháng virut.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON và một hoặc nhiều polypeptit khác nhau.

Sáng chế đề xuất dược phẩm kháng virut chứa phức chất chelat ON kháng virut và một hoặc nhiều polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng bệnh lý bao gồm bước dùng dược phẩm chứa phức chất chelat ON và polypeptit cho đối tượng cần điều trị.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng bệnh lý bao gồm bước dùng qua các đường dùng như nhau hoặc khác nhau các dược phẩm riêng biệt, dược phẩm thứ nhất chứa phức chất chelat ON và dược phẩm thứ hai chứa polypeptit cho đối tượng cần điều trị.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virut bao gồm bước dùng

dược phẩm chứa chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut cho đối tượng cần điều trị.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virut bao gồm bước dùng qua các đường như nhau hoặc khác nhau các dược phẩm riêng biệt, một dược phẩm chứa phức chất chelat ON kháng virut và dược phẩm còn lại chứa polypeptit kháng virut cho đối tượng cần điều trị.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virut bao gồm bước dùng phức chất chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut hoặc là trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm khác nhau nhờ sử dụng các đường dùng như nhau hoặc khác nhau.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dược phẩm chứa phức chất chelat ON và polypeptit để điều trị bệnh.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dược phẩm chứa phức chất chelat ON và polypeptit để bào chế thuốc để điều trị bệnh.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dược phẩm thứ nhất chứa phức chất chelat ON và dược phẩm thứ hai chứa polypeptit để điều trị tình trạng bệnh lý, dược phẩm này được bào chế cho các đường dùng như nhau hoặc khác nhau.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dược phẩm chứa chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dược phẩm chứa chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut để bào chế thuốc để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế mô tả việc sử dụng các dược phẩm, một dược phẩm chứa phức chất chelat ON kháng virut và dược phẩm còn lại chứa polypeptit kháng virut, được bào chế để cung cấp theo các đường như nhau hoặc khác nhau một cách riêng biệt, để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế mô tả việc sử dụng phức chất chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut, được bào chế hoặc là trong cùng một dược phẩm hoặc trong các dược phẩm khác nhau cho các đường dùng như nhau hoặc khác nhau, để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat oligonucleotit (ON),

bao gồm hai hoặc nhiều ON được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, và ít nhất một polypeptit.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON kháng virut, bao gồm hai hoặc nhiều ON kháng virut được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, và ít nhất một polypeptit kháng virut.

Theo một phương án, polypeptit kháng virut được pegyl hóa tiếp.

Theo một phương án khác, cation hóa trị hai là kim loại kiềm thổ có trạng thái điện tích 2+.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là kim loại chuyển tiếp có trạng thái điện tích 2+.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là kim loại dãy lantanoit có trạng thái điện tích 2+.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là kim loại nằm sau nhóm chuyển tiếp có trạng thái điện tích 2+.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là canxi.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là magie.

Theo một phương án khác, cation kim loại hóa trị hai là sắt (2+), mangan, đồng hoặc kẽm.

Theo một phương án khác, cation hóa trị hai bao bao gồm hai hoặc nhiều cation kim loại hóa trị hai khác nhau.

Theo một phương án khác, cation hóa trị hai bao gồm canxi và magie.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON dạng sợi kép.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON có ít nhất một liên kết phosphorothioat.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON có một riboza đã cải biến ở vị trí 2'.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON

có riboza đã O-metyl hóa ở vị trí 2'.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON chứa ít nhất 5'metylxytosin.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON, trong đó xytosin còn là 5'metylxytosin.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit được chọn trong số các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1-6 và 10-18.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit được chọn trong số các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 7-9.

Theo một phương án khác, polypeptit là ít nhất một trong số:

Thymosin α1;

α-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

β-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

γ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

λ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

Interferon α-2a hoặc α-2b hoặc α-N3;

Interferon β-1a hoặc β-1b;

Interferon γ-1b;

Interferon λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

Interferon α-2a hoặc α-2b hoặc λ1 hoặc λ2 hoặc λ3 đã pegyl hóa;

Myrcludex B;

Xytokin kháng vi rut bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

Protein thymic A; và

Polypeptit bất kỳ thể hiện hoạt tính kháng virut hoặc hoạt tính kích thích miễn dịch.

Theo một phương án khác, dược phẩm được bào chế để dùng dưới da.

Theo một phương án khác, dược phẩm được bào chế để truyền tĩnh mạch.

Theo một phương án khác, dược phẩm được bào chế cho ít nhất một trong số các đường dùng sau: hít khí dung, trong nhãn cầu, tiêu hóa qua đường miệng, tan trong ruột, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm vào tủy sống, truyền vào

tủy sống, trong khí quản, tiêm tĩnh mạch và tại chỗ.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON bao gồm ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án khác, dược phẩm còn chứa một hoặc nhiều trong số các chất sau: entecavir, tenofovir disoproxil fumarat, telbuvidin, adefovir dipivoxil, lamivudin, ribavirin, telaprevir, boceprevir, GS-7977, tegobuvir, zanamivir, oseltamivir, ganciclovir, foscarnet, acyclovir, zidovudin, abacavir, lopinavir, ritonavir hoặc efavirenz.

Theo một phương án khác, dược phẩm còn chứa chất mang.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và thymosin α1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và thymosin α1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và thymosin α1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon α-2b.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon α-2b.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2b.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon α-2b đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon α-2b đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2b đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon λ1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon λ1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon λ1.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon λ1 đã

pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon λ1 đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon λ1 đã pegyl hóa.

Sáng chế đề xuất phương pháp bào chế dược phẩm như được mô tả ở đây, phương pháp này bao gồm các bước:

a. hoà tan ít nhất một muối natri oligonucleotit (ON) trong tá dược dạng nước dược dụng;

b. bổ sung từ từ dung dịch muối kim loại hóa trị hai dược dụng vào ON đã hòa tan sao cho phức chất chelat ON còn lại hòa tan;

c. hoà tan một hoặc nhiều polypetit kháng virut trong tá dược dạng nước dược dụng, tương thích; và

d. trộn từ từ dung dịch polypeptit kháng virut với dung dịch phức chất chelat ON sao cho độ tan của phức chất ON chelat và polypeptit kháng virut được bảo toàn.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bào chế dược phẩm như được mô tả ở đây, phương pháp này bao gồm các bước:

a. hoà tan ít nhất một muối natri oligonucleotit (ON) trong tá dược dạng nước dược dụng;

b. bổ sung từ từ ít nhất một trong số các dung dịch muối canxi và/hoặc magie dược dụng vào ON đã hòa tan sao cho phức chất chelat ON còn lại hòa tan;

c. hoà tan một hoặc nhiều polypetit kháng virut trong tá dược dạng nước dược dụng, tương thích; và

d. trộn từ từ dung dịch polypeptit kháng virut với dung dịch phức chất chelat ON sao cho độ tan của phức chất ON chelat và polypeptit kháng virut được bảo toàn.

Theo một phương án, dung dịch phức chất chelat ON và dung dịch polypeptit được kết hợp ngay trước khi cung cấp dược phẩm.

Theo một phương án khác, tỷ lệ giữa muối kim loại hóa trị hai được bổ

sung vào ON đã hòa tan với lượng nằm trong khoảng 0,1-50mg cho 100mg oligonucleotit.

Theo một phương án khác, nồng độ ON cuối nằm trong khoảng 0,1-200mg/ml.

Theo một phương án khác, muối kim loại hóa trị hai là ít nhất một trong số muối clorua, muối gluconat, muối xitrat, muối lactat, muối malat, muối aspartat, muối fumarat, muối ascorbat, muối benzoat, muối erythorbat, muối propionat, muối sulfat hoặc muối bicacbonat.

Theo một phương án khác, dung dịch muối kim loại hóa trị hai chứa ít nhất một trong số canxi, magie, sắt (2+), mangan, đồng hoặc kẽm.

Sáng chế đề xuất kit chứa dược phẩm như được mô tả ở đây.

Theo một phương án, phức chất chelat ON và ít nhất một polypeptit được bào chế một cách riêng biệt.

Theo một phương án khác, phức chất chelat ON và ít nhất một polypeptit được bào chế để cùng dùng theo các đường dùng như nhau hoặc khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phần mô tả sau được đưa ra có dựa vào các hình vẽ kèm theo:

Fig.1 minh họa các dấu hiệu sinh hóa thông thường của các ON. A) Đồng tách REP 2006 và phosphorothioat ON có 21mer có một trình tự đã được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao. B) Nhận diện các loại trong ON có 21mer bằng phổ khối. C) Nhận diện các loại trong REP 2006 ON bằng phổ khối.

Fig.2A minh họa các dấu hiệu hóa học chung của các ON không phụ thuộc vào trình tự ON. Không phụ thuộc vào trình tự, ON tồn tại dưới dạng polyme có cả tính kỵ nước lẫn tính ưa nước. Quá trình phosphorothio hóa (được thể hiện dưới dạng cấu trúc hóa trên hình vẽ này) có tác dụng làm tăng tính kỵ nước của polyme ON nhưng không ảnh hưởng tới tính ưa nước. Fig.2B khái quát hóa bản chất của sự chelat hóa ON của các cation kim loại hoá trị hai và hóa trị ba. Các cation kim loại (được thể hiện bằng các hình tròn đặc xám) liên kết các bề mặt ưa nước của polyme ON qua các cầu ion kim loại (được thể hiện bằng các hình elip) nằm giữa hai hoặc ba nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh không liên kết cầu trong các liên kết

phosphođieste.

Fig.3 minh họa mô hình đối với tính chất của dung dịch chứa các ON với sự có mặt của các cation kim loại hóa trị hai hoặc đa hóa trị với các nồng độ ON và cation kim loại hóa trị hai khác nhau. A) Nồng độ cation kim loại hoá trị hai/hóa trị ba thấp, nồng độ ON thấp tạo ra các các phức chất chelat ON có trật tự thấp hoặc các đime. B) Việc tăng nồng độ cation kim loại hoá trị hai/hóa trị ba dẫn đến sự tạo ra phức chất chelat ON đầy đủ hơn trong dung dịch này. C) Việc gia tăng tiếp các nồng độ ON với sự có mặt của các kim loại hoá trị hai hoặc hóa trị ba có khả năng tạo ra các phức chất chelat ON có trật tự cao hơn cùng với việc gia tăng các nồng độ kim loại. Toàn bộ các phức chất chelat từ (A) tới (C) đều hòa tan trong dung dịch nước do có các bề mặt ưa nước vẫn được tiếp xúc với môi trường nước nhờ vậy duy trì được tính hòa tan. D) Với các nồng độ ON và kim loại đủ, tất cả các bề mặt ưa nước đều nằm trong các phức chất chelat ON, chỉ còn các bề mặt kỵ nước được tiếp xúc với môi trường nước. Điều này dẫn đến làm kết tủa phức chất chelat ON.

Fig.4 minh họa mức độ ảnh hưởng của tính chất của dung dịch chứa các phức chất chelat ON-chất phát huỳnh quang tới sự phân cực phát huỳnh quang. Khi tăng nồng độ kim loại, thì kích thước (và khối lượng) của lượng tạo ra phức chất chelat ON cũng tăng (xem Fig.3) và do vậy ít xáo trộn hơn trong dung dịch này. Sự xáo trộn chậm đó của phức chất này trong dung dịch dẫn đến việc làm tăng mức phân cực phát huỳnh quang và làm tăng trị số mP.

Fig.5 minh họa việc tách HPLC của hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp oligo như được mô tả trong Ví dụ 4. Pic ON có chiều dài đầy đủ (mũi tên lớn) trong sắc ký nằm sau các sản phẩm thứ yếu của quy trình tổng hợp không hoàn toàn (các mũi tên nhỏ) và thường là các ON có các trình tự khuyết một hoặc nhiều nucleotit so với trình tự ON có chiều dài đầy đủ. Profin HPLC này thường là đối với tất cả các ON không được tinh chế được sử dụng (REP 2055, REP 2057 và REP 2148).

Fig.6 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 16,70 phút được thể

hiện trên Fig.5. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12612,2 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12612,5).

Fig.7 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp protein 1 (xem Ví dụ 4).

Fig.8 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 11,03 phút được thể hiện trên Fig.7. Pic khối lượng quan sát được ở 19263 Da tương ứng với interferon α-2b (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 19271 Da) và pic ở 66560 Da tương ứng với albumin ở người.

Fig.9 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Như được thể hiện trên Fig.5, các sản phẩm thứ yếu của quy trình tổng hợp không hoàn toàn đứng trước pic chính của trình tự REP 2057 có chiều dài đầy đủ.

Fig.10 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 15,46 phút được thể hiện trên Fig.9. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 13413,5 Da, nhận diện nó là REP 2057 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 13413,3).

Fig.11 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp protein 1 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.12 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 11,43 phút được thể hiện trên Fig.11. Pic khối lượng quan sát được ở 19264 Da tương ứng với interferon α-2b (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 19271 Da) và pic ở 66618 Da tương ứng với albumin ở người.

Fig.13 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Không thấy có các sản phẩm tổng hợp không hoàn toàn.

Fig.14 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 19,11 được thể hiện trên Fig.13. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14095,3 Da,

nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 14094,6).

Fig.15 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp protein 1 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.16 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 11,12 phút được thể hiện trên Fig.15. Pic khối lượng quan sát được ở 19264 Da tương ứng với interferon α-2b (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 19271 Da) và pic ở 66674 Da tương ứng với albumin ở người.

Fig.17 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Các sản phẩm thứ yếu của quy trình tổng hợp không hoàn toàn đứng trước pic chính của trình tự REP 2148 có chiều dài đầy đủ.

Fig.18 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 15,34 phút được thể hiện trên Fig.17. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12891,6 Da, nhận diện nó là REP 2148 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12893,6).

Fig.19 minh họa việc tách HPLC của hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2b bằng cách sử dụng phương pháp protein 1 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.20 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2b từ pic HPLC ở 8,44 phút được thể hiện trên Fig.19. Pic khối lượng quan sát được ở 19265 Da tương ứng với interferon α-2b.

Fig.21 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,31 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 15,15 phút tương ứng với REP 2006 có chiều đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.22 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 15,15 phút được thể hiện trên Fig.21. Khối lượng quan sát được là khoảng 12650 - 13150 Da, nhận

diện nó là REP 2006 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 12612 - 1309 2Da).

Fig.23 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,31 phút được thể hiện trên Fig.21. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3108 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.24 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,12 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 16,70 phút tương ứng với REP 2055 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.25 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 16,70 phút được thể hiện trên Fig.24. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12612,1 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 12612,5).

Fig.26 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,12 phút được thể hiện trên Fig.24. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,6 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.27 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,18 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 15,47 phút tương ứng với REP 2057 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.28 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 15,47 phút được thể hiện trên Fig.27. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 13413,5 Da, nhận diện nó là REP 2057 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 13413,3 Da).

Fig.29 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,18 phút được thể hiện trên Fig.27. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,6 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.30 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/thymosin

α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,13 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 19,01 phút tương ứng với REP 2139 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.31 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 19,01 phút được thể hiện trên Fig.30. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14094,5 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6).

Fig.32 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,13 phút được thể hiện trên Fig.30. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,6 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.33 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,28 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 15,19 phút tương ứng với REP 2148 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.34 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 15,19 phút được thể hiện trên Fig.33. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12892 Da, nhận diện nó là REP 2148 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12893 Da).

Fig.35 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,28 phút được thể hiện trên Fig.33. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,3 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.36 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.37 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 14,59 phút được thể hiện trên Fig.36. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là khoảng 12600 - 13200 Da, nhận diện nó là REP 2006 (Trọng lượng phân tử được

kỳ vọng = 12612 - 13092 Da).

Fig.38 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.39 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2006 canxi chelat/interferon α-2a interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,21 phút được thể hiện trên Fig.38.

Fig.40 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.41 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 16,71 phút được thể hiện trên Fig.40. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12612,4 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12612,5 Da).

Fig.42 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.43 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 8,03 phút được thể hiện trên Fig.42.

Fig.44 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.45 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 15,45 phút được thể hiện trên Fig.44. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 13413,5 Da, nhận diện nó là REP 2057 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 13413,3 Da).

Fig.46 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon

α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.47 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2057 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 8,04 phút được thể hiện trên Fig.46.

Fig.48 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.49 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 19,08 phút được thể hiện trên Fig.48. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14095,3 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.50 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.51 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 8,02 phút được thể hiện trên Fig.50.

Fig.52 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.53 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 15,42 phút được thể hiện trên Fig.52. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12891,5 Da, nhận diện nó là REP 2148 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12893 Da).

Fig.54 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.55 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,17 phút được thể hiện trên Fig.54.

Fig.56 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.57 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 14,84 phút được thể hiện trên Fig.56. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12610,6 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12612,5 Da).

Fig.58 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.59 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 10,68 phút được thể hiện trên Fig.58. Một pic chủ yếu quan sát được ở 20139 Da, phù hợp với trọng lượng phân tử gần đúng của interferon λ1.

Fig.60 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.61 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 17,31 phút được thể hiện trên Fig.60. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14095,3 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.62 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.63 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng protein trong hỗn hợp REP 2139 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 10,53 phút được thể hiện trên Fig.62. Một pic chủ yếu quan sát được ở 20139 Da, phù hợp với trọng lượng phân tử gần đúng của interferon λ1

Fig.64 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.65 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong

hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 15,47 phút được thể hiện trên Fig.64. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12891,8 Da, nhận diện nó là REP 2148 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12893 Da).

Fig.66 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon λ1 bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.67 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng protein trong hỗn hợp REP 2148 canxi chelat/interferon λ1 từ pic HPLC ở 10,51 phút được thể hiện trên Fig.66. Một pic chủ yếu quan sát được ở 20139 Da, phù hợp với trọng lượng phân tử gần đúng của interferon λ1

Fig 68 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 magie chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 5,86 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 14,62 phút tương ứng với REP 2055 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.69 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 14,62 phút được thể hiện trên Fig.68. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12610,1 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là = 12612,5).

Fig.70 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 5,82 phút được thể hiện trên Fig.68. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,1 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.71 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 6,02 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 14,85 phút tương ứng với REP 2055 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.72 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 14,85 phút được thể hiện trên Fig.71. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12609,7 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng là =

12612,5).

Fig.73 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 6,02 phút được thể hiện trên Fig.71. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,1 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.74 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.75 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 14,83 phút được thể hiện trên Fig.74. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12610,2 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12612,5 Da).

Fig.76 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.77 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,44 phút được thể hiện trên Fig.76.

Fig.78 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.79 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 14,83 phút được thể hiện trên Fig.78. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 12609,8 Da, nhận diện nó là REP 2055 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 12612,5 Da).

Fig.80 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.81 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2055 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,44 phút được thể hiện trên Fig.80.

Fig.82 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 magie chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 5,84 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 16,86 phút tương ứng với REP 2139 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.83 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 magie chelat/thymosin α1 comvị trí từ pic HPLC ở 16,86 phút được thể hiện trên Fig.82. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14091,3 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.84 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 5,84 phút được thể hiện trên Fig.82. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,1 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.85 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4). Pic rửa giải ở 5,84 phút tương ứng với thymosin α1 (mũi tên màu trắng) và pic rửa giải ở 16,61 phút tương ứng với REP 2139 có chiều dài đầy đủ (mũi tên màu đen).

Fig.86 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 16,61 phút được thể hiện trên Fig.85. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14091,1 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.87 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/thymosin α1 từ pic HPLC ở 5,84 phút được thể hiện trên Fig.85. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 3107,1 Da, nhận diện nó là thymosin α1 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 3108 Da).

Fig.88 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.89 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 17,19 phút được thể hiện trên Fig.88. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14091,5 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.90 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.91 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,38 phút được thể hiện trên Fig.90.

Fig.92 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp oligo được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.93 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng oligonucleotit trong hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 16,95 phút được thể hiện trên Fig.92. Khối lượng quan sát được của các loài sơ cấp là 14091,4 Da, nhận diện nó là REP 2139 (Trọng lượng phân tử được kỳ vọng = 14094,6 Da).

Fig.94 minh họa việc tách HPLC hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa bằng cách sử dụng phương pháp protein 2 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 4).

Fig.95 minh họa việc phân tích ESI-MS hàm lượng peptit trong hỗn hợp REP 2139 hỗn hợp canxi-magie chelat/interferon α-2a đã pegyl hóa từ pic HPLC ở 13,46 phút được thể hiện trên Fig.94.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế WO 2012/021985 và Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0046348, các ON trong các dung dịch nước chứa cation kim loại đơn bất kỳ có hoá trị hai (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, Ca^{2+}, Mg^{2+} và Fe^{2+}) không có mặt dưới dạng các muối nhưng lại có mặt dưới dạng các phức chất đã chelat hóa của các ON. Các phức chất này bao gồm các các đime ON hoặc các tổ chức phân tử có trật tự cao hơn trong đó các ON được liên kết tại các mạch chính phosphođieste của chúng qua các cầu nối ion kim loại hoá trị hai (xem Fig. 2B). Với các nồng độ ON và cation kim loại đặc thù, các phức chất đã chelat hóa này là bền và tan trong dung dịch nước và cô lập một cách hiệu quả các cation hóa trị hai bất kỳ trong các phức chất chelat ON không có tương tác với dung dịch. Sự tạo thành phức chất chelat này cũng có khả năng xảy ra cùng với các cation kim loại đơn có hóa trị 3+ hoặc hơn (như được mô tả trong Fig.2B). Do vậy, các ON có chức năng giống như các chelat cation kim loại đa hóa trị và không tạo ra các muối với các cation kim loại đa hóa trị.

Các phức chất chelat ON có thể chứa các cation kim loại đa hóa trị khác nhau bao gồm canxi, magie, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, kẽm, cađimi, thủy ngân và chì. Điều cũng đã được chứng minh là sự chelat hóa các cation kim loại đa hóa trị này dẫn đến sự tạo thành của các phức chất chelat ON có hai hoặc nhiều ON được liên kết qua các cation kim loại và xuất hiện với các ON có độ dài lớn hơn 6 nucleotit, và với sự có mặt của các ON có các liên kết phosphođieste hoặc phosphorothioat. Tùy ý, các ON có thể có mỗi liên kết đã được phosphorothio hóa. Sự chelat hóa cũng xảy ra với các ON chứa các cải biến 2' (như 2' O metyl) ở riboza hoặc chứa các bazơ đã được cải biến như 5'metylxytosin hoặc 4-thiouraxil. Các cải biến 2' này có thể có mặt trên một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các riboza và các bazơ đã được cải biến có thể có mặt trên một hoặc nhiều bazơ hoặc đồng thời có mặt trên mỗi bazơ (tức là, tất cả các xytosin có mặt dưới dạng 5'metylxytosin). Ngoài ra, các phức chất chelat ON có thể có các ON chứa nhiều cải biến như mỗi liên kết đã được phosphorothio hóa, mỗi riboza đã được cải biến 2' và mỗi bazơ đã được cải biến. Các cải biến ON tương thích

với với sự tạo thành phức chất chelat ON được xác định rõ hơn ở dưới. Hơn nữa, sự chelat hóa các cation kim loại không phụ thuộc vào trình tự của nucleotit có mặt mà dựa trên cơ sở các dấu hiệu hóa lý thường thấy với tất cả các ON (xem Fig. 2A).

Mặc dù sự tạo thành của các phức chất chelat ON có thể đạt được với cation kim loại hóa trị hai bất kỳ, song tốt hơn nếu các phức chất chelat ON được dự định để sử dụng làm các thuốc có thể không chỉ chứa canxi và hoặc magie mà có thể còn chứa sắt, mangan, đồng hoặc kẽm với các hàm lượng vi lượng và có thể không bao gồm coban, bari, niken, cađimi, thủy ngân, chì hoặc kim loại hoá trị hai bất kỳ khác không được liệt kê trong bản mô tả.

Điều quan trọng là, sự tạo thành của các phức chất chelat ON không xảy ra với các cation hoá trị một như Na^+, K^+ hoặc NH_4^+ và do vậy không thể xảy ra với cation hoá trị một bất kỳ. Do vậy, thuật ngữ "muối ON" là giới hạn một cách cụ thể hơn với các muối ON với các cation hoá trị một hoặc với các cation không tạo ra các phức chất chelat với các ON.

Ít nhất là một phần của sự tương tác nhất thời đã biết của các ON với các thành phần protein trong máu có khả năng là do thông qua sự tương tác của các ON với protein gắn kết kim loại như albumin và các protein của các thác đông tụ phụ thuộc canxi. Do vậy việc cung cấp các ON dưới dạng các phức chất đã chelat hóa (làm giảm hoặc loại bỏ đáng kể khả năng chúng tương tác với các protein đã gắn kết kim loại hóa trị hai) có thể làm giảm bớt các tương tác protein này trong máu và dẫn đến có ít các tác dụng phụ hơn với việc dùng ON (như sự kháng đông tụ nhất thời) và cũng có thể làm tăng phân đoạn của liều ON đi tới các cơ quan đích (ví dụ gan, phổi hoặc lá lách) so với các ON chưa được chelat hóa. Trước khi có sáng chế, tác động giảm bớt như vậy về sự tương tác protein tới hoạt tính trị liệu là chưa được biết đến và chưa từng được mô tả.

Sự phân cực phát huỳnh quang là một phương pháp phổ biến thường được dùng để kiểm tra sự tương tác giữa các phân tử. Theo kỹ thuật này, phân tử mồi (tức là, ON bất kỳ) được gán nhãn bằng nhãn phát huỳnh quang (ví dụ, FITC). Trong dung dịch, phân tử mồi này nhào lộn tự do trong dung dịch do sự chuyển

động Brow dẫn đến sự phát huỳnh quang đã được phân cực kém khi phân tử mồi này bị kích thích bằng ánh sáng chính xác của ánh sáng. Với một phối tử có trọng lượng phân tử thỏa đáng (ít nhất là có cùng kích cỡ như phân tử mồi), sự tương tác giữa phân tử mồi và phối tử này tạo ra sự ức chế đáng kể sự nhào lộn của phức chất trong dung dịch. Do kết quả của việc ức chế nhào lộn này trong dung dịch, sự phát xạ phát huỳnh quang trở nên bị phân cực đáng kể khi có kích thích. Do vậy bằng kỹ thuật này, các tương tác có thể được đo trong dung dịch mà bị bị giới hạn vật lý tới hoặc là đối tác gắn kết. Sự phân cực phát huỳnh quang được đưa ra theo thứ nguyên mP, nó tỷ lệ thuận với phần các phân tử mồi đã gắn kết trong phản ứng. Ví dụ, nếu một phần rất nhỏ của các phân tử mồi được gắn kết bởi một phối tử cụ thể, thì có thể có sự phân cực phát huỳnh quang rất nhỏ và do đó có các trị số mP nhỏ. Tại một đầu khác của phổ này, nếu một tỷ lệ lớn của các phân tử mồi được gắn kết bởi một phối tử cụ thể (hoặc với một nồng độ cao hơn của phối tử), sẽ có thể có sự phân cực phát huỳnh quang đáng kể và do đó có các trị số mP lớn. Với kiểu hình này, các đường đẳng nhiệt gắn kết cho các tương tác phân tử mồi-phối tử có thể được tạo ra bằng cách thay đổi các nồng độ của phối tử với sự có mặt của một lượng cố định của phân tử mồi đã gán nhãn phát huỳnh quang.

Các ON đã gán nhãn phát huỳnh quang khác nhau theo sáng chế được sử dụng để theo dõi sự tạo thành phức chất của chúng với sự có mặt của các cation kim loại đa hóa trị. Mặc dù việc theo dõi sự tạo thành phức chất bởi sự phân cực phát huỳnh quang đòi hỏi các ON phải được gán nhãn phát huỳnh quang, song nhãn này được cố định vào ON ở đầu 3' để không gây ảnh hưởng tới gốc nitơ hoặc mạch chính phosphođieste của ON được đề cập. Hơn nữa, nhãn phát huỳnh quang được giữ để tách rời ON bởi một liên kết 3 cacbon cứng nhằm loại trừ tiếp sự nhiễu loại bất kỳ của hành vi ON thông thường trong dung dịch. Do vậy, sự tạo thành phức chất ON bất kỳ quan sát được theo sáng chế nhờ sử dụng sự phân cực phát huỳnh quang với một ON đã gán nhãn phát huỳnh quang biểu hiện chính xác tính chất của dung dịch của các ON chưa được gán nhãn (có sự tạo phức hoặc không).

Tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này chỉ ra một cách rõ ràng việc thực hành cung cấp các ON cho các đối tượng cần điều trị bằng các muối ON natri. Được lấy làm ví dụ là cung cấp nhiều ON trong các thử nghiệm lâm sàng dưới dạng các muối natri bao gồm Fomivirisen (ISIS 2922), Mipomersen (ISIS 301012), Trecovirsen (GEM 91), Custirsen (OGX-011/ISIS 112989), Genasense (G3139), Aprinocarsem (ISIS 3531/LY 900003), PRO-51 (GSK 2402968) và ALN-RSV01 (Geary et al., 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260; Yu et al., 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50; Sereni et al., 1999, J. Clin. Pharmacol., 39: 47-54; Chi et al., 2005, J. Nat. Canc. Inst., 97: 1287-1296; Marshall et al., 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283; Grossman et al., 2004, Neuro-Oncol, 6: 32-40; Goemans et al., 2011 NEJM 364: 1513-1522). Chưa từng có dữ liệu đã công bố nào về các chế phẩm oligonucleotit cho phác đồ bất kỳ để cung cấp ngoài đường tiêu hóa cùng với việc sử dụng canxi hoặc magie hoặc các kim loại hóa trị hai khác bất kỳ.

Nhiều tác dụng phụ có liên quan tới việc cung cấp muối natri ON có thể có tác động tới các tác động chelat hóa của chúng. Khả năng chống đông máu bởi các ON ít nhất một phần là do sự chelat hóa canxiv huyết thanh bởi các ON nhờ vậy tạo nên bậc đông tụ phụ thuộc canxi. Sự chelat hóa canxi huyết thanh và sự giảm canxi huyết thanh cơ bản cũng có thể là nguyên nhân liên quan tới các tác dụng phụ quan sát được khi cung cấp các ON bằng cách tiêm tĩnh mạch bao gồm các chứng sốt, run, suy nhược và tụt huyết áp (chứng huyết áp đi kèm với tiêm hoặc truyền tĩnh mạch). Các phản ứng tại vị trí tiêm quan sát được khi tiêm dưới da các ON (gây cứng, viêm, rát và đau) do ít nhất một phần là sự chelat hóa cục bộ bởi các ON của canxi và có thể là các cation hoá trị hai khác như magie hoặc các cation đa hóa trị ở vị trí tiêm. Việc dùng ON dưới dạng các phức chất đã chelat hóa đã cho thấy là giảm thiểu rất nhiều các tác dụng phụ này..

Hơn nữa, do các phức chất chelat ON sẽ tạo ra cùng với các kim loại hóa trị hai ở dạng dung dịch cùng với ON bất kỳ, nên lý thuyết về sự tạo thành và độ tương thích của các polypeptit khác nhau và các polypeptit đã pegyl hóa ở dạng dung dịch cùng với phức chất chelat ON bất kỳ sẽ được chứng minh thỏa đáng bởi

người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bởi việc sử dụng ON REP 2006 thoái biến và một trình tự oligonucleotit được lấy làm ví dụ [trong các ví dụ ở dưới $(AG)_{20}$ và $(AC)_{20}$] có các cải biến ON khác nhau. Sự tạo thành bền của các chế phẩm chứa cac sloài ON nêu trên dưới dạng các chelat cùng với các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa khác nhau sẽ chứng tỏ rằng phức chất chelat ON bất kỳ (không phụ thuộc vào chức năng cụ thể của nó) sẽ tạo ra dung dịch bền cùng với polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa khác nhau có thể được mong muốn trong lĩnh vực kỹ thuật này để điều trị cho một dấu hiệu bệnh cụ thể (ví dụ, interferon đã pegyl để điều trị bệnh viêm gan B hoặc bệnh viêm gan C hoặc Myrcludex B để điều trị bệnh viêm gan B).

Thuật ngữ oligonucleotit (ON) dùng để chỉ oligome hoặc polyme của axit ribonucleic (ARN) và/hoặc axit đeoxyribonucleic (ADN). Thuật ngữ này bao gồm các ON chứa các nucleobazơ đã cải biến (bao gồm 5'metylxytosin và 4'thiouraxil), đường và các liên kết cộng hóa trị giữa các nucleosit (mạch chính) cũng như các ON có các phần không có mặt trong tự nhiên có chức năng tương đương. Các ON đã được thế hoặc đã được cải biến như vậy có thể được ưu tiên hơn so với các dạng tự nhiên nhờ có các tính chất có thể được mong muốn như, ví dụ, hoạt tính miễn dịch thấp, mức độ hấp thụ tế bào cao, ái lực cao đối với với đích axit nucleic và độ ổn định cao với sự có mặt của các nucleaza. Các ON cũng có thể có dạng sợi kép.

Các ON theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến khác nhau, ví dụ, các cải biến làm ổn định, và do vậy có thể bao gồm ít nhất một cải biến trong liên kết phosphođieste và/hoặc trên đường, và/hoặc trên bazơ. Ví dụ, ON có thể bao gồm, mà không nhằm giới hạn ở, một hoặc nhiều cải biến, hoặc được cải biến hoàn toàn để chứa tất cả các liên kết hoặc đường hoặc bazơ có các cải biến được đề cập. Các liên kết được cải biến có thể bao gồm các liên kết phosphorothioat, các liên kết phosphorođithioat, và/hoặc các liên kết metylphosphonat. Mặc dù các liên kết được cải biến là hữu ích, song các ON có thể bao gồm các liên kết phosphođieste. Các cải biến hữu ích bổ sung bao gồm, mà không nhằm giới hạn ở, các cải biến ở vị trí 2'- của đường bao gồm các cải biến 2'-O-alkyl như các cải biến 2'-O-metyl,

2' O-metoxyetyl (2' MOE), các cải biến 2'-amino, các cải biến 2'-halo như 2'-flo; và/hoặc các chất tương tự nucleotit không vòng. Các cải biến 2' khác cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng như các axit nucleic đã được khóa. Cụ thể, ON có các liên kết được cải biến trên khắp hoặc trên mỗi liên kết được cải biến, ví dụ, phosphorothioat; có đầu chụp 3'- và/hoặc 5'-; bao gồm liên kết 3'-5' đầu cuối; ON là hoặc bao gồm đoạn trùng lặp bao gồm hai hoặc nhiều trình tự ON được nối bởi (các) liên kết. Các cải biến bazơ có thể bao gồm 5'metyl hóa bazơ xytosin (5' metylxytosin hoặc trong phạm vi của nucleotit, 5' metylxytiđin) và/hoặc 4'thioat hóa bazơ uraxil (4'thiouraxil hoặc trong phạm vi của nucleotit, 4'thiouriđin). Các liên kết đã cải biến tương thích hóa học khác nhau có thể được kết hợp khi các điều kiện tổng hợp tương thích hóa học như có một oligonucleotit có các liên kết phosphorothioat, cải biến 2' riboza (như 2'O-metyl hóa) và bazơ đã cải biến (như 5'metylxytosin). ON có thể được cải biến hoàn toàn tiếp bằng tất cả các cải biến khác nhau này (ví dụ, mỗi liên kết được phosphorothio hóa, mỗi riboza 2'O metyl được cải biến và mỗi bazơ xytosin còn có các cải biến 5' metyl (5'metylxytosin)).

Trong phần mô tả, thuật ngữ "ON kháng virut" dùng để chỉ ON bất kỳ mà nhờ hoạt tính sinh hóa đặc thù của nó (cho dù không phụ thuộc trình tự hay phụ thuộc vào trình tự) có khả năng ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp một phần dấu hiệu sao chép virut hoặc nâng cao trực tiếp hoặc gián tiếp khả năng khỏi bệnh của vật chủ bởi cơ chế miễn dịch hoặc cơ chế khác.

Trong phần mô tả, thuật ngữ "phức chất chelat ON" dùng để chỉ phức chất của hai hoặc nhiều ON trong dung dịch được liên kết giữa các phân tử bởi cation kim loại đa hóa trị.

Trong phần mô tả, thuật ngữ "phức chất chelat ON kháng virut" dùng để chỉ phức chất của hai hoặc nhiều ON kháng virut trong dung dịch được liên kết các phân tử với nhau bởi cation kim loại đa hóa trị. Phức chất chelat ON kháng virut có thể bao gồm các loài đơn của ON kháng virut hoặc hai hoặc nhiều loài khác nhau của ON kháng virut có thể có cơ chế tác động như nhau hoặc khác nhau (ví dụ, hai hoặc nhiều ON đối nghĩa, ít nhất một ON đối nghĩa và ít nhất một

aptamer, ít nhất một ON đối nghĩa và ít nhất một siARN).

Trong phần mô tả, thuật ngữ "polypeptit kháng virut" dùng để chỉ polypeptit mà nhờ có hoạt tính sinh hóa đặc thù (phụ thuộc vào trình tự hoặc không phụ thuộc vào trình tự) nên nó có khả năng trực tiếp hoặc gián tiếp ức chế một số khía cạnh của sự sao chép virut hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp tăng cường khả năng của vật chủ để làm mất đi các nhiễm trùng bởi cơ chế miễn dịch hoặc các cơ chế khác. Polypeptit có thể có nguồn gốc tự nhiên hoặc được tái tổ hợp. Polypeptit có thể có nguồn gốc tái tổ hợp từ một phần của polypeptit có trong tự nhiên. Polypeptit có thể được pegyl hóa hoặc không được pegyl hóa.

Trong Phần mô tả, thuật ngữ "ON thoái biến" được dự định để chỉ ON sợi đơn có một dao động (N) ở mỗi vị trí, như NNNNNNNNNN. Mỗi bazơ được tổng hợp dưới dạng dao động để sao cho ON này thực sự tồn tại dưới dạng một quần thể của các trình tự được tạo ra ngẫu nhiên có cùng độ dài và tính chất hóa lý. Ví dụ, đối với ON thoái biến có độ dài 40 bazơ, trình tự cụ thể bất kỳ trong quần thể về theo lý thuết có thể chỉ chiếm $1/4^{40}$ hoặc 8.3×10^{-25} trong tổng số phân đoạn. Giả thuyết rằng 1 mol = $6{,}022 \times 10^{23}$ phân tử, và thực tế là 1mol ON có 40mer có khối lượng khoảng 12-14kg (tuỳ thuộc vào trình tự và các cải biến có mặt), ON bất kỳ có trình tự cụ thể trình bày một cách hiệu quả không tồn tại nhiều hơn một trong chế phẩm bất kỳ. Do vậy, sự tạo thành chelat bất kỳ hoặc hoạt tính sinh học quan sát được trong một chế phẩm như vậy phải là do các tính chất hóa lý không phụ thuộc vào trình tự (hoặc phụ thuộc vào trình tự) của các ON do ON cụ thể bất kỳ có trình tự đã được xác định, là duy nhất trong chế phẩm này, không được kỳ vọng để góp phần có hoạt tính bất kỳ có nguồn gốc từ trình tự nucleotit đặc thù của nó.

Như một minh họa tiếp về vấn đề này, Ví dụ 1 so sánh sự khác biệt của REP 2006 (ON có 40mer có trình tự đã phosphorothio hóa hoàn toàn, thoái biến) với một ON có 21mer có một trình tự đã được xác định (cũng đã được phosphorothioat hoàn toàn) bằng phép phổ khối và sắc ký lỏng hiệu suất cao và cho thấy một cách rõ ràng là ON bất kỳ có cùng kích cỡ và cải biến hoá học (tức là, đã phosphorothio hóa) sẽ có các dấu hiệu hóa lý rất giống nhau (nếu không

giống hệt) không phụ thuộc vào trình tự của nucleotit có mặt (xem các hình vẽ 1A-C).

Trong Phần mô tả, thuật ngữ "polyme axit nucleic" hoặc NAP được dự định để nhận diện cho ON sợi đơn bất kỳ không có tính năng đặc thù trình tự. Hoạt tính sinh hóa của các NAP không phụ thuộc vào sự thừa nhận thụ thể dạng Toll của các ON, lai hóa với một axit nucleic đích hoặc tương tác aptamer đòi hỏi một cấu trúc ON bậc ba thứ cấp đặc thù có nguồn gốc từ một bộ đặc thù của nucleotit có mặt. Các NAP có thể bao gồm các cải biến bazơ và hoặc liên kết và hoặc đường như được mô tả ở trên.

Các ON có thể tạo ra các tác động của chúng bởi nhiều cơ chế phụ thuộc vào trình tự hoặc không phụ thuộc vào trình tự. Các cơ chế phụ thuộc vào trình tự gồm các cơ chế đòi hỏi một trình tự axit nucleic đặc thù đối với hoạt tính của chúng và trong đó hoạt tính này bị khử bởi một hoặc nhiều biến đổi trong trình tự nucleotit có mặt. Trình tự đặc thù này có thể bao hàm toàn bộ độ dài của ON hoặc chỉ một phần phần của nó (motif trình tự). Các ví dụ về các ON phụ thuộc vào trình tự bao gồm:

1. Các ON đối nghĩa (các ARN sợi đơn hoặc sợi kép (ví dụ, ARN can thiệp ít (siARN) hoặc ARN ngắn hình cặp tóc (shARN)) bổ trợ cho một phần cụ thể của ARN thông tin (mARN) (tức là, mARN virut hoặc mARN vật chủ) liên quan tới một tình trạng bệnh lý (tức là, chứng nhiễm virut hoặc sự điều hòa cholesterol) và khi được đưa vào tế bào, chúng gây ra sự thoái biến của các mARN đích này bởi RNAza H hoặc phức chất gây ức chế được cảm ứng bởi ARN (RISC).

2. Các ON phong bế stearic là các ON đối nghĩa sợi đơn bổ trợ cho một phần cụ thể của mARN nhưng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để không hoạt hóa ARNaza H. Sự lai hóa các ON này thành mARN đích của chúng tạo ra cấu trúc sợi kép gây ra sự cản trở không gian cho các protein thường có tác động lên mARN. Các ON như vậy có thể được sử dụng để phong bế sự dịch mã của một mARN cụ thể hoặc can thiệp vào việc tách intron sau phiên mã và sự trưởng thành của một mARN cụ thể. Các ON như vậy có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để phong bế sự hoạt hóa của ARNza H (do nó không tích hợp vào cơ chế tác động

của các ON này) bởi các cải biến 2' riboza trên toàn bộ hoặc trên mỗi riboza có mặt trong ON (như 2' O metyl hóa).

3. Các aptamer là các ON thích ứng cho một cấu hình ba chiều cụ thể có khả năng tương tác protein đặc thù (tức là, protein virut hoặc protein vật chủ) và không dễ dàng tương tác với ADN hoặc ARN vật chủ. Các aptamer cũng có thể bao gồm các spiegelmer, chúng sử dụng L-nucleotit để tạo sự kháng với sự thoái biến nucleaza thành ON.

4. Các ON kích thích miễn dịch sử dụng motif axit nucleic có 6mer đặc thù (XXCGXX) để kích thích đáp ứng miễn dịch ở các động vật có vú. Motif tối ưu khác nhau giữa các loài nhưng chỉ phụ thuộc vào một trình tự cụ thể phù hợp với motif XXCGXX.

5. Các vi ARN (miARN) gắn kết và phong bế chức năng của các phân tử vi ARN có trong tự nhiên có liên quan tới các con dudường sinh hóa khác nhau.

Duy nhất một ví dụ đã được công bố về các ON không phụ thuộc vào trình tự là các NAP đã phosphorothio hóa hóa, chúng có tương tác một cách chọn lọc với các cấu trúc protein lưỡng cực theo kiểu hình phụ thuộc kích cỡ (độ dài) nhờ các đặc tính hóa lý của chúng dưới dạng các polyme lưỡng cực.

Một vài thuốc trên cơ sở polypeptit kháng virut hiện đã được phê chuẩn để điều trị các nhiễm virut bao gồm interferon α-2a đã pegyl hóa (điều trị bệnh viêm gan B (HBV) và bệnh viêm gan C (HCV)), interferon α-2b (điều trị HBV), thymosin α1 (điều trị HBV) và enfurtide (điều trị HIV-1). Cũng có các thuốc trên cơ sở polypeptit khác đang nghiên cứu phát triển bao gồm đoạn protein kháng nguyên bề mặt pre-s1 HBV đã myristyl hóa (Myrcludex B, Pethersen et al., 2008, Nature Biotech. 26: 335-341) để điều trị HBV và interferon λ1 đã pegyl hóa (Muir et al., 2010 Hepatology 52: 822-832). Ngoài ra, các interferon λ1, λ2 và λ3 cũng đã biết là có hoạt tính kháng virut (Friborg et al., 2013, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57: 1312-1322). Trong trường hợp các interferon đã pegyl hóa hoặc chưa được pegyl hóa và các chất khác đã biết là các chất điều biến miễn dịch (ví dụ, thymosin α1), thì các polypeptit này có hoạt tính kích thích các đường sinh hóa của chúng dẫn đến sự kích thích đáp ứng miễn dịch cho các nhiễm virut ở các

đối tượng. Mặc dù các polypeptit này có thể kích thích thỏa đáng đáp ứng miễn dịch, song chỉ một phần nhỏ trong số các bệnh nhân bị nhiễm virut HBV hoặc HCV có được sự kiểm soát nhiễm trùng của chúng nhờ việc sử dụng các thuốc trên cơ sở polypeptit này. Myrcludex B có chức năng phong bế sự thâm nhập HBV vào trong các tế bào gan nhưng lợi ích trị của nó vẫn chưa được chứng minh ở người bệnh.

Ngoài các polypeptit này, còn có các nhóm polypeptit khác có hoạt tính kháng virut đã biết có thể hữu ích cho việc điều trị bệnh nhiễm virut khi kết hợp với phức chất chelat ON. Các polypeptit như vậy bao gồm xytokin như, nhưng không chỉ giới hạn ở TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, và interferon γ.

Các phương pháp để pegyl hóa các polypeptit có hoạt tính trị liệu và khả năng tương thích của quá trình pegyl hóa với hoạt tính sinh hóa của các polypeptit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và gồm liên kết của các sợi polyetylenglycol (PEG) với polypeptit được đề cập ở các gốc axit amin đặc biệt. Chức năng cơ bản của sự pegyl hóa là làm tăng thời gian tuần hoàn sau khi trộn polypeptit và còn làm giảm tính miễn dịch của nó. Các dấu hiệu này cải thiện khả năng chịu dung nạp của polypeptit được đề cập và làm giảm tần suất liều dùng cần thiết để có tác dụng điều trị tối ưu. Cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là sự gắn bám của các gốc PEG với polypeptit có thể đạt được mà không ảnh hưởng tới hoạt tính sinh hóa đặc thù của polypeptit được đề cập. Sự pegyl hóa cũng đã biết để làm tăng độ tan trong nước của polypeptit được đề cập, cải thiện khả năng dễ bào chế của nó. Nhiều ví dụ về polypeptit đã pegyl hóa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm: Mircera™ là một dạng đã pegyl hóa của erythropoietin; Neulasta™, một dạng đã pegyl hóa của yếu tố kích thích khuẩn lạc hạt ở người; Pegasys™ là một dạng đã pegyl hóa của interferon α-2a ở người; Peg-intron™, một dạng đã pegyl hóa của người interferon α-2b; và interferon λ1 đã pegyl hóa (hiện đang được phát triển lâm sàng). Do đó, phần mô tả về độ tương thích của một polypeptit đã pegyl hóa (tức là, interferon α-2a đã pegyl hóa) trong hỗn hợp với phức chất chelat ON đưa ra một phương pháp tiếp cận chung về độ tương thích của polypeptit đã pegyl hóa bằng phức chất chelat ON nói chung, và đặc biệt là đối với các phiên bản đã

pegyl hóa của polypeptit chưa được pegyl hóa cụ thể có mặt trong phần mô tả tương thích với phức chất chelat ON (tức là thymosin α1, interferon α-2b và interferon λ1).

Một vài thuốc kháng virut trên cơ sở ON hiện thời đang được phát triển để điều trị các nhiễm virut bao gồm các NAP đã phosphorothio hóa hóa REP 9AC (REP 2055), REP 9AC' (REP 2139) và REP 9AC^{m} (REP 2148) để điều trị HBV; miravirsen để điều trị HCV (Janssen et al., 2013, NEJM, Marchch 27); và ALN-RSV01 để điều trị chứng virut hợp bào hô hấp (RSV) (Zamora et al., 2011, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 183: 531-538). Mỗi ON này có cơ chế tác động khác nhau: các NAP ngăn ngừa sự giải phóng protein kháng nguyên bề mặt HBV vào máu (protein ức chế chức năng miễn dịch) như được mô tả ở Ví dụ 5, miravirsen (miARN) phong bế tác động của vi ARN mir-122 đã biết là đóng vai trò trong sự sao chép HCV và ALN-RSV01 (siARN) phong bế sự tổng hợp RSV N nucleocapsid protein, ngăn ngừa sự sản xuất các virion RSV. Tất cả các thuốc ON này là rất hiệu quả để gây ra các tác động đã định của chúng trong các đối tượng: REP 9AC/REP 9AC'/REP 9ACm phong bế sự vận chuyển nội bào và sự tiết của các hạt transit và các hạt subvirut HBV (SVP) dẫn đến việc làm sạch kháng nguyên bề mặt HBV trong máu mà nó làm giảm virut HBV trong máu; miravirsen có khả năng ức chế chức năng mir-122 tốt có liên quan tới sự sao chép HCV; và ALN-RSV-01 có khả năng phong bế tốt sự sản xuất RSV capsid protein. Tuy nhiên, trong mọi trường hợp khi các hợp chất trên cơ sở ON này được cấp ngoài đường tiêu hóa, chúng thường đi kèm với các tác dụng phụ do việc dùng thuốc như sốt, ớn lạnh, run khi được cấp bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch hoặc đau, viêm hoặc cứng ở vị trí tiêm khi được cấp bằng cách cung cấp dưới da. Điều quan trọng hơn là, mặc dù tất cả các thuốc trên cơ sở ON này đều có các hiệu quả được dự định của chúng ở các đối tượng, song kết quả điều trị tổng thể là khác xa với những điều được mong muốn: chỉ một phần nhỏ trong số các bệnh nhân được được điều trị bằng các thuốc này đạt được đáp ứng kháng virut đáng kể hoặc sự kiểm soát hoàn toàn sự nhiễm virut trong khi quá trình điều trị hoặc sau khi quá trình điều trị đã kết thúc.

Do đó được mong muốn nếu bào chế bất kỳ trong số các thuốc kháng virut trên cơ sở ON này dưới dạng các chelat ON (để làm giảm đến mức tối thiểu các tác dụng phụ liên quan tới việc do việc dùng thuốc của chúng và có tiềm năng cải thiện các đặc tính dược động học của chúng) và kết hợp chúng với một hoặc nhiều polypeptit kháng virut (như interferon α-2a đã pegyl hóa, interferon α-2b hoặc thymosin α1 hoặc interferon λ1 đã pegyl hóa) trong cùng một chế phẩm. Các hiệu quả kháng virut đặc thù của các hợp chất trên cơ sở ON (dưới dạng các chelat), kết hợp với các tác dụng kháng virut kích thích miễn dịch của các polypeptit có thể có tác dụng có lợi được cải thiện để gây ra đáp ứng kháng virut tiềm năng đầy đủ hơn ở các đối tượng và dẫn đến một phần lớn trong số các đối tượng đạt được sự kiểm soát hoàn toàn sự nhiễm virut của chúng so với các thuốc được sử dụng một cách riêng biệt.

Có thể hữu ích nếu điều trị chứng nhiễm virut cụ thể bằng dược phẩm chứa ít nhất một kháng virut phức chất chelat ON và ít nhất một polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut để đạt được đáp ứng kháng virut được cải thiện ở đối tượng.

Có thể hữu ích nếu điều trị chứng nhiễm virut cụ thể bằng ít nhất một kháng virut phức chất chelat ON và polypeptit kháng virut trong đó mỗi trong số các hợp chất này được cấp một cách riêng biệt trong các dược phẩm khác nhau, theo cùng một đường dùng hoặc không.

Để tạo ra đáp ứng kháng virut tốt nhất có thể ở đối tượng, có thể cần phải bổ sung trị liệu kết hợp gồm chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut, được cấp trong cùng một dược phẩm trong các dược phẩm riêng biệt, thuốc không ON thứ ba, thuốc không polypeptit. Các thuốc như vậy có thể là (nhưng không chỉ giới hạn ở): entecavir, tenofovir disoproxil fumarat, telbuvidin, adefovir dipivoxil, lamivudin, ribavirin, telaprevir, boceprevir, GS-7977, tegobuvir, zanamivir, oseltamivir, ganciclovir, foscarnet, acyclovir, zidovudine, abacavir, lopinavir, ritonavir và/hoặc efavirenz. Các thuốc kháng virut như vậy có thể ngăn ngừa sự sao chép của hệ gen virut và hoặc mARN virut trong nhiều virut như HCV, HBV, HIV, influenza, RSV, và virut xytomegalo.

Có khả năng là tổ hợp của các hiệu quả kháng virut đặc thù của phức chất chelat ON kháng virut, được kết hợp với các các hiệu quả kích thích miễn dịch của polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut và sự phong bế sự sao chép ADN/ARN virut bởi các thuốc không ON, không polypeptit thuốc đã nêu trên, có thể tạo ra đáp ứng trị liệu tốt và tiềm năng nhất ở đối tượng có nhiễm virut và còn tăng cường hơn nữa khả năng là đối tượng được đề cập sẽ đạt được sự kiểm soát bền lâu virut mà nó có thể là kéo dài sau khi đã dừng việc điều trị.

Phức chất chelat ON trong chế phẩm có thể có nguồn gốc từ ON bất kỳ có hoạt tính kháng virut, các ví dụ về chúng được đưa ra trong Bảng 1.

Bảng 1

Các ví dụ về ON có thể bào chế được dưới dạng các phức chất chelat.

Nhóm ON	Loại axit nucleic	Chuỗi (5' – 3')	Các cải biến
NAP	ADN	$(AC)_{20}$ (SEQ ID NO:2)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(CA)_{20}$ (SEQ ID NO:10)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(A\text{-}5'MeC)_{20}$ (SEQ ID NO:11)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(5'MeC\text{-}A)_{20}$ (SEQ ID NO:12)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ARN	$(2'OMeA\text{-}2'OMeC)_{20}$ (SEQ ID NO: 13)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ARN	$(2'OMeC\text{-}2'OMeA)_{20}$ (SEQ ID NO:14)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(AG)_{20}$ (SEQ ID NO:3)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	(GA)20 (SEQ ID NO:15)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	C_{40} (SEQ ID NO:1)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(TC)_{20}$ (SEQ ID NO: 5)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(CT)_{20}$ (SEQ ID NO: 16)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	$(TG)_{20}$ (SEQ ID NO: 6)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ADN	(GT)20 (SEQ ID NO: 17)	Toàn bộ liên kết PS
NAP	ARN	$(2'OMe, 5'MeC\text{-}2'OMeA)_{20}$	Toàn bộ liên kết PS

Nhóm ON	Loại axit nucleic	Chuỗi (5' – 3')	Các cải biến
		(SEQ ID NO:4)	
NAP	ARN	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC)$_{20}$ (SEQ ID NO:18)	Toàn bộ liên kết PS
miARN	**LNA** / ADN	CC**A**TT**G**TC**A**CA^{m}**C**TC^{m}**C**A (SEQ ID NO:7)	Toàn bộ liên kết PS LNA in đậm (^{m}C = 5'MeC)
miARN	ADN / ARN	Chuỗi tương ứng với vi ARN của vật chủ	Toàn bộ liên kết PS, có thể chứa LNA hoặc ARN có cải biến 2' riboza
đối nghĩa	ADN / ARN	Chuỗi tương ứng với phiến mã gen hoặc mARN của virut hoặc vật chủ	Toàn bộ liên kết PS, có thể chứa một phần hoặc toàn bộ ARN có cải biến 2' riboza
siARN / shARN	ARN/ADN sợi kép	Chuỗi tương ứng với protein HBV X	Có thể chứa ARN có cải biến 2' riboza, có thể chứa PS
siARN	ARN/ADN sợi kép	GGCUCCUUAGCAAAGUCAAG$_{d}$T$_{d}$T (SEQ ID NO:8) + CUUGACUUUGCUAAGAGCC$_{d}$T$_{d}$T (SEQ ID NO:9) Chuỗi tương ứng với mARN cho RSV N protein mARN	Toàn bộ ARN trừ đeoxythymiđin ($_{d}$T), có thể chứa PS
siARN / shARN	ARN/ADN sợi kép	Chuỗi tương ứng với mARN của virut	Có thể chứa ARN có cải biến 2' riboza, có thể chứa PS
đối nghĩa	**ARN** / ADN	**GCCTC**AGTCTG^{m}CTT^{m}C**G CACC** (SEQ ID NO:20)	Toàn bộ liên kết PS 2'MOE ARN in đậm (^{m}C = 5'MeC)
đối nghĩa	ARN hoặc ADN	hướng đích PKCS9	Toàn bộ liên kết PS, có thể chứa 5'MeC
siARN	ARN/ADN sợi kép	hướng đích PKCS9	Có thể chứa ARN có cải biến 2' riboza, có thể chứa PS, có thể chứa GalNAc thể tiếp hợp
đối nghĩa	ARN	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU (SEQ ID NO:19)	Toàn bộ liên kết PS, tất cả các riboza 2' O đã được metyl hóa

LNA = axit nucleic đã khóa, PS = phosphorothioat, 2'OMe = 2' O metyl, 2'MOE = 2'metoxyetyl, 5'MeC = 5'metylxytosin

Polypeptit trong chế phẩm có thể có hoạt tính kháng virut trực tiếp hoặc có khả năng kích thích hoạt tính kháng virut có nguồn gốc từ vật chủ và có thể là các loại sau đây:

Thymosin α1;

α-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

β-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

γ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

λ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

Interferon α-2a hoặc α-2b hoặc α-N3;

Interferon β-1a hoặc β-1b;

Interferon γ-1b;

Interferon λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

Interferon α-2a đã pegyl hóa hoặc α-2b hoặc λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

Myrcludex B;

Xytokin kháng vi rut bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

Protein thymic A; và/hoặc

Polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa bất kỳ thể hiện hoạt tính kháng virut hoặc hoạt tính kích thích miễn dịch.

Điều được đề xuất ở đây là nhiều phức chất chelat ON có thể được kết hợp với các thuốc polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa khác nhau trong một dược phẩm đơn không ảnh hưởng tới cấu trúc của ON hoặc polypeptit.

Các chế phẩm này có thể được sử dụng để cung cấp cả phức chất chelat ON lẫn các thuốc polypeptit cho đối tương cần điều trị đồng thời và với một chế độ cung cấp đơn như được chứng minh trong Ví dụ 6 ở dưới.

Hơn thế nữa, các dược phẩm nêu trên có thể chứa các chất mang sinh lý và/hoặc dược dụng, các dược phẩm bổ sung, các chất dẫn thuốc và/hoặc các tá dược. Các đặc tính của chất mang có thể phụ thuộc vào đường dùng thuốc. Thuật ngữ "chất mang dược dụng, dược phẩm bổ sung, chất dẫn thuốc và/hoặc tá dược" dùng để chỉ chất mang, dược phẩm bổ sung, chất dẫn thuốc hoặc tá dược có thể được cấp cho đối tượng, được đưa vào dược phẩm theo sáng chế, và không ảnh

hưởng tới hoạt tính dược lý của nó. Các chất mang dược dụng, các dược phẩm bổ sung, các chất dẫn thuốc và các tá dược có thể được sử dụng trong các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau: các chất trao đổi ion, oxit nhôm, nhôm stearat, lexitin, các hệ phân phối thuốc tự nhũ hóa ("SEDDS"), các chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong các dạng liều dùng dược phẩm như Tweens hoặc các chất nền phân phối polyme tương tự khác, các protein huyết thanh như albumin huyết thanh người, các chất đệm như các phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, các hỗn hợp glyxerit không hoàn toàn của các axitbéo thực vật bão hoà, nước, các muối hoặc các chất điện phân như protamin sulfat, đinatri hyđro phosphat, kali hyđro phosphat, natri clorua, kẽm muối, silic oxit dạng keo, magie trisilicat, polyvinyl pyroliđon, các chất trên cơ sở xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, các sáp, các polyme khối polyetylen-polyoxypropylen, polyetylen glycol, chất béo gỗ, natri caprat hoặc tetrađexylmaltosit (TDM), các dẫn xuất TDM hoặc các sacarit đã alkylat hóa. Các xyclođextrin như α-, β- và γ-xyclođextrin, hoặc các dẫn xuất đã cải biến hóa học như như các hyđroxyalkylxyclođextrin, bao gồm các 2- và 3-hyđroxypropyl-β-xyclođextrin, hoặc các dẫn xuất đã hòa tan khác có thể cũng được sử dụng để tăng cường khả năng phân phối của các dược phẩm theo sáng chế.

Các chế phẩm này có thể chứa các tác nhân trị liệu khác như được mô tả ở dưới, và có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách sử dụng các chất dẫn thuốc hoặc các chất pha loãng lỏng hoặc rắn thông thường, cũng như các chất phụ gia dược dụng có dạng thích hợp cho chế độ cung cấp được mong muốn (ví dụ, các tá dược, chất kết dính, các chất bảo quản, các chất làm ổn định, các hương vị, v.v.) theo kỹ thuật như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật bào chế dược phẩm.

Các chế phẩm này có thể được dùng theo cách thức bất kỳ, ví dụ, qua đường miệng, như dưới dạng hỗn dịch lỏng, viên nén, viên nang, hạt hoặc bột; đặt dưới lưỡi; đặt trong má; ngoài đường tiêu hóa, như dưới da, tĩnh mạch, trong cơ, tiêm vào tủy sống hoặc truyền tĩnh mạch (ví dụ dưới dạng hỗn dịch hoặc dung dịch nước hoặc không nước tiêm vô trùng); qua đường mũi như bởi phun xịt qua

mũi; khu trú, như dưới dạng kem hoặc thuốc mỡ; hoặc qua đường trực tràng như dưới dạng các thuốc đạn hoặc thuốc thụt; trong các chế phẩm dạng đơn vị liều lượng chứa các chất dẫn thuốc hoặc chất pha loãng dược dụng, không độc. Dược phẩm theo sáng chế có thể, ví dụ, được cấp ở dạng thích hợp để giải phóng vừa phải hoặc giải phóng kéo dài. Sự giải phóng vừa phải hoặc sự giải phóng kéo dài có thể đạt được bằng cách sử dụng các dược phẩm thích hợp, hoặc, cụ thể là trong trường hợp giải phóng kéo dài, bằng cách sử dụng các dụng cụ như các vật cấy ghép dưới da hoặc các bơm thẩm lọc. Do vậy, các dược phẩm nêu trên có thể được làm thích ứng để cung cấp theo bất kỳ trong số các đường sau: trong mắt, tiêu hóa qua đường miệng, tan trong ruột, ngửi, dưới da tiêm, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng (IP), tiêm trong vỏ hoặc tiêm truyền, trong khí quản, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm truyền, hoặc khu trú.

Các chế phẩm được lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch có thể chứa, ví dụ, xenluloza vi tinh thể để cấp một lượng lớn axit alginic hoặc natri alginat dưới dạng tác nhân tạo lửng, metylxenluloza dưới dạng chất làm tăng độ nhớt, và chất làm ngọt hoặc các hương liệu như các chất đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này; và các viên nén giải phóng trung bình có thể chứa, ví dụ, xenluloza vi tinh thể, đicanxi phosphat, tinh bột, magie stearat và/hoặc lactoza và/hoặc các tá dược khác, chất kết dính, chất độn mạch, chất tiêu hóa, chất pha loãng và chất làm trơn như các chất đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được phân phối qua khoang miệng bởi việc đặt dưới lưỡi và/hoặc đặt trong má. Các viên nén được đúc, các viên nén được dập hoặc các viên nén được làm khô nhanh là các dạng được lấy làm ví dụ có thể được sử dụng. Các dược phẩm được lấy làm ví dụ bao gồm các dược phẩm có công thức theo các dược phẩm theo sáng chế cùng với các chất pha loãng hòa tan nhanh như manitol, lactoza, sucroza và/hoặc xyclođextrin. Cũng được bao gồm trong các dược phẩm này có thể là các tá dược trọng lượng phân tử cao như các xenluloza (avicel) hoặc polyetylen glycol (PEG). Các chế phẩm như vậy cũng có thể bao gồm tá dược để bổ trợ cho sự bám dính niêm mạc như hyđroxy propyl xenluloza (HPC), hyđroxy propyl metyl xenluloza (HPMC), natri carboxy metyl xenluloza

(SCMC), copolyme anhyđrit maleic (ví dụ, Gantrez), và các tác nhân để khống chế sự giải phóng như copolyme polyacrylic (ví dụ, Carbopol 934). Các chất làm trơn, các chất chảy, các hương vị, các chất tạo màu và các chất làm ổn định cũng có thể được bổ sung để tạo thuận lợi cho việc bào chế và sử dụng.

Lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và bao gồm liều lượng được lấy làm ví dụ cho người trưởng thành là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mg/kg thể trọng của hoạt chất mỗi ngày, nó có thể được cấp với liều lượng đơn hoặc dưới dạng các liều lượng chia nhỏ riêng rẽ, như (nhưng không chỉ giới hạn ở) từ 1 tới 5 lần mỗi ngày hoặc từ 1 tới 7 liều dùng mỗi tuần. Cần phải hiểu rằng mức liều đặc hiệu và tần suất liều lượng cho đối tượng cụ thể bất kỳ có thể thay đổi và sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính hợp chất cụ thể được sử dụng, độ ổn định trao đổi chất và độ dài tác động của hoạt chất, các loài, độ tuổi, thể trọng, sức khỏe chung, giới tính và khẩu phần ăn của đối tượng, chế độ và thời điểm cung cấp, mức độ bài tiết và thanh thải, thuốc kết hợp, và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý cụ thể. Các đối tượng được ưu tiên để điều trị bao gồm các động vật, tốt nhất là các loài động vật có vú như người, và các vật nuôi trong nhà như chó, mèo và tương tự.

Cũng được đưa ra ở đây là một ví dụ về hoạt tính kháng virut có ích của phức chất chelat oligonucleotit kháng virut và polypeptit kháng virut khi được sử dụng ở dạng kết hợp để điều trị cho người bệnh bị nhiễm virut.

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ ở dưới.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Đặc tả các ON thoái biến

Fig.1A mô tả chi tiết việc phân tách bằng HPLC (sử dụng cột kỵ nước) hai chế phẩm ON cùng được phun vào trong cột một cách đồng thời. Chế phẩm thứ nhất là chất chuẩn nội và là phosphorothioat ON có 21mer có trình tự đã được xác định, chế phẩm thứ hai là REP 2006 (phosphorothioat ON thoái biến có 40mer). Cả hai loại này riêng biệt thành các pic đã xác định riêng biệt dựa trên các tính

chất hóa lý của chúng (cụ thể là kích cỡ và tính kỵ nước); trình tự của nucleotit có mặt trong mỗi ON này thực tế không liên quan tới các tính hóa lý của chúng và do đó không ảnh hưởng tới việc tách chúng. Do đó, chất chuẩn nội rửa giải ra khỏi cột dưới dạng một pic đã được xác định chặt chẽ cùng với thời gian lưu nhỏ hơn so với REP 2006, do sự khác nhau về kích cỡ của hai polyme ON này. Lưu ý rằng các sườn ở mỗi bên pic REP 2006 này là do các trình tự hỏng thường thấy khi tạo ra các ON dài hơn. Mặc dù REP 2006 có bản chất không đồng nhất, song nó vẫn phân giải dưới dạng một pic được xác định rõ tương tự bởi HPLC là một trình tự đặc thù có 21mer minh họa cho các tính chất hóa lý thông thường của tất cả các loại trong chế phẩm REP 2006, mặc dù có mặt một số lượng rất lớn các trình tự khác nhau. Tiếp sau việc phân tách bằng HPLC các pic REP 2006 và 21-mer, có thể tiến hành phép phổ khối (MS) để nhận diện các loại có mặt trong các pic đã được xác định này (Fig.1B và Fig.1C).

Trong Fig.1B, 21mer được phân giải thành các loài đơn có MW bằng 7402,6 Da, phù hợp với PS-ON có trình tự đã được xác định. Tuy nhiên, phép phân tích MS của REP 2006 (Fig.1C) cho thấy có mặt một số lượng rất lớn các loài mà khoảng khối lượng của chúng có sự phân bố bình thường gần như hoàn hảo, phù hợp với bản chất thoái biến hoàn toàn của nó. Khoảng khối lượng đi từ C_{40} (các loài nhỏ nhất) tới A_{40} (các loài lớn nhất) và sự phổ biến của các loài này là cực kỳ nhỏ cùng với số lượng các loài gia tăng (cường độ pic) khi khối lượng của chúng tiệm cận gần tâm của khoảng khối lượng. Điều này là do một số lượng lớn gia tăng của các trình tự khác nhau sẽ cho kết quả khối lượng tương tự. Thực tế là tất cả các loài ON khác nhau khác nhau có mặt trong REP 2006 có cùng thời gian lưu trong cột kỵ nước mặc dù việc phân tách HPLC cho thấy rõ ràng rằng tất cả các ON có cùng kích cơc và cùng các cải biến hóa học (tức là, phosphorothioa hóa) sẽ có các tính chất hóa lý rất giống nhau (nếu không giống hệt nhau) và do đó, có thể được xem là có chức năng tương đương trong ứng dụng bất kỳ hoặc tính chất không phụ thuộc vào trình tự của nucleotit có mặt trong phân tử ON cụ thể. Do vậy, sự tạo phức chất chelat ON bất kỳ quan sát được cùng với ON thoái biến bất kỳ (ví dụ, REP 2006), không phụ thuộc vào trình tự của các ON có mặt và phải

phụ thuộc vào các tính chất hóa lý được bảo toàn của ON bất kỳ.

Ví dụ 2

Tạo các phức chất chelat cùng với ON kháng virut

REP 2031, REP 2055, REP 2057 và REP 2139 là các polyme axit nucleic (NAP) có hoạt tính kháng virut phổ rộng đối với HIV, HSV, virut xytomegalo, LCMV, HCV và các virut đã phát triển khác (Bernstein et al., 2008, Antimicrobial Agents Chemother. 52: 2727-2733; Cardin et al., 2009, Virology J. 6: 214; Vaillant et al., 2006, Antimicrobial Agents Chemother., 50: 1393-1401; Guzman et al., 2007, Antiviral Therapy, 12: 1147-1156; Lee et al., Virology, 372: 107-117; Matsumura et al., 2009, Gastroenterology 137: 673-681). Tất cả các hợp chất này là các ON đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn có 40mer có các chuỗi 5'-3' C_{40} trong trường hợp REP 2031 (SEQ ID NO:1), $(AC)_{20}$ trong trường hợp REP 2055 (SEQ ID NO: 2), $(AG)_{20}$ trong trường hợp REP 2057 (SEQ ID NO: 3) và (2'OMeA - 2'OMe, 5'MeC)$_{20}$ trong trường hợp REP 2139 (SEQ ID NO: 18). Trong khi REP 2031, REP 2055 và REP 2057 là các ON ADN, song REP 2139 là một ON ARN trong đó tất cả các riboza là các 2' O metyl được cải biến và tất cả các xytosin là 5' được metyl hóa.

Sự tạo thành của các phức chất chelat với các ON kháng virut này được kiểm tra bằng sự phân cực phát huỳnh quang bằng cách các dẫn xuất đã gán nhãn 3' FITC của các hợp chất này. Trong quá trình tổng hợp ON, mỗi ON được tiếp hợp với isothioxyanat phát huỳnh quang (FITC) ở đầu 3' bởi một liên kết 3 cacbon cứng bằng cách sử dụng các chất phản ứng và phương pháp tổng hợp đã được thiết lập. Các ON này được phân giải từ quá trình tổng hợp và nằm lại dưới dạng các muối amoni. Mỗi ON này được bào chế dưới dạng 0,5mM nguyên liệu trong 1mM TRIS (độ pH = 7,2). Các nguyên liệu này được sử dụng để bào chế các dung dịch ON phát huỳnh quang 3nM trong chất đệm FP (10mM TRIS, 80mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM b-mercaptoetanol và 0,1% Tween®-20). EDTA có mặt để loại bỏ các kim loại hóa trị hai bất kỳ có mặt trong dung dịch trước khi đo FP. Mỗi dung dịch đệm này còn chứa 80mM NaCl để đánh giá sự tạo phứuc chất ON với sự có mặt của một lượng mol dư của các cation hóa trị một. Mỗi ON phát huỳnh

quang trong dung dịch được bổ sung các lượng khác nhau của các muối clorua loại ACS của các kim loại hoá trị hai (2+) (như được mô tả trong Bảng 2). Sự tạo đime hoặc các phức chất chelat ON có trật tự cao hơn được kiểm tra bởi số gia của sự phân cực phát huỳnh quang (được xác định bằng đơn vị thứ nguyên "mP") để sao cho việc gia tăng sự tạo các phức chất chelat ON dẫn đến thay đổi nhiều về khối lượng (xem Fig.3). Sự nhào trộn thấp thu được của các phức chất chelat ON này trong dung dịch dẫn đến làm gia tăng sự phân cực của chất huỳnh quang được phát ra (xem Fig.4). Các kết quả của các thử nghiệm này được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2

Tạo chelat ON với các NAP có các kim loại hóa trị hai khác nhau

ON	Mức phân cực phát huỳnh quang (mP)							
	canxi (dưới dạng $CaCl_2$)				magie (dưới dạng $MgCl_2$)			
	không có mặt		có mặt		không có mặt		có mặt	
	avg	stdev	avg	stdev	avg	stdev	avg	stdev
REP 2006-FL	92	4,24	183	4,94	97	2,82	187	1,41
REP 2031-FL	58,5	23,3	114,5	2,1	52,5	3,5	89,5	2,1
REP 2055-FL	48	5,7	172	15,6	60,0	2,8	151,0	7,8
REP 2057-FL	59,5	1,4	152,5	6,36	61	4,24	136,5	2,83
REP 2139-FL	48	7,1	138,5	10,6	46	.4	142,5	7,8

Các số đo trung bình (avg) và độ lệch chuẩn (stdev) dựa trên hai phép đo lặp lại.

Trong mỗi trường hợp, sự gia tăng đáng kể về mức phân cực phát huỳnh quang thấy được với tất cả các ON đã được gán nhãn phát huỳnh quang với sự có mặt của canxi và magie, chứng tỏ sự tạo thành của các phức chất chelat ON với các cation kim loại hóa trị hai này. Những kết quả này chứng tỏ những vấn đề dưới đây:

. REP 2006, REP 2031, REP 2055, REP 2057 và REP 2139 tạo ra các đime và cao các phức chất có trật tự cao hơn với sự có mặt của các cation magie và canxi. Các phức chất này được kỳ vọng để tạo ra cùng với tất cả các cation kim loại đa hóa trị khác và với ON bất kỳ (như được thể hiện bằng NAP REP 2006 thoái biến). Sự tạo thành của các phức chất ON này bao gồm sự tương tác của các ON này với các cation kim loại hóa trị hai này.

. Sự tạo thành của các phức chất ON không thể là do sự lai hóa giữa các bazơ nitơ qua các tương tác Watson-Crick thông thường do REP 2031, REP 2055, REP 2057 và REP 2139 không thể tự lai hóa dưới các điều kiện thử nghiệm được sử dụng.

. Sự tạo thành của các phức chất ON là bền và tan trong dung dịch nước và do các phức chất này dường như kết hợp kim loại hoá trị hai kim loại dưới dạng một phần của phức chất được tạo thành, các phức chất ON này có tác động chelat hóa kim loại hóa trị hai từ dung dịch mà trong đó phức chất ON được tạo thành.

Ví dụ 3

Bào chế chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit.

Việc bào chế chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và polypeptit được tiến hành bằng cách sử dụng năm ON kháng virut khác nhau và bốn polypeptit kháng virut. Các ON được sử dụng là các NAP đã được chỉ ra từ trước là có hoạt tính kháng virut phổ rộng ở các virut đã phát triển, bao gồm HBV, HCV, influenza, RSV, Ebola, HSV-1 và HSV-2. Các ON này gồm REP 2006 (NAP đã phosphorothio hóa hóa thoái biến có 40mer), REP 2055 (SEQ ID NO: 2), REP 2057 (SEQ ID NO: 3), REP 2139 (SEQ ID NO: 18) và REP 2148 (SEQ ID NO: 11). Các NAP này được bào chế bởi các điều kiện tổng hợp pha rắn tiêu chuẩn trong thiết bị phản ứng kiểu dòng và còn được trao đổi muối để thay thế các ion trai dâu amoni bằng các ion trái dấu natri trong quá trình tinh chế. Trọng lượng phân tử axit tự do theo lý thuyết của các ON này lần lượt là (12612 - 13092), 12612, 13413 và 14094 và 12893 Da. Polypeptit kháng virut được sử dụng gồm interferon α-2b, thymosin α1, interferon α-2a đã pegyl hóa, và interferon λ1 (IL-29), tất cả chúng đều thể hiện hoạt tính kháng virut (Yang et al., 2008, Antiviral

Res., 77: 136-141; Fried et al., 2002, N. Engl. J. Med., 347: 975-982; Friborg et al., 2013, Antimicrob. Agents Chemmother. 57: 1312-1322). Tất cả các ON được tổng hợp theo các tiêu chuẩn hiện hành trong lĩnh vực kỹ thuật này để tổng hợp oligonucleotit pha rắn và được bào chế dưới dạng các muối natri thích hợp để cung cấp *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã được chấp nhận và được làm đông khô nhanh tới <10% hàm lượng nước trước khi cất giữ. REP 2006, REP 2055, REP 2057 và REP 2148 là các chế phẩm chưa được tinh chế chứa các lượng nhỏ của các sản phẩm tổng hợp không hoàn toàn thường xuất hiện trong quá trình tổng hợp pha rắn. REP 2139 được bào chế dưới dạng một chế phẩm có độ tinh khiết cao hầu hết các sản phẩm của quy trình tổng hợp không hoàn toàn là không có mặt. REP 2006, REP 2057 và REP 2139 được bào chế trước dưới dạng các dung dịch trong nước muối thường và được điều chỉnh tới 25mg/ml trong quá trình tạo chelat. REP 2055 cũng đã được bào chế trước dưới dạng dung dịch trong nước muối thường nhưng được điều chỉnh tới 12,5mg/ml trong quá trình bào chế chelat. Thymosin α1 là một peptit đã axyl hóa có đầu tận amino tổng hợp có 28 axit amin có trọng lượng phân tử 3108 Da và được tạo ra dưới dạng chế phẩm thương mại (Zadaxin^{TM}) và được bào chế dưới dạng 1,6mg/ml dung dịch trong nước để tiêm. interferon α-2b được tạo ra trong *E. coli* bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN và có trọng lượng phân tử 19271 Da. interferon α-2b được tạo ra ở dạng chế phẩm thương mại (Intron A^{TM}) và được bào chế dưới dạng 1X10^7 IU/ml dung dịch trong nước để tiêm còn chứa 1mg/ml albumin huyết thanh người (có trọng lượng phân tử khoảng 66500 Da). Interferon α-2a đã pegyl hóa là thể tiếp hợp đồng hóa trị của interferon α-2a và mạch bis-monometoxy polyetylen glycol có mạch nhánh đơn có trọng lượng phân tử xấp xỉ khoảng 60000 Da. Interferon α-2a đã pegyl hóa được tạo ra ở dạng chế phẩm thương mại (Pegasys^{TM}) đã pha loãng trước trong nước để tiêm chứa các hàm lượng vết của rượu benzylic với nồng độ 360ug/ml. Interferon λ1 tái tổ hợp đã tinh chế (IL-29) được tạo ra dưới dạng dung dịch không chất mang co 0,5mg/ml trong nước muối đệm phosphat của hãng Ebiosciences (Sandiego, U.S.A.) và có trọng lượng phân tử khoảng 20 kDa khi được xác định bằng điện di gel.

Canxi clorua được tạo ra dưới dạng 100mg/ml USP chế phẩm $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ trong nước để tiêm (Lifeshield™ của hãng Hospira). Magie sulfat được tạo ra dưới dạng 500mg/ml USP chế phẩm $MgSO_2 \cdot 7H_2O$ trong nước để tiêm (Baxter) và được pha loãng tới 100mg/ml trong nước muối thường. Để bào chế các phức chất chelat ON chứa canxi, magie hoặc canxi và magie, các dung dịch muối kim loại này được bổ sung dần từng giọt vào dung dịch ON cùng với trộn đều cho tới đạt được tỷ lệ được mong muốn giữa muối kim loại và ON. Đối với các phức chất chelat canxi, tỷ lệ giữa 30mg canxi clorua trên 100mg ON dược tạo ra trong dung dịch, chỉ khác là phức chất chelat canxi REP 2148, nó chứa 20mg canxi clorua trên 100mg ON. Đối với các phức chất chelat magie, tỷ lệ 30mg magie sulfat trên 100mg ON được tạo ra trong dung dịch. Đối với các phức chất chelat hỗn hợp canxi/magie, tỷ lệ giữa 15mg canxi clorua và 15mg magie sulfat trên 100mg ON được tạo ra trong dung dịch. Phương pháp này đã được chỉ ra là sự tạo thành của các phức chất chelat ON (như được mô tả trongCông bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ No. 2012/0046348). Khi kết thúc quá trình này, phức chất chelat ON là một dung dịch đồng nhất trong có màu hơi vàng nhạt.

Phức chất chelat ON /hỗn hợp polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa được bào chế bằng cách trộn nhẹ dung dịch phức chất chelat ON với dung dịch polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa theo tỷ lệ 1:1 tới thể tích cuối là 1mL.

Ví dụ 4

Đặc tả các chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit.

Để xác nhận tính đồng nhất của các ON và các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa có trong các chế phẩm được bào chế trong Ví dụ 3, chúng được tiến hành phân tích bằng phép sắc lỏng hiệu suất cao (HPLC) tiếp đó là phép phổ khối ion hóa điện tử (ESI-MS). Do sự thay đổi trong một khoảng rộng về khối lượng và chóa học của các loài ON và polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa có mặt trong các chế phẩm này, ba phương pháp HPLC khác nhau được sử dụng cho việc phana tích này:

Phương pháp Oligo: Pha rắn: 2 x 50mm ACE ™ C18 (3um)

Pha động: A = 1/0,1% HFIPA/DIEA

B = 65/0,075/0,0375% ACN/HFIPA/DIEA

Građien: 5-25% B trên 20 phút

70%B trong khoảng thời gian trên 2 phút ở 60°C

Tốc độ chảy: 0,4mL/phút

Phương pháp Protein 1: Pha rắn: 2 x 50mm PLRP-s (Agilent ™) 4000A (8um)

Pha động: A = 0,05% TFA trong ACN

B = 0,05% TFA trong ACN

C = 0,1% NH_4OH trong H_2O

D = 0,1% NH_4OH trong 40/40/20 ACN/MeOH/H_2O

Građien: 80/20% C/D rửa trong 1 phút để làm sạch

(tùy ý 20% D rửa trong 1 phút để làm sạch)

20% - 100% D trên 15 phút, 100% B trong khoảng thời gian trên 2 phút (tùy ý 20-70% B trên 16 phút)

Tốc độ chảy: 0,5mL/phút để rửa

0,3mL/phút cho građien

Phương pháp protein 2: Pha rắn: 2 x 50mm PLRP-s (Agilent ™) 4000A (8um)

Pha động: A = 0,05% TFA trong ACN

B = 0,05% TFA trong ACN

C = 0,1% NH_4OH trong H_2O

D = 0,1% NH_4OH trong 40/40/20 ACN/MeOH/H_2O

Građien: 80/20% C/D rửa trong 1 phút để làm sạch

80/20%A/B - 100% B trên 15 phút

100% B trong khoảng thời gian trên 2 phút

Tốc độ chảy: 0,5mL/phút để rửa

0,3mL/phút cho građien

Thiết bị được sử dụng là LTQ-Orbitrap Discovery vận hành theo chế độ quét LTQ bằng các ion âm cho phương pháp oligo và với ché độ quét khối lượng cao Orbitrap ở độ phân giải 7500 bằng các ion dương cho cả hai phương pháp protein. Acoynyms: ACN = axetonitril, TFA = axit trifloaxetic, HFIPA = hexafloroisopropanol, DIEA = N,N-điisopropyletylamin.

Các kết quả từ các phân tích này có thể tìm thấy trong các Fig. 5-95. Tất cả các sắc ký HPLC được lập đồ thị từ dữ liệu dòng ion tổng (TIC) trong đó các thời gian lưu đỉnh (pic) kèm theo các nhận biết khối lượng từ ESI-MS tiếp sau (trừ các Fig. 39, 43, 47, 51, 55, 77, 81, 91 và 95 ở đó nó bị ngăn chặn bởi sự có mặt của thể tiếp hợp polyetylen glycol trong interferon α-2a đã pegyl hóa). Đối với các trường hợp chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và thymosin α1, phương pháp oligo là thỏa đáng để phân tích cả hai loài đồng thời. Đối với các chế phẩm khác chứa các protein trọng lượng phân tử lớn, phép phân tích ON và phép phân tích polypeptit được tiến hành trên cùng một mẫu nhưng sử dụng các phương pháp HPLC khác nhau (như được chỉ ra trong các Fig. 5-95).

Phép phân tích LC-MS về hàm lượng ON của tất cả các chế phẩm đã chứng minh rằng tất cả các ON có mặt trong các chế phẩm này tương ứng với độ tinh khiết được kỳ vọng của chúng: các lượng nhỏ sản phẩm tổng hợp ON không hoàn toàn được quan sát trong các phân tích HPLC bằng cách sử dụng phương pháp oligo cho REP 2055 (các Fig. 5, 24, 40 56, 68, 71, 74 và 78), REP 2057 (các Fig. 9, 27 và 44) và REP 2148 (các Fig.17, 33, 52 và 64) nhưng không mặt trong trường hợp REP 2139 (các Fig. 13, 30, 48, 60, 82, 85, 88 và 92). Trong tất cả các trường hợp, ESI-MS của các pic ON đứng đầu (chủ yếu) ON gần như tương quan chính xác với các trọng lượng phân tử được kỳ vọng của REP 2055, REP 2057, REP 2139 và REP 2148. Đối với REP 2006, ESI-MS của các pic dẫn đầu tạo ra pic có sự phân bố rộng nằm trong khoảng 12612-13092 Da, phù hợp với bản chất thoái biến của nó (các Fig. 22 và 37).

Để phân tích các thành phần chứa interferon α-2b, các sắc ký HPLC chạy bằng cách sử dụng phương pháp protein 1 đã cho thấy các pic có độ phân giải kém, lớn phù hợp với sự có mặt của nhiều hơn một polypeptit trong các chế phẩm

này (các Fig. 7, 11, 15 và 19) nhưng pic dẫn đầu này đã phana giải thành hai loài khối lượng riêng biệt tương ứng gần như chính xác với các trọng lượng phân tử được kỳ vọng cho interferon α-2b và albumin ở người (các Fig. 8, 12, 16 và 20).

Đối với chế phẩm chứa thymosin α1, các sắc ký HPLC thu được từ phương pháp oligo 1 có thể giành được một pic nổi bật thứ hai trong cùng một quá trình tách với thời gian lưu nhỏ hơn nhiều so với pic ON (chủ yếu) (các Fig. 21, 24, 27, 30, 33, 68, 71, 82 và 85) do trọng lượng phân tử tương đối thấp của polypeptit này. Trong mọi trường hợp, ESI-MS của pic thứ hai này đều tương quan gần như chính xác với trọng lượng phân tử được mong muốn của thymosin α1 (các Fig. 23, 26, 29, 32, 35, 70, 73, 84 và 87).

Đối với các chế phẩm chứa interferon α-2a đã pegyl hóa, phép phân tích LC-MS là rất phức tạp do sự có mặt của thể tiếp hợp đã pegyl hóa, nó tạo ra nhiều loài ion làm cho việc giải chập phổ khối cho polypeptit đã pegyl hóa bất kỳ rất khó khăn. Tuy nhiên, bằng cách sử dụng phương pháp protein 2, dữ liệu HPLC từ các chế phẩm chứa interferon α-2a đã pegyl hóa tất cả đều thể hiện các pic nổi bật tương đương phù hợp với các thời gian lưu được kỳ vọng cho một polypeptit đã pegyl hóa (các Fig. 38, 42, 46, 50, 54, 76, 80, 90 và 94). Các phân tích ESI-MS cho các pic này trong tất cả các trường hợp đều thể hiện một nhóm tương tự của các tín hiệu liên quan tới sự pegyl hóa từ m/z 600-100- và 1500 - 3600 phù hợp với sự có mặt của protein đã pegyl hóa (các Fig. 39, 43, 47, 51, 55, 77, 81, 91 và 95).

Một phần trong số toàn bộ các chế phẩm oligonucleotit chelat-polypeptit được bào chế trong Ví dụ 3 cũng được tiến hành xác định canxi và hoặc magie bằng quang phổ phát xạ quang học huyết tương được kết hợp cảm ứng (ICP-OES). Việc xác định canxi và magie cho mỗi chế phẩm được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3

Xác định kim loại trong các chế phẩm phức chất chelat ON-polypeptit

ON có mặt (dưới dạng chelat)	Polypeptit có mặt	Hàm lượng kim loại (% tổng khối lượng xác định được bằng ICP-OES)	
		Canxi	Magie
REP 2006	thymosin α1	0,107%	không có mặt
REP 2006	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,0991%	không có mặt
REP 2055	interferon α-2b	0,0242%	không có mặt
REP 2055	thymosin α1	0,0393%	không có mặt
REP 2055	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,0448%	không có mặt
REP 2055	interferon λ1	0,0515%	không có mặt
REP 2057	interferon α-2b	0,0987%	không có mặt
REP 2057	thymosin α1	0,101%	không có mặt
REP 2057	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,114%	không có mặt
REP 2139	interferon α-2b	0,0953%	không có mặt
REP 2139	thymosin α1	0,0922%	không có mặt
REP 2139	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,104%	không có mặt
REP 2139	interferon λ1	0,0959%	không có mặt
REP 2148	interferon α-2b	0,0615%	không có mặt
REP 2148	thymosin α1	0,061%	không có mặt
REP 2148	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,0641%	không có mặt
REP 2148	interferon λ1	0,065%	không có mặt
REP 2055	thymosin α1	không có mặt	0,0199%
REP 2055	thymosin α1	0,0248%	0,00959%
REP 2055	interferon α-2a đã pegyl hóa	không có mặt	0,0181%
REP 2055	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,0244%	0,00938%
REP 2139	thymosin α1	không có mặt	0,0361%

ON có mặt (dưới dạng chelat)	Polypeptit có mặt	Hàm lượng kim loại (% tổng khối lượng xác định được bằng ICP-OES)	
REP 2139	thymosin α1	0,0453%	0,0175%
REP 2139	interferon α-2a đã pegyl hóa	không có mặt	0,0340%
REP 2139	interferon α-2a đã pegyl hóa	0,0482%	0,0184%

Các kết quả từ Các ví dụ 3 và 4 chứng tỏ những vấn đề dưới đây:

1. Các chế phẩm chứa các phức chất chelat ON bao gồm canxi, magie hoặc hỗn hợp canxi/magie và các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa có thể được bào chế là thích hợp để cung cấp ngoài đường tiêu hóa.

2. Cả ON lẫn polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa trong các chế phẩm theo sáng chế đều không trải qua sự thay đổi hoá học có thể phát hiện được bất kỳ, như được chứng tỏ bởi sự tương quan gần như hoàn toàn giữa các trọng lượng phân tử quan sát được và các trọng lượng phân tử theo lý thuyết cho REP 2055, REP 2057, REP 2139, REP 2148, interferon α-2b, thymosin α1 và interferon λ1.

3. Trong trường hợp các chế phẩm chứa interferon α-2a đã pegyl hóa, các ON không thay đổi, và các thay đổi polypeptit (nếu có bất kỳ) không thể phát hiện được.

Từ những kết quả này, các kết luận dưới đây có thể được đưa ra:

1. REP 2006 là một ON thoái biến hoàn toàn và do đó là một mô hình nguyên mẫu về các đặc tính hóa lý thường thấy với tất cả các ON. Do đó, ON bất kỳ có thể được bào chế dưới dạng phức chất chelat có thể tương thích với các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa này trong dung dịch.

2. REP 2006, REP 2055, REP 2057 và REP 2148 là ADN trong khi REP 2139 là ARN. Do đó, ON ARN hoặc ADN hoặc ARN/ADN hydrid bất kỳ có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit.

3. REP 2006, REP 2055 và REP 2057 có các riboza không được cải biến trong khi REP 2139 có mỗi riboza 2'O được metyl hóa. Do đó, cải biến 2' riboza sẽ tương thích với việc bào chế chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit.

4. REP 2139 và REP 2148 bao gồm mỗi xytosin được cải biến tiếp dưới dạng

5'metylxytosin. Do đó, các ON chứa các bazơ được cải biến có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa.

5. Chế phẩm chứa phức chất chelat ON và polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa sẽ tương thích với cation kim loại hóa trị hai dược dụng bất kỳ như canxi và/hoặc magie.

6. Bốn polypeptit được sử dụng để bào chế các chế phẩm có các cấu trúc khác nhau rất nhiều: thymosin α1 là một polypeptit tổng hợp nhỏ, interferon α-2b và interferon λ1 là các polypeptit tái tổ hợp lớn và interferon α-2a đã pegyl hóa là một peptit tái tổ hợp lớn với một thể tiếp hợp đã pegyl hóa phức tạp lớn. Do đó, chế phẩm chứa các phức chất chelat ON và các polypeptit có thể được bào chế một cách thành công nhờ sử dụng một khoảng rộng các polypeptit từ các polypeptit tổng hợp nhỏ tới các polypeptit tái tổ hợp lớn với các thể tiếp hợp phức tạp như polyetylen glycol. Có thể có hạn chế duy nhất là polypeptit được đề cập có thể tan trong dung dịch nước. Ngoài ra, việc sử dụng BSA làm protein mang trong Intron A (được sử dụng làm nguồn cấp interferon α-2b) không gây ảnh hưởng tới độ bền của các chế phẩm được bào chế bằng chế phẩm polypeptit này.

7. Như được mô tả ở trên, sự pegyl hóa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để cải thiện khả năng chịu dung nạp và hành vi dược động học của các polypeptit và nhiều polypeptit đã pegyl hóa hiện đang sử dụng làm các thuốc đã được phê chuẩn (xem ở trên). Do đó, điều đã được chứng tỏ là các chế phẩm theo sáng chế có thể chịu dung nạp tốt sự có mặt của peptit đã pegyl hóa và tính hữu dụng khi kết hợp phức chất chelat ON và peptit đã pegyl hóa để cải thiện đáp ứng kháng virut và ở người bệnh (xem Ví dụ 6 ở dưới) cho một sự mô tả rõ ràng cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng polypeptit bất kỳ được dự liệu ở đây là một phần của chế phẩm được mô tả cũng có thể có mặt dưới dạng polypeptit đã pegyl hóa. Ví dụ, thymosin α1 có thể được pegyl hóa, interferon α-2b có thể được pegyl hóa (phiên bản đã pegyl hóa của interferon α-2b, Peg-intron™ là thuốc hiện đã được phê chuẩn), và interferon λ1 có thể được pegyl hóa (phiên bản đã pegyl hóa của interferon λ1 hiện đang được nghiên cứu phát triển lâm sàng dưới dạng

tác nhân kháng virut).

Ví dụ 5

Các NAP ức chế sự vận chuyển HBsAg ra khỏi các tế bào

Kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) đã được chỉ ra là phong bế nhiều dấu hiệu của đáp ứng miễn dịch cho nhiễm virut HBV (Cheng et al., J. Hepatology 43: 465-471; Moucari et al., Hepatology 49: 1151-1157; Vanlandschoot et al., J. Gen. Virol. 83: 1281-1289; Woltman et al., PloS One 6: e15324; Wu et al., Hepatology 49: 1132-1140 và Xu et al., Mol. Immunology 46: 2640-2646). Do đó, việc loại trừ tuần hoàn HBsAg có thể là một yếu tố lý tưởng cho phép phục hồi khả năng miễn dịch ở bệnh nhân mắc nhiễm virut viêm gan B mãn tính. Một phương pháp hiệu quả để loại trừ HBsAg trong vòng tuần hoàn là ngăn ngừa sự tạo thành và/hoặc sự giải phóng các SVP từ các tế bào bị nhiễm bệnh (các SVP là chất mang chủ yếu của HBsAg trong máu). Hình thái và sự vận chuyển nội bào của SVPs có thể được mô hình hóa *in vitro* trong các tế bào BHK-21 bởi việc biểu hiện dạng nhỏ của HBsAg protein (sHBsAg) là dạng đã làm giàu các SVP một cách đặc biệt. Hệ mô hình này được xem là một mô hình đại diện cho hình thái và sự vận chuyển các HBV SVP ở người bệnh (Patient et al., J. Virology 81: 3842-3851). Do vai trò quan trọng của HBsAg huyết thanh trong việc tạo tính mạn của nhiễm virut HBV, nên khả năng của các hợp chất để phong bế sự tạo thành của các SVP hoặc sự vận chuyển nội bào của chúng trong mô hình này chứng tỏ hoạt tính kháng virut của chúng đối với HBV.

Các hợp chất NAP khác nhau được thử nghiệm trong các tế bào BHK-21 biểu hiện sHBsAg bao gồm các NAP đã phosphorothio hóa hóa thoái biến hoàn toàn REP 2006 và REP 2107 (2107 cũng có tất cả các riboza có cải biến 2'O metyl), NAP thoái biến đã 2'O metyl hóa hoàn toàn, không được phosphorothio hóa (REP 2086) cũng như các NAPs gồm trình tự poly AC: REP 2055 (SEQ ID NO: 2) và REP 2148 (SEQ ID NO: 11). Các NAP này được đưa vào các tế bào BHK-21 nhờ việc mở lỗ bằng điện đồng thời làm làm khuân ARN để biểu hiện sHBsAg bằng cách sử dụng sự mở lỗ bằng điện. Hoạt tính trong hệ mô hình BHK được đánh giá bằng cách hình dung protein HBsAg nằm bên trong các tế bào

BHK-21 bằng kính hiển vi phát huỳnh quang miễn dịch. Các hợp chất được đánh giá là có hoạt tính nếu như HBsAg được hạn chế ở khoảng trống quanh nhân và ngăn không cho vận chuyển tới ngoại vi của tế bào (sự tiết). Hoạt tính của các hợp chất NAP khác nhau được tóm tắt trong Bảng 4 ở dưới.

Bảng 4

Ảnh hưởng của các NAP khác nhau tới sự vận chuyển HBsAg trong các tế bào BHK-21

NAP	HBsAg được lưu giữ trong khoảng trống quanh nhân	sự vận chuyển HBsAg tới ngoại vi tế bào
đối chứng (không có mặt NAP)	-	++++
REP 2006	++++	-
REP 2107	+++	+
REP 2086	-	++++
REP 2055 (SEQ ID NO: 2)	++++	-
REP 2148 (SEQ ID NO: 11)	++++	-

- = tác dụng không được quan sát

+ tới ++++ = tác dụng từ biến tới hoàn toàn quan sát được

Các kết quả với việc xử lý các tế bào BHK-21 biểu hiện sHBsAg bằng REP 2006 và REP 2107 chứng tỏ khả năng của các NAP để phong bế sự vận chuyển sHBsAg theo kiểu hình không phụ thuộc vào trình tự. Việc không có hoạt tính với REP 2086 chứng tỏ rằng hoạt tính này là phụ thuộc một cách chặt chẽ vào sự có mặt của sự phosphorothio hóa. Ngoài ra, khả năng này được lưu giữ với sự có mặt của cải biến 2'riboza (trong REP 2107) và cải biến bazơ (5'metylxytosin trong trường hợp REP 2148). Ngoài ra, REP 2107, REP 2055 và REP 2139 đã biết là hoàn toàn không có hoạt tính kích thích miễn dịch bất kỳ và có hoạt tính tương đương với REP 2006. Ngoài ra, chuỗi đã được xác định của poly AC (REP 2055 và REP 2148) có hoạt tính tương đương với chuỗi thoái biến (REP 2006 và REP 2107).

Những kết quả này cho thấy rằng nằm trong phạm vi của trình thoái biến của và các chuỗi chứa các đơn vị lặp lại của AC (và do đó cả CA) và các chuỗi khác cũng bao gồm các đơn vị lặp lại của nucleotit purin/pyrimiđin khác nhau (như TG và GT hoặc UG và GU) và bao gồm các cải biến 2'riboza hoặc các cải biến bazơ hoặc bao gồm cả cải biến 2'riboza lẫn cải biến bazơ (xem REP 2139 trong Ví dụ 6), các NAP đã phosphorothio hóa sẽ được kỳ vọng là có khả năng phong bế sự tạo thành và sự vận chuyển nội bào và sự tiết các SVP từ các tế bào bị nhiễm ở các độ dài oligonucleotit từ 20 - 120 nucleotit như được mô tả trong các patent Mỹ 8,008,269, 8,008,270 và 8,067,385.

Ví dụ 6

Trị liệu kết hợp để điều trị viêm gan B mạn tính ở người bệnh

REP 2055 là muối natri đơn của ON đã phosphorothio hóa hóa (SED ID NO: 2). REP 2139-Ca là phức chất chelat canxi của phosphorothioat oligonucleotit REP 2139 (SEQ ID NO: 18) được bào chế trong nước muối thường bằng cách sử dụng tỷ lệ 30mg $CaCl_2$ cho mỗi 100mg oligonucleotit có mặt. REP 2055 và REP 2139 là các NAP và họ các hợp chất này là các hợp chất kháng virut phổ rộng có hiệu quả đối với các virut đã phát triển (Bernstein et al., 2008, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 2727-2733; Cardin et al., 2009, Virology Journal, 6: 214; Guzman et al., 2007, Antiviral Therapy, 12: 1147-1156; Lee et al., 2008, Virology, 372: 107-117; Matsumura et al., 2009, Gastroenterology, 137: 673-681; Vaillant et al., 2006, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1393-1401 và các patent Mỹ số 8,008,269B, 8,008,270 và 8,067,385). Các phức chất chelat không tác động tới hoạt tính sinh học của các NAP hoặc các loài ON khác và do vậy chế phẩm REP 2139 dưới dạng phức chất chelat canxi không ảnh hưởng tới hoạt tính kháng virut của nó. Duy nhất cải biến NAP cần thiết cho hoạt tính kháng virut là sự phosphorothio hóa mỗi liên kết trong ON. Các cải biến bổ sung bao gồm các cải biến 2' riboza (như 2'O metyl hóa) và các cải biến bazơ (như 5'metylxytosin và 4'thiouraxil) có ảnh hưởng không đáng kể tới hoạt tính kháng virut của các NAP nhưng có thể được sử dụng để tối ưu hóa khả năng chịu dung nạp ở người bệnh.

Interferon α-2a đã pegyl hóa được bán dưới nhãn hiệu hàng hóa Pegasys™ của Roche Inc. (Basel, Switzerland) và được phê chuẩn để điều trị bệnh nhiễm virut HBV mạn tính. Thymosin α1 được bán dưới nhãn hiệu hàng hóa Zadaxin™ của SciClone Pharmaceuticals (Foster City, California, U.S.A.) và cũng đã được phê chuẩn để điều trị bệnh nhiễm virut HBV mạn tính ở nhiều quốc gia châu Á.

Để kiểm tra liệu xem tác dụng kháng virut của việc điều trị NAP kết hợp với trị liệu miễn dịch (kích thích các đáp ứng miễn dịch thích ứng và bẩm sinh) có thể cải thiện đáp ứng kháng virut ở bệnh nhân nhiễm virut HBV mạn tính, bệnh nhân đang được đơn trị liệu bằng REP 2055 và trị liệu kết hợp cùng với REP 2139-Ca và hoặc là thymosin α1 (Zadaxin™ - được đưa ra dưới dạng 1,6mg tiêm dưới da hai lần môi tuần) hoặc interferon α-2a đã pegyl hóa (Pegasys™ - được đưa ra dưới dạng 180mg tiêm dưới da một lần mỗi tuần) theo chế độ đang phát triển NAP của chúng.

Cả REP 2055 lẫn REP 2139-Ca, khi được sử dụng trong đơn trị liệu có hoạt tính như nhau để phong bế sự giải phóng HBsAg có cơ chế trị liệu tác động của tất cả các NAP đối với nhiễm HBV nói chung. REP 2055 và REP 2139-Ca, khi được đưa ra với các chế độ đơn trị liệu tương đương, tạo ra sự làm sạch HBsAg trong huyết thanh của bệnh nhân đã bị nhiễm HBV ở 7/8 và 9/12 bệnh nhân, một cách tương ứng và việc làm sạch HBsAg huyết thanh có thể tương đương với cả hai loại thuốc (xem Bảng 5), thể hiện hoạt tính kháng virut tương đương của các NAP này khi được đưa ra dưới dạng các muối natri hoặc dưới dạng các phức chất chelat.

Bảng 5

REP 2055 và REP 2139-Ca làm sạch một cách hiệu quả và tương đương HBsAg huyết thanh ở các bệnh nhân nhiễm virut HBV mạn tính .

NAP	Người bệnh có đáp ứng	HBsAg huyết thanh xử lý sơ bộ (mIU /mL*)	HBsAg huyết thanh sau khi xử lý (mIU /mL*)
REP 2055	1	934	0,25
	2	1885,4	0,38

	3	384,1	0
	4	126645,07	0,03
	5	158180	0
	6	36996,00	7
	7	4762,5	50,6
REP 2139-Ca	1	70050	0,19
	2	13400	0
	3	3654,3	0,34
	4	47689,7	180,44
	5	107659,6	32,15
	6	58937,87	9,91
	7	17988,99	29,21
	8	125000	0,01
	9	1288,56	0,02

*như được xác định bởi thẻ nghiệm định lượng Abbott Architect™ cho HBsAg

Việc điều trị trên cơ sở interferon thường dẫn tới 25% số bệnh nhân có được sự kiểm soát nhiễm HBV của chúng sau khi dừng điều trị (ADN HBV huyết thanh <500 bản sao/ml; Mourcari et al., 2009, Hepatology 49: 1151-1157) và việc điều trị thymosin α1 nhìn chung được xem là có hiệu quả tương đương (Yang et al., 2008 Antiviral Research 77: 136-141).

Việc đơn trị liệu REP 2055 dẫn đến đạt được sự kiểm soát nhiễm HBV (ADN HBV huyết thanh <500 bản sao/mL) sau khi dừng điều trị ở 3/7 bệnh nhân (43%). Việc điều trị REP 2139-Ca, có hiệu quả giống hệt với REP 2055 để làm sạch HBsAg huyết thanh, khi được đưa ra dưới dạng đơn trị liệu) kết hợp với thymosin α1 hoặc interferon α-2a đã pegyl hóa dẫn tới sự kiểm soát virut ở 8/9 bệnh nhân (89%) bị nhiễm HBV (xem Bảng 6).

Bảng 6

Kết quả của đáp ứng virut (SVR) bằng đơn trị liệu NAP hoặc kết hợp NAP/trị liệu miễn dịch

NAP	Người bệnh có đáp ứng	Trị liệu miễn dịch	SVR ở 12 tuần sau điều trị *
REP 2055	1	không	Có
	2		Không
	3		Có
	4		Không
	5		Có
	6		Không
	7		Không
REP 2139-Ca	1	Zadaxin™	Có
	2	Zadaxin™	Có
	3	Zadaxin™	Có
	4	Zadaxin™ / Pegasys ™	Có
	5	Zadaxin™ / Pegasys ™	Có
	6	Pegasys ™	Có
	7	Pegasys ™	Không
	8	Pegasys ™	Có
	9	Pegasys ™	Có

*ADN HBV huyết thanh <500 bản sao/mL

Những kết quả này chứng tỏ rằng tác dụng kết hợp của phức chất chelat ON kháng virut (trong ví dụ này là REP 2139-Ca) và polypeptit kháng virut (trong ví dụ này là interferon α-2a đã pegyl hóa hoặc thymosin α1) có thể dẫn đến sự cải thiện về sự kiểm soát sau điều trị nhiễm HBV ở người bệnh và còn chứng tỏ khả năng hữu dụng của việc điều trị kết hợp với phức chất chelat ON và polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa ở người bệnh nhiễm virut.

Các chế phẩm chứa phức chất chelat ON kháng virut và polypeptit kháng virut có thể được mong muốn do chúng có thể cải thiện sự đáp ứng kháng virut tổng thể ở bệnh nhân nhiễm virut (bao gồm nhiễm HBV) bởi việc cung cấp đồng

thời cả hai tác nhân (tính hữu dụng của nó đã được mô tả trong ví dụ này).

Chelat ON kháng virut trong chế phẩm nêu trên có thể bao gồm ON kháng virut bất kỳ như được mô tả ở trên và trong trường hợp HBV có thể đặc biệt bao gồm REP 2055 (SEQ ID NO: 3, REP 2139 (SEQ ID NO: 18), REP 2148 (SEQ ID NO: 11) hoặc hợp chất NAP khác bất kỳ phong bế sự vận chuyển HBsAg như được mô tả ở trên.

Polypeptit trong chế phẩm nêu trên có thể bao gồm polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut kháng virut bất kỳ và trong trường hợp HBV có thể đặc biệt bao gồm interferon α-2b, interferon α-2b đã pegyl hóa, interferon α-2a đã pegyl hóa, thymosin α1, interferon λ1 hoặc interferon λ1 đã pegyl hóa.

Một tác dụng có ích tương tự với các điều trị kết hợp được mô tả ở trên có thể được tin là chỉ ở nhiễm HBV mà còn ở các nhiễm virut khác như viêm gan C, cúm, RSV và các virut khác có thể đáp ứng tác dụng của ON kháng virut hoặc polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut. Mặc dù các NAP được sử dụng trong ví dụ này, nhưng các cải thiện như vậy về kết quả kháng virut ở người bệnh có thể đạt được với các ON kháng virut khác tác động bởi các cơ chế phụ thuộc vào trình tự được bào chế dưới dạng các phức chất chelat khi kết hợp với polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut. Các tác dụng này có thể còn có hiệu quả rộng hơn trong các nhiễm virut khác cùng với sự kết hợp thích hợp của phức chất chelat oligonucleotit kháng virut và polypeptit kháng virut. Ví dụ, các NAP có hoạt tính rộng đối với nhiều virut đã phát triển khác như viêm gan C, cúm, virut hợp bào hô hấp và virut xytomegalo và do đó các phức chất chelat NAP, kết hợp với polypeptit kháng virut thích hợp (nó có thể là thymosin α1 hoặc interferon α-2a đã pegyl hóa nhưng cũng có thể là một polypeptit kháng virut khác thích ứng hơn với chứng nhiễm virut cụ thể) có thể được kỳ vọng để tạo ra đáp ứng kháng virut tốt hơn ở đối tượng bị nhiễm virut so với cả hai hợp chất trong đơn trị liệu. Theo một ví dụ khác, phức chất chelat của miravirsen (SEQ ID NO: 7) có thể kết hợp với interferon (đã pegyl hóa hoặc chưa) để cải thiện đáp ứng kháng virut ở bệnh nhân bị nhiễm virut viêm gan C.

Các tác dụng có lợi đã được chứng minh với các phức chất chelat NAP và

thymosin α1 hoặc interferon α-2a đã pegyl hóa có thể cũng được kỳ vọng để xuất hiện cùng với các phức chất chelat ON của các nhóm khác của oligonucleotit như các ON đối nghĩa hoặc siARN hoặc miARN hoặc aptamer đã được phát triển kháng chứng nhiễm virut cụ thể hoặc oligonucleotit kích thích miễn dịch. Do đó, phương pháp kết hợp phức chất chelat ON có nguồn gốc từ bất kỳ trong số các nhóm ON này cùng với polypeptit kháng virut thích hợp có thể được kỳ vọng để sử dụng trị liệu trong một khoảng rộng các nhiễm virut đã chứng tỏ các đáp ứng với oligonucleotit kháng virut (hoặc là dưới dạng muối natri hoặc phức chất chelat) hoặc polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut trong đơn trị liệu.

Theo quan điểm của các ví dụ nêu trên, có thể dự liệu được hai hoặc nhiều phức chất chelat ON kháng virut (ví dụ, chứa NAP và ON đối nghĩa hoặc chứa NAP và siARN kháng virut) có thể được kết hợp với một hoặc nhiều polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut (ví dụ, interferon α-2a đã pegyl hóa và thymosin α1 hoặc thymosin α1 và interferon λ1 đã pegyl hóa), hoặc là trong cùng hoặc trong nhiều chế phẩm để được cấp qua các đường như nhau hoặc khác nhau.

Trong ví dụ nêu trên, REP 2139-Ca được cấp bằng cách truyền tĩnh mạch và interferon α-2a đã pegyl hóa hoặc thymosin α1 được cấp bằng cách cung cấp dưới da. Trên cơ sở các vấn đề nêu trong ví dụ ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng dự đoán rằng phức chất chelat ON và polypeptit có thể được đưa ra đồng thời trong cùng một chế phẩm (như chế phẩm đã mô tả trong các Ví dụ 3 và 4 ở trên) hoặc là bằng cách tiêm dưới da hoặc truyền tĩnh mạch và có thể được dự đoán là có tác dụng có lợi giống như các tác nhân này được cấp một cách riêng biệt (hoặc là theo các đường dùng như nhau hoặc khác nhau).

Các tác dụng có lợi của việc điều trị kết hợp như được mô tả ở đây cùng với phức chất chelat ON và polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa kháng virut trong điều trị kháng virut như được mô tả ở đây dự báo một cách rõ rệt các tác dụng có lợi của việc điều trị kết hợp với các chelat ON và các polypeptit hoặc polypeptit đã pegyl hóa trong các điều trị trị liệu khi cả hai tác nhân này có phạm vi hoạt tính nhất định trong đơn trị liệu. Ví dụ, ON đối nghĩa hướng đích gen liên

quan tới ung thư (do đó có hoạt tính kháng ung thư), có thể được bào chế dưới dạng phức chất chelat ON như được mô tả ở đây và còn được kết hợp tác nhân trị liệu miễn dịch đã biết có phạm vi hoạt tính kháng ung thư nhất định khi được sử dụng thông thường trong đơn trị liệu. Các điều trị trị liệu như vậy có thể bao gồm ung thư, xơ cứng rải rác, và bệnh Alzheimer.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa phức chất chelat oligonucleotit (ON) mà bao gồm hai hoặc nhiều ON được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, và ít nhất một polypeptit được chọn trong số:

thymosin α1;

α-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

β-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

γ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

λ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

interferon α-2a hoặc α-2b hoặc α-N3;

interferon β-1a hoặc β-1b;

interferon γ-1b;

interferon λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

interferon đã pegyl hóa α-2a hoặc α-2b hoặc λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

Myrcludex B;

xytokin kháng virut bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó; và

Protein thymic A.

2. Dược phẩm chứa phức chất ON kháng virut mà bao gồm hai hoặc nhiều ON kháng virut được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, và ít nhất một polypeptit kháng virut được chọn trong số:

thymosin α1;

α-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

β-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

γ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

λ-interferon bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó;

interferon α-2a hoặc α-2b hoặc α-N3;

interferon β-1a hoặc β-1b;

interferon γ-1b;

interferon λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

interferon đã pegyl hóa α-2a hoặc α-2b hoặc λ1 hoặc λ2 hoặc λ3;

Myrcludex B;

xytokin kháng virut bất kỳ hoặc các dẫn xuất đã pegyl hóa của nó; và

Protein thymic A.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là canxi.

4. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là magie.

5. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là sắt (2+), mangan, đồng hoặc kẽm.

6. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai bao gồm hai hoặc nhiều cation kim loại hóa trị hai khác nhau .

7. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai gồm canxi và magie.

8. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON dạng sợi kép.

9. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON có ít nhất một liên kết phosphorothioat.

10. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON đã phosphorothio hóa hoàn toàn.

11. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON có một riboza đã cải biến ở vị trí 2'.

12. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON mà có riboza đã O-metyl hóa ở vị trí 2'.

13. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON chứa ít nhất 5'metylxytosin.

14. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON trong đó mỗi xytosin cũng là 5'metylxytosin.

15. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON trong đó mỗi riboza được O-metyl hóa ở vị trí 2' và trong đó mỗi xytosin cũng là 5'metylxytosin.

16. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa

oligonucleotit có trình tự được chọn từ các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1-6 và 10-18.

17. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa oligonucleotit được chọn từ các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 7-9.

18. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng dùng dưới da.

19. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng dùng để truyền tĩnh mạch.

20. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng dùng cho ít nhất một đường trong số các đường dùng sau: hít khí dung, trong nhãn cầu, tiêu hóa qua đường miệng, tan trong ruột, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm vào tủy sống, truyền vào tủy sống, trong khí quản, tiêm tĩnh mạch và tại chỗ.

21. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

22. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

23. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trong đó phức chất chelat ON chứa ít nhất một ON có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

24. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất trong số các chất sau: entecavir, tenofovir disoproxil fumarat, telbuvidin, adefovir dipivoxil, lamivudin, ribavirin, telaprevir, boceprevir, GS-7977, tegobuvir, zanamivir, oseltamivir, ganciclovir, foscarnet, acyclovir, zidovudin, abacavir, lopinavir, ritonavir hoặc efavirenz.

25. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang.

26. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

27. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm hai hoặc nhiều ON được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, chứa ít nhất một oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

28. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2a đã pegyl hóa.

29. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và thymosin α1.

30. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và thymosin α1.

31. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và thymosin α1.

32. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, và interferon α-2b.

33. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm hai hoặc nhiều ON được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, chứa ít nhất một oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon α-2b.

34. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2b.

35. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

36. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

37. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và thymosin α1 đã pegyl hóa.

38. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon α-2b đã pegyl hóa.

39. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON bao gồm hai hoặc nhiều ON được liên kết giữa các phân tử bởi cation hóa trị hai, chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon λ-2b đã pegyl hóa.

40. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon α-2b đã pegyl hóa.

41. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon λ1.

42. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon λ1.

43. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon λ1.

44. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và interferon λ1 đã pegyl hóa.

45. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, và interferon λ1 đã pegyl hóa.

46. Dược phẩm chứa phức chất chelat ON chứa oligonucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, và interferon λ1 đã pegyl hóa.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> REPLICOR INC.
Andrew VAILLANT
Michel BAZINET

<120> Dược phẩm chứa phức chất chelat oligonucleotit-polypeptit

<130> 05016051-37PCT

<150> US 61/695035
<151> 2012-08-30

<150> US 61/648711
<151> 2012-05-18

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2031, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<400> 1
ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc
40

<210> 2
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2055, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<400> 2
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
40

<210> 3
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2057, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<400> 3
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag
40

<210> 4
<211> 40

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn, 2' O metylriboza đầy đủ, mỗi xytosin đã 5' metyl hóa

<400> 4
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
40

<210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2056, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<400> 5
tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc
40

<210> 6
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2133, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<400> 6
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg
40

<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miARN, LNA/ADN, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 3, 6, 9, 12, 15
<223> LNA

<220>
<221> bazơ đã cải biến
<222> 12, 15
<223> m5c

<400> 7
ccattgtcac actcca
16

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 20, 21
<223> đeoxythymiđin

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 1-18
<223> ribonucleotit

<400> 8
ggcuccuuag caaagucaag tt
22

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 19, 20
<223> đeoxythymiđin

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 1-18
<223> ribonucleotit

<400> 9
cuugacuuug cuaagagcct t
21

<210> 10
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn

<400> 10
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
40

<210> 11
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2148, phosphorothio hóa hoàn toàn, C = 5'
metylxytiđin

<400> 11
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
40

<210> 12
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn, C = 5' metylxytiđin

<400> 12
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
40

<210> 13
<211> 40
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn, 2’ O metyl riboza đầy đủ

<400> 13
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
40

<210> 14
<211> 40
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn, 2’ O metyl riboza đầy đủ

<400> 14
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
40

<210> 15
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn

<400> 15
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga
40

<210> 16
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn

<400> 16

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct
40

<210> 17
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phosphorothio hóa hoàn toàn

<400> 17
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt
40

<210> 18
<211> 40
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2139, phosphorothio hóa hoàn toàn, 2' O metyl riboza đầy đủ, C = 5' metylxytiđin

<400> 18
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
40

<210> 19
<211> 40
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> REP 2165, đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn, mỗi xytosin đã 5′ metyl hóa

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 1-10, 12-20, 22-30, 32-40
<223> cải biến 2′ O metylriboza

<400> 19
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
40

<210> 20
<211> 40
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đã phosphorothio hóa hóa hoàn toàn, mỗi xytosin đã 5′ metyl hóa

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<222> 1-9, 11-19, 21-29, 31-40
<223> cải biến 2′ O metylriboza

<400> 20
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
40

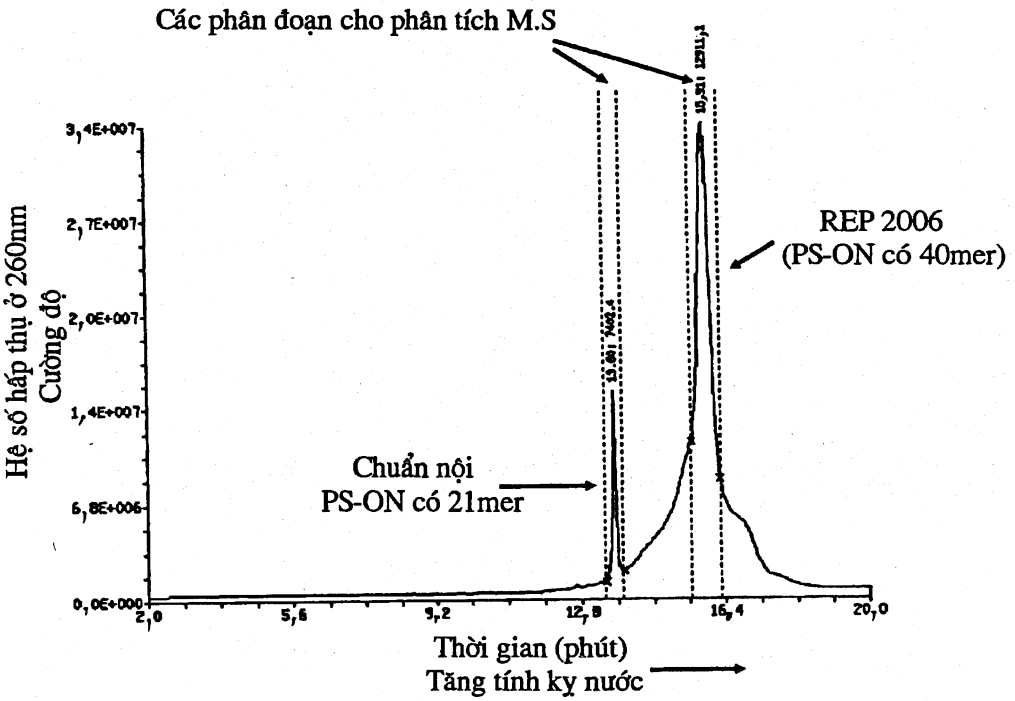

Các phân đoạn cho phân tích M.S
REP 2006
(PS-ON có 40mer)
Chuẩn nội
PS-ON có 21mer
Hệ số hấp thụ ở 260nm
Cường độ
Thời gian (phút)
Tăng tính kỵ nước

Fig.1A

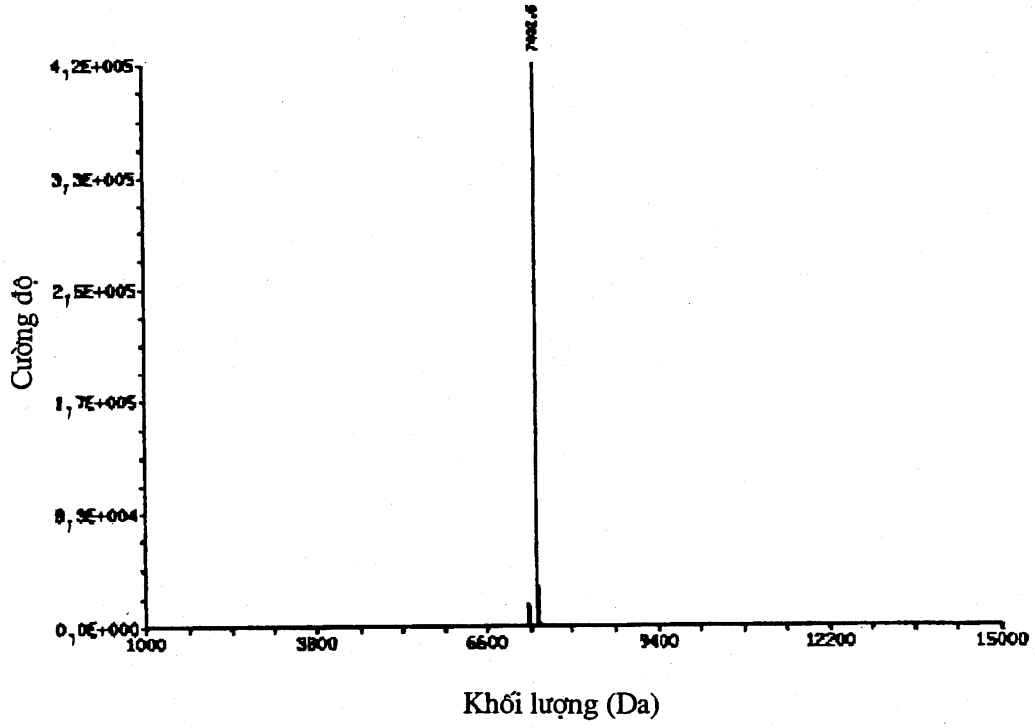

Cường độ
Khối lượng (Da)

Fig.1B

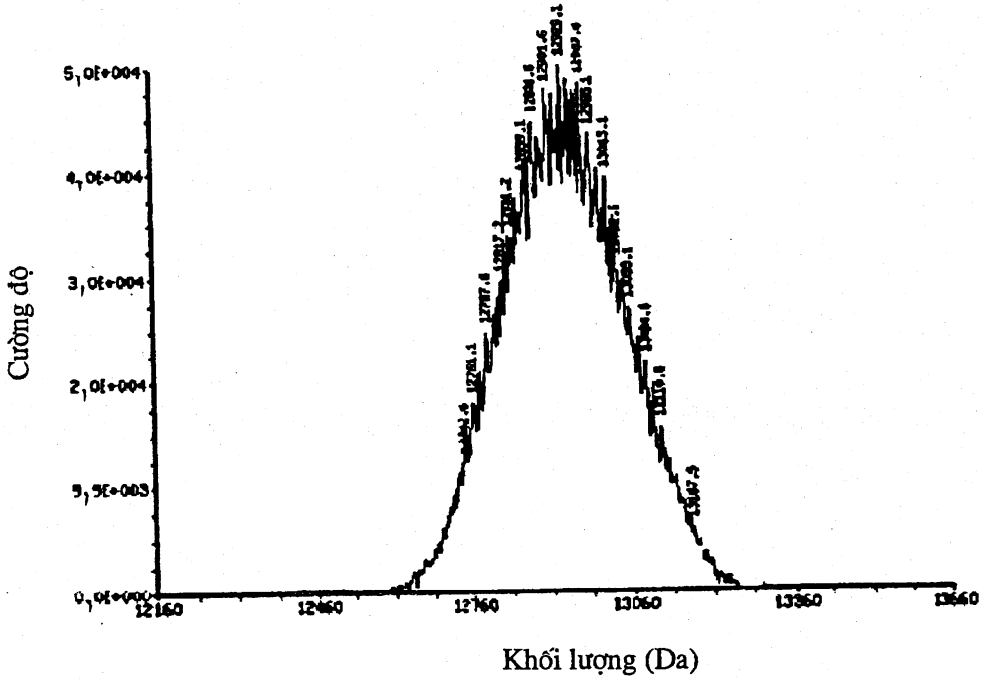

Cường độ
5,0E+004
4,0E+004
3,0E+004
2,0E+004
9,5E+003
0,0E+000
12160
12460
12760
13060
13360
13660
Khối lượng (Da)

Fig.1C

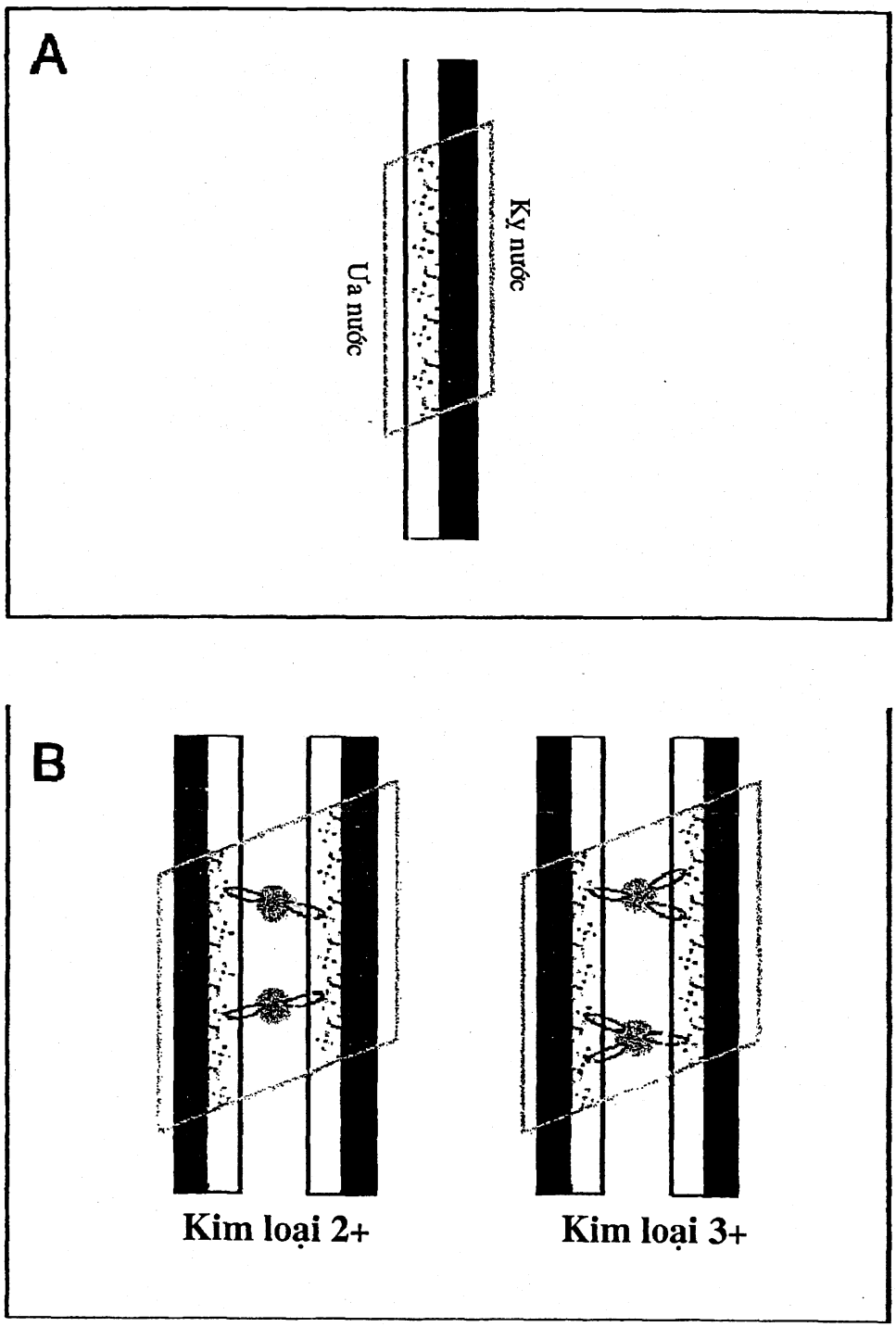


Fig.2

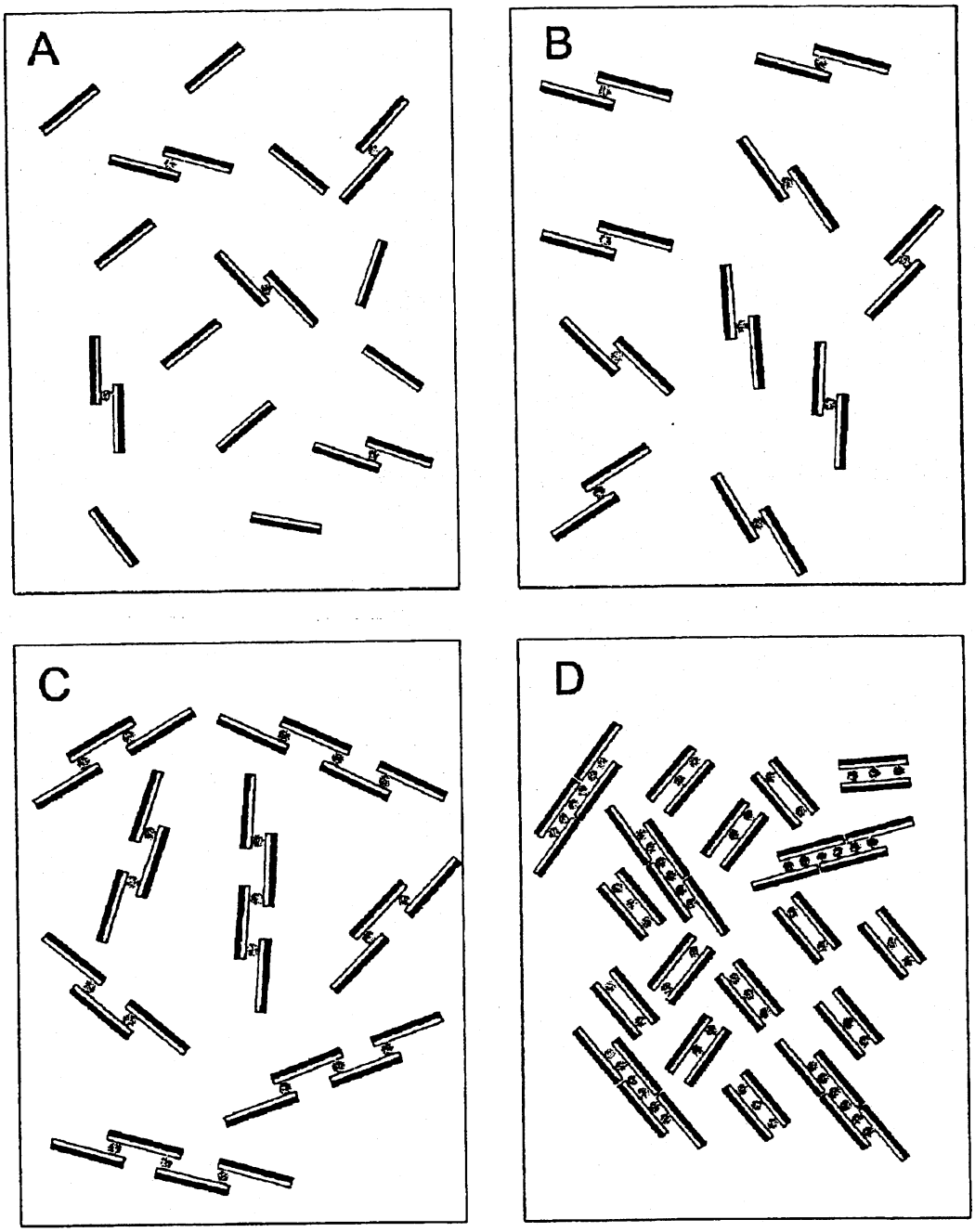


Fig.3

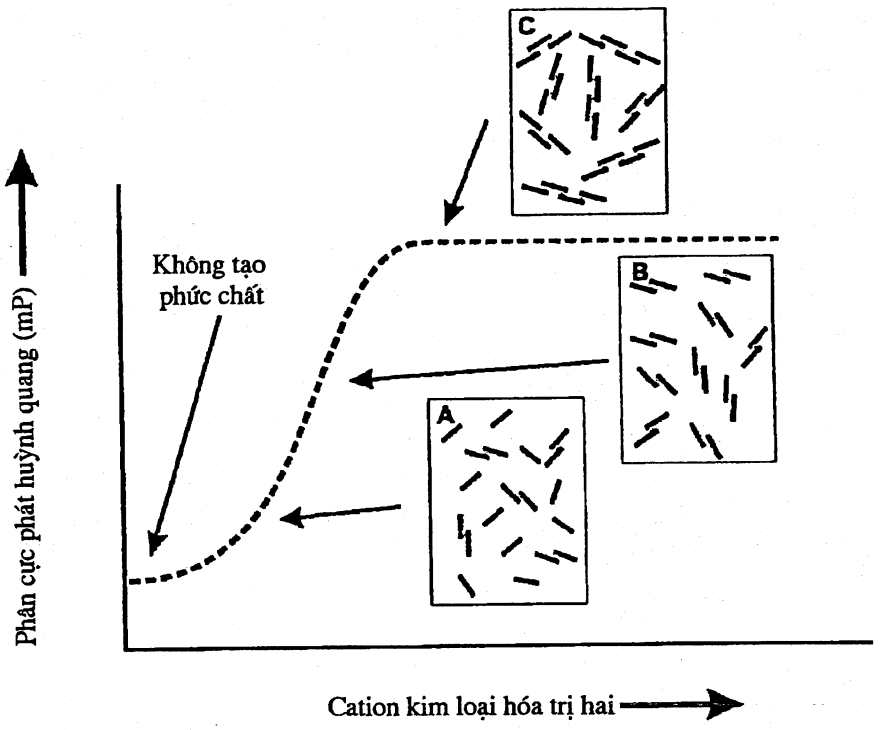

C
B
A
Không tạo
phức chất
Phân cực phát huỳnh quang (mP)
Cation kim loại hóa trị hai

Fig.4

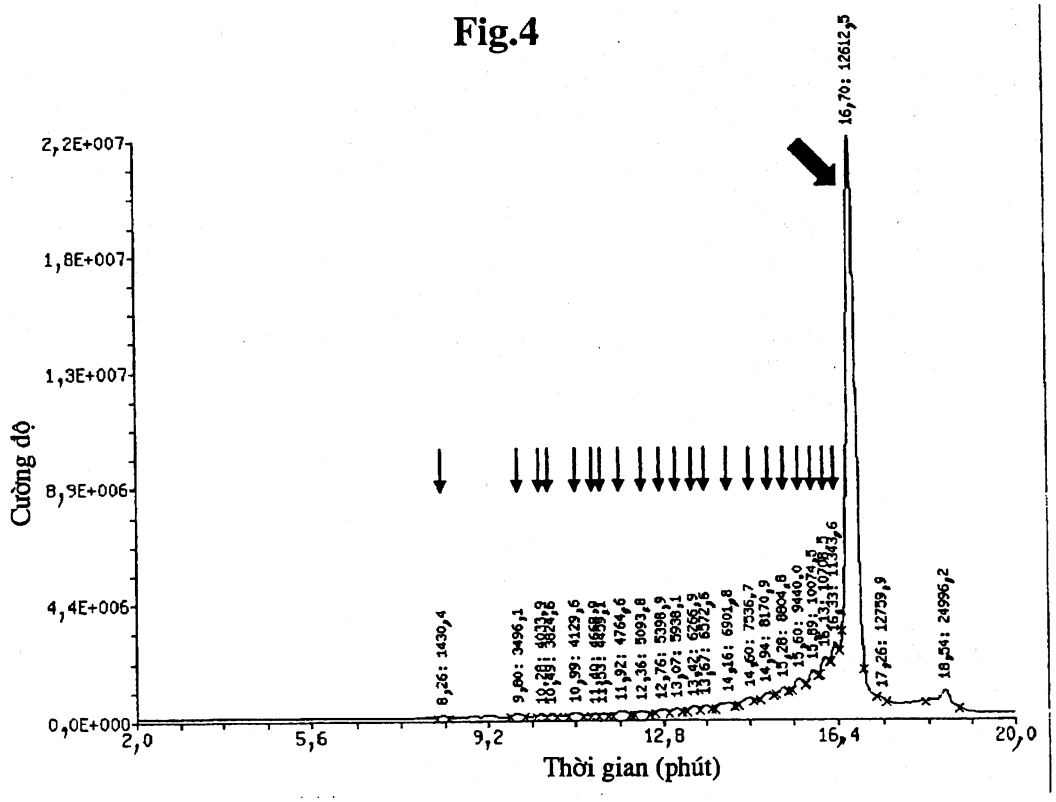

2,2E+007
1,8E+007
1,3E+007
8,9E+006
4,4E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)
16,70: 12612,5
17,26: 12739,9
18,54: 24996,2

Fig.5

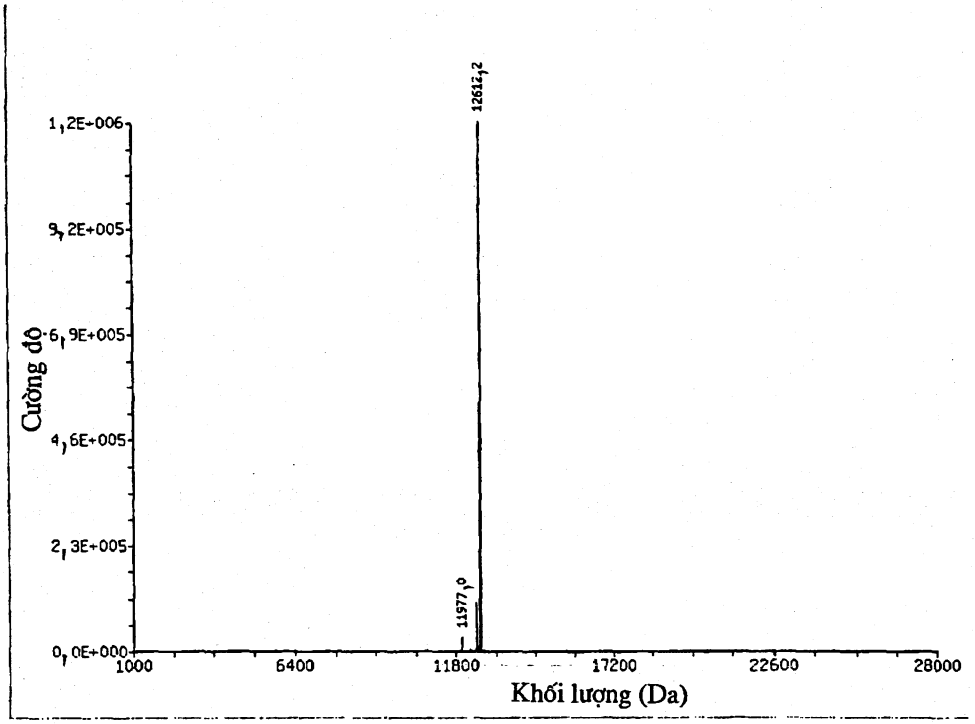

12612,2
11577,0
1,2E+006
9,2E+005
6,9E+005
4,6E+005
2,3E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.6

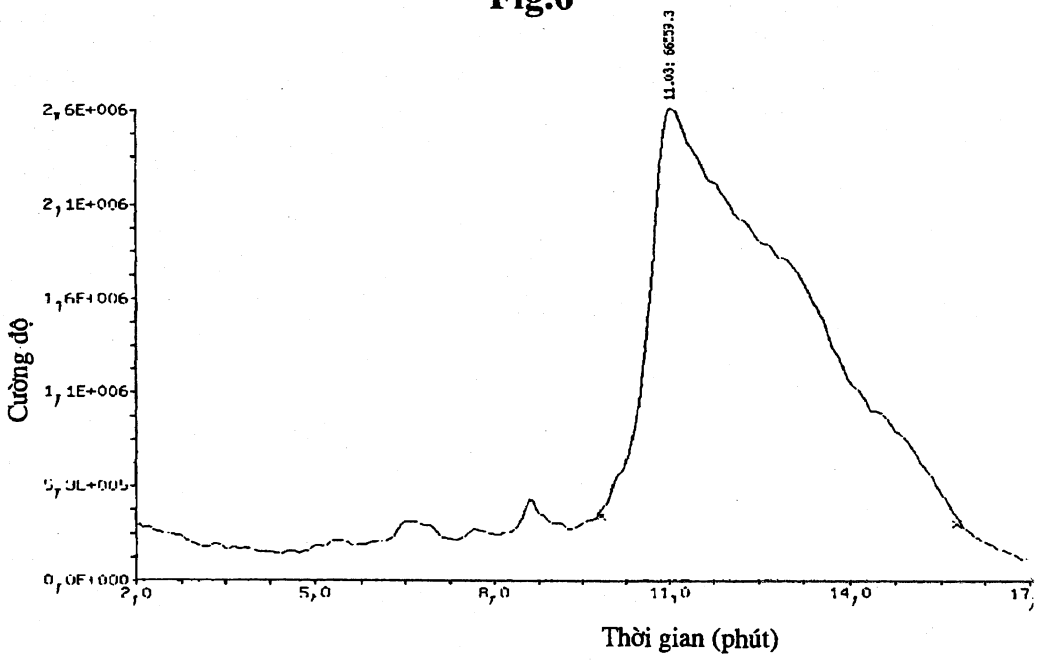

11.03; 66539.3
2,6E+006
2,1E+006
1,6E+006
1,1E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
Thời gian (phút)

Fig.7

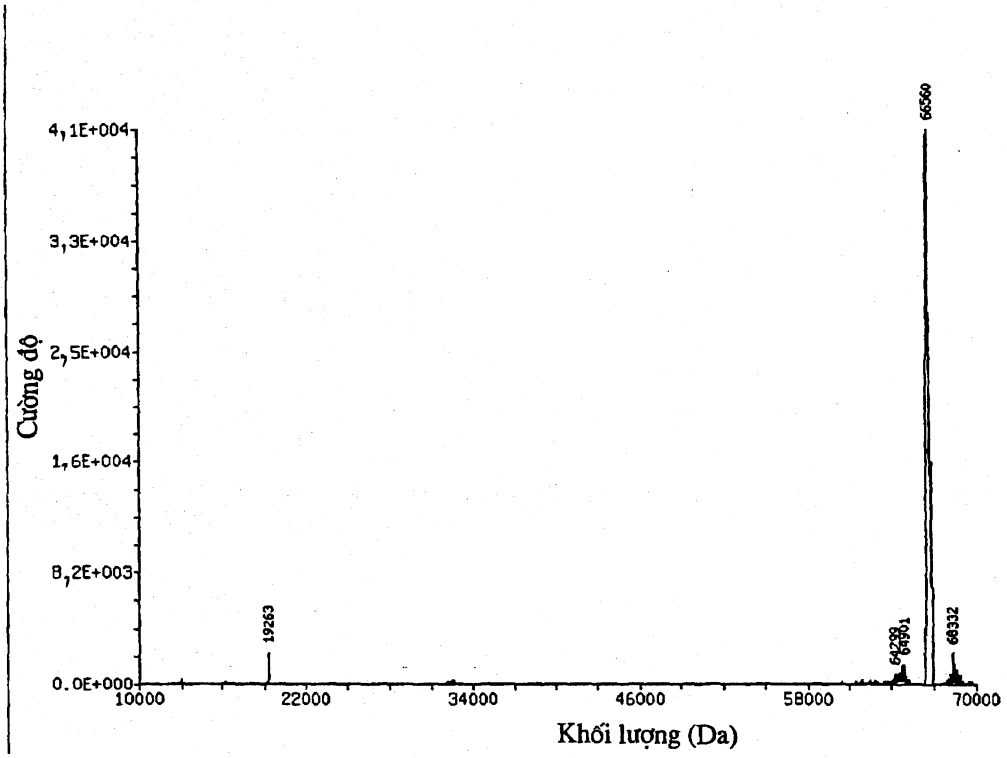

4,1E+004
3,3E+004
2,5E+004
1,6E+004
8,2E+003
0.0E+000
Cường độ
10000
22000
34000
46000
58000
70000
Khối lượng (Da)
19263
64298
65901
66560
68332

Fig.8

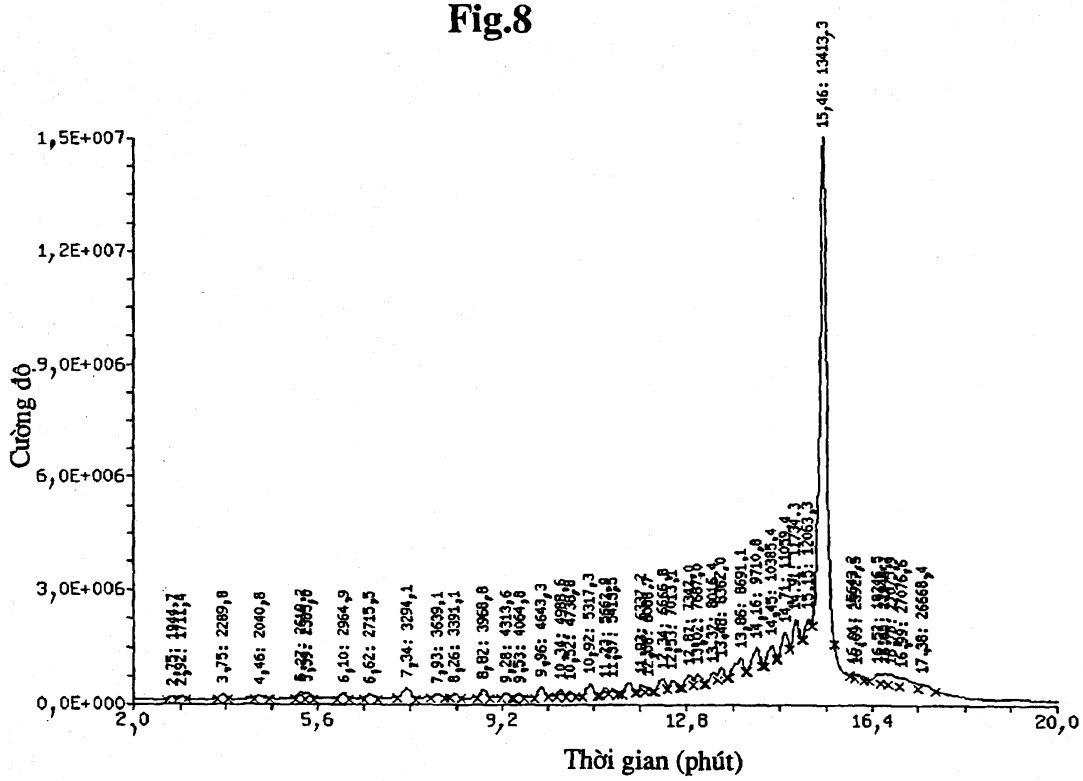

1,5E+007
1,2E+007
9,0E+006
6,0E+006
3,0E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)
15,46: 13413,3

Fig.9

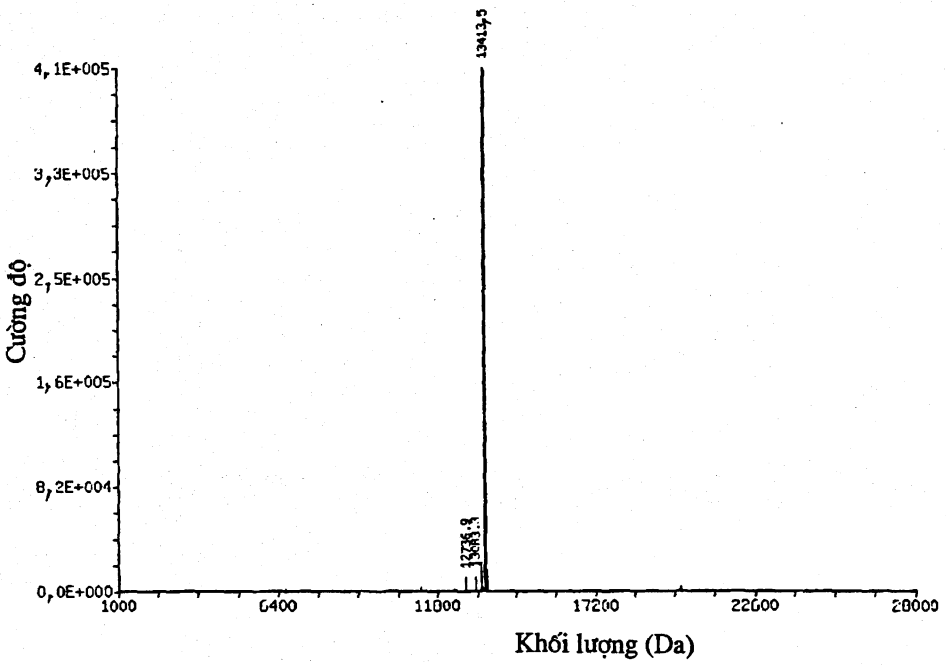

13413,5
4,1E+005
3,3E+005
2,5E+005
1,6E+005
8,2E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11000
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.10

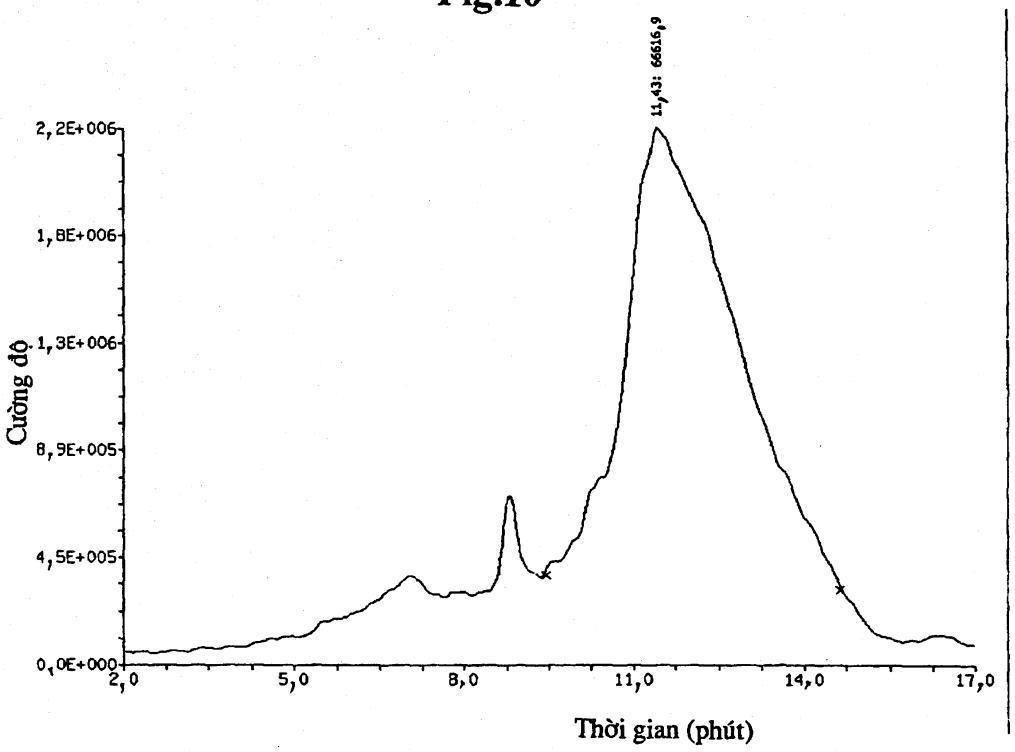

11,43; 66616,9
2,2E+006
1,8E+006
1,3E+006
8,9E+005
4,5E+005
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (phút)

Fig.11

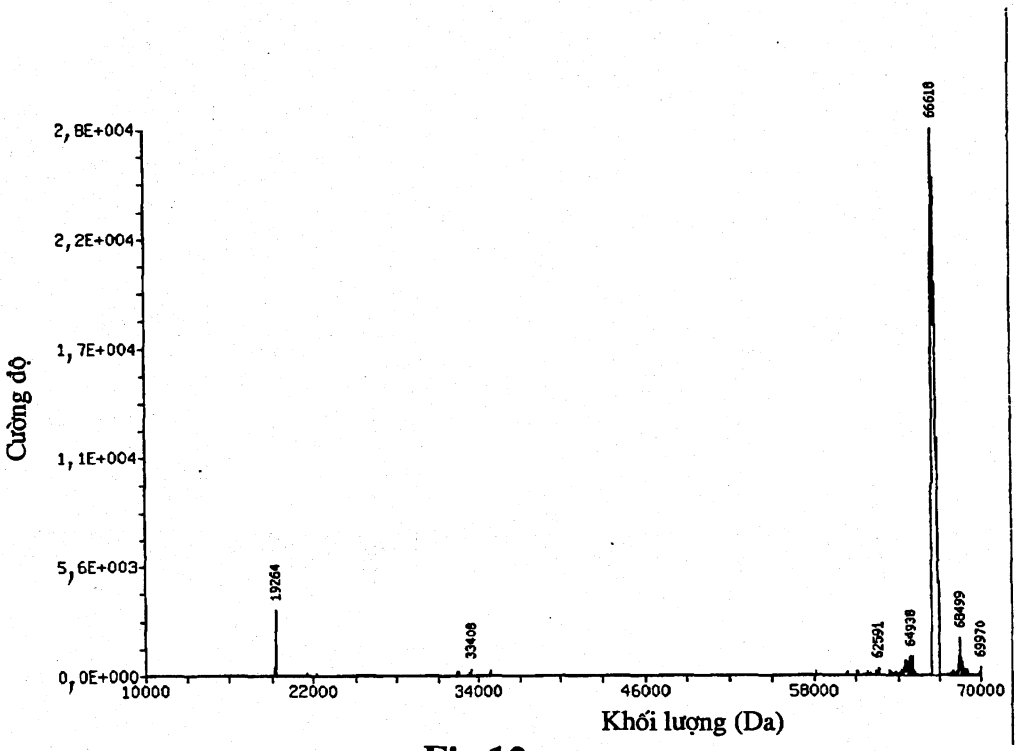

2,8E+004
2,2E+004
1,7E+004
1,1E+004
5,6E+003
0,0E+000
Cường độ
19264
33408
62591
64938
66618
68499
69970
10000
22000
34000
46000
58000
70000
Khối lượng (Da)

Fig.12

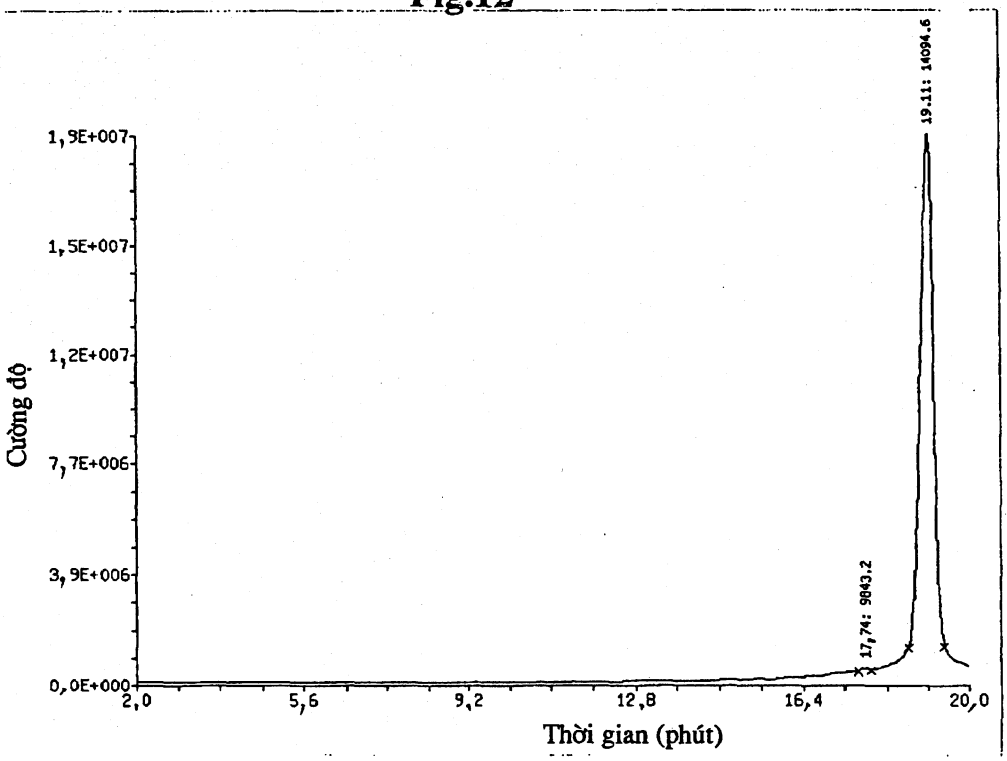

1,9E+007
1,5E+007
1,2E+007
7,7E+006
3,9E+006
0,0E+000
Cường độ
19.11: 14094.6
17.74: 9843.2
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)

Fig.13

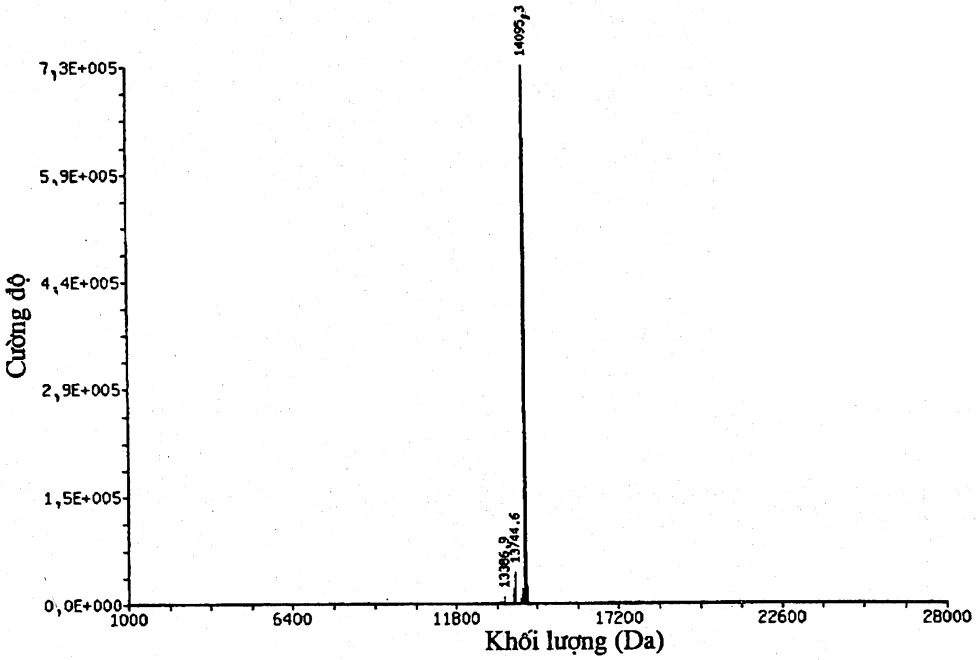

14095,3
13744,6
13396,9
7,3E+005
5,9E+005
4,4E+005
2,9E+005
1,5E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.14

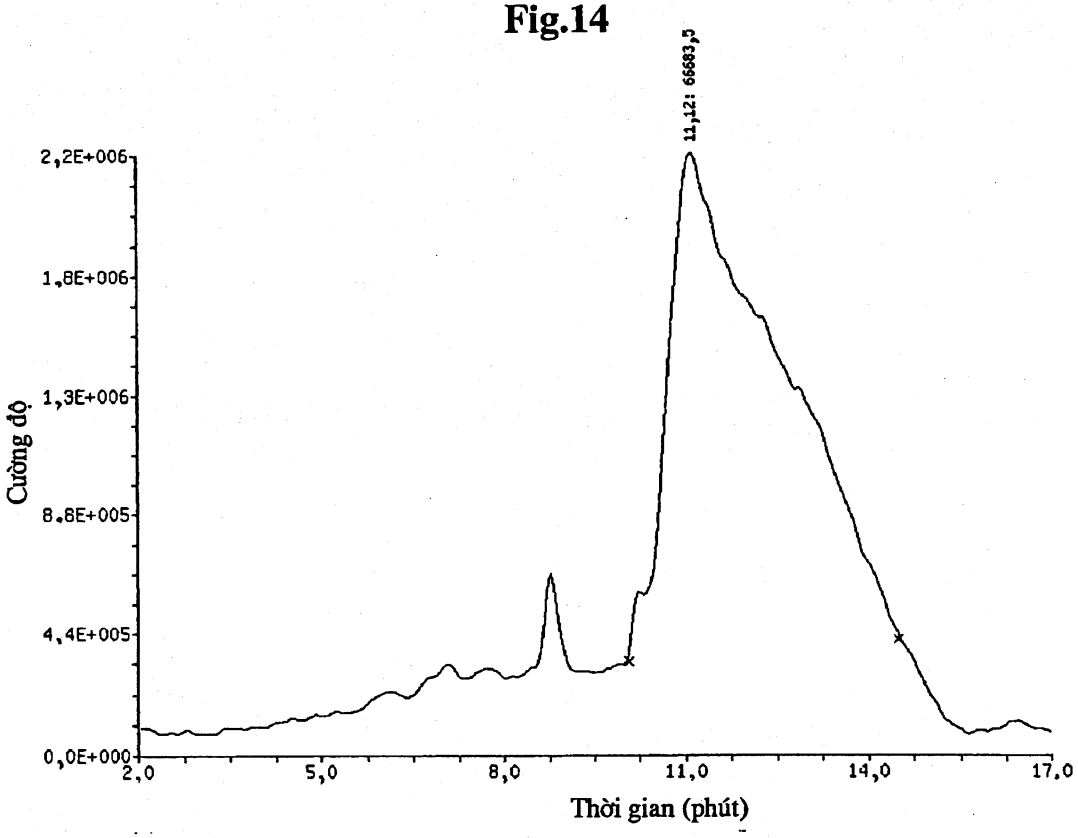

11,12: 66883,5
2,2E+006
1,8E+006
1,3E+006
8,8E+005
4,4E+005
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (phút)

Fig.15

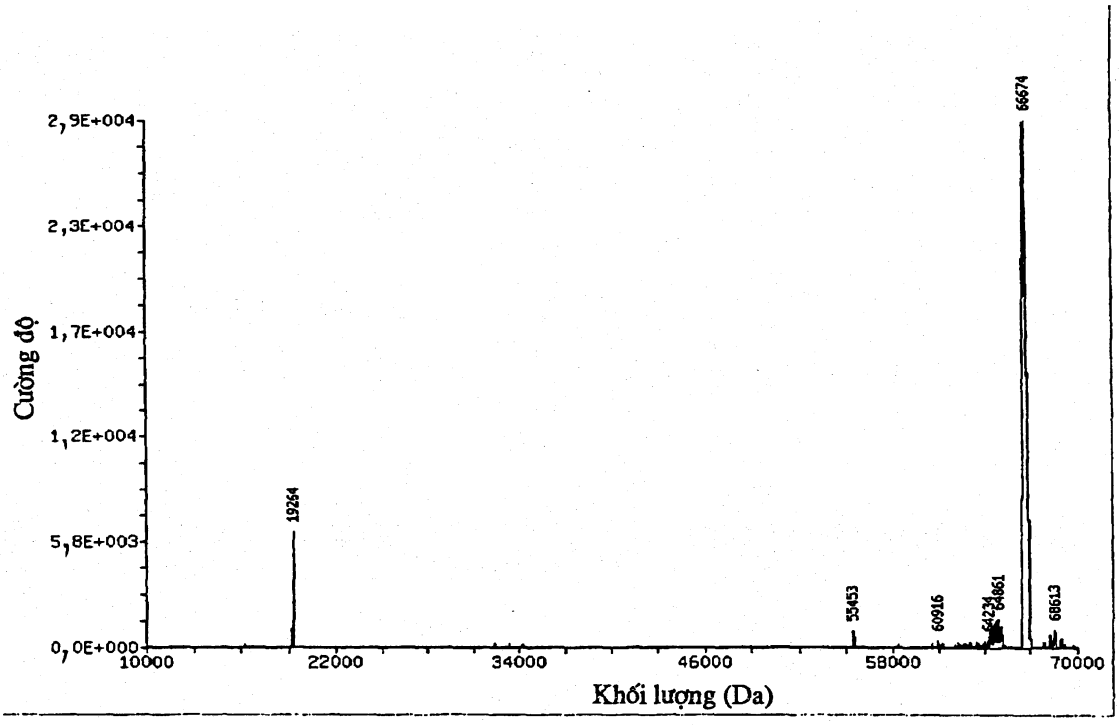

2,9E+004
2,3E+004
1,7E+004
1,2E+004
5,8E+003
0,0E+000
Cường độ
10000
22000
34000
46000
58000
70000
Khối lượng (Da)
19254
55453
60916
64234
64861
66674
68613

Fig.16

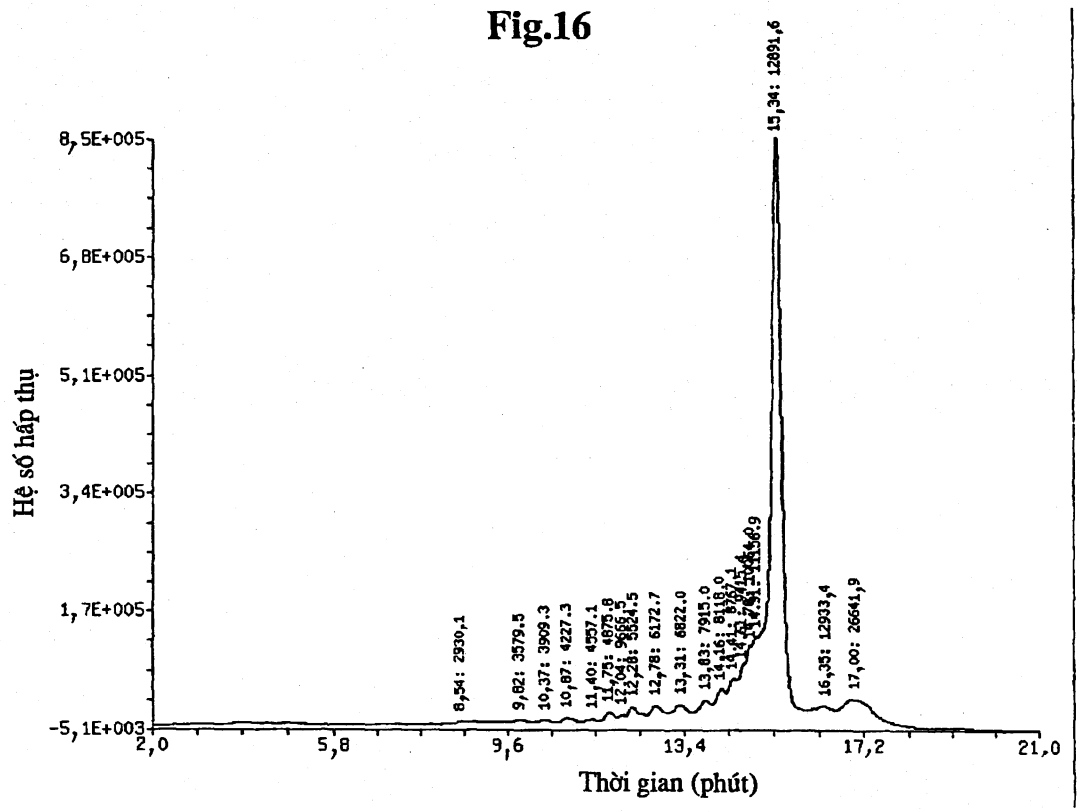

8,5E+005
6,8E+005
5,1E+005
3,4E+005
1,7E+005
-5,1E+003
Hệ số hấp thụ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
15,34: 12891,6
8,54: 2930,1
9,82: 3579,5
10,37: 3909,3
10,87: 4227,3
11,40: 4557,1
12,78: 6172,7
13,31: 6822,0
13,83: 7915,0
16,35: 12933,4
17,00: 26641,9

Fig.17

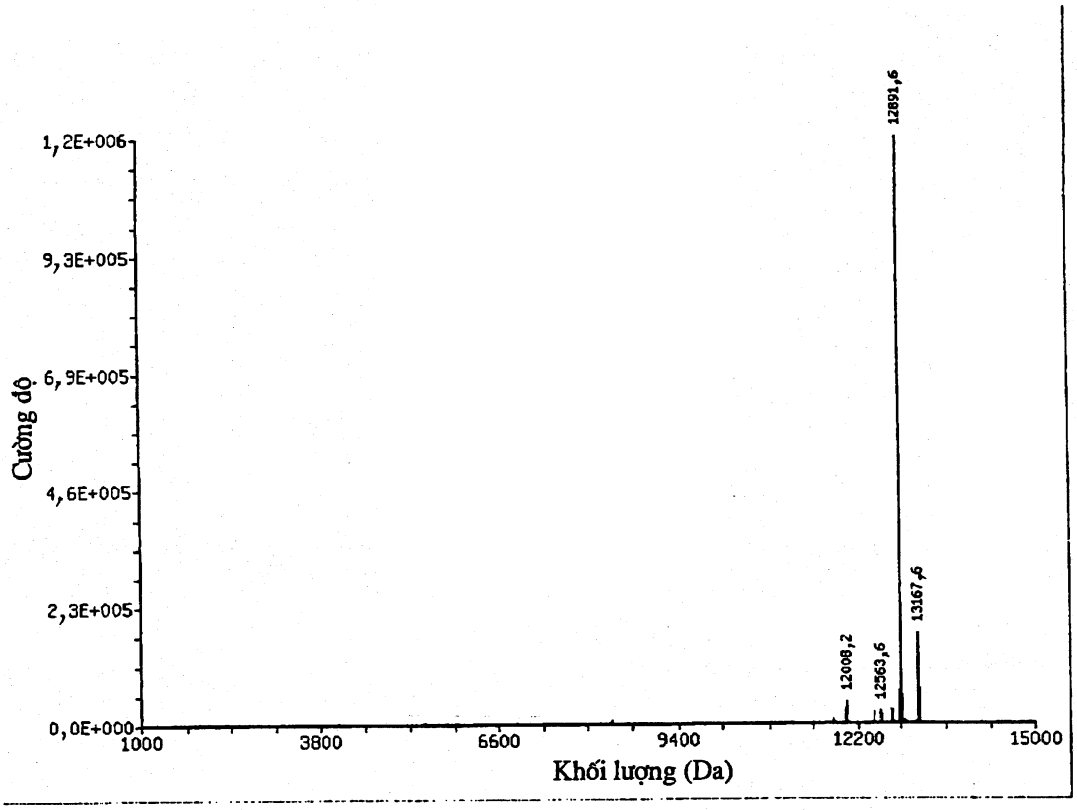

12891,6
13167,6
12008,2
12563,6
1,2E+006
9,3E+005
6,9E+005
4,6E+005
2,3E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
3800
6600
9400
12200
15000
Khối lượng (Da)

Fig.18

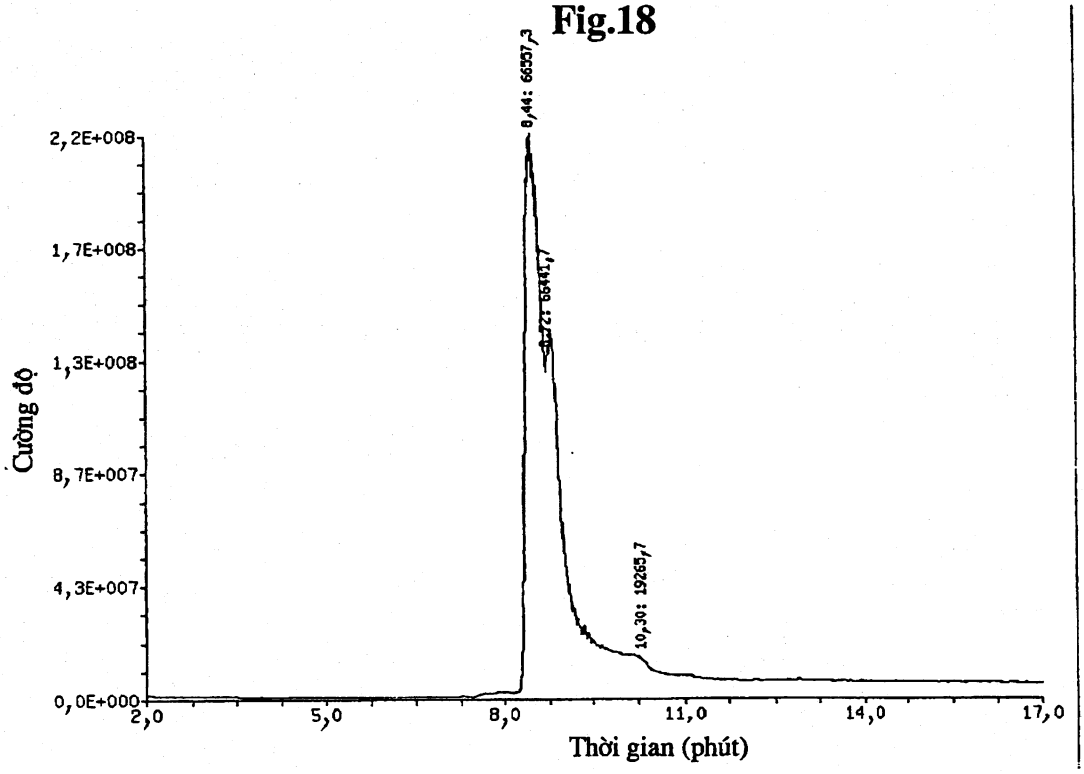

8,44: 66957,3
10,30: 19265,7
2,2E+008
1,7E+008
1,3E+008
8,7E+007
4,3E+007
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (phút)

Fig.19

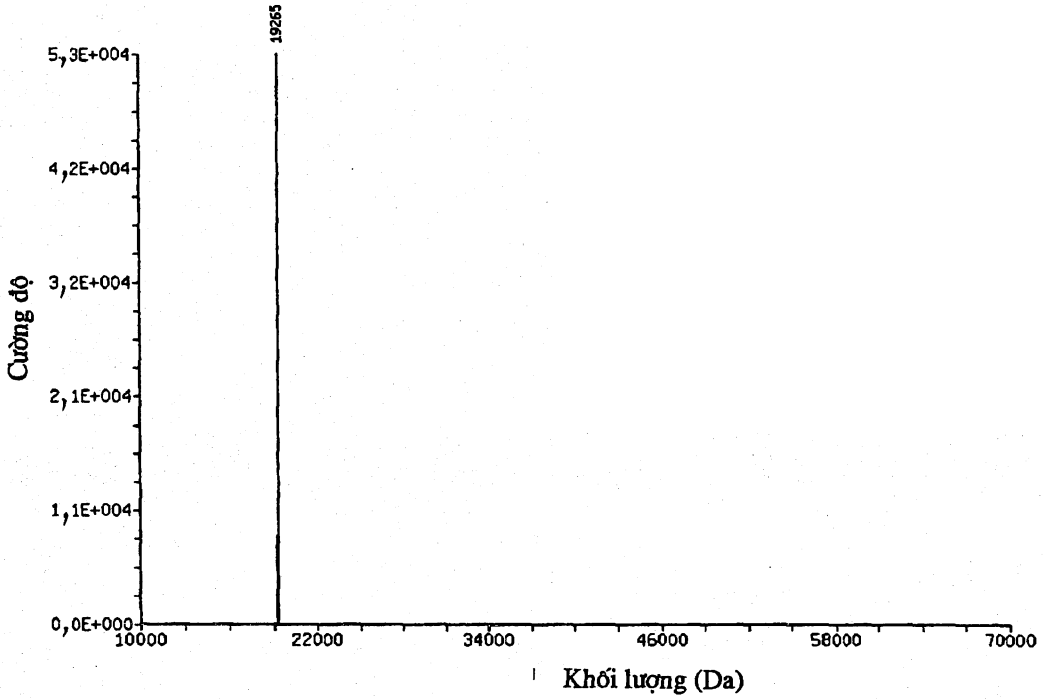

19265
5,3E+004
4,2E+004
3,2E+004
2,1E+004
1,1E+004
0,0E+000
Cường độ
10000
22000
34000
46000
58000
70000
Khối lượng (Da)

Fig.20

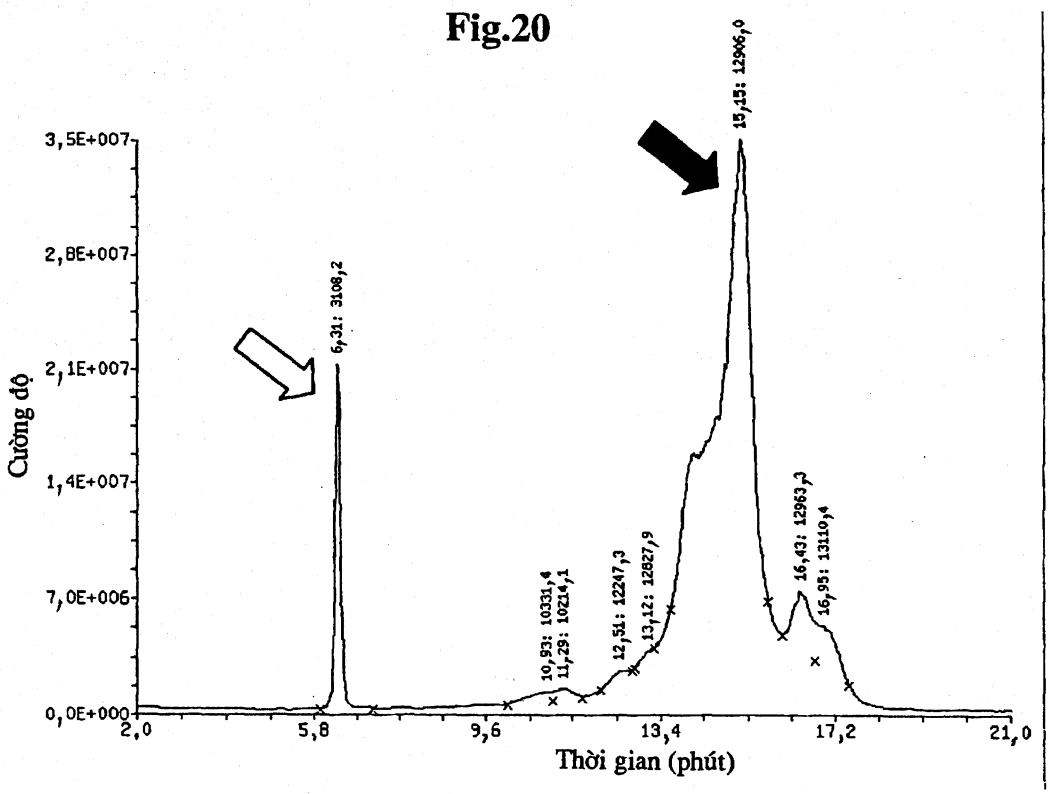

3,5E+007
2,8E+007
2,1E+007
1,4E+007
7,0E+006
0,0E+000
Cường độ
6,31: 3108,2
10,93: 10331,4
11,29: 10214,1
12,51: 12247,3
13,12: 12827,9
15,13: 12906,0
16,43: 12963,3
16,95: 13110,4
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.21

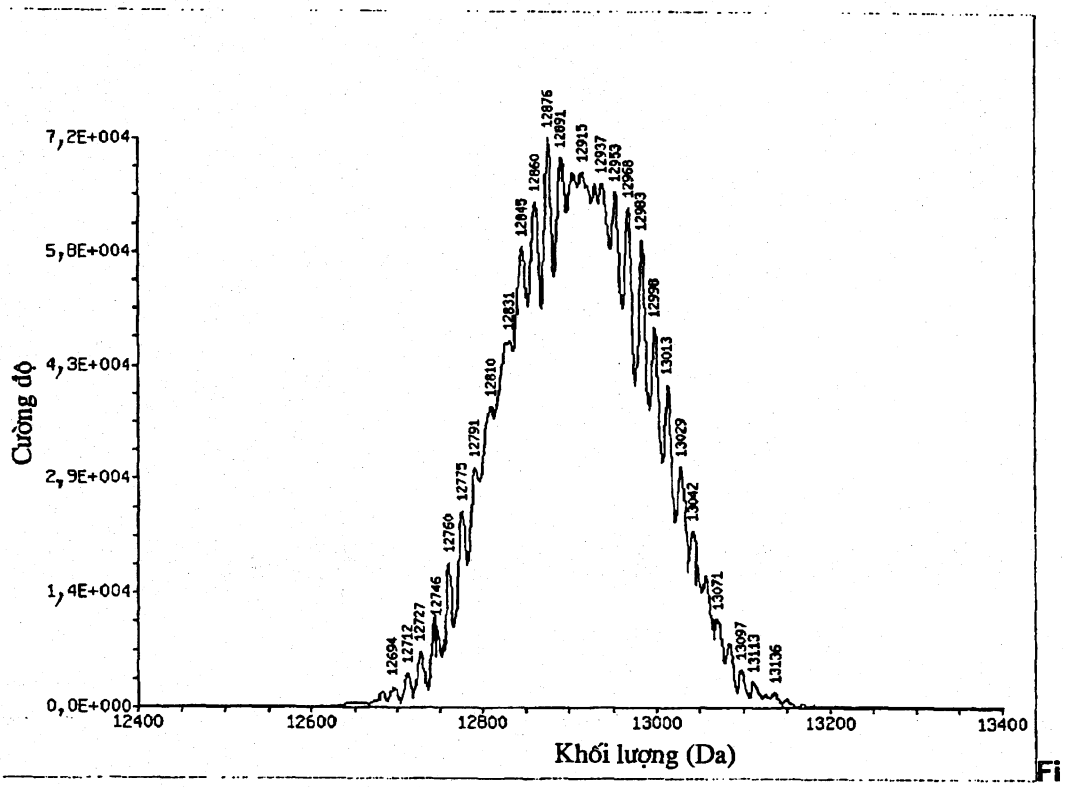

7,2E+004
5,8E+004
4,3E+004
2,9E+004
1,4E+004
0,0E+000
Cường độ
12400
12600
12800
13000
13200
13400
Khối lượng (Da)
12694
12712
12727
12746
12760
12775
12791
12810
12831
12845
12860
12876
12891
12915
12937
12953
12968
12983
12998
13013
13029
13042
13071
13097
13113
13136

Fig.22

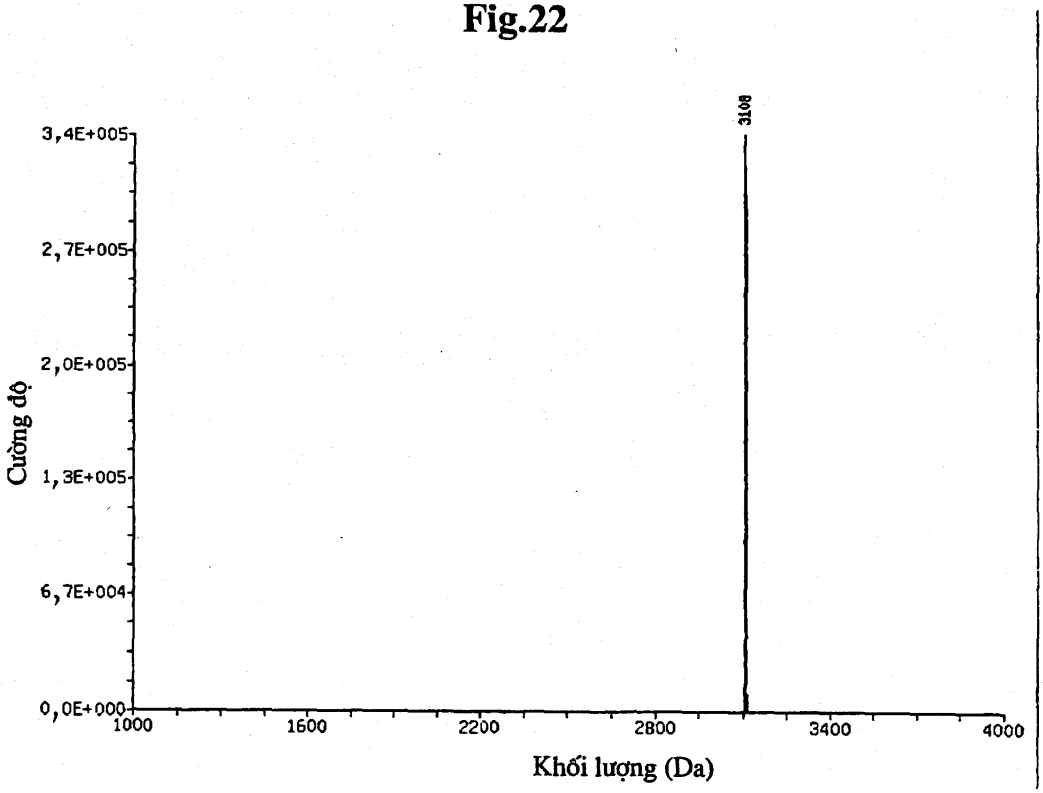

3,4E+005
2,7E+005
2,0E+005
1,3E+005
6,7E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
1600
2200
2800
3400
4000
Khối lượng (Da)
3108

Fig.23

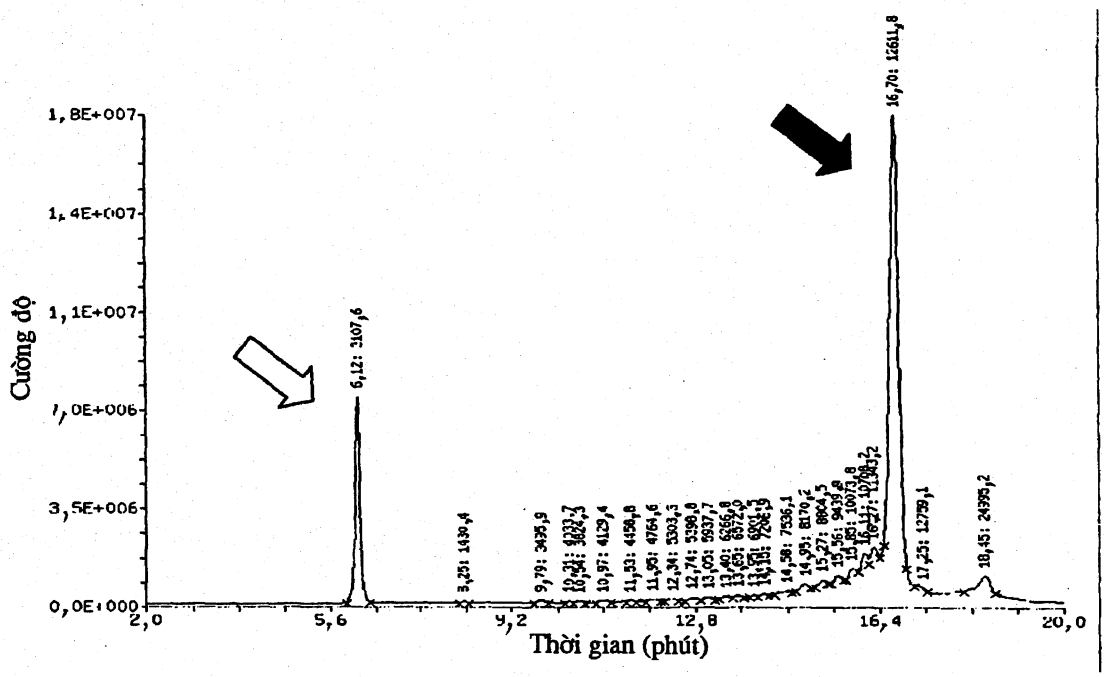

Cường độ
1,8E+007
1,4E+007
1,1E+007
7,0E+006
3,5E+006
0,0E+000
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)
6,12: 3107,6
16,70: 11611,8

Fig.24

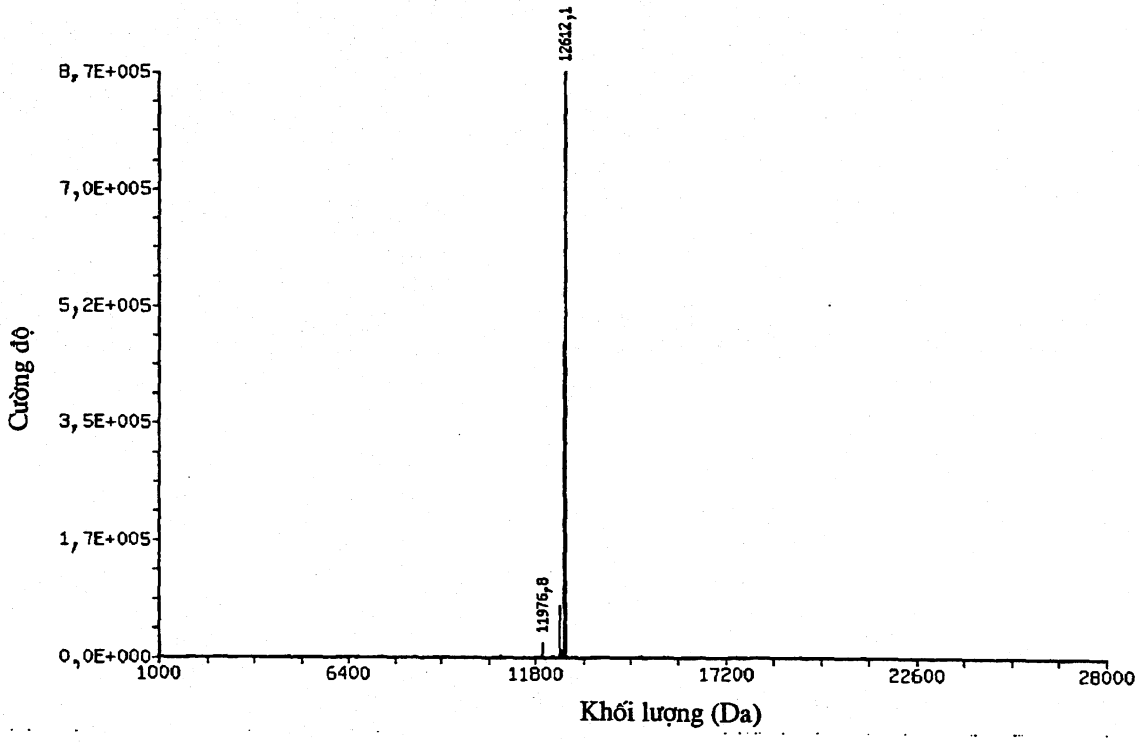

Cường độ
8,7E+005
7,0E+005
5,2E+005
3,5E+005
1,7E+005
0,0E+000
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)
12612,1
11976,8

Fig.25

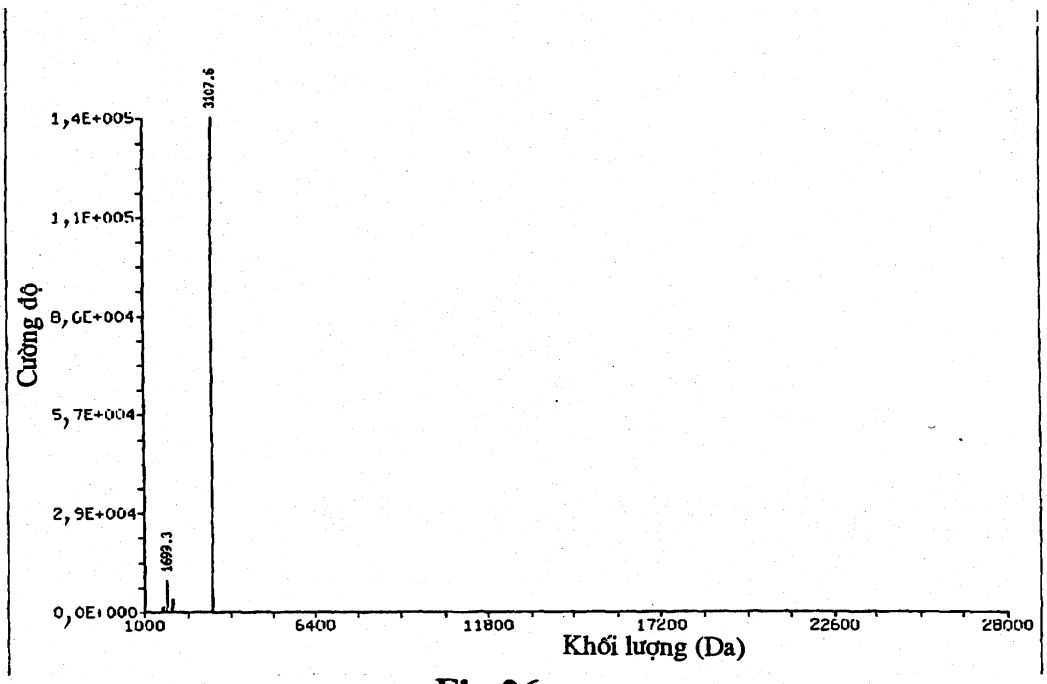

1,4E+005
1,1E+005
8,0E+004
5,7E+004
2,9E+004
0,0E+000
Cường độ
3107.6
1699.3
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.26

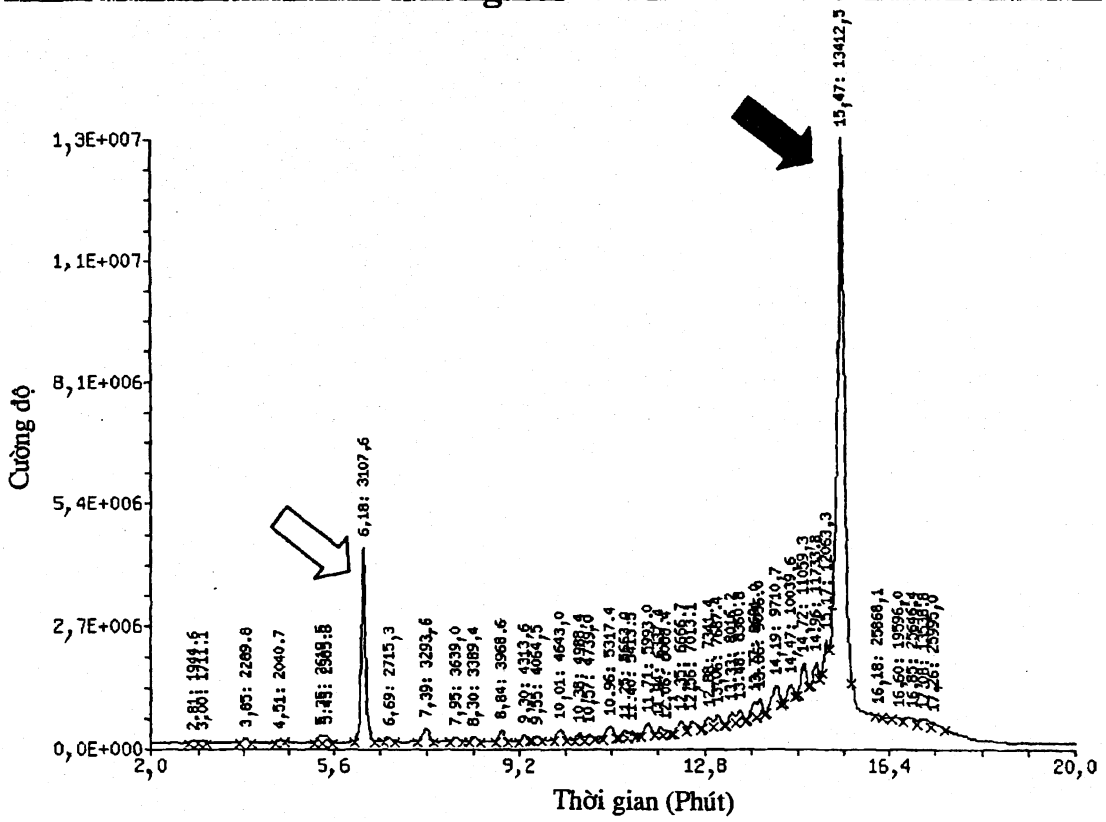

1,3E+007
1,1E+007
8,1E+006
5,4E+006
2,7E+006
0,0E+000
Cường độ
6,18: 3107,6
15,47: 13412,3
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (Phút)

Fig.27

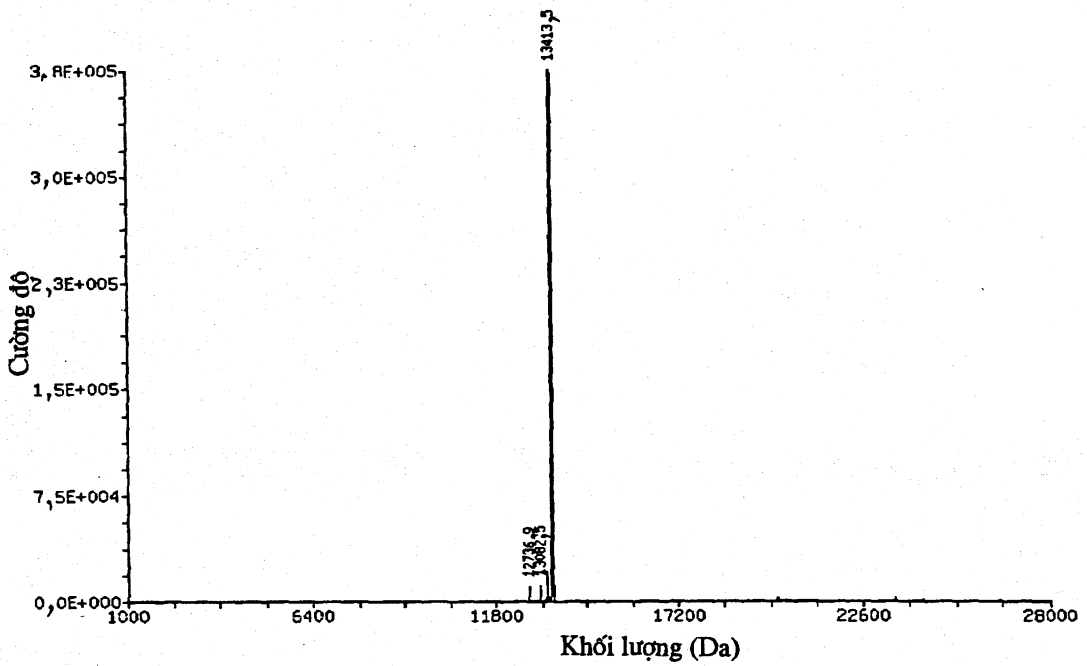

3,8E+005
3,0E+005
2,3E+005
1,5E+005
7,5E+004
0,0E+000
Cường độ
13413,5
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.28

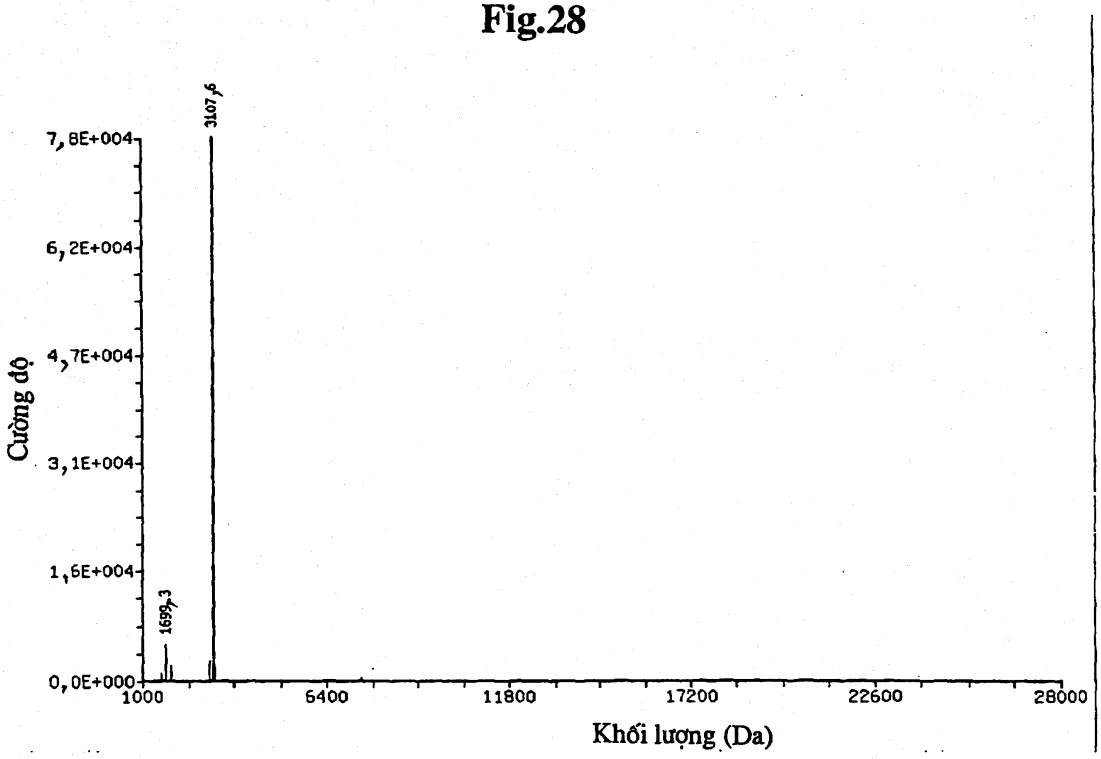

7,8E+004
6,2E+004
4,7E+004
3,1E+004
1,6E+004
0,0E+000
Cường độ
3107,6
1699,3
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.29

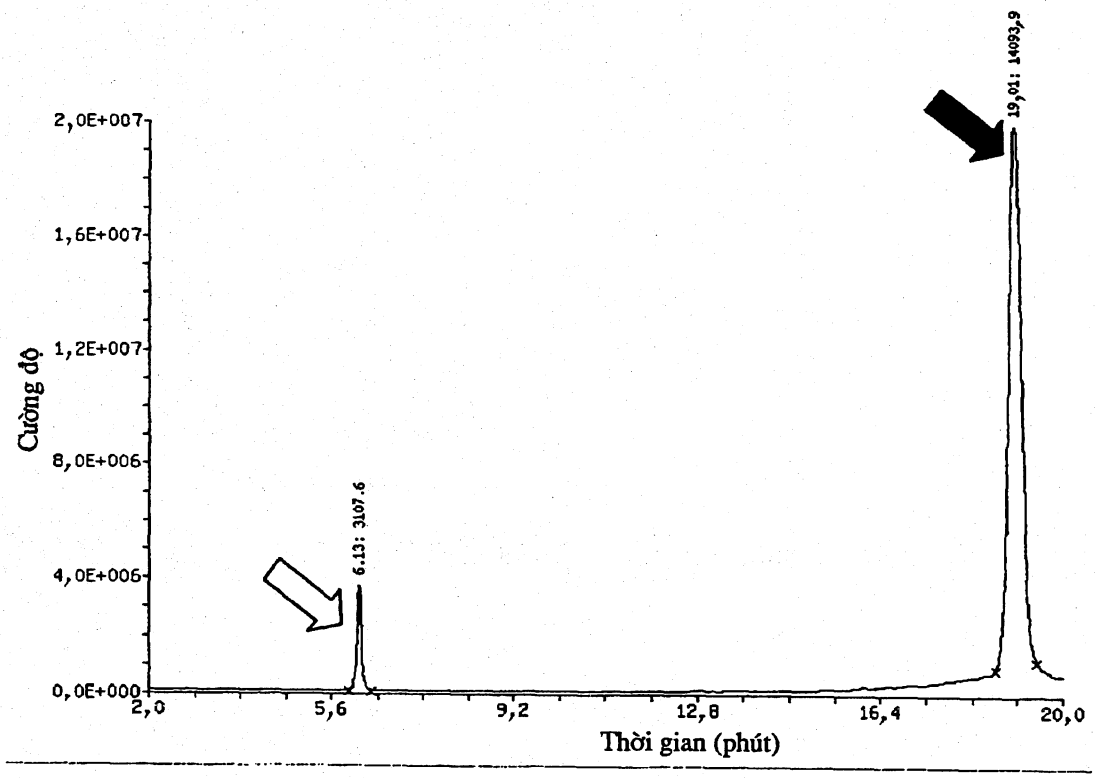

2,0E+007
1,6E+007
1,2E+007
8,0E+006
4,0E+006
0,0E+000
Cường độ
6.13: 3107.6
19.01: 14093.9
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)

Fig.30

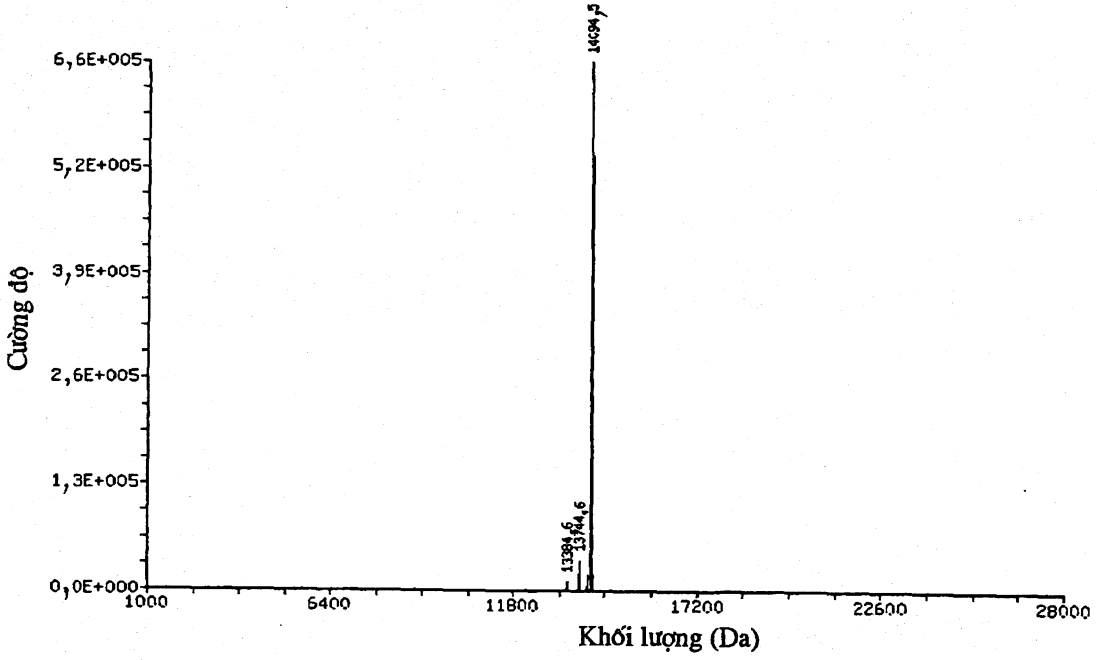

6,6E+005
5,2E+005
3,9E+005
2,6E+005
1,3E+005
0,0E+000
Cường độ
14094,5
13944,6
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.31

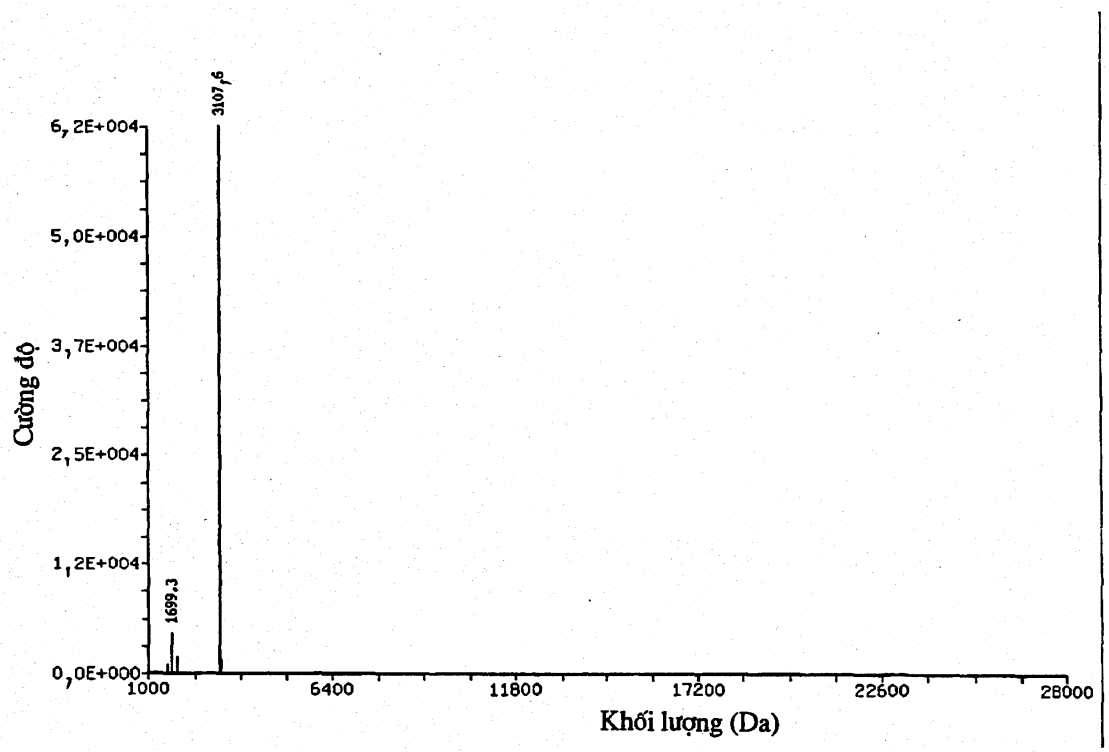

3107,6
6,2E+004
5,0E+004
3,7E+004
2,5E+004
1,2E+004
0,0E+000
1699,3
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.32

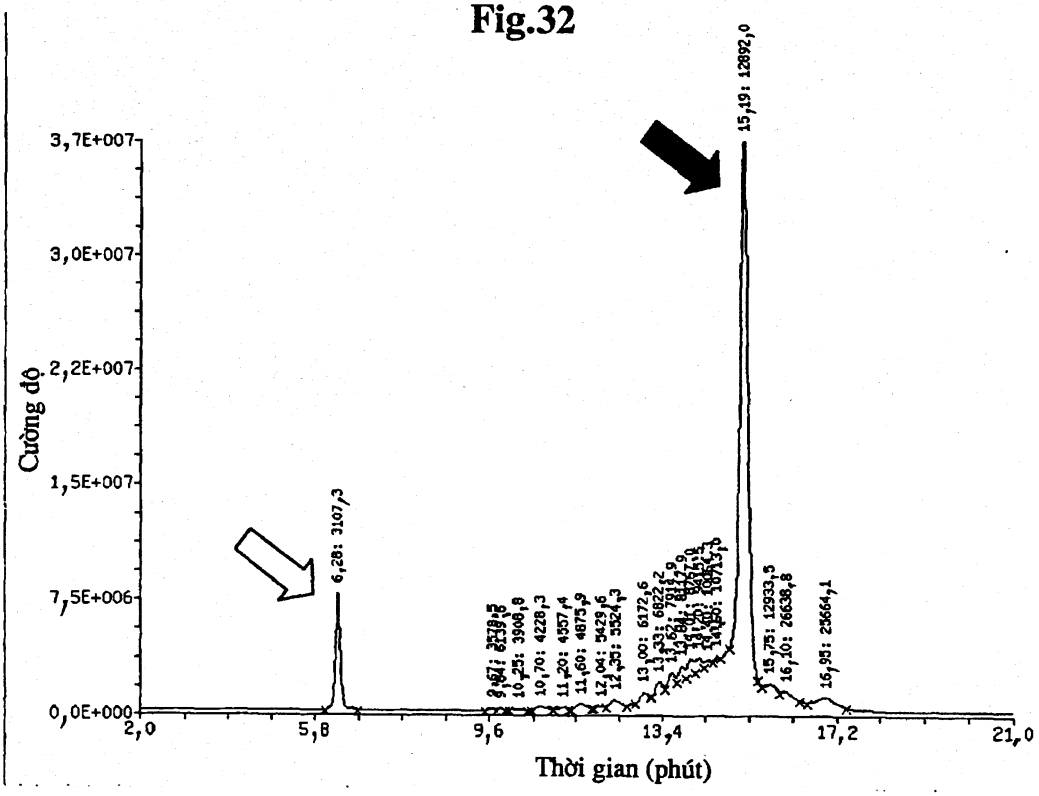

15,19: 12892,0
3,7E+007
3,0E+007
2,2E+007
1,5E+007
7,5E+006
0,0E+000
Cường độ
6,28: 3107,3
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.33

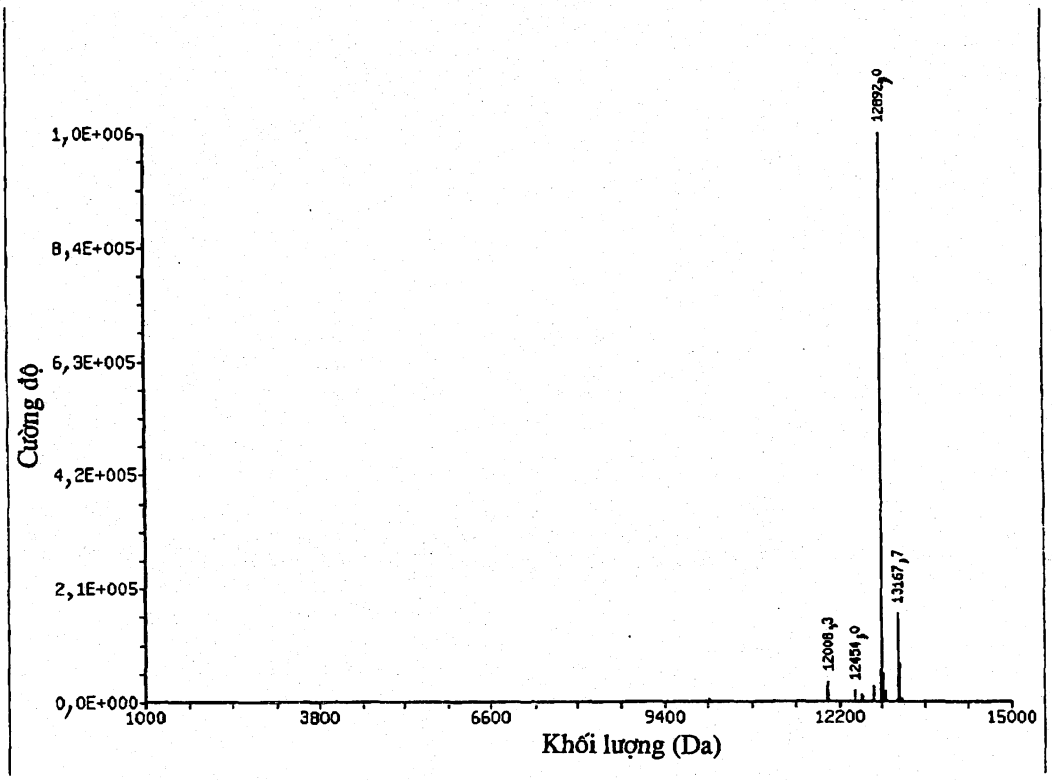

1,0E+006
8,4E+005
6,3E+005
4,2E+005
2,1E+005
0,0E+000
Cường độ
12692,0
13167,7
12008,3
12454,0
1000
3800
6600
9400
12200
15000
Khối lượng (Da)

Fig.34

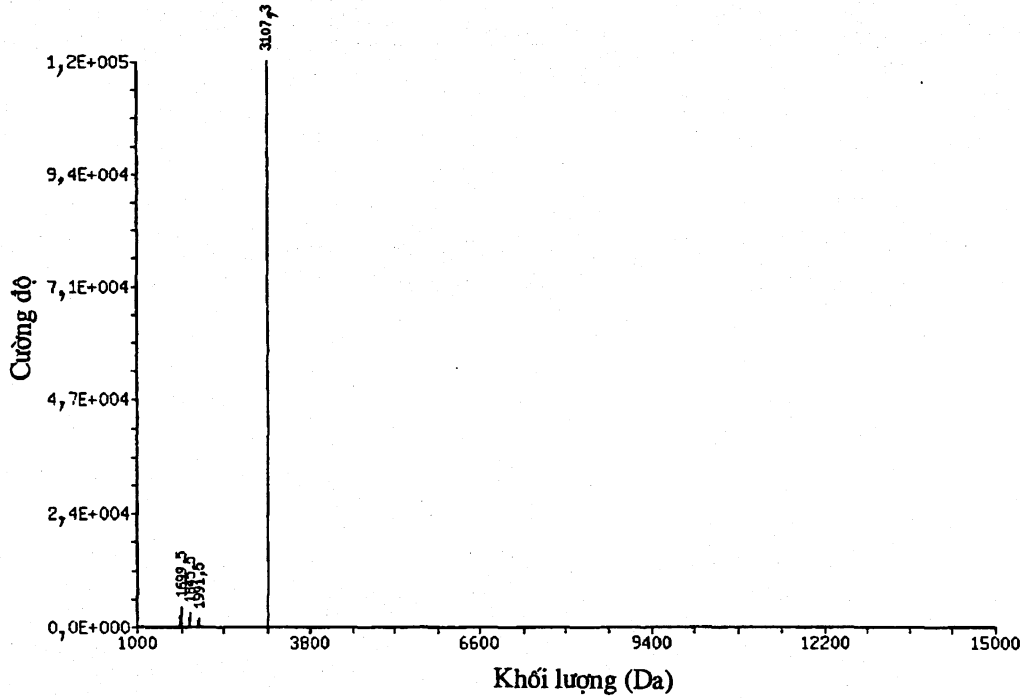

1,2E+005
9,4E+004
7,1E+004
4,7E+004
2,4E+004
0,0E+000
Cường độ
3107,3
1689,5
1991,6
1000
3800
6600
9400
12200
15000
Khối lượng (Da)

Fig.35

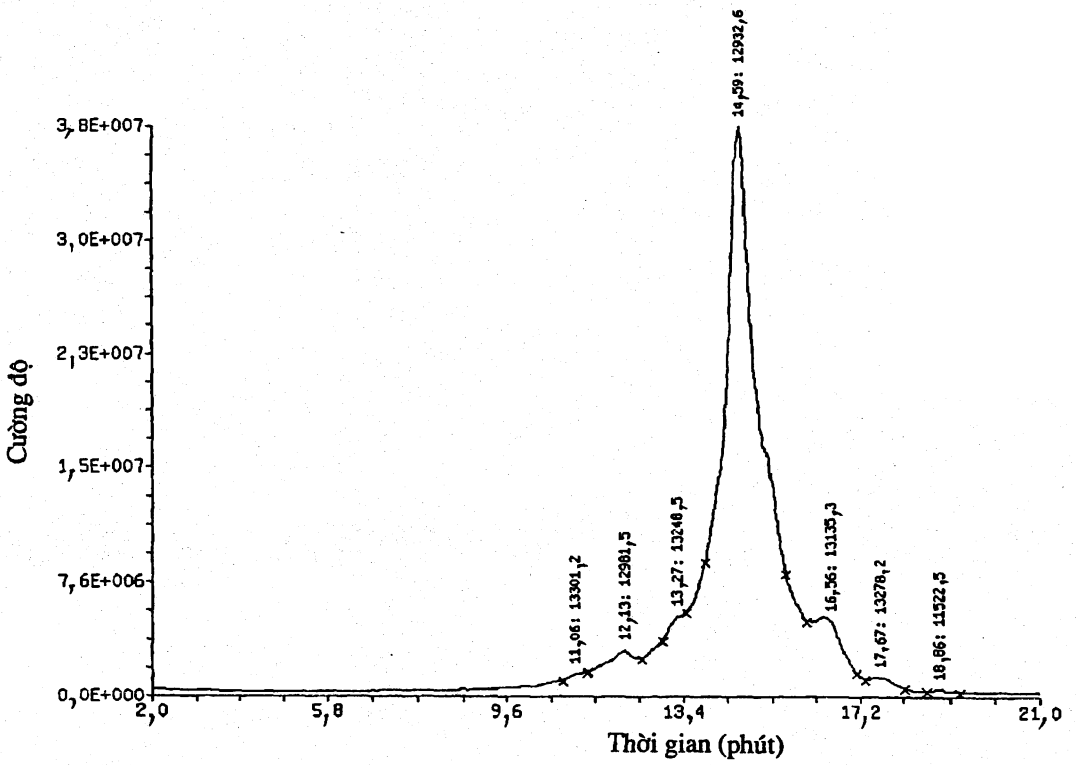

3,8E+007
3,0E+007
2,3E+007
1,5E+007
7,6E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
11,06: 13301,2
12,13: 12981,5
13,27: 13248,5
14,59: 12932,6
16,56: 13135,3
17,67: 13278,2
18,86: 11522,5

Fig.36

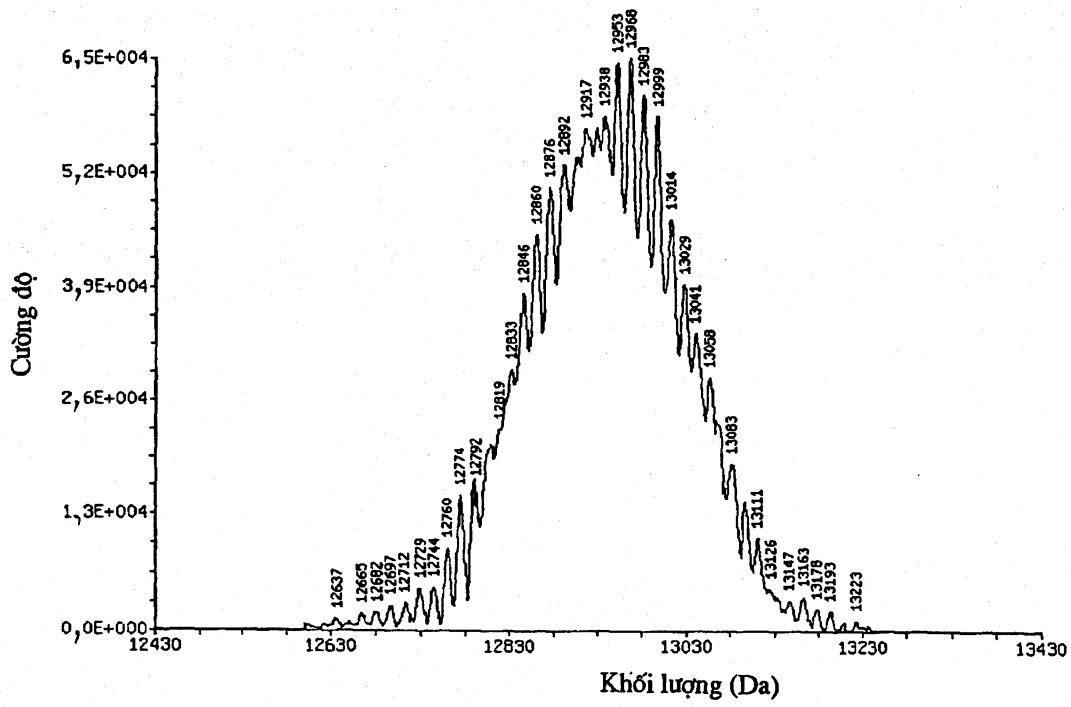

6,5E+004
5,2E+004
3,9E+004
2,6E+004
1,3E+004
0,0E+000
Cường độ
12430
12630
12830
13030
13230
13430
Khối lượng (Da)
12637
12665
12682
12697
12712
12729
12744
12760
12774
12792
12819
12833
12846
12860
12876
12892
12917
12938
12953
12968
12983
12999
13014
13029
13041
13058
13083
13111
13126
13147
13163
13178
13193
13223

Fig.37

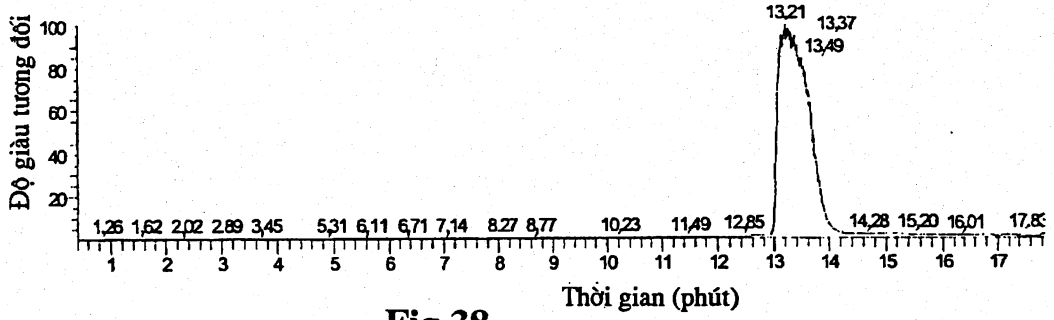


Fig.38

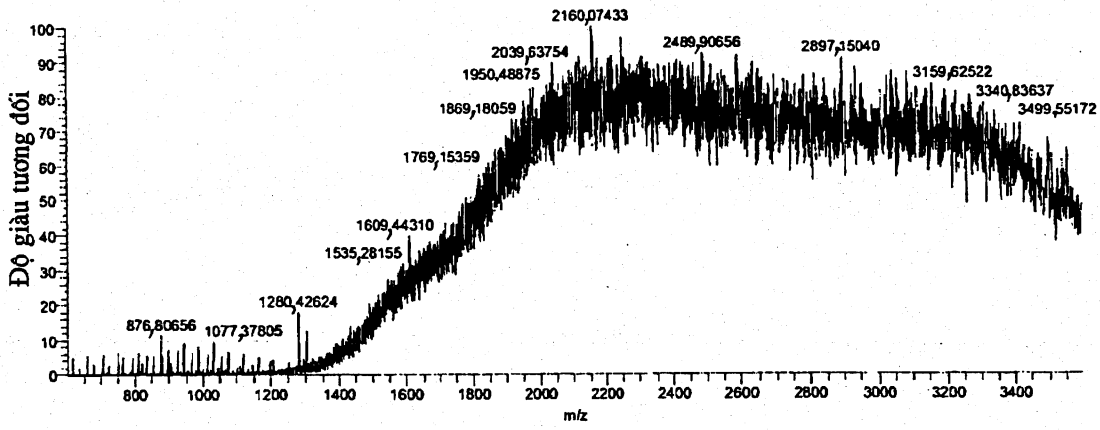


Fig.39

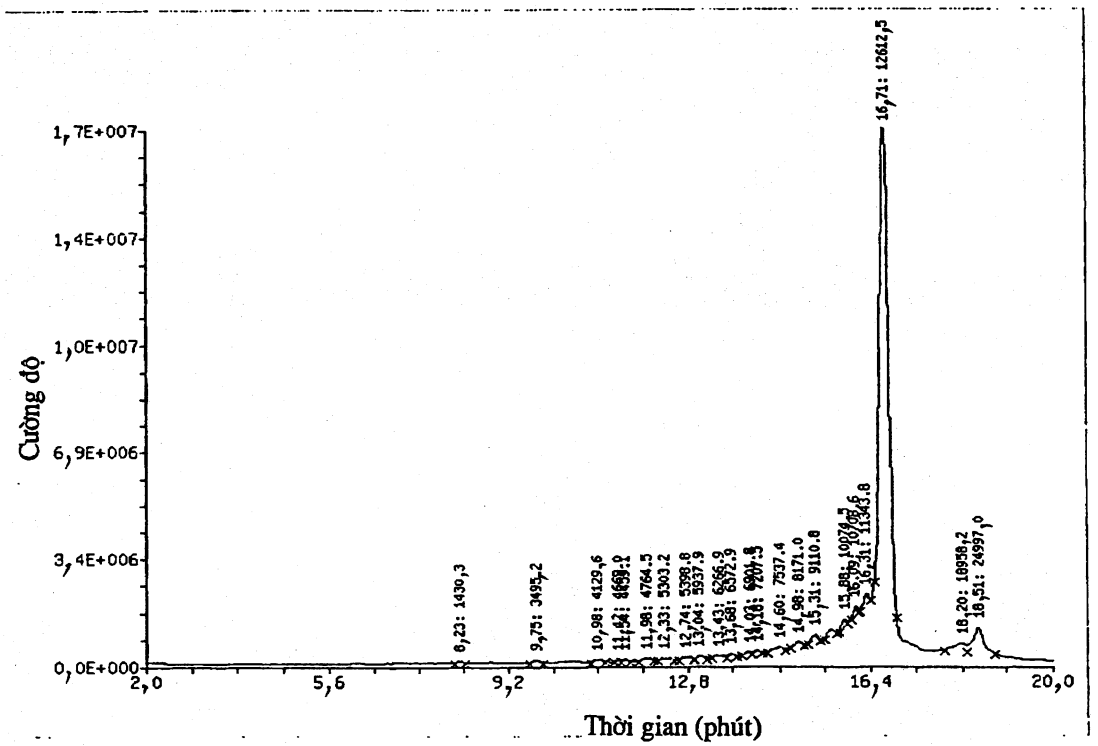


Fig.40

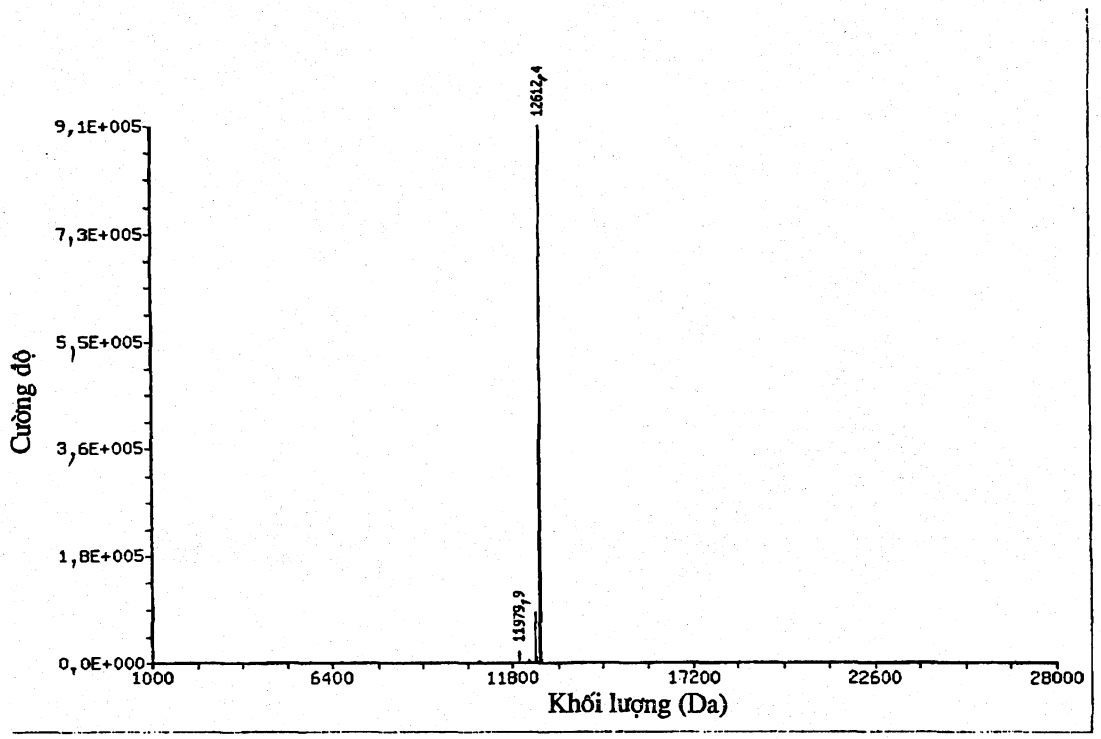


Fig.41

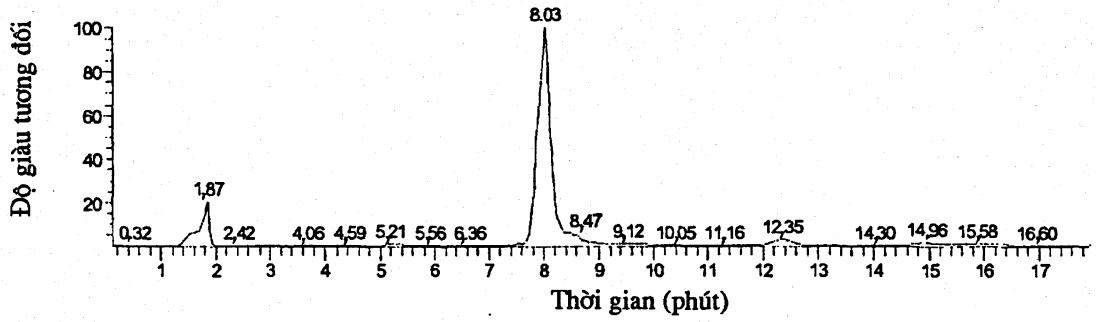


Fig.42

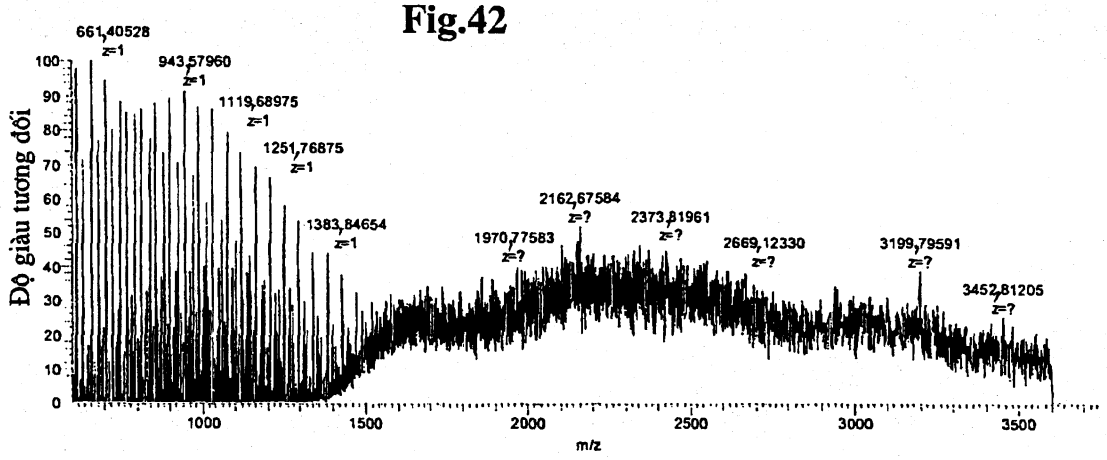


Fig.43

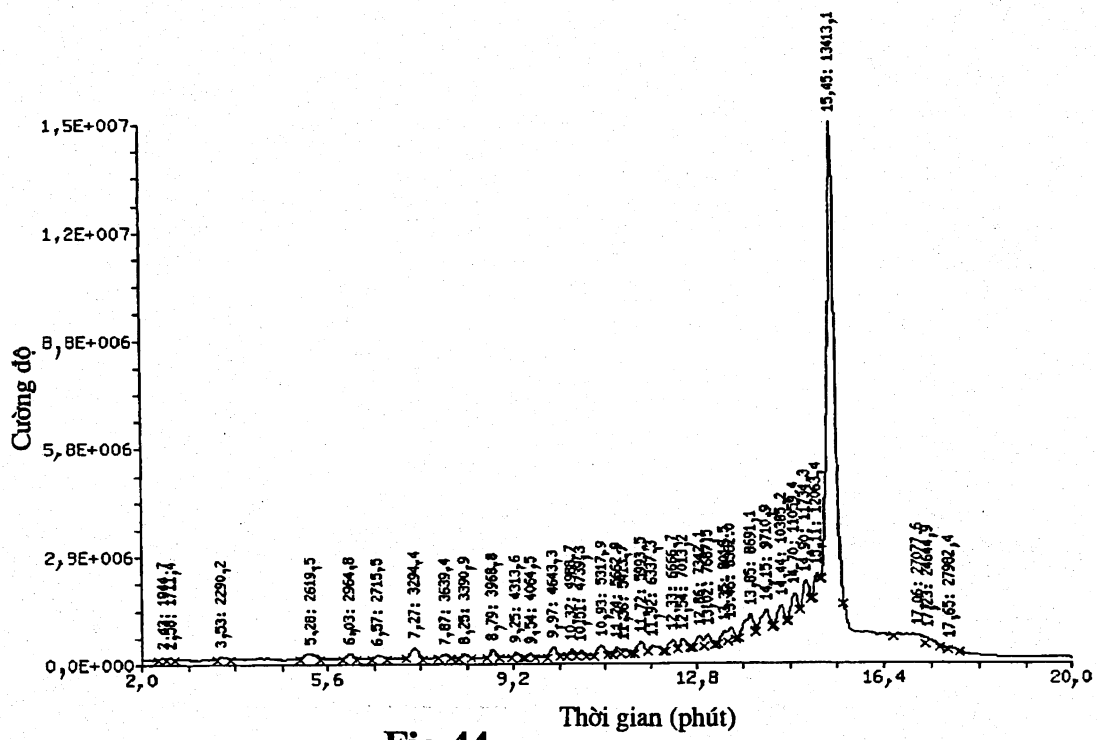

1,5E+007
1,2E+007
8,8E+006
5,8E+006
2,9E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,6
9,2
12,8
16,4
20,0
Thời gian (phút)
15,45: 13413,1
17,65: 27982,4

Fig.44

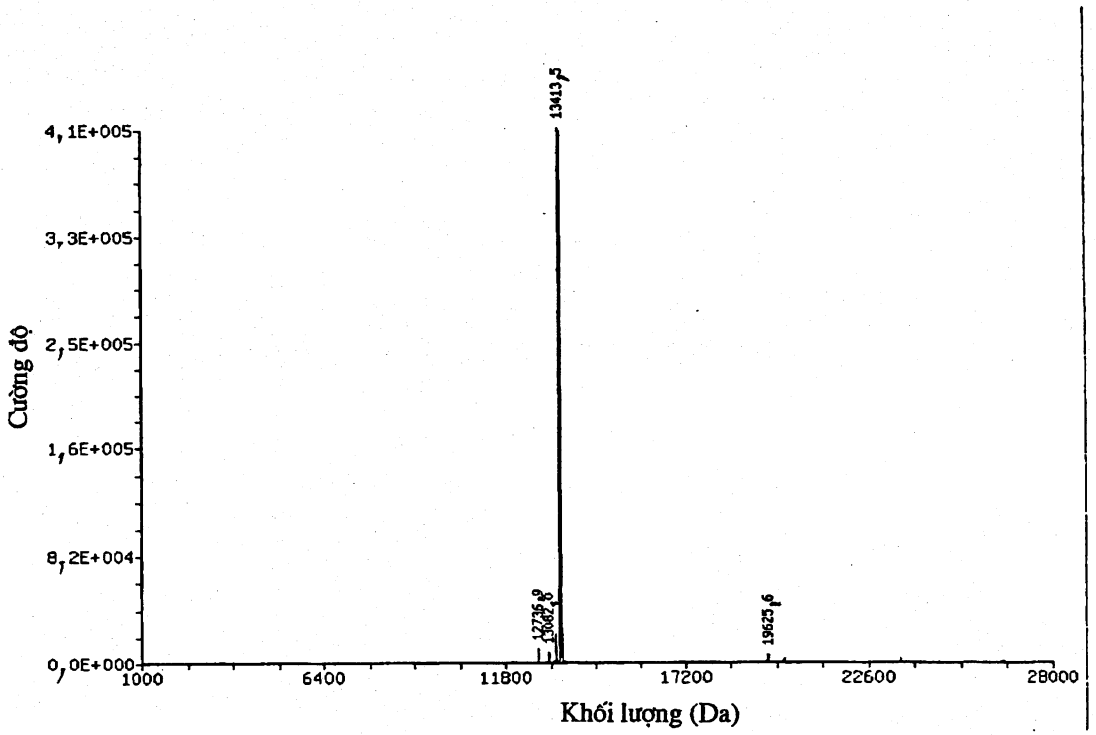

4,1E+005
3,3E+005
2,5E+005
1,6E+005
8,2E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)
13413,5
19625,6

Fig.45

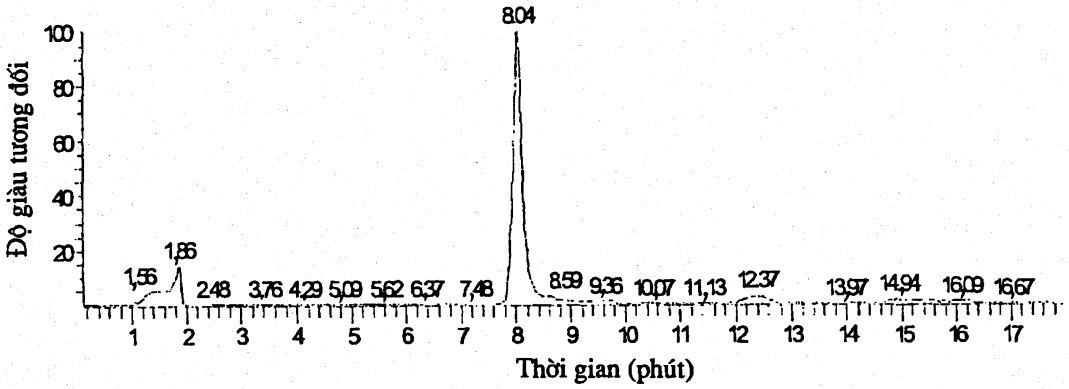


Fig.46

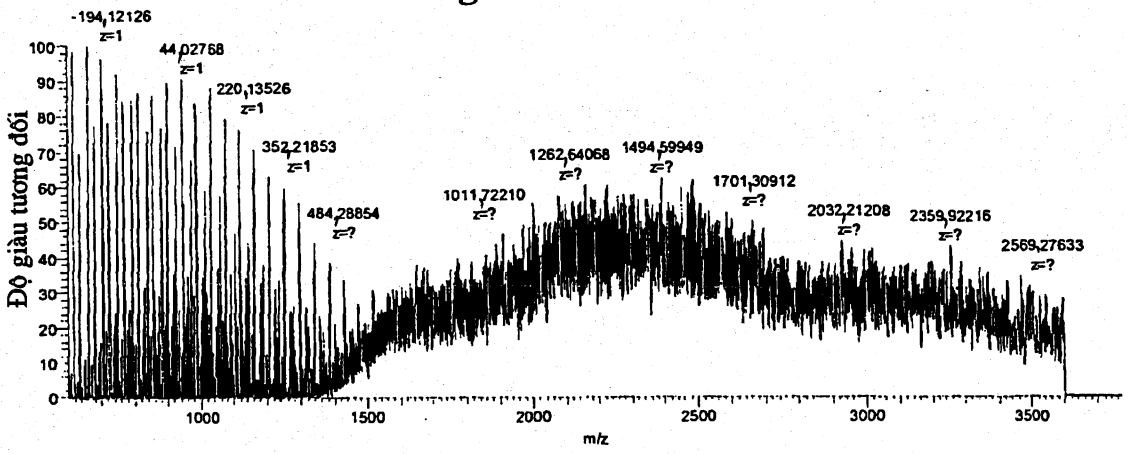


Fig.47

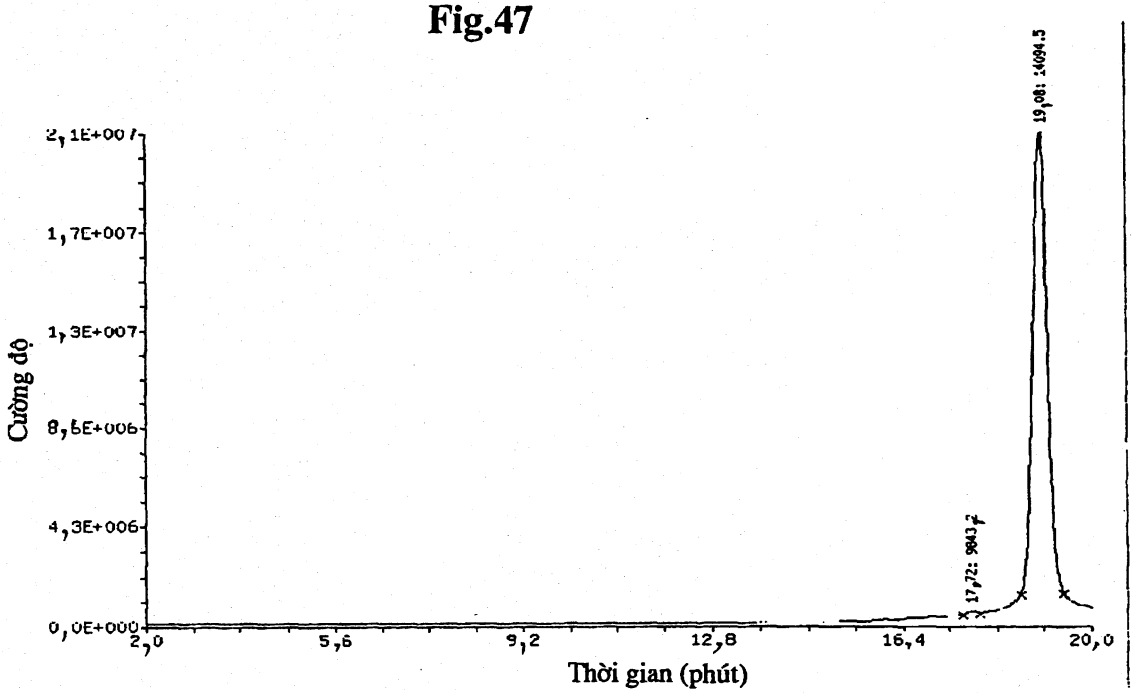


Fig.48

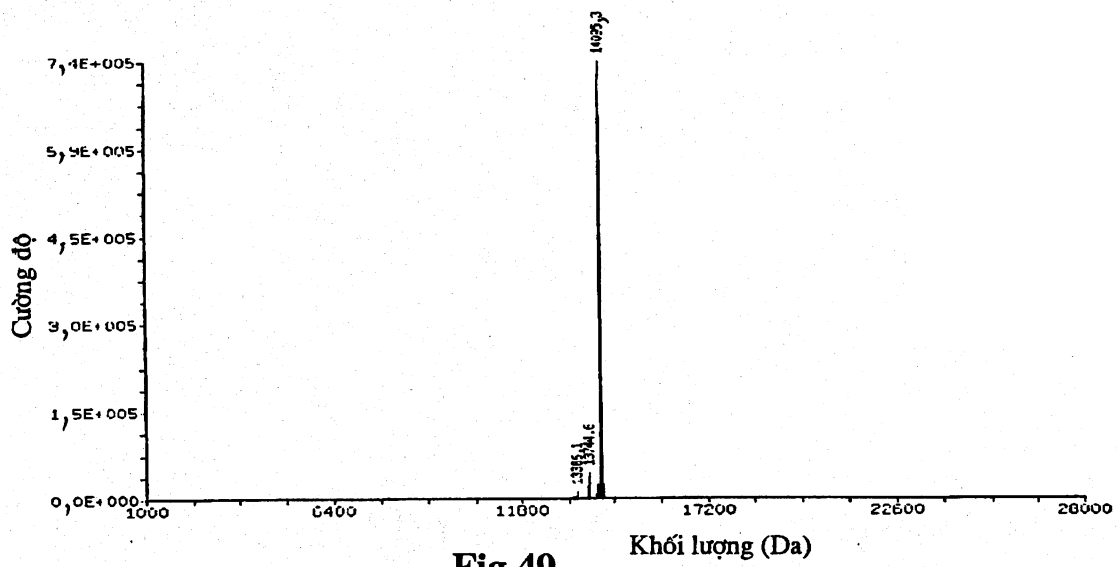


Fig.49

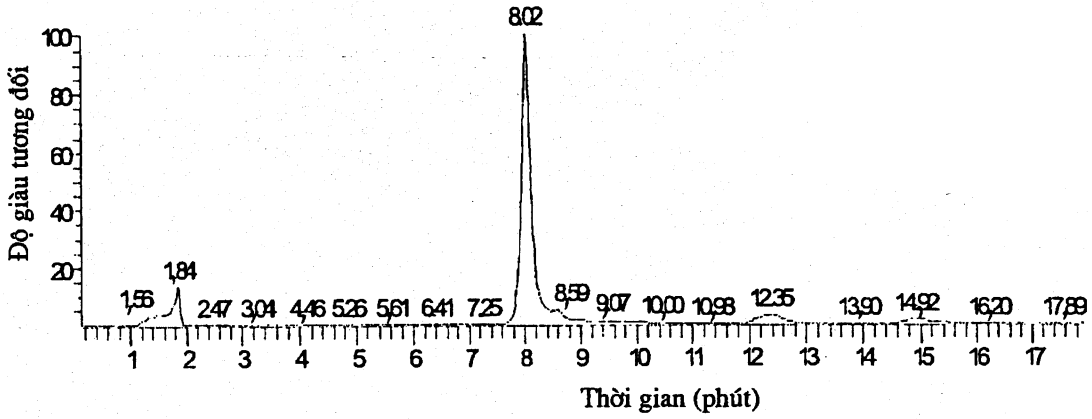


Fig.50

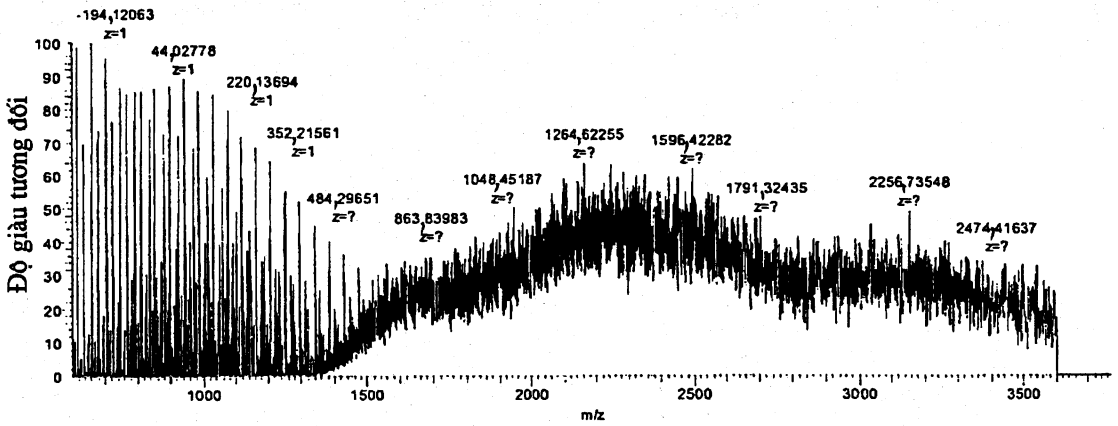


Fig.51

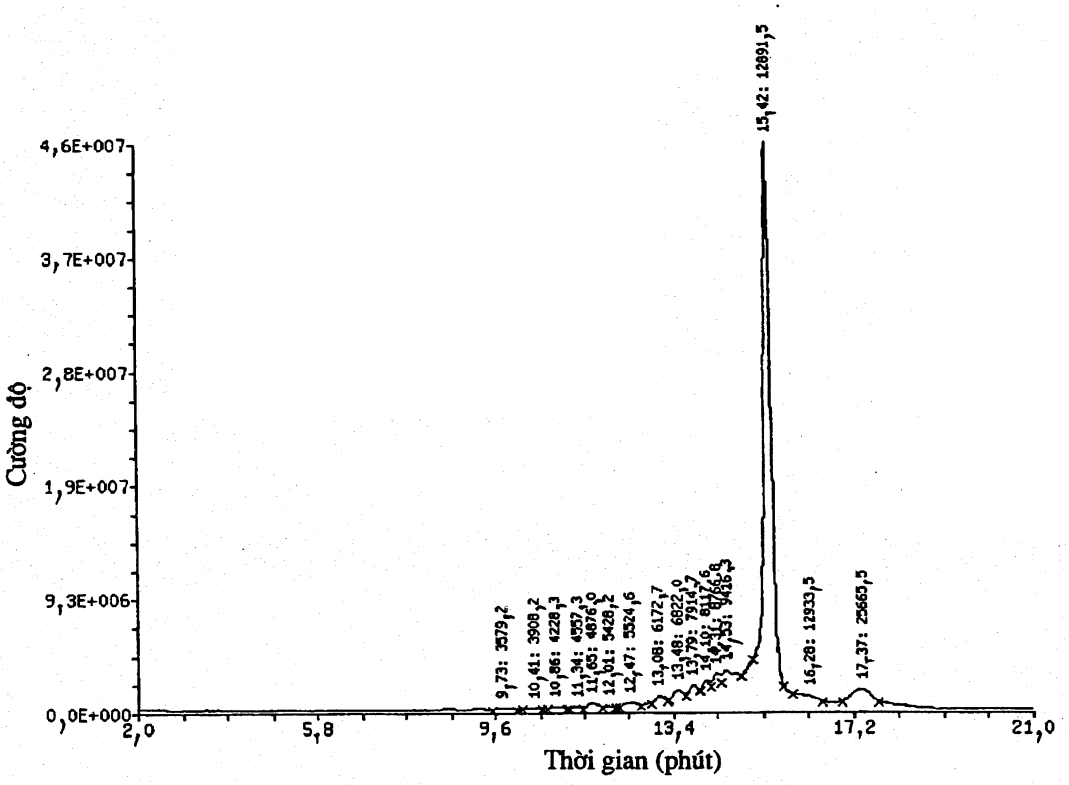

4,6E+007
3,7E+007
2,8E+007
1,9E+007
9,3E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
15,42: 12891,5
9,73: 3579,2
10,41: 3908,2
10,86: 4228,3
11,24: 4552,3
11,65: 4876,0
12,01: 5428,2
12,47: 5324,6
13,08: 6172,7
13,48: 6822,0
13,79: 7914,7
16,28: 12933,5
17,37: 25665,5

Fig.52

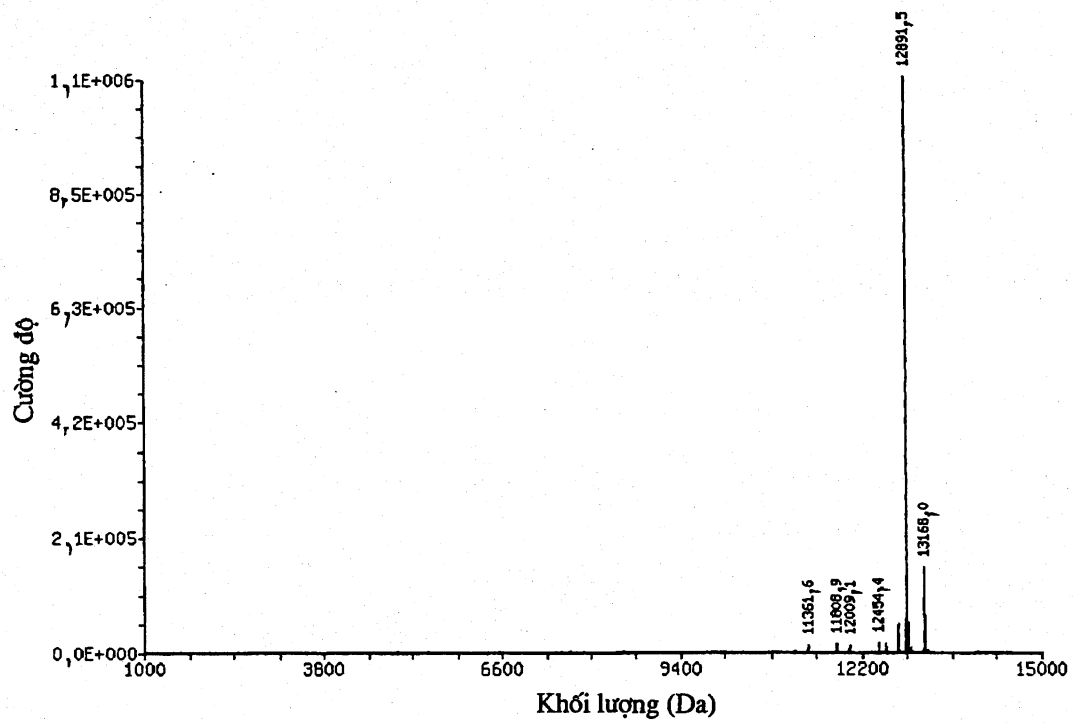

1,1E+006
8,5E+005
6,3E+005
4,2E+005
2,1E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
3800
6600
9400
12200
15000
Khối lượng (Da)
12891,5
13166,0
11361,6
11808,9
12009,1
12454,4

Fig.53

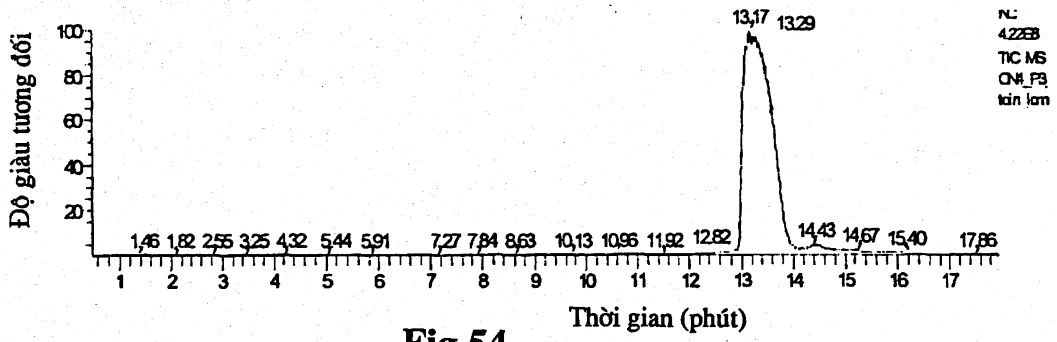


Fig.54

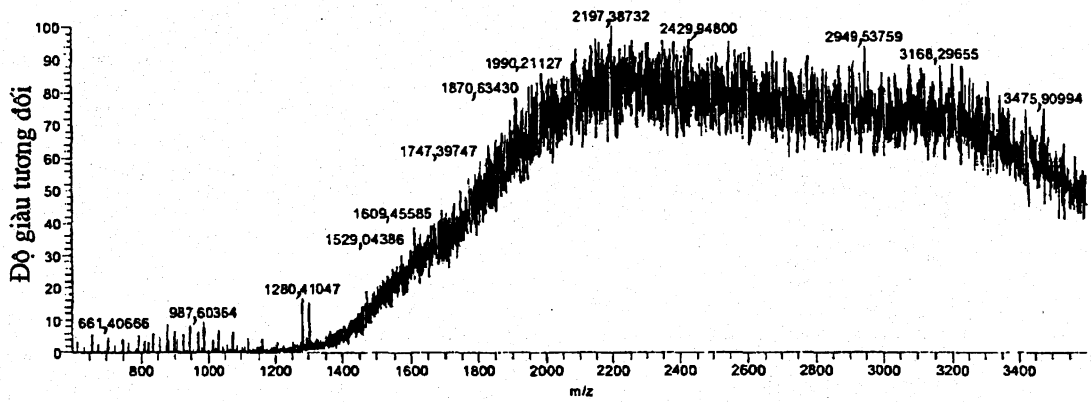


Fig.55

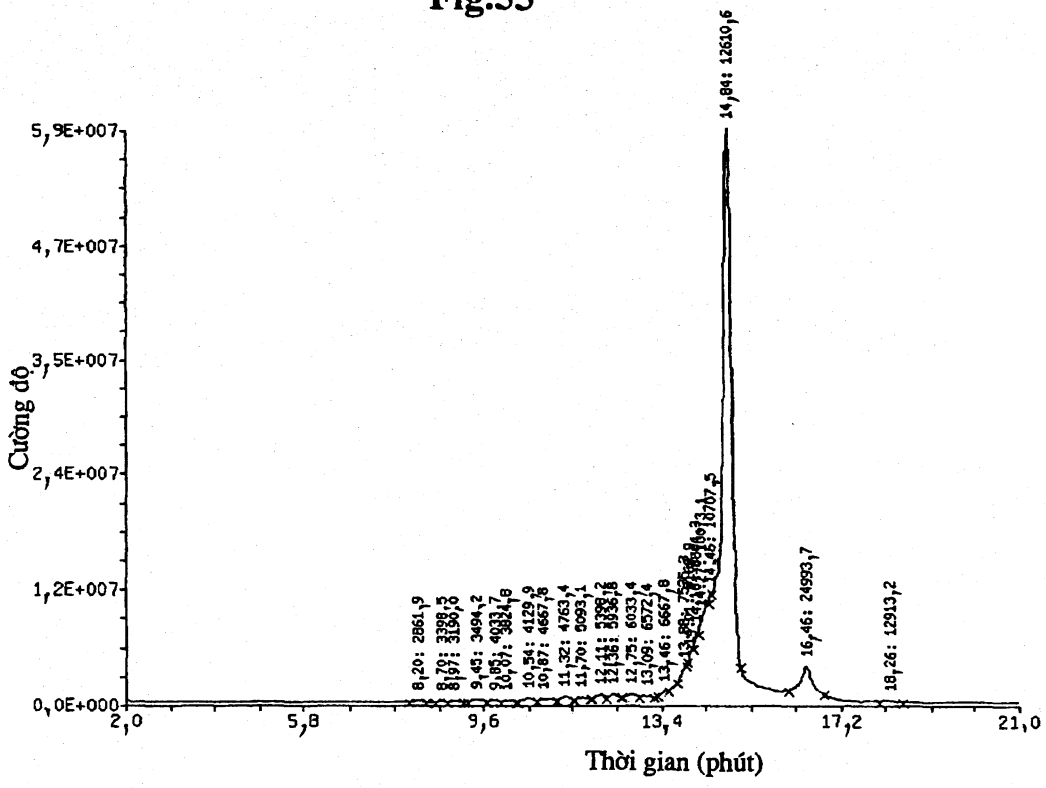


Fig.56

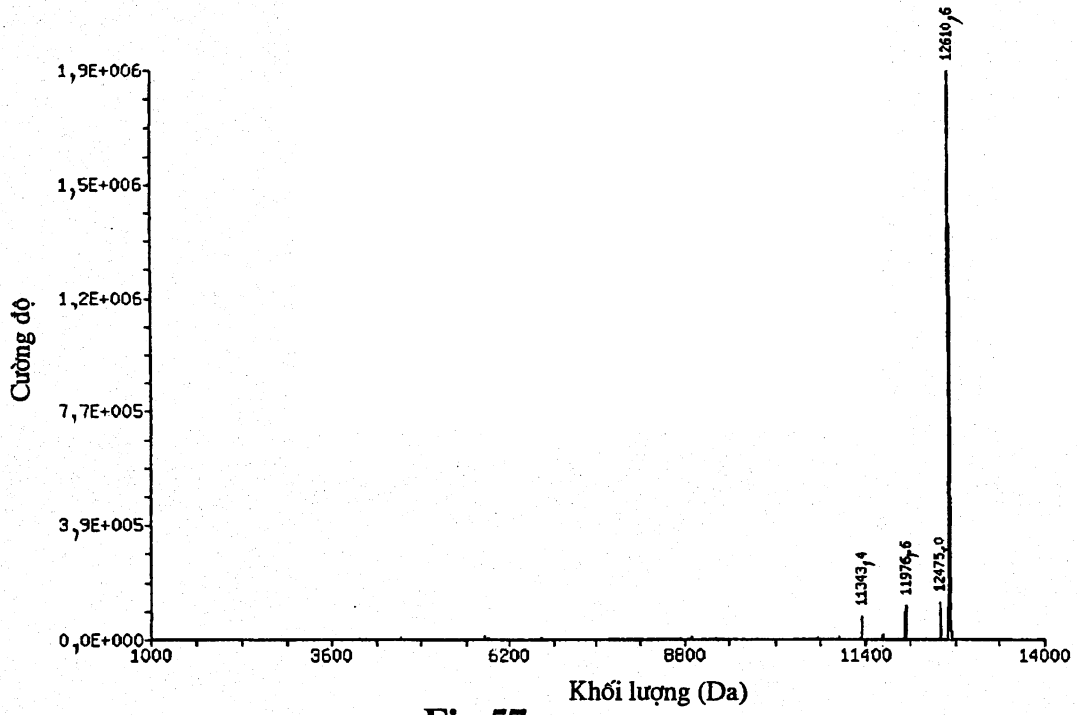

1,9E+006
1,5E+006
1,2E+006
7,7E+005
3,9E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
3600
6200
8800
11400
14000
Khối lượng (Da)
11343,4
11976,6
12473,0
12610,6

Fig.57

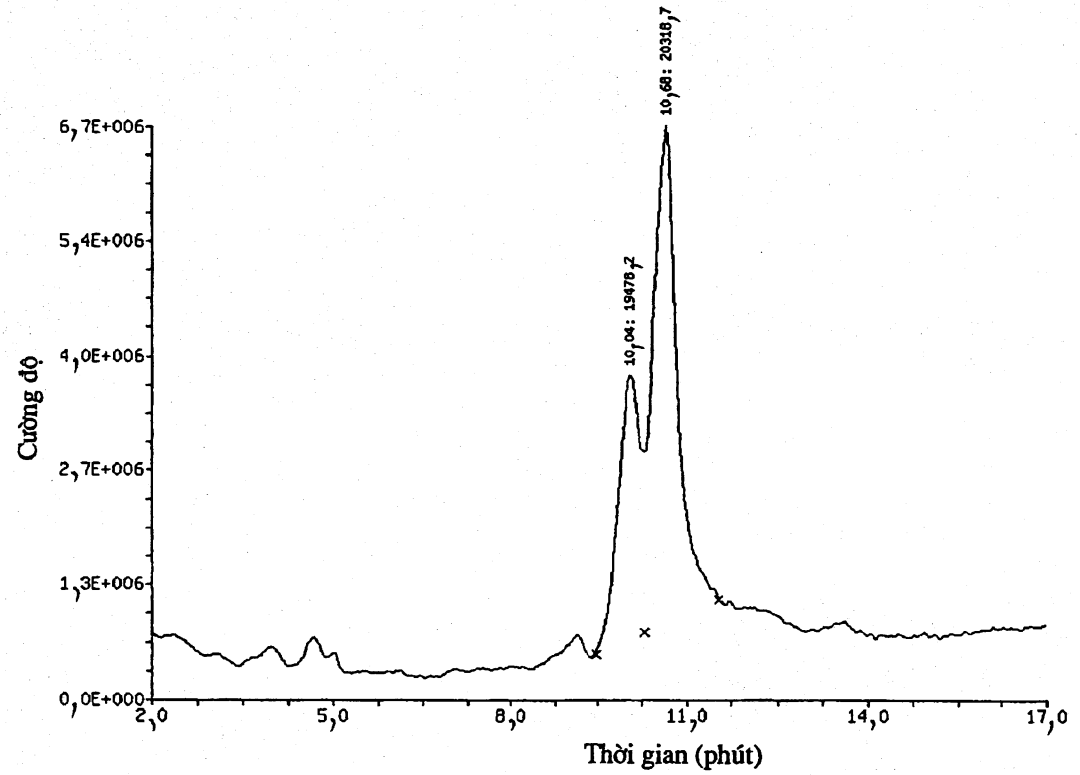

6,7E+006
5,4E+006
4,0E+006
2,7E+006
1,3E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (phút)
10,04: 19478,2
10,68: 20318,7

Fig.58

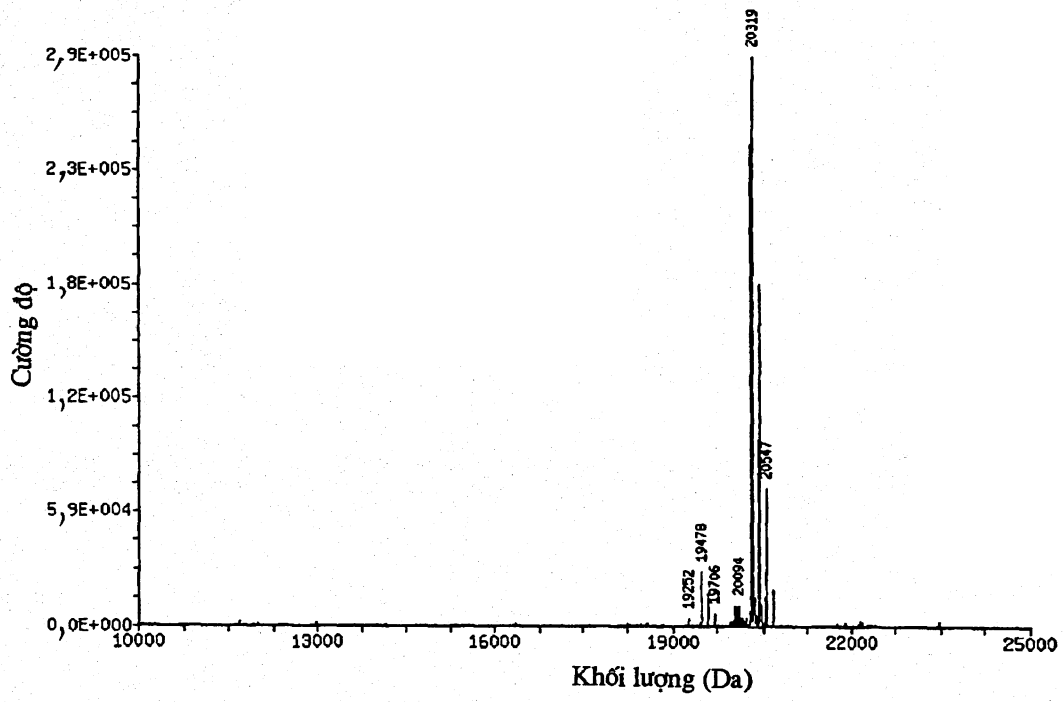

2,9E+005
2,3E+005
1,8E+005
1,2E+005
5,9E+004
0,0E+000
Cường độ
10000
13000
16000
19000
22000
25000
Khối lượng (Da)
20319
20347
19478
19252
19706
20094

Fig.59

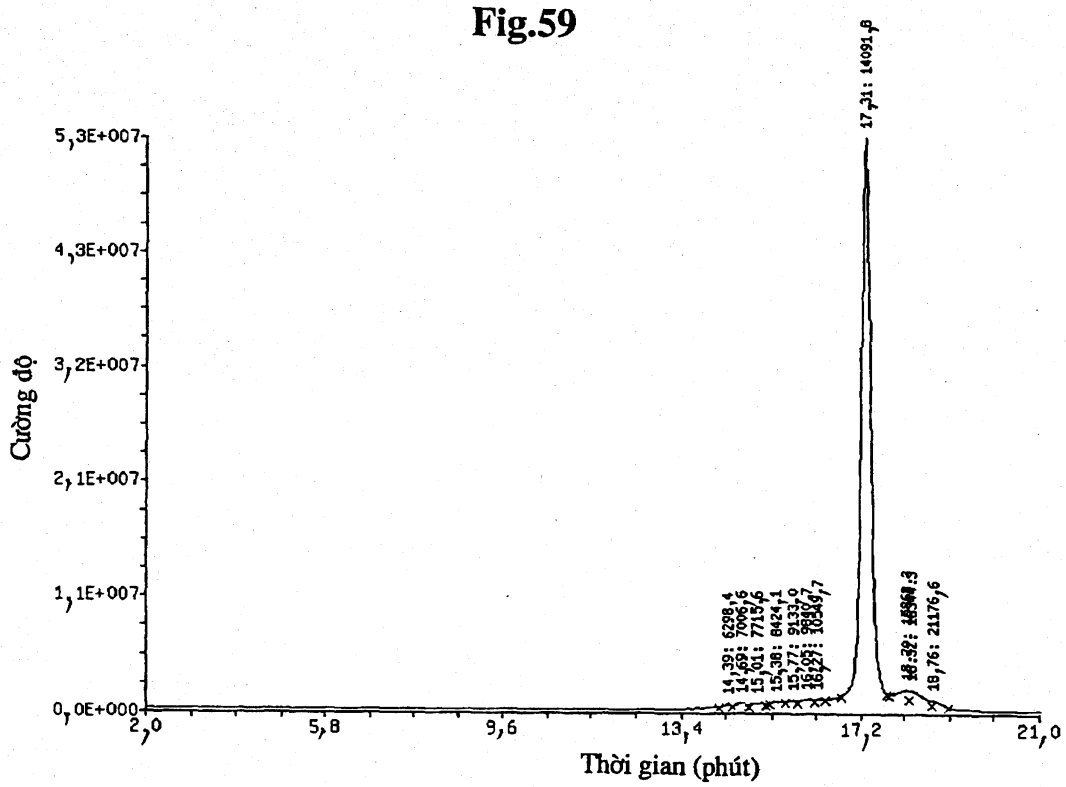

5,3E+007
4,3E+007
3,2E+007
2,1E+007
1,1E+007
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
17,31: 14091,8
18,76: 21176,6

Fig.60

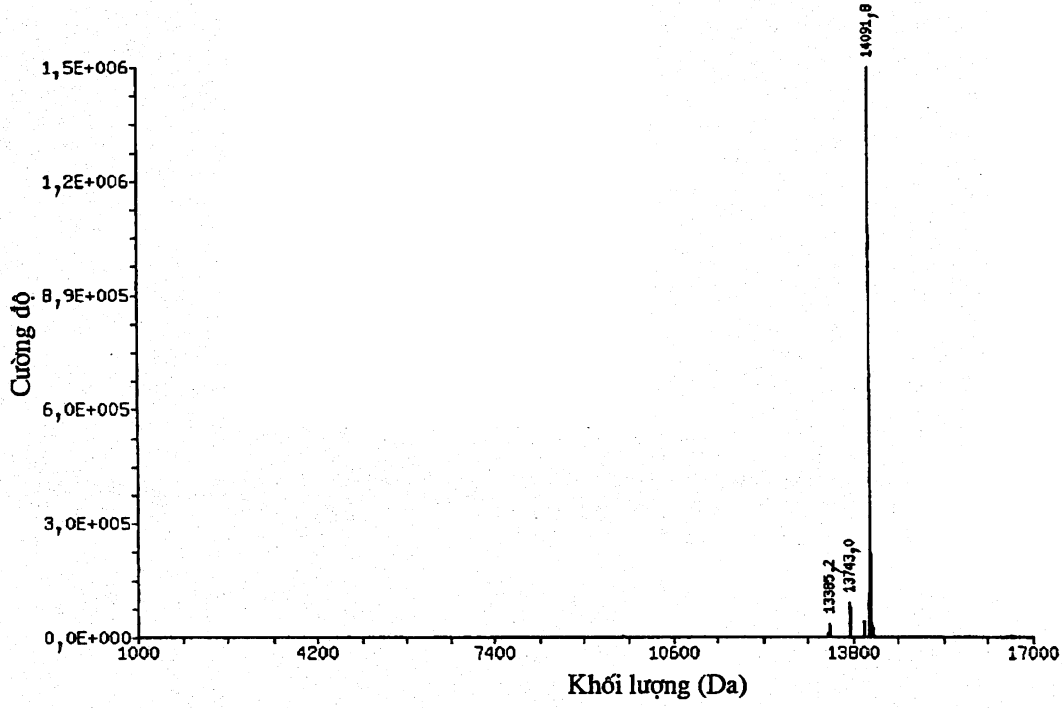

14091,8
13395,2
13743,0
1,5E+006
1,2E+006
8,9E+005
6,0E+005
3,0E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
4200
7400
10600
13800
17000
Khối lượng (Da)

Fig.61

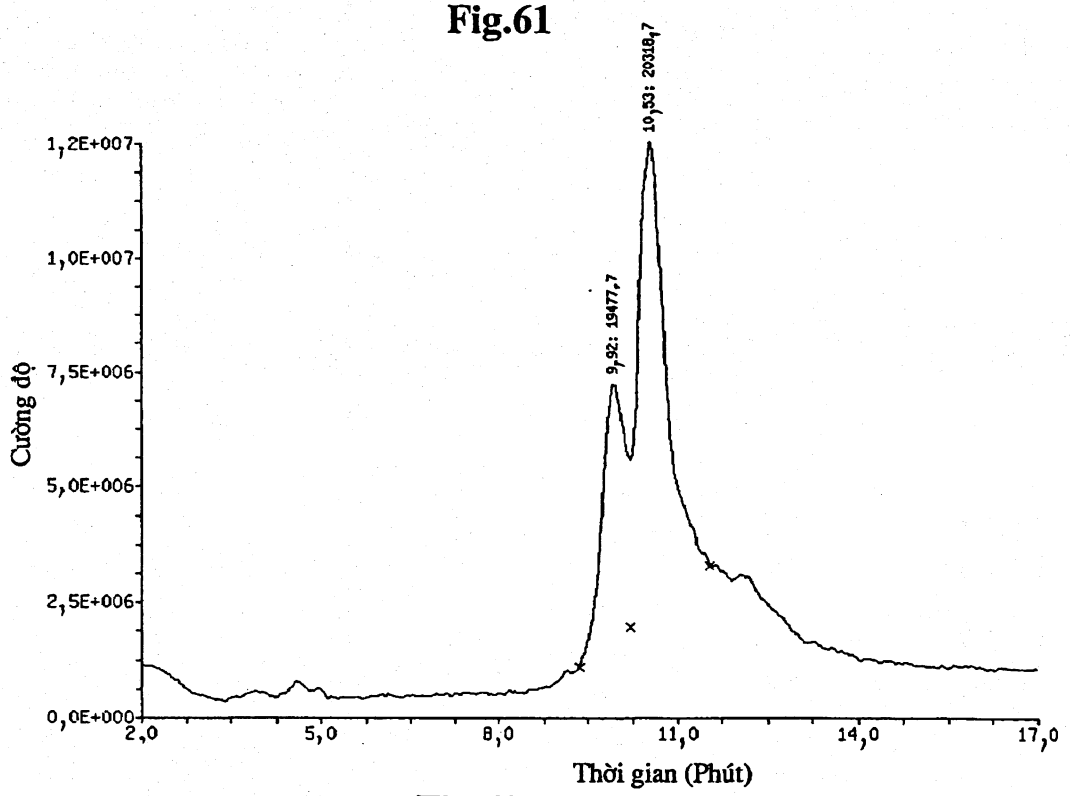

10,53: 20318,7
9,92: 19477,7
1,2E+007
1,0E+007
7,5E+006
5,0E+006
2,5E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (Phút)

Fig.62

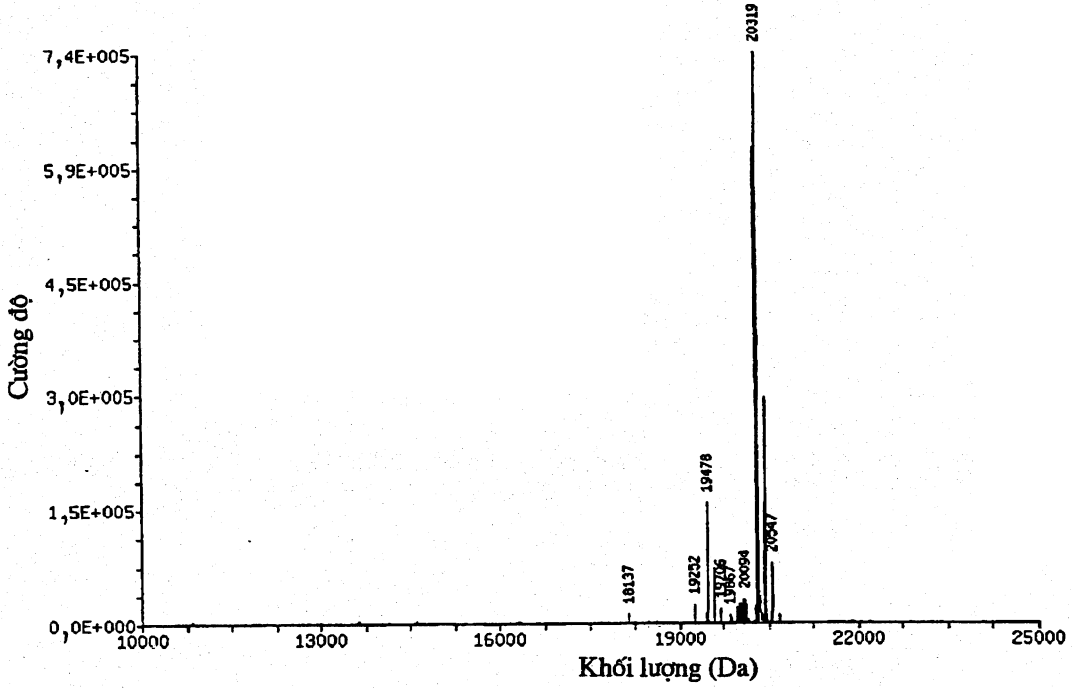

7,4E+005
5,9E+005
4,5E+005
3,0E+005
1,5E+005
0,0E+000
Cường độ
10000
13000
16000
19000
22000
25000
Khối lượng (Da)
20319
19478
18137
19252
20047

Fig.63

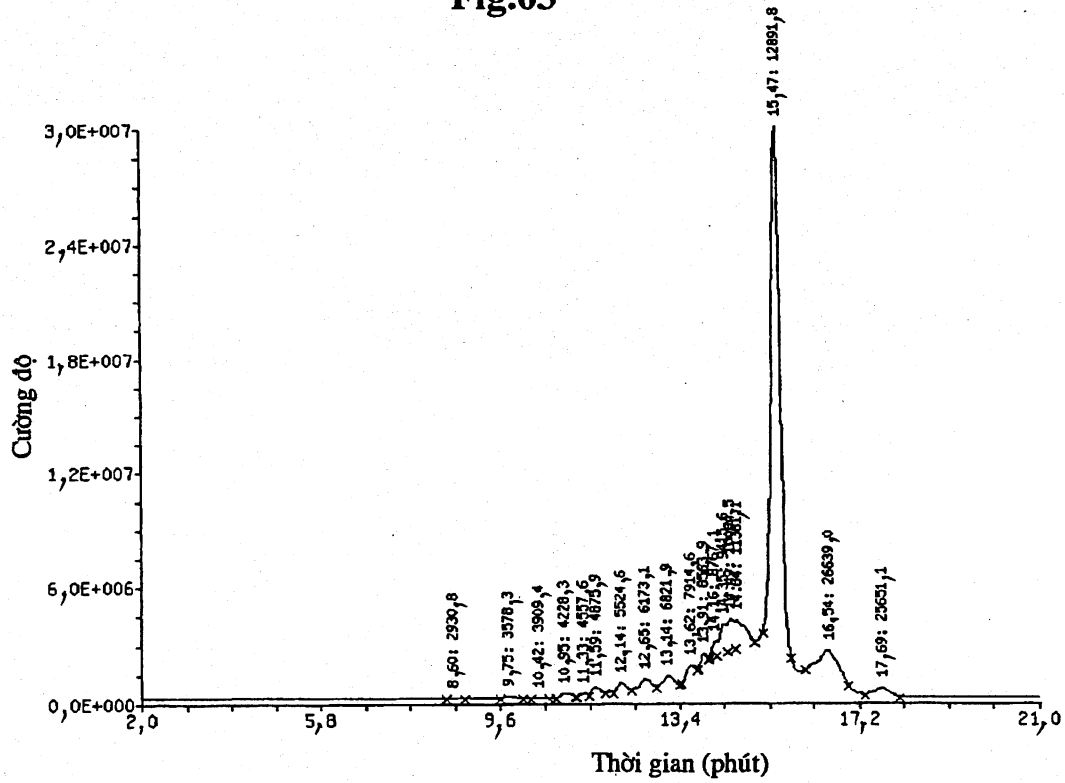

3,0E+007
2,4E+007
1,8E+007
1,2E+007
6,0E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
15,47: 12891,8
16,54: 26639,0
17,69: 25651,1
8,601: 2930,8
9,73: 3578,3
10,42: 3909,4
13,62: 7914,6
12,65: 6173,1
13,44: 6821,9
12,14: 5524,6

Fig.64

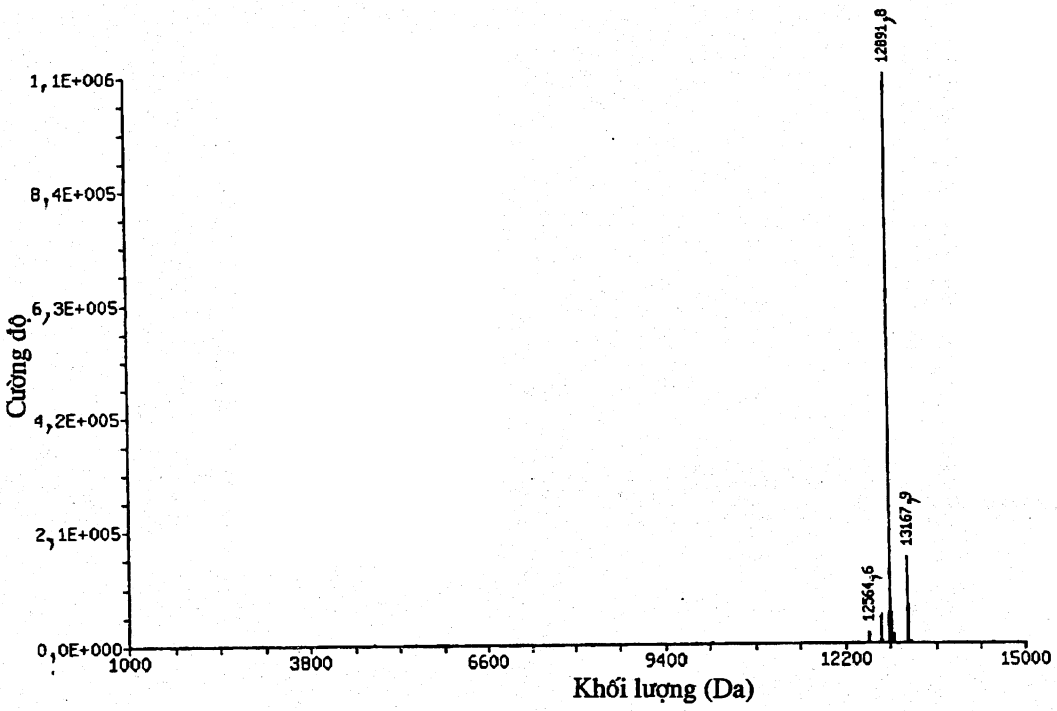

1,1E+006
8,4E+005
6,3E+005
4,2E+005
2,1E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
3800
6600
9400
12200
15000
Khối lượng (Da)
12891,8
13167,9
12564,6

Fig.65

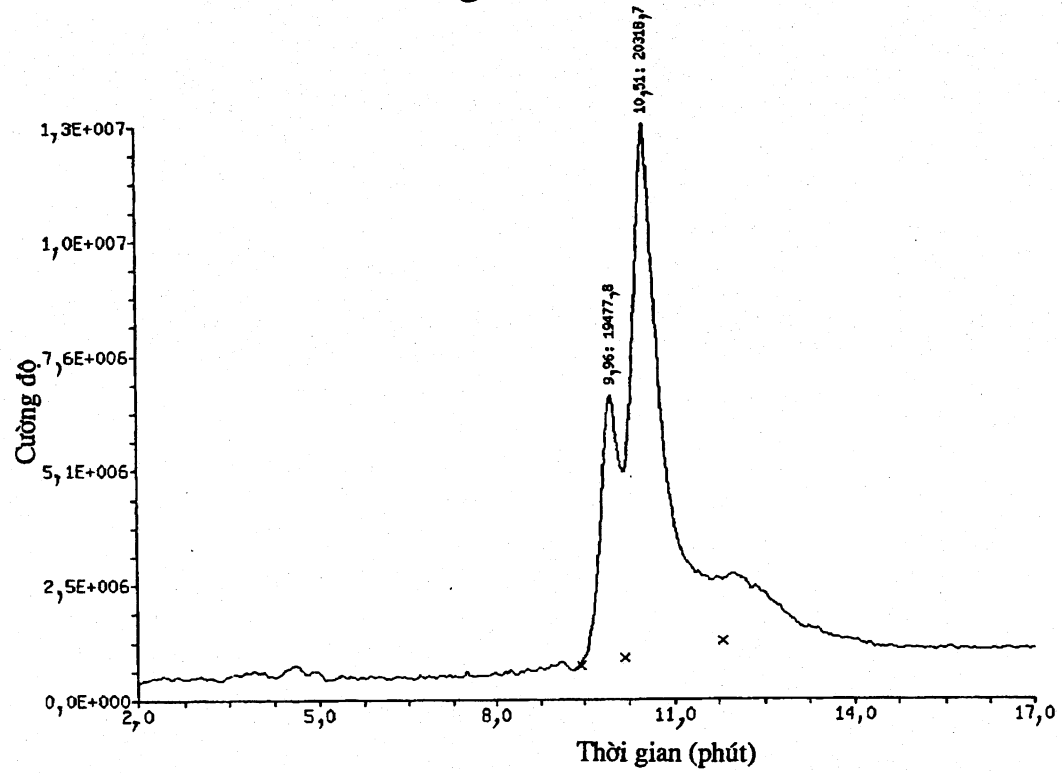

1,3E+007
1,0E+007
7,6E+006
5,1E+006
2,5E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,0
8,0
11,0
14,0
17,0
Thời gian (phút)
10,51: 20318,7
9,96: 19477,8

Fig.66

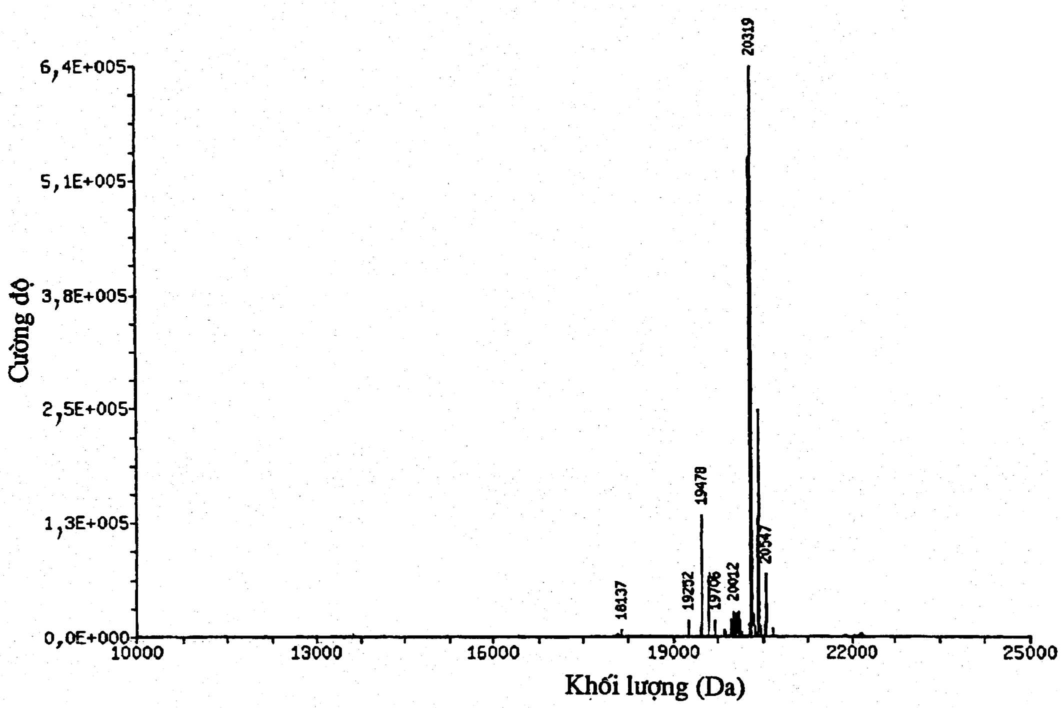

6,4E+005
5,1E+005
3,8E+005
2,5E+005
1,3E+005
0,0E+000
Cường độ
20319
19478
18137
19232
19706
20012
20547
10000
13000
16000
19000
22000
25000
Khối lượng (Da)

Fig.67

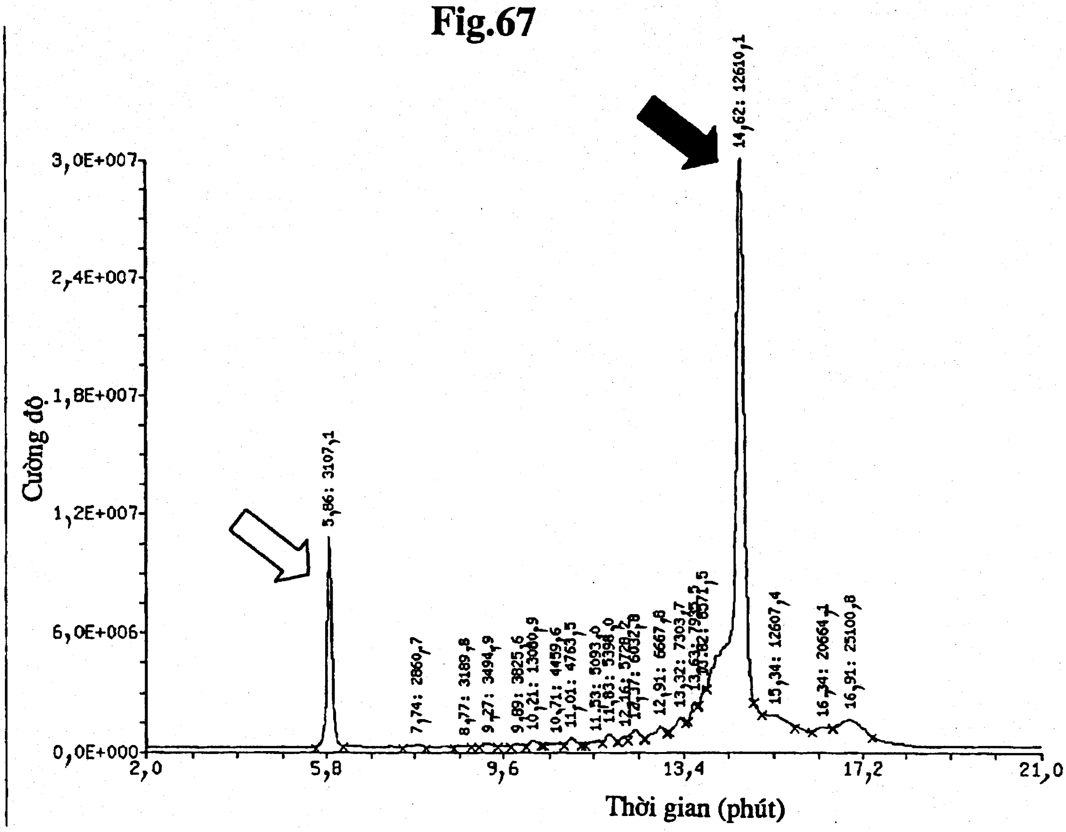

3,0E+007
2,4E+007
1,8E+007
1,2E+007
6,0E+006
0,0E+000
Cường độ
14,62: 12610,1
5,86: 3107,1
7,74: 2860,7
8,77: 3189,8
9,27: 3494,9
9,89: 3825,6
10,21: 13000,9
10,71: 4459,6
11,01: 4763,5
11,53: 5093,0
12,91: 6667,8
13,32: 7303,7
15,34: 12607,4
16,34: 20664,1
16,91: 25100,8
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.68

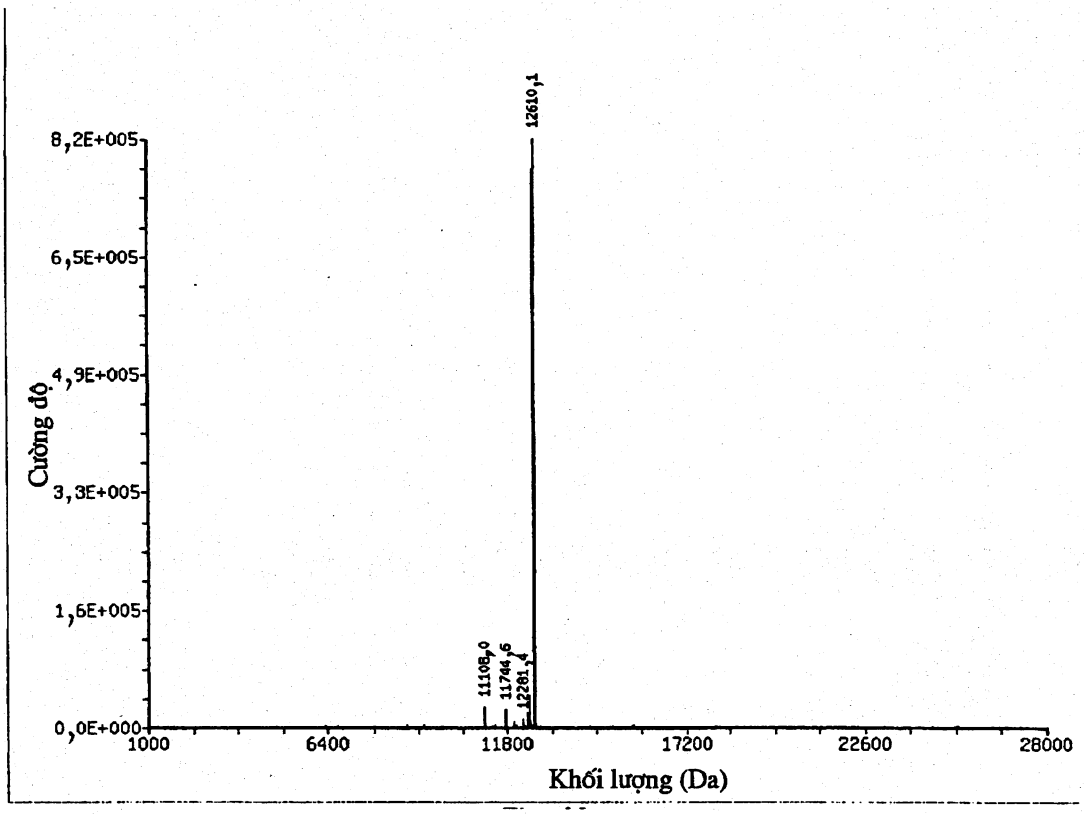

12610,1
11108,0
11744,6
12281,4
8,2E+005
6,5E+005
4,9E+005
3,3E+005
1,6E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.69

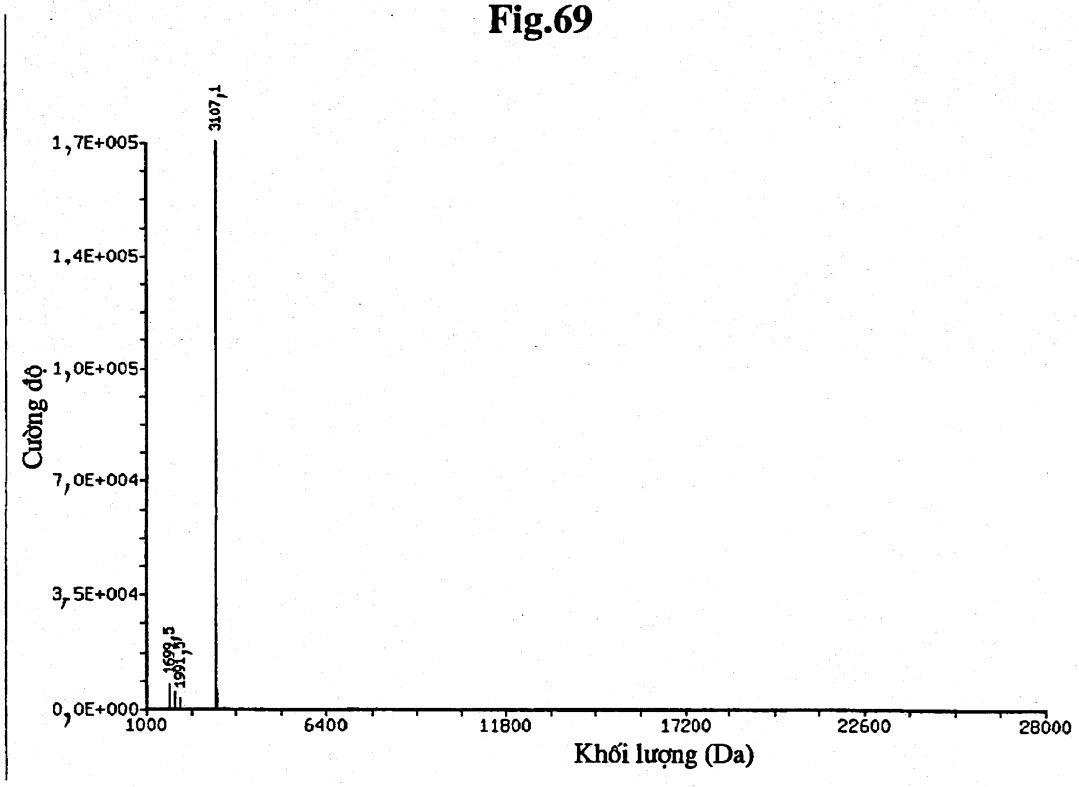

3107,1
1692,3
1991,7
1,7E+005
1,4E+005
1,0E+005
7,0E+004
3,5E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.70

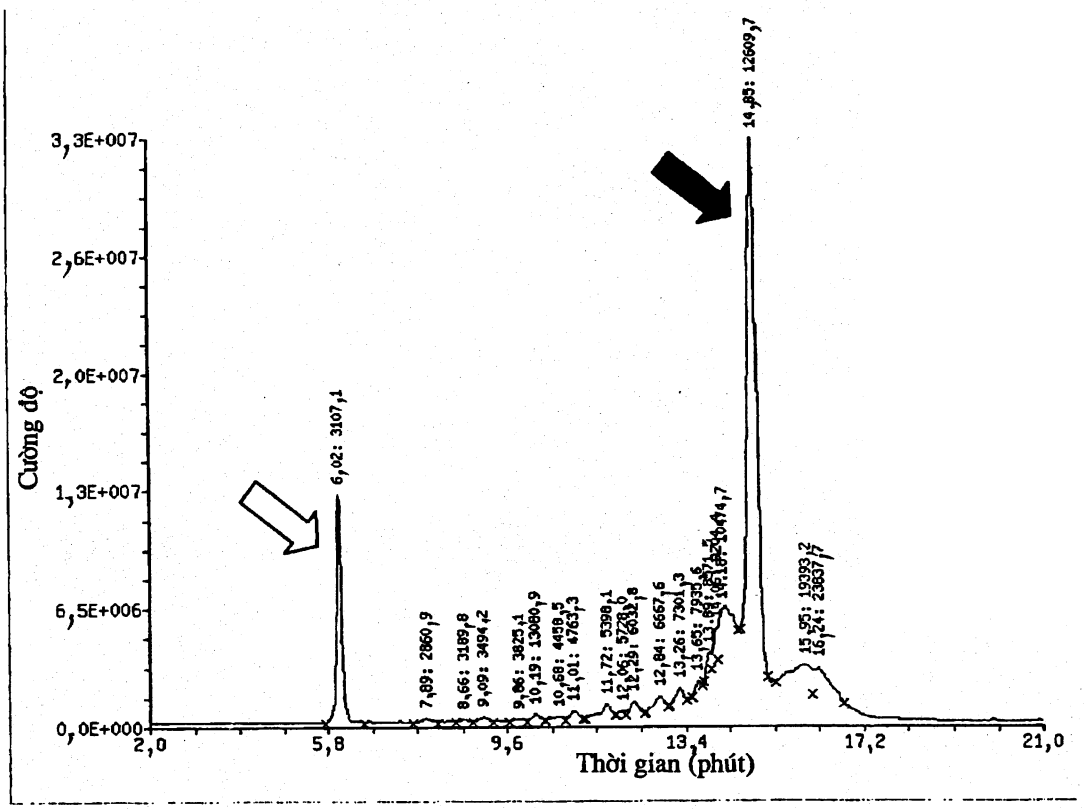

Cường độ
3,3E+007
2,6E+007
2,0E+007
1,3E+007
6,5E+006
0,0E+000
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
6,02: 3107,1
14,83: 12609,7

Fig.71

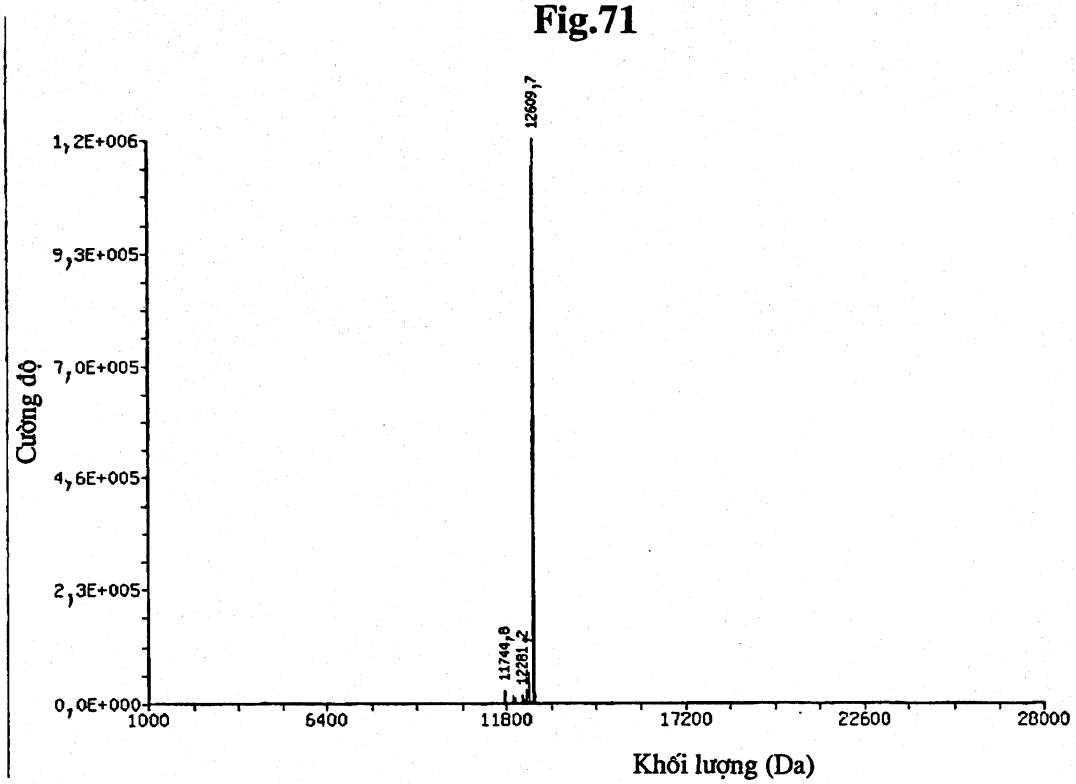

Cường độ
1,2E+006
9,3E+005
7,0E+005
4,6E+005
2,3E+005
0,0E+000
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)
12609,7
11744,8
12281,2

Fig.72

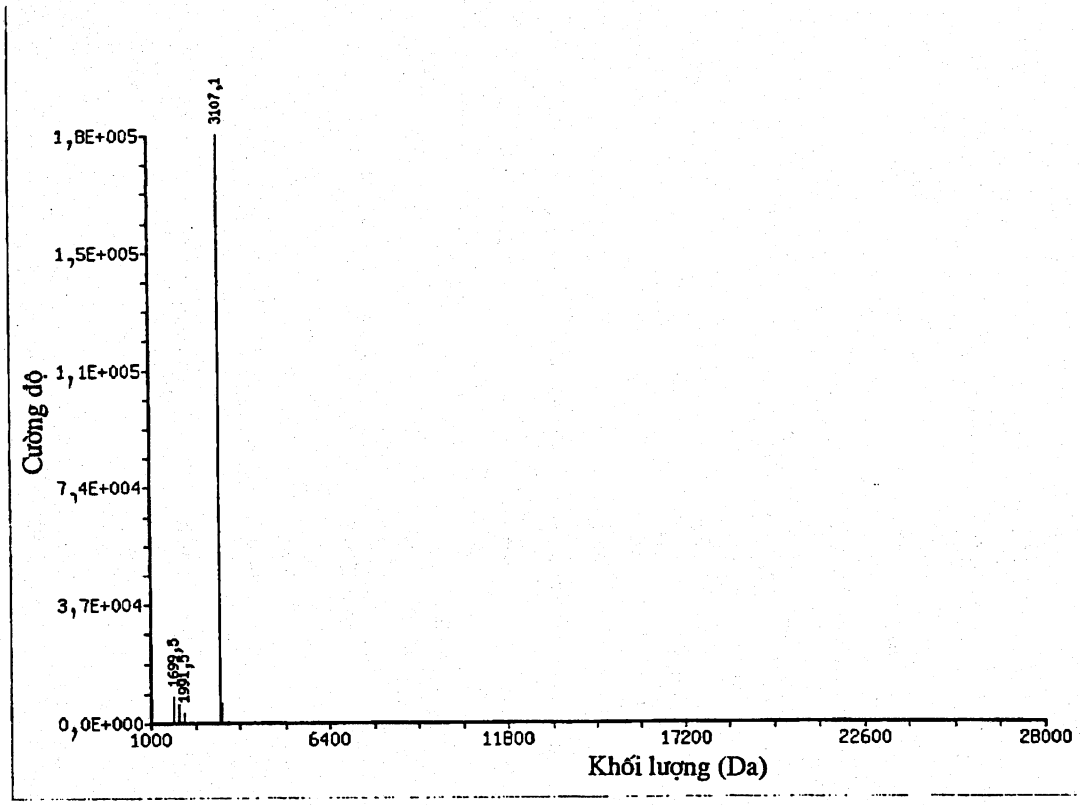

3107,1
1,8E+005
1,5E+005
1,1E+005
7,4E+004
3,7E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.73

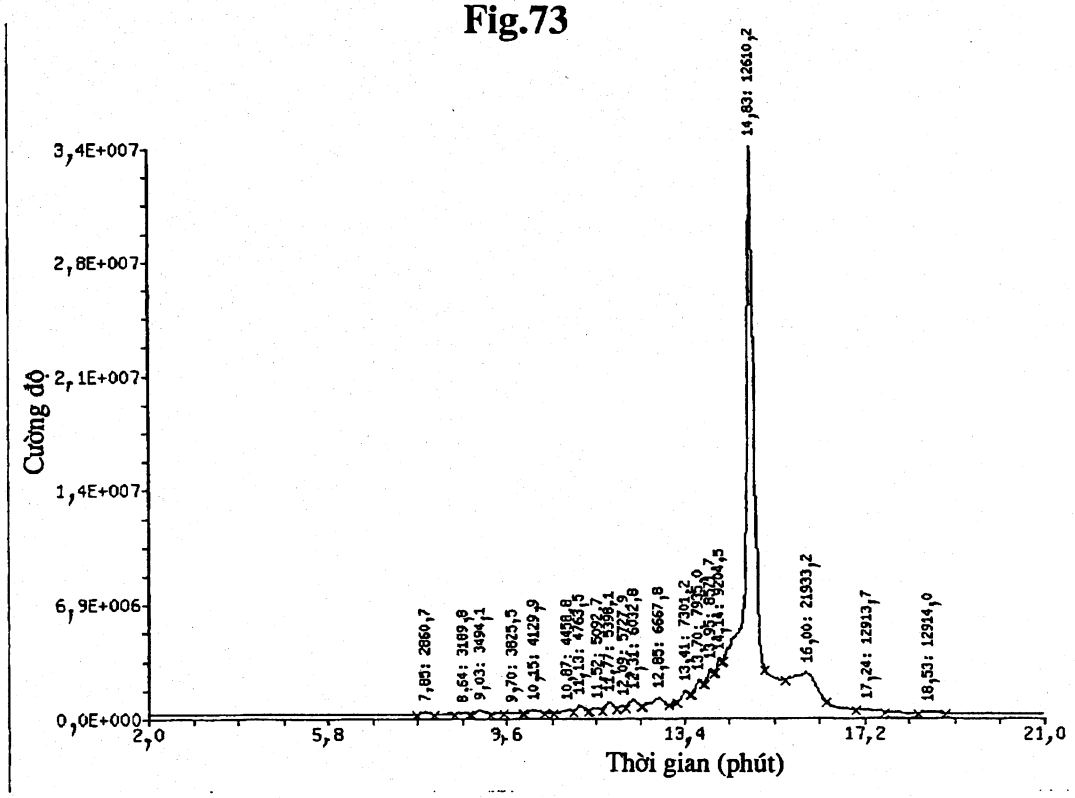

14,83: 12610,2
3,4E+007
2,8E+007
2,1E+007
1,4E+007
6,9E+006
0,0E+000
Cường độ
16,00: 21933,2
17,24: 12913,7
18,53: 12914,0
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.74

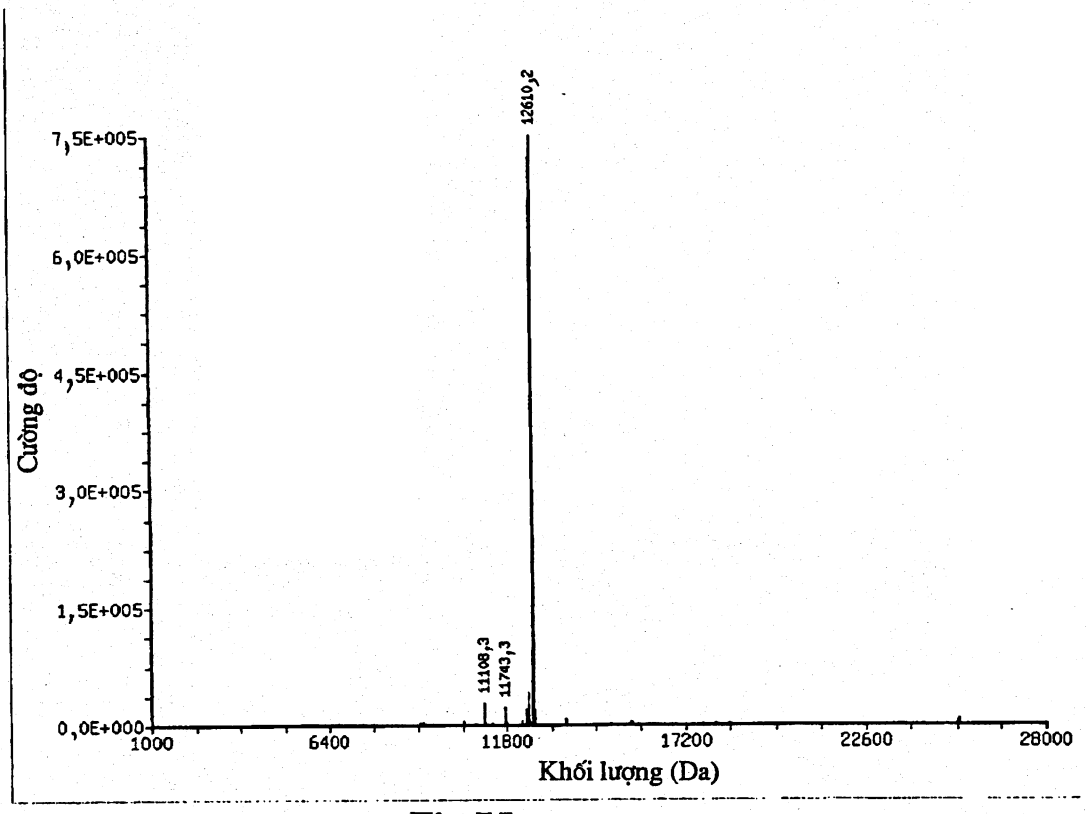


Fig.75

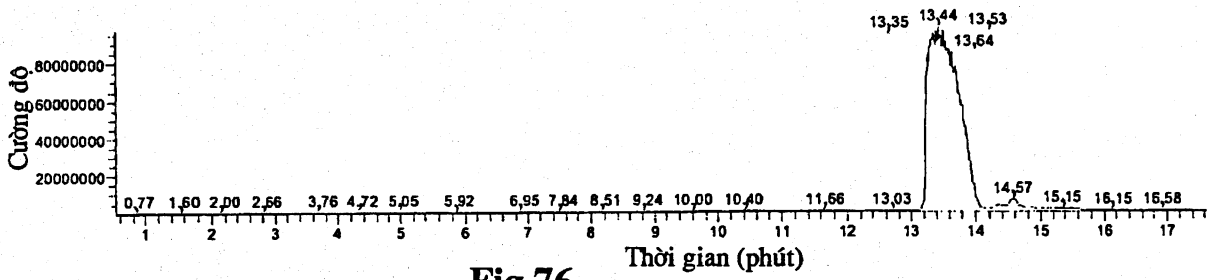


Fig.76

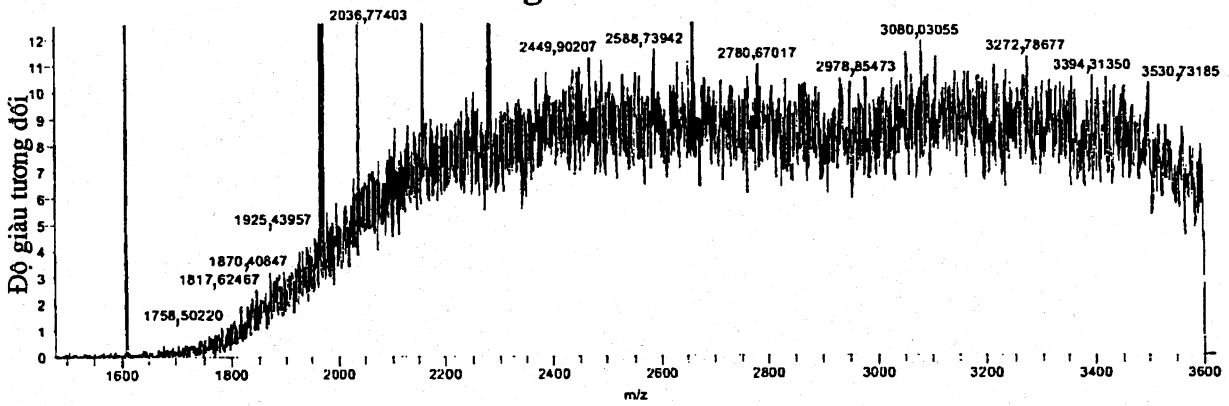


Fig.77

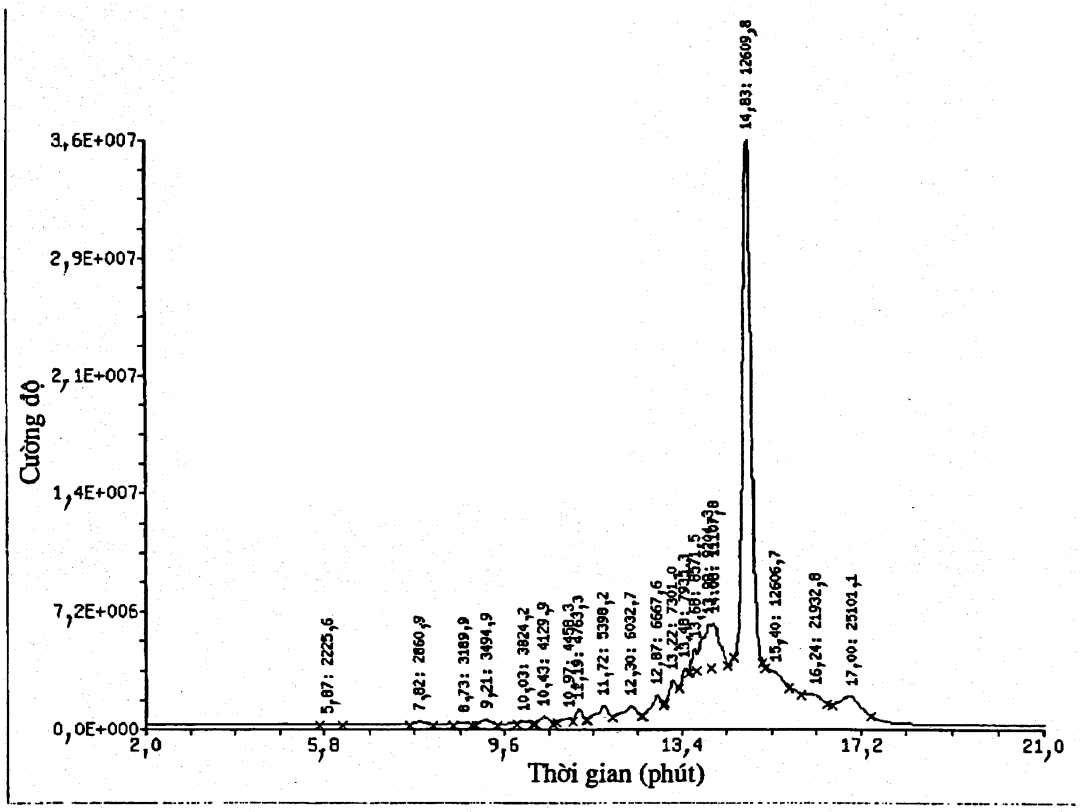

3,6E+007
2,9E+007
2,1E+007
1,4E+007
7,2E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
5,87: 2225,6
7,82: 2860,8
8,73: 3189,9
9,21: 3494,9
10,03: 3824,2
10,43: 4129,9
10,97: 4458,3
11,19: 4763,3
11,72: 5398,2
12,30: 6032,7
12,87: 6667,6
13,22: 7301,0
14,83: 12609,8
15,40: 12606,7
16,24: 21932,8
17,00: 25101,1

Fig.78

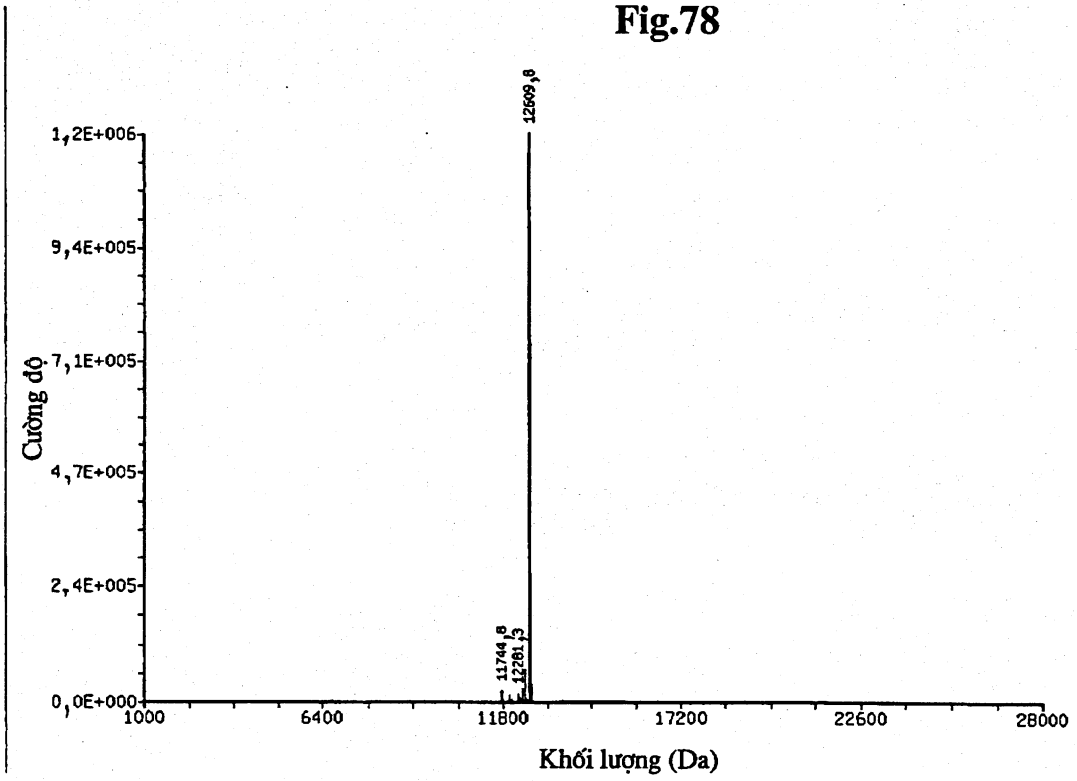

1,2E+006
9,4E+005
7,1E+005
4,7E+005
2,4E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)
12609,8
11744,8
12281,3

Fig.79

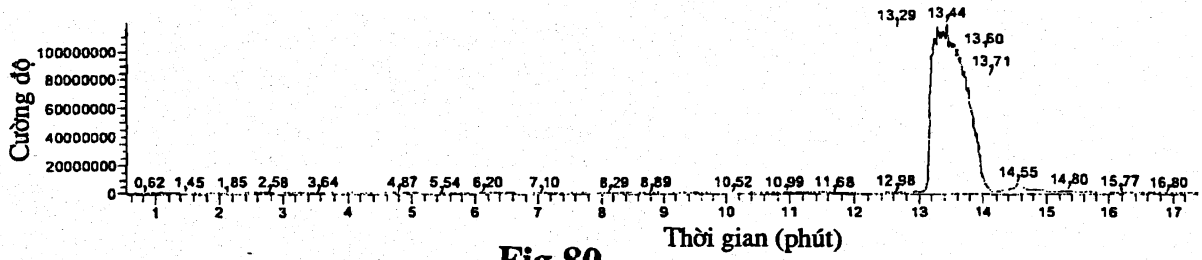


Fig.80

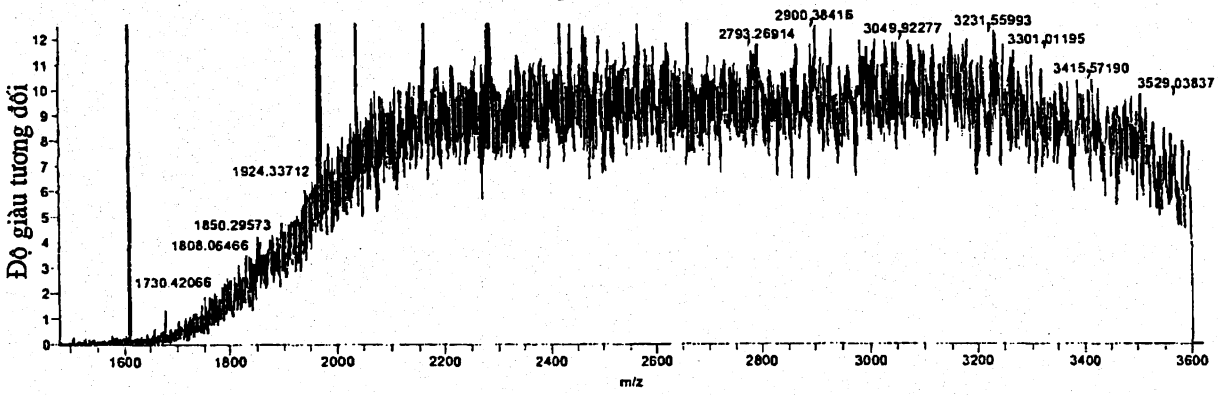


Fig.81

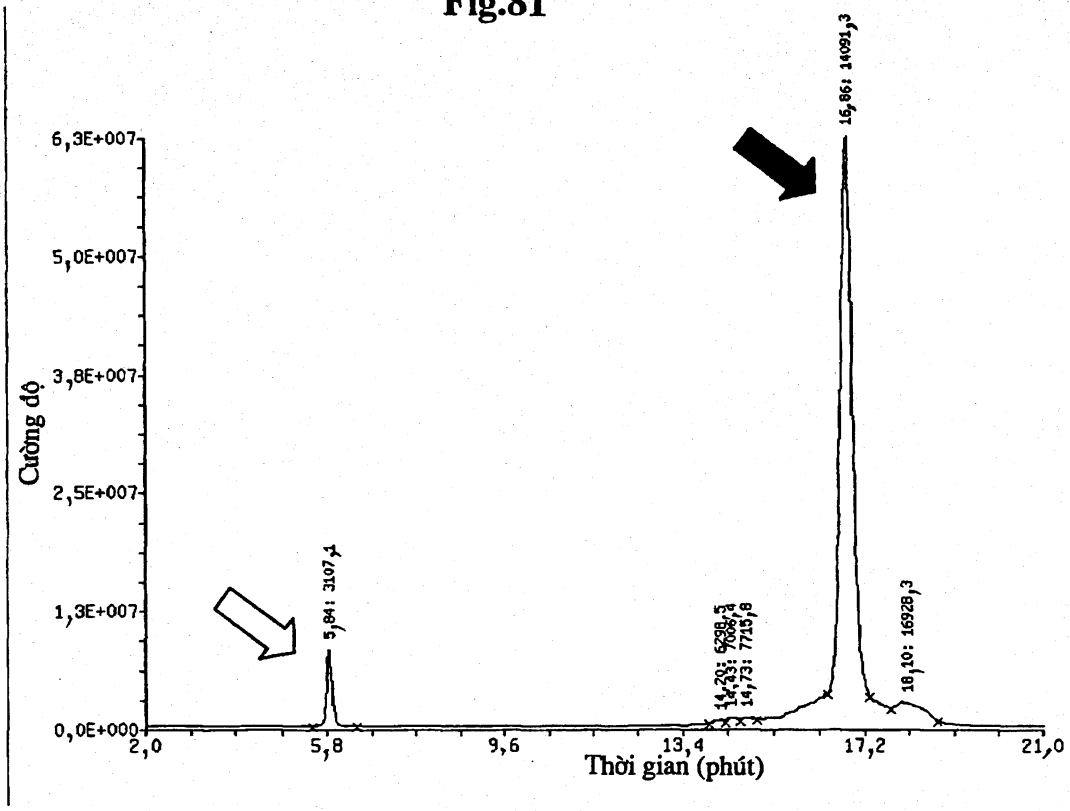


Fig.82

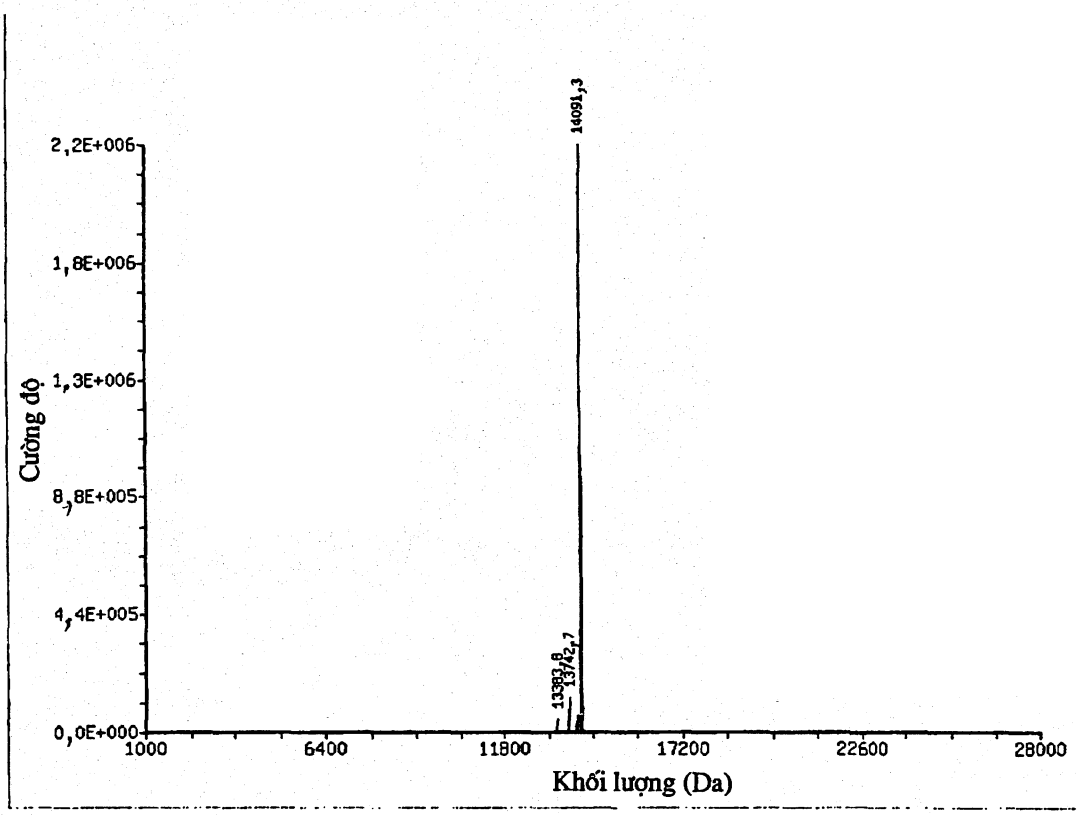

14091,3
2,2E+006
1,8E+006
1,3E+006
8,8E+005
4,4E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.83

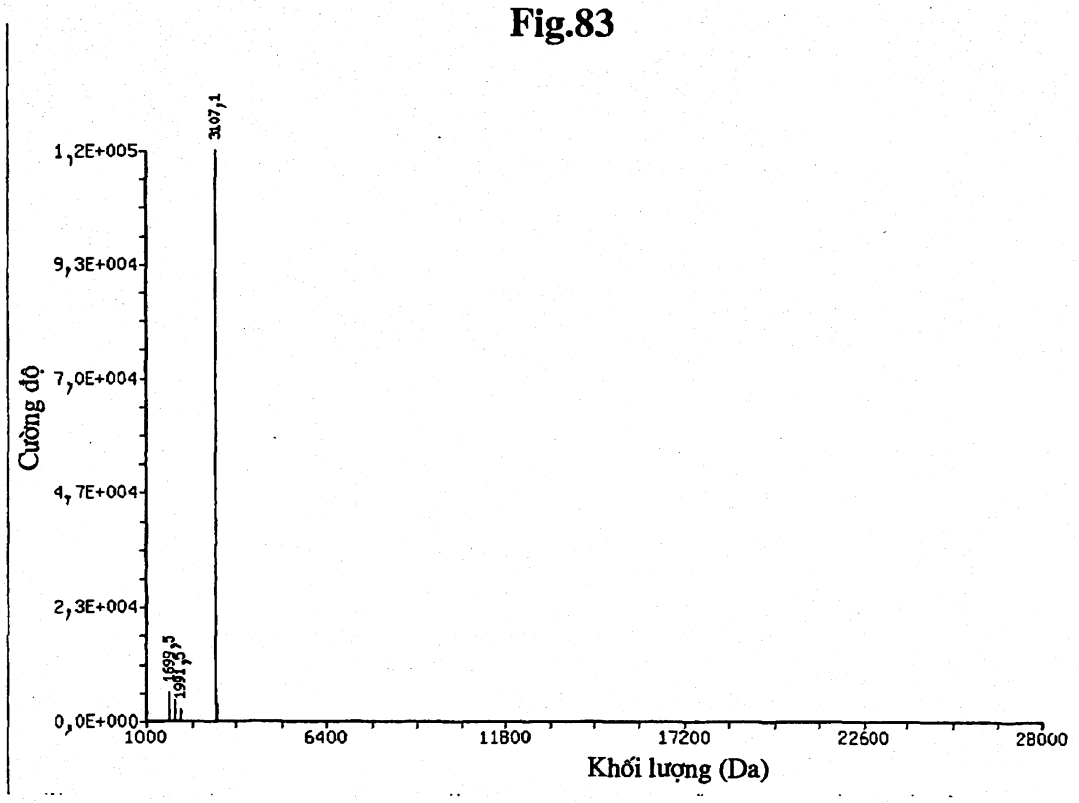

3107,1
1,2E+005
9,3E+004
7,0E+004
4,7E+004
2,3E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.84

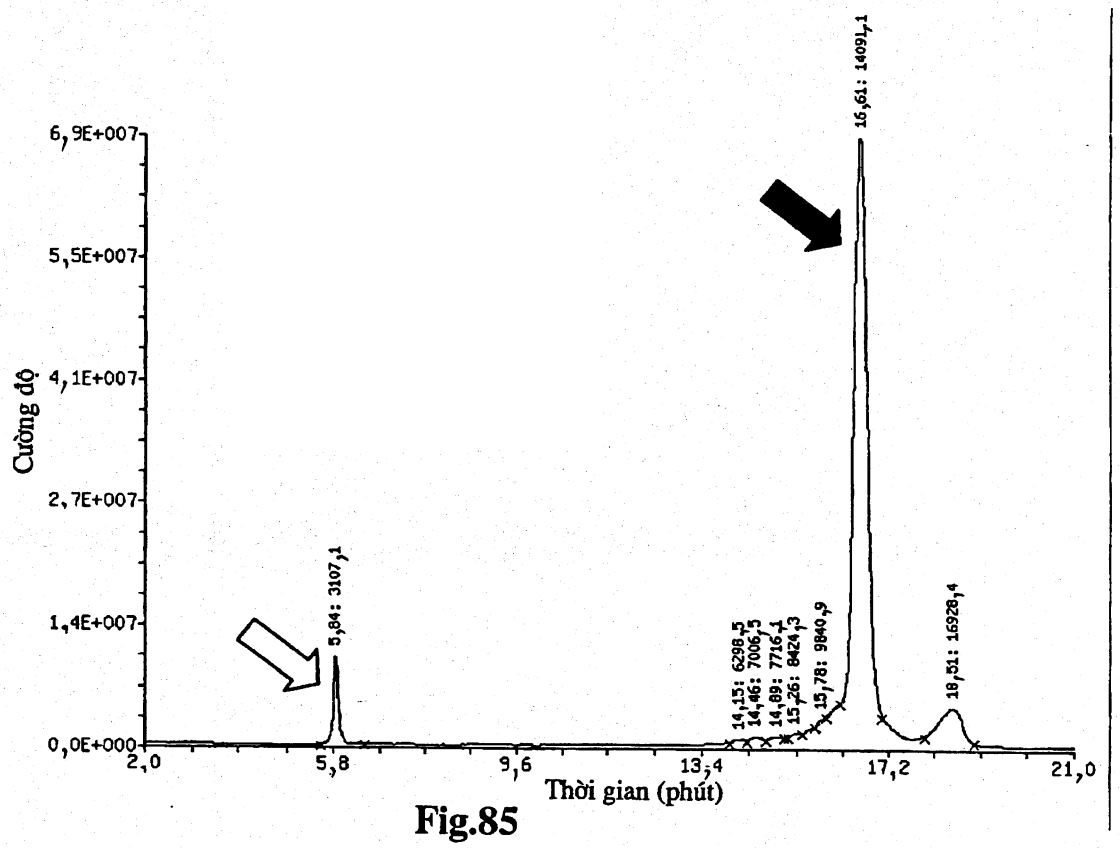

6,9E+007
5,5E+007
4,1E+007
2,7E+007
1,4E+007
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)
5,84: 3107,1
14,15: 6298,5
14,46: 7006,5
14,89: 7716,1
15,26: 8424,3
15,78: 9840,9
16,61: 14091,1
18,51: 16928,4

Fig.85

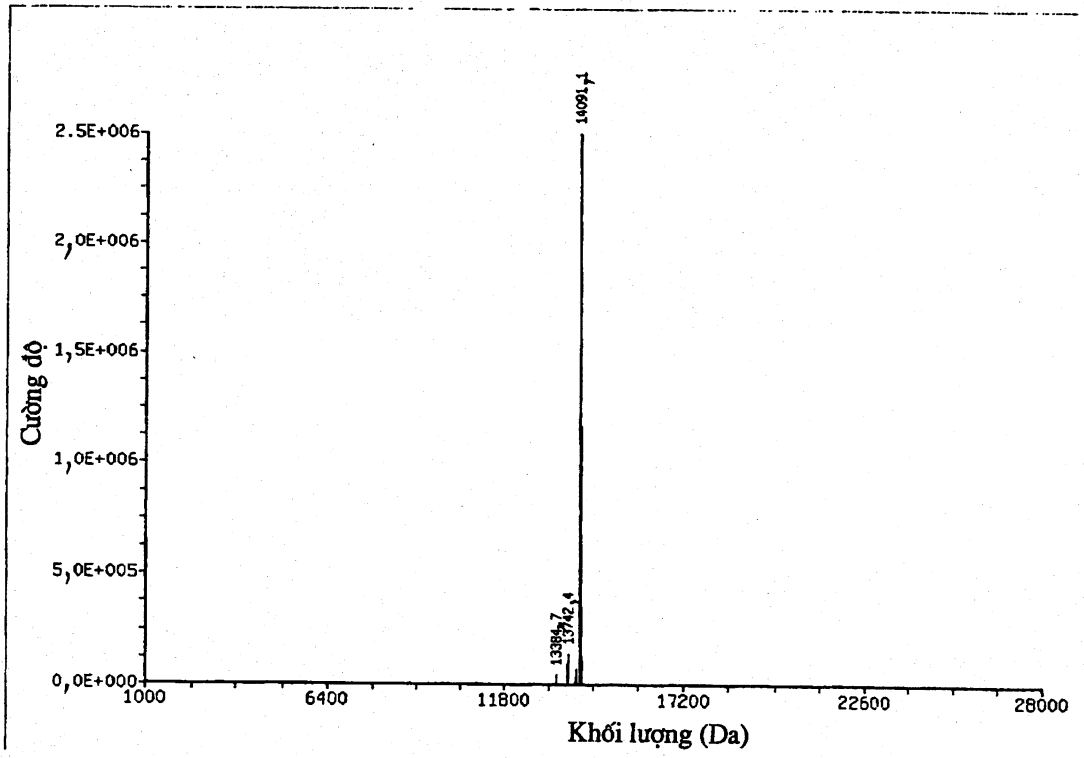

2.5E+006
2,0E+006
1,5E+006
1,0E+006
5,0E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)
14091,1
13742,4

Fig.86

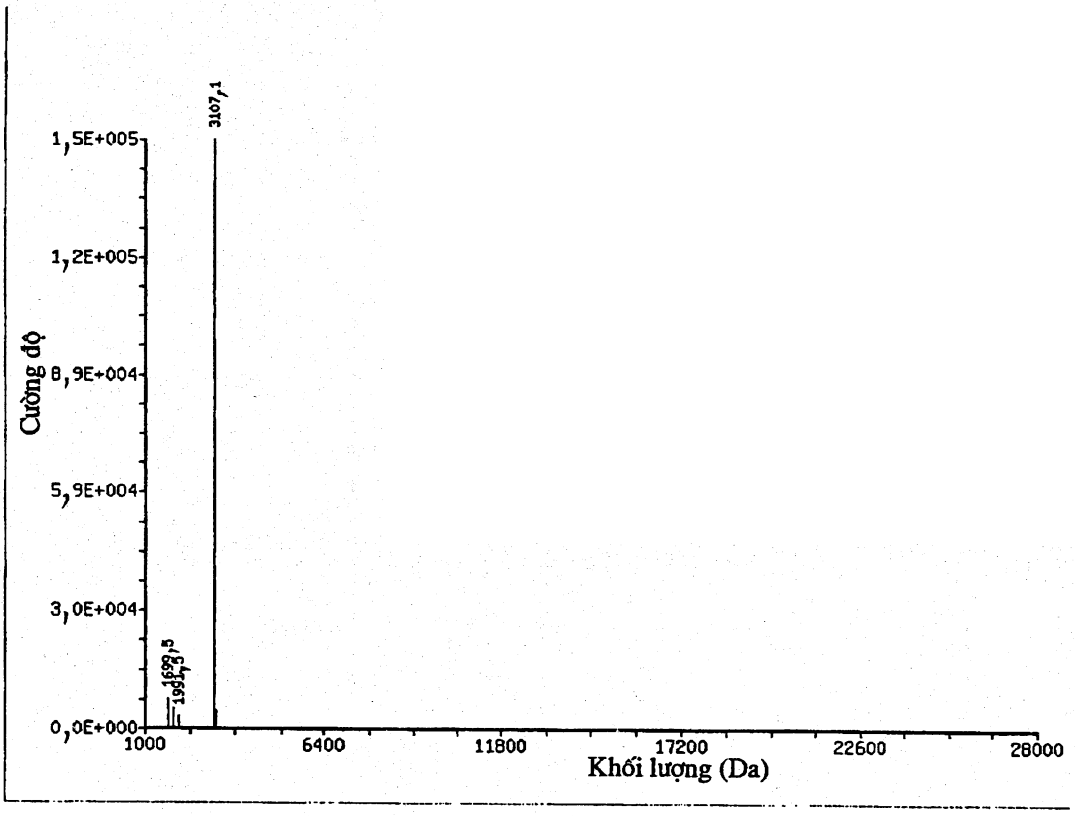

3107,1
1,5E+005
1,2E+005
8,9E+004
5,9E+004
3,0E+004
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.87

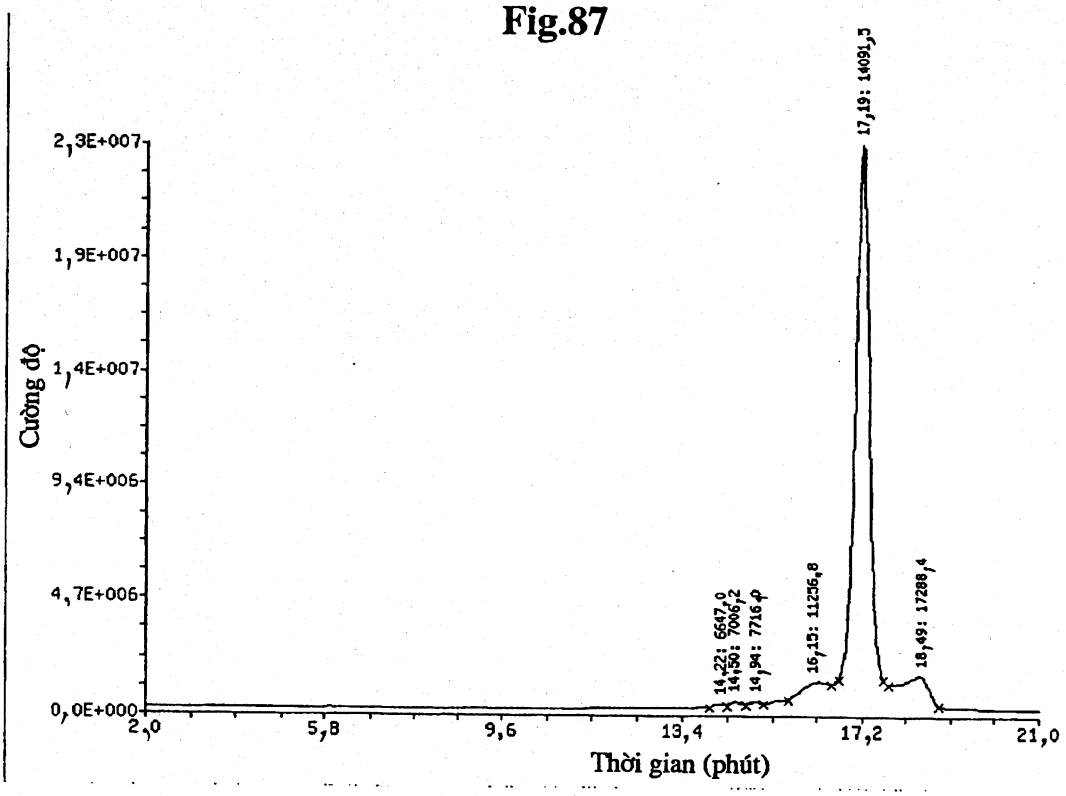

17,19: 14091,5
16,15: 11256,8
18,49: 17288,4
14,22: 6647,0
14,50: 7006,2
14,94: 7716,0
2,3E+007
1,9E+007
1,4E+007
9,4E+006
4,7E+006
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.88

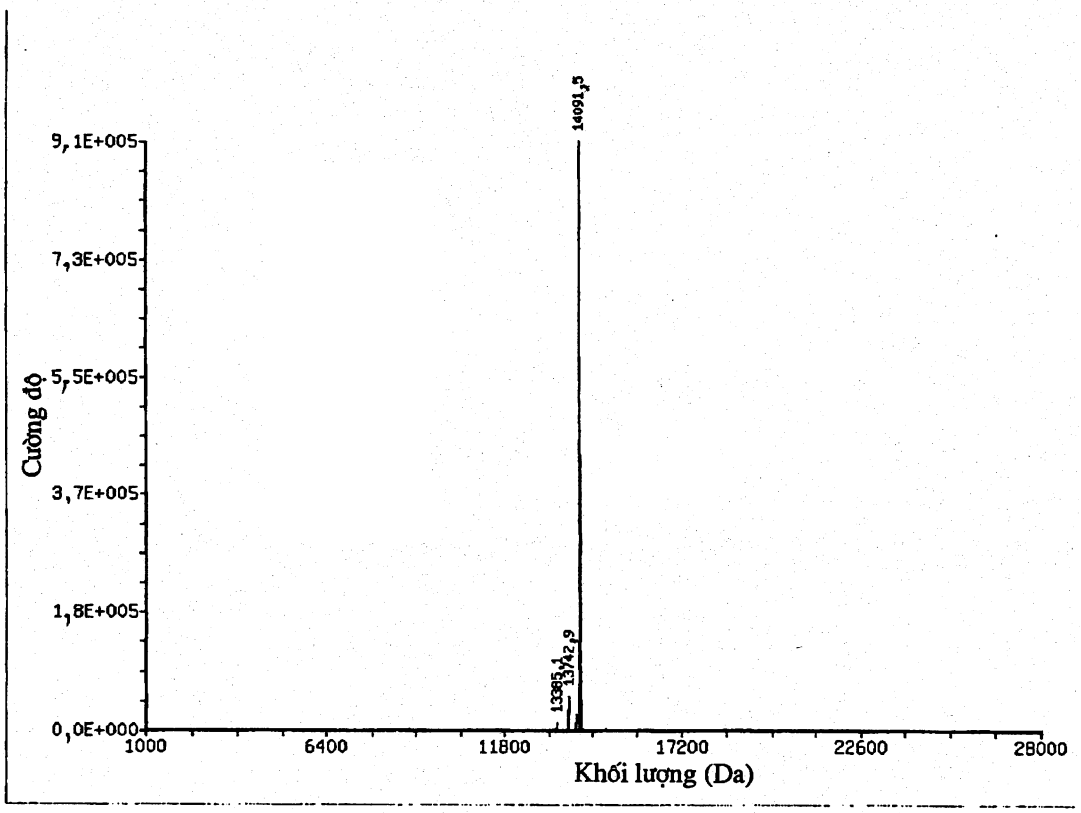


Fig.89

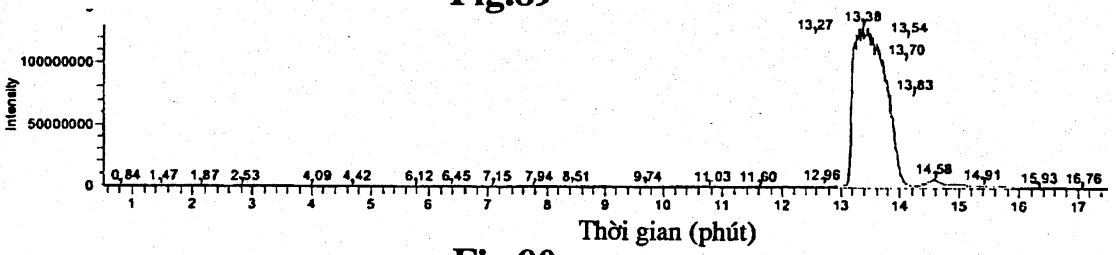


Fig.90

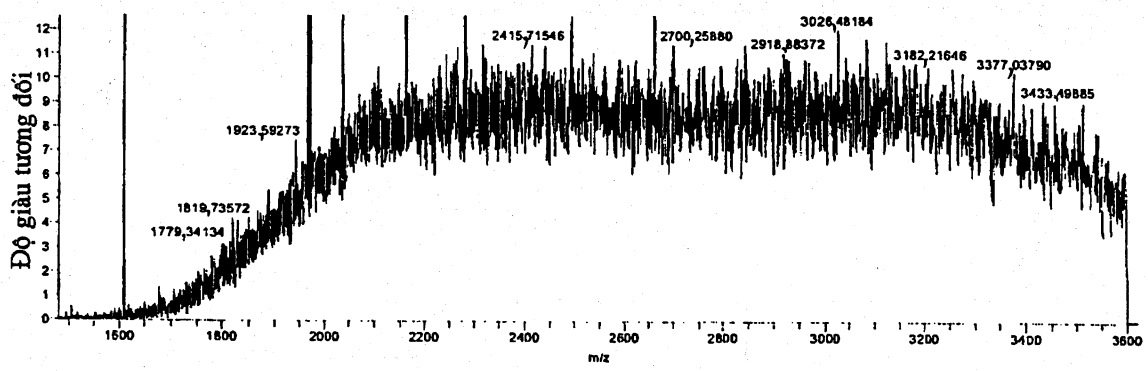


Fig.91

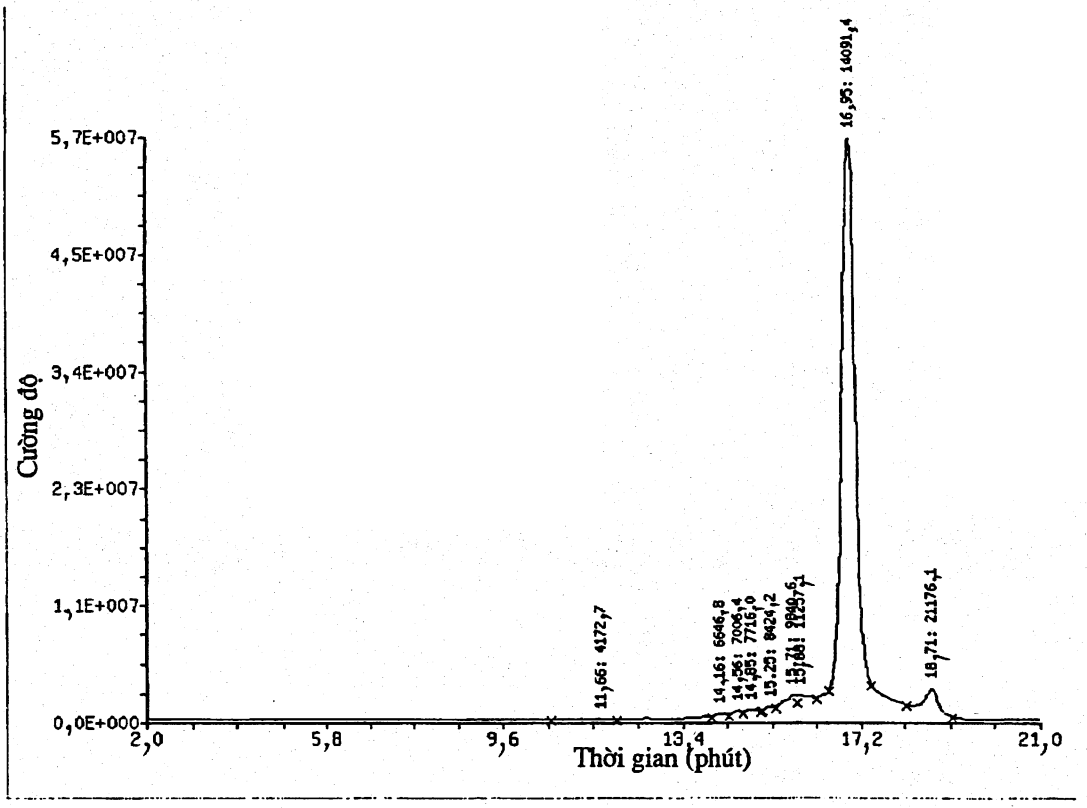

16,95: 14091,4
11,66: 4172,7
14,16: 6646,8
14,56: 7006,4
14,85: 7716,0
15,25: 8424,2
18,71: 21176,1
5,7E+007
4,5E+007
3,4E+007
2,3E+007
1,1E+007
0,0E+000
Cường độ
2,0
5,8
9,6
13,4
17,2
21,0
Thời gian (phút)

Fig.92

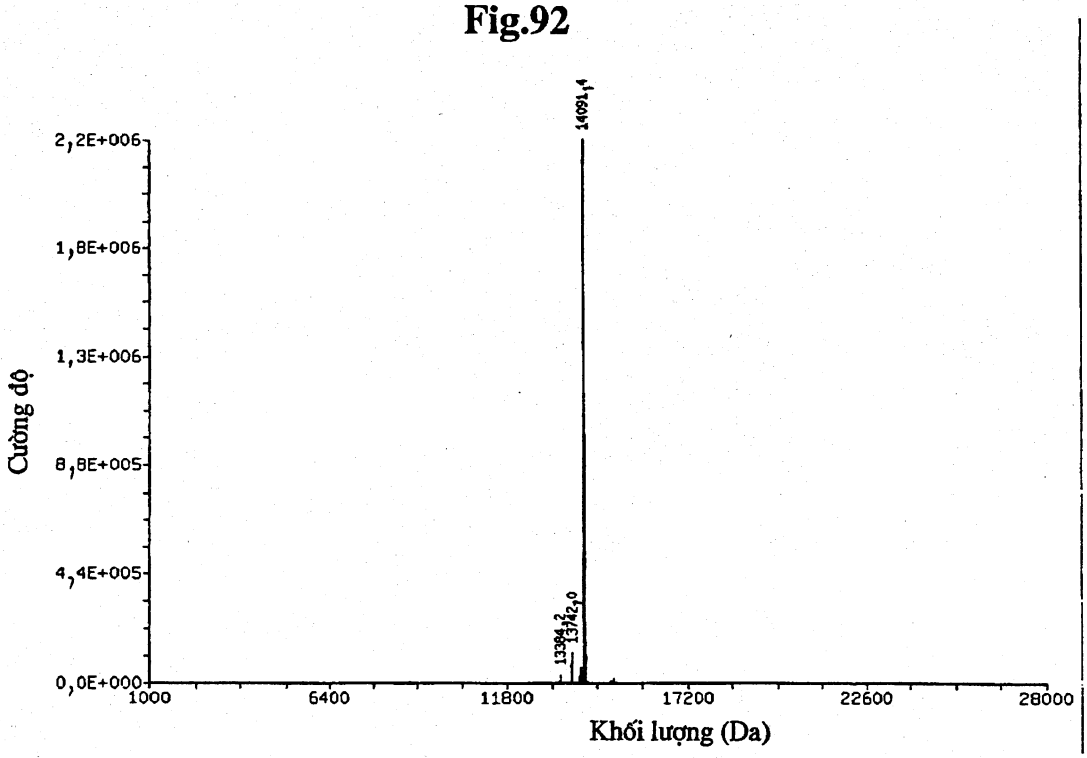

14091,4
13384,2
13742,0
2,2E+006
1,8E+006
1,3E+006
8,8E+005
4,4E+005
0,0E+000
Cường độ
1000
6400
11800
17200
22600
28000
Khối lượng (Da)

Fig.93

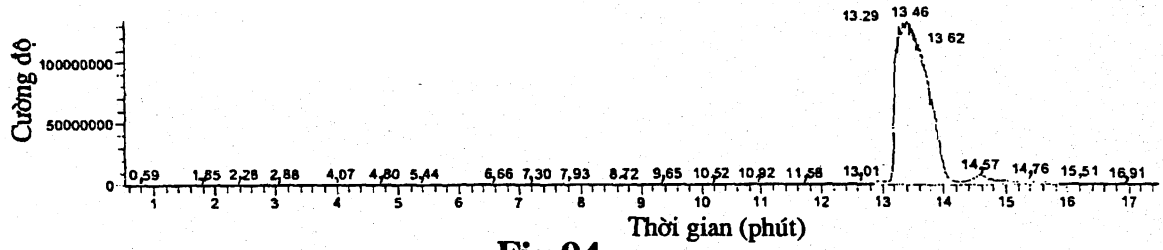

Cường độ
100000000
50000000
0
13.29
13.46
13.62
0,59
1,85
2,28
2,88
4,07
4,80
5,44
6,66
7,30
7,93
8,72
9,65
10,52
10,92
11,58
13,01
14,57
14,76
15,51
16,91
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
Thời gian (phút)

Fig.94

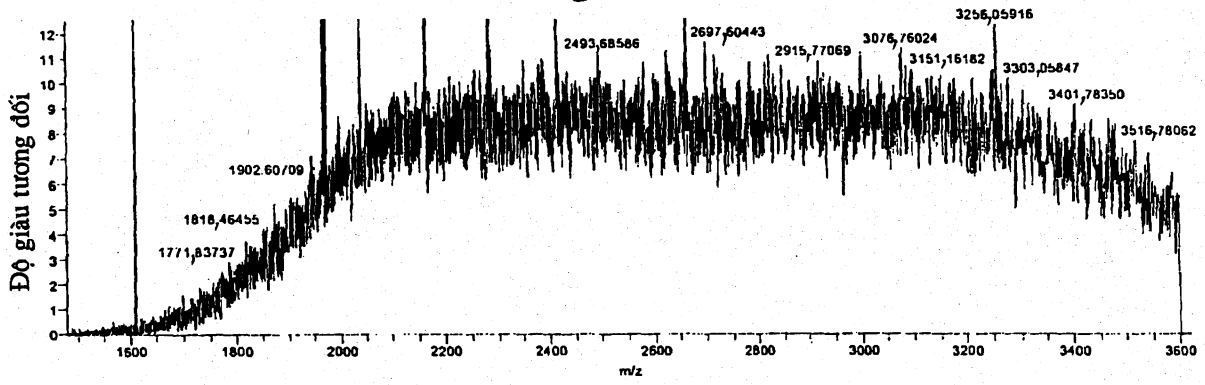

Độ giàu tương đối
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1902.60709
1818.46455
1771.83737
2493.68586
2697.60443
2915.77069
3076.76024
3151.16182
3256.05916
3303.05847
3401.78350
3516.78062
1500
1800
2000
2200
2400
2600
2800
3000
3200
3400
3600
m/z

Fig.95