

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất hợp chất purin dinucleotit dạng vòng cảm ứng sản sinh interferon typ I phụ thuộc chất kích thích gen interferon (STimulator of INterferon Genes (“STING”) và chế phẩm chứa hợp chất này. Chế phẩm này hữu ích để sử dụng trong phương pháp điều trị.

Tính trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ miễn dịch của người thường có thể được chia thành hai nhánh, gọi là nhánh “miễn dịch bẩm sinh” và nhánh “miễn dịch thích ứng.” Nhánh bẩm sinh của hệ miễn dịch được ưu tiên chịu trách nhiệm về đáp ứng viêm ban đầu thông qua nhiều yếu tố dịch thể, bao gồm hệ bổ thể và hệ chất hóa ứng động/xytokin; và nhiều kiểu tế bào đặc hiệu bao gồm các tế bào nuôi, tế bào đơn nhân lớn, các tế bào tua (DC), và tế bào diệt tự nhiên. Trái lại, nhánh miễn dịch thích ứng liên quan đến đáp ứng kháng thể chậm và đáp ứng kháng thể kéo dài cùng với đáp ứng tế bào T CD8+ và CD4+ mà đóng vai trò quan trọng trong trí nhớ miễn dịch đối với kháng nguyên. Nhánh thứ ba của hệ miễn dịch có thể được xác định là liên quan đến các tế bào T $\gamma\delta$ và các tế bào T có kho thụ thể tế bào T giới hạn như các tế bào NKT và tế bào MAIT.

Để có đáp ứng miễn dịch hữu hiệu đối với kháng nguyên, các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) phải xử lý và trình diện kháng nguyên trong ngữ cảnh MHC phù hợp với tế bào T, mà sau đó sẽ gây kích thích tế bào T gây độc tế bào và tế bào T trợ giúp. Sau khi trình diện kháng nguyên, tương tác thành công của các phân tử đồng kích thích trên cả APC và tế bào T phải xảy ra hoặc làm ngừng hoạt hóa. GM-CSF và IL-12 có tác dụng làm các phân tử tiền viêm hữu hiệu ở nhiều kiểu khối u. Ví dụ, GM-CSF khiến các tế bào tiền thân myeloit tăng sinh và biệt hóa thành các tế bào tua (DC) mặc dù cần có các tín hiệu khác để hoạt hóa sự thành thực của chúng thành các tế bào trình diện kháng nguyên hữu hiệu cần thiết để hoạt hóa tế bào T. Trở ngại đối với các liệu pháp điều trị miễn dịch hữu hiệu bao gồm sự dung nạp kháng nguyên đích mà có thể hạn chế sự tạo ra các tế bào T CD8 gây độc tế bào có mức độ và chức năng thích hợp, vận chuyển kém các tế bào T đã được tạo ra đến vị trí của các tế bào ác tính, và kém duy trì đáp ứng tế bào T được cảm ứng.

DC mà thực bào các mảnh vỡ tế bào của khối u sẽ xử lý chất này để biểu hiện phức tương thích với mô chính (Major Histocompatibility Complex - MHC), điều tiết tăng sự biểu hiện của các phân tử đồng kích thích, và di trú đến hạch bạch huyết cục bộ để kích thích tế bào lympho đặc hiệu với khối u. Quá trình này dẫn đến sự tăng sinh và hoạt hóa các tế bào T CD4+ và CD8+ mà phản ứng với các kháng nguyên liên quan đến khối u. Thực vậy, các tế bào này có thể được phát hiện thường xuyên trong máu, mô bạch huyết, và tổn thương ác tính của bệnh nhân.

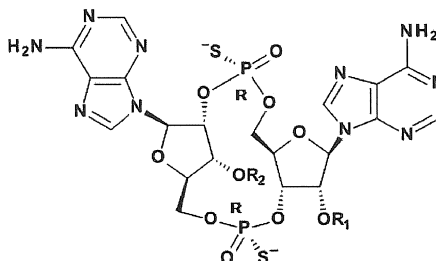
Các hiểu biết sâu sắc mới về các cơ chế giải thích sự xâm nhiễm miễn dịch, cùng với các phác đồ điều trị bệnh phối hợp mà có hiệu lực tiềm năng để chủng ngừa nhằm điều trị bệnh — một cách trực tiếp hoặc gián tiếp — thông qua việc phối hợp với các chất ức chế kiểm soát miễn dịch hoặc tác nhân trị liệu khác, có vai trò làm nền móng cho việc phát triển vacxin mà gây ra miễn dịch chống khối u hữu hiệu. CDN cyclic-di-AMP (do *Listeria monocytogenes* tạo ra) và cyclic-di-GMP tương tự của nó (do *Legionella pneumophila* tạo ra) được nhận biết bởi tế bào chủ như PAMP (kiểu phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh - Pathogen Associated Molecular Pattern), mà liên kết với PRR (thụ thể nhận biết tác nhân gây bệnh - Pathogen Recognition Receptor) được gọi là STING. STING là protein thích ứng trong tế bào chất của tế bào chủ của động vật có vú mà hoạt hóa kinaza liên kết TANK (TBK1) —trực phát tín hiệu IRF3, dẫn đến sự tạo ra IFN- β và các sản phẩm gen khác phụ thuộc vào IRF-3 mà hoạt hóa mạnh mẽ hệ miễn dịch bẩm sinh. Hiện nay, đã biết rằng STING tham gia vào quá trình kiểm soát bào tương của vật chủ, mà nhạy với sự lây nhiễm tác nhân gây bệnh nội bào và khi đáp ứng thì gây sản sinh IFN- β , dẫn đến sự phát triển đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với tác nhân gây bệnh để bảo vệ thích ứng cấu thành cả tế bào T CD4 và CD8 đặc hiệu với kháng nguyên cũng như các kháng thể đặc hiệu với tác nhân gây bệnh. Các ví dụ về purin dinucleotit vòng được bộc lộ một cách chi tiết, ví dụ, trong các patent Mỹ số 7,709,458 và 7,592,326; WO2007/054279; và trong tài liệu: Yan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem Lett.* 18: 5631 (2008).

Vẫn cần có các dược phẩm và phương pháp cải tiến cho chiến lược gây miễn dịch để điều trị các bệnh như bệnh ung thư mà có thể khó chữa được theo các phương pháp điều trị bệnh truyền thống.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm điều biến các đáp ứng miễn dịch với bệnh tật.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất purin dinucleotit vòng (“CDN”) nêu trong điểm 1 yêu cầu bảo hộ mà gây sản sinh interferon typ I phụ thuộc STING, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất:



Trong vai trò làm tá dược của chúng, theo phương án nhất định, các dược phẩm này có thể được dùng làm các tá dược trong chiến lược điều trị hoặc phòng bệnh bằng cách sử dụng vaccin. Do đó, CDN theo sáng chế, hoặc các tiền dược chất hoặc muối dược dụng của nó, có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều vaccin đã được chọn để kích thích đáp ứng miễn dịch với một hoặc nhiều kháng nguyên định trước. CDN theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, có thể được cung cấp cùng, hoặc riêng biệt, với vaccin.

Vaccin có thể chứa vi khuẩn hoặc virus không hoạt hóa hoặc bị suy yếu chứa kháng nguyên quan tâm, kháng nguyên tinh khiết, vectơ vật truyền phân phối virus hoặc vi khuẩn sống được thiết kế tái tổ hợp để biểu hiện và/hoặc tiết ra kháng nguyên, vectơ tế bào trình diện kháng nguyên (APC) chứa tế bào mà đã được mang kháng nguyên hoặc đã được chuyển nhiễm với chế phẩm chứa axit nucleic mã hóa kháng nguyên, chất dẫn phân phối kháng nguyên liposom, hoặc vật truyền axit nucleic trần mã hóa kháng nguyên. Danh mục này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Để làm ví dụ, vaccin này còn có thể chứa tế bào khối u đã được làm bất hoạt mà biểu hiện và tiết một hoặc nhiều trong số phối tử GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, FLT-3.

CDN theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, có thể được cho cá thể có nhu cầu điều trị bệnh dùng qua nhiều đường: dùng ngoài đường tiêu hóa và không ngoài đường tiêu hóa ở dạng chế phẩm bào chế chứa chất mang, tá dược và chất dẫn dược dụng. Đường dùng được ưu tiên là đường ngoài đường tiêu hóa, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều đường dùng dưới da, qua đường tĩnh mạch, trong bắp, trong động mạch, trong da, nội tủy mạc và ngoài màng cứng. Đường dùng

trong khối u cũng được ưu tiên. Được đặc biệt ưu tiên là đường dùng dưới da. Dược phẩm được ưu tiên được bào chế ở dạng nhũ tương nước hoặc nhũ tương dầu trong nước.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa, hoặc được dùng cùng với, một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính dược khác như tá dược, lipid, nang nhiều lớp có liên kết ngang giữa hai lớp với nhau, hạt có kích thước nanomet hoặc vi hạt trên cơ sở poly(D,L-lactic-co-axit glycolic) [PLGA] hoặc trên cơ sở poly anhydrit thoái biến sinh học, và hạt xốp kích thước nanomet- được phủ hai lớp lipid, các chất đối kháng quá trình CTLA-4 và PD-1, các tác nhân phong bế quá trình PD-1, vi khuẩn không hoạt hóa mà cảm ứng miễn dịch bẩm sinh (ví dụ, *Listeria monocytogenes* không hoạt hóa hoặc bị suy yếu), các dược phẩm làm trung gian kích hoạt miễn dịch bẩm sinh thông qua thụ thể giống Toll (TLR), thụ thể giống (NOD) (NLR), thụ thể giống gen sản sinh axit retinoic (RIG)-I (RLR), thụ thể lectin kiểu C (CLR), kiểu phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh ("PAMP"), các tác nhân hóa trị liệu, v.v.

Theo khía cạnh có liên quan, sáng chế mô tả phương pháp cảm ứng, kích thích, hoặc điều chỉnh đáp ứng miễn dịch ở cá thể. Phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng CDN theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó. Đường dùng được ưu tiên là đường ngoài đường tiêu hóa.

Theo phương án nhất định, phương pháp này là phương pháp điều trị bệnh ung thư. Để làm ví dụ, CDN theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, có thể được cung cấp một mình, hoặc cùng với hoặc với một hoặc nhiều vacxin dùng cho bệnh ung thư mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bệnh nhân được điều trị có thể mắc bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư tế bào kết tràng, bệnh ung thư tế bào vảy hầu họng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư não, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư dạ dày, sacôm, bệnh bạch cầu, u bạch huyết, đa u tủy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư vú, u hắc tố, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư biểu mô tụy, và bệnh ung thư biểu mô thận. Theo phương án khác, phương pháp này là phương pháp cảm ứng, kích thích, hoặc điều chỉnh đáp ứng miễn dịch với tác nhân gây bệnh.

Liên quan đến việc điều trị bệnh cho động vật có vú mắc bệnh ung thư, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm việc cho động vật có vú dùng lượng hiệu quả của CDN theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, tùy ý trước hoặc

sau phép điều trị bệnh cơ bản dùng cho động vật có vú để loại bỏ hoặc diệt tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên ung thư. Các dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp để làm tá dược mới dùng để điều trị bệnh; tuy nhiên, theo các phương án được ưu tiên, các dược phẩm theo sáng chế được dùng sau phép điều trị bệnh cơ bản. Theo phương án khác nhau, phép điều trị bệnh cơ bản bao gồm việc phẫu thuật để loại bỏ tế bào ung thư ra khỏi động vật có vú, xạ trị để diệt tế bào ung thư trong động vật có vú, hoặc cả phẫu thuật và xạ trị.

Theo phương án khác, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm việc cho động vật có vú dùng lượng hiệu quả của CDN theo sáng chế để điều trị các rối loạn, trong đó việc chuyển từ miễn dịch Th1 thành Th2 tạo ra lợi ích về mặt lâm sàng. Tính miễn dịch do tế bào gây ra (Cell-Mediated Immunity - CMI) liên quan đến tế bào lympho T TH1 CD4⁺ tạo ra các xytokin IL-2, interferon (IFN)- γ và yếu tố hoại tử u (Tumor Necrosis Factor - TNF)- α . Trái lại, miễn dịch thể dịch liên quan đến tế bào lympho T TH2 CD4⁺ tạo ra IL-4, IL-6 và IL-10. Sự lệch hướng miễn dịch đối với đáp ứng TH1 thường gây hoạt hóa độc tính đối với tế bào lympho tế bào T (CTL), tế bào diệt tự nhiên (NK), đại thực bào và bạch cầu đơn nhân lớn. Nói chung, đáp ứng Th1 có tác dụng nhiều hơn đối với tác nhân gây bệnh nội bào (virus và vi khuẩn nằm bên trong các tế bào chủ) và các khối u, trong khi đáp ứng Th2 có tác dụng nhiều hơn đối với vi khuẩn, ký sinh trùng ngoại bào bao gồm giun sán và độc tố. Ngoài ra, mức độ hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh được kỳ vọng là sẽ bình thường hóa cân bằng miễn dịch tế bào T trợ giúp typ 1 và 2 (Th1/Th2) và ức chế phản ứng quá mức của đáp ứng kiểu Th2 mà gây ra các bệnh dị ứng và bệnh hen dị ứng phụ thuộc vào globulin miễn dịch (Ig) E.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện quá trình truyền tín hiệu do purin dinucleotit vòng (“CDN”) gây ra. CDN (ví dụ, c-di-AMP hoặc c-di-GMP) tạo ra IFN- β nhờ gắn kết với thụ thể bào tương STING (chất kích thích gen Interferon), và gây truyền tín hiệu thông qua quá trình TBK-1/IRF-3, gây hoạt hóa cả DC tự tiết và cận tiết thông qua gắn kết với thụ thể IFN và tiếp theo đó là truyền tín hiệu.

Hình 2A thể hiện sơ đồ tổng hợp c-[G(2',5')pG(3',5')p] và các chất dẫn xuất dithio.

Hình 2B thể hiện sơ đồ tổng hợp c-[A(2',5')pA(3',5')p] và các chất dẫn xuất đithio.

Hình 2C thể hiện các cấu trúc hợp chất có công thức 10, 20, 21, 22, và 23.

Hình 3A thể hiện kết quả ^1H -NMR của hợp chất 9a.

Hình 3B thể hiện kết quả COSY (3,5 đến 6,0 phần triệu trục ^1H) của hợp chất 9a.

Hình 3C thể hiện kết quả HMBC (3,0 đến 5,5 phần triệu trục ^1H) của hợp chất 9a.

Hình 3D thể hiện kết quả ^1H -NMR của hợp chất 21.

Hình 3E thể hiện kết quả COSY (3,5 đến 6,0 phần triệu trục ^1H) của hợp chất 21.

Hình 3F thể hiện kết quả HMBC (0 đến 9,5 phần triệu trục ^1H) của hợp chất 21.

Hình 3G thể hiện kết quả HMBC (3,5 đến 5,5 phần triệu trục ^1H) của hợp chất 21.

Hình 3H thể hiện kết quả sắc ký lỏng cao áp phân tích (dung dịch đệm chứa 2% đến 20% ACN/10mM TEAA – 20 phút) của hợp chất có công thức 19b.

Hình 4 thể hiện các chất dẫn xuất được thể ở vị trí O c-[G(2',5')pG(3',5')p] và đithio riboza.

Hình 5 thể hiện các chất dẫn xuất được thể ở vị trí O c-[A(2',5')pA(3',5')p] và đithio riboza.

Hình 6 thể hiện các chất dẫn xuất được thể ở vị trí O hiện c-[G(2',5')pA(3',5')p] và đithio riboza.

Hình 7 thể hiện mức độ sản sinh interferon typ 1 ở các tế bào THP-1 sau khi bị kích thích bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 8 thể hiện mức độ biểu hiện ARN đã được chuẩn tắc hóa của các interferon typ 1 và interferon gama ở PBMC của người lấy từ những người độc lập sau khi kích thích bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 9 (A - C) thể hiện lượng interferon alpha và beta protein và interferon gama protein typ 1 ở PBMC của người lấy từ những người cho độc lập sau khi kích thích bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 10 thể hiện mức độ tạo ra IFN- β ở các tế bào như là dấu hiệu của khả năng làm tá được sau khi xử lý bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Các hình 11(a)-(c) thể hiện mức độ điều biến tăng sự biểu hiện CD69 bề mặt lần lượt trên các tế bào diệt tự nhiên (NK), các tế bào T CD4⁺ và các tế bào CD8⁺, dưới dạng số đo kích hoạt miễn dịch sau khi xử lý bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 12 thể hiện tính kháng của các chất dẫn xuất CDN khác nhau đối với việc xử lý bằng phosphodiesteraza.

Hình 13 thể hiện các biến thể STING đã biết khác nhau.

Hình 14 thể hiện mức độ kích thích của các dòng tế bào HEK293 ghi mã alen biến dị bằng STING của người bằng cách đo mức tăng sản sinh gen thông báo IFN β -LUC.

Hình 15A thể hiện mức độ biểu hiện bề mặt của MHC nhóm I (HLA-ABC), CD80, CD83 và CD86 bởi tế bào tua người bị kích thích.

Hình 15B thể hiện sơ đồ biểu hiện CD80, CD86, CD83 và MHC nhóm I (HLA-ABC) ở DC của người sau khi kích thích LPS hoặc CDN.

Hình 16 thể hiện miễn dịch tế bào T CD8 đặc hiệu với OVA trong PBMC ở chuột nhắt C57BL/6 tại thời điểm 7 ngày sau khi chủng ngừa bằng protein OVA được điều chỉnh bằng dinucleotit vòng.

Hình 17 thể hiện miễn dịch tế bào T CD8 đặc hiệu với OVA trong PBMC ở các con chuột nhắt C57BL/6 hoặc goldenticket (STING^{-/-}) tại thời điểm 7 ngày sau khi chủng ngừa bằng protein OVA được điều chỉnh bằng dinucleotit vòng.

Hình 18 thể hiện thể tích khối u ở mô hình u hắc tố B16 sau khi điều trị bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 19 thể hiện đường cong sống sót ở mô hình khối u CT26 sau khi điều trị bằng các phân tử dinucleotit vòng khác nhau.

Hình 20A thể hiện mức độ ức chế khối u ở chuột nhắt C57BL/6 hoang sau khi dùng ML RR-CDN so với chuột nhắt đối chứng dùng HBSS và CpG dinucleotit.

Hình 20B thể hiện các kết quả đạt được ở chuột nhắt thiếu hụt STING.

Hình 21A thể hiện mức độ thải bỏ biểu mô ung thư ruột kết CT26 đã được thiết lập sau khi sử dụng ML RR-CDN.

Hình 21B thể hiện IFN mức độ sản sinh INF- γ ở chuột nhắt được điều trị bằng ML RR-CDA.

Hình 22A thể hiện mức độ thải bỏ biểu mô ung thư tuyến vú 4T1 đã được thiết lập sau khi dùng ML RR-CDN.

Hình 22B thể hiện tác dụng bảo vệ khỏi sự tái tiếp xúc với các tế bào CT26 của khối u.

Hình 23 thể hiện mức độ ức chế u nguyên phát đã được điều trị ở cả động vật mang khối u CT26 (A) và 4T1 (B) sau khi dùng ML RR-CDA, so với đối chứng chất dẫn HBSS.

Hình 24A thể hiện mức độ ức chế u nguyên phát đã điều trị ở u hắc tố B16 sau khi dùng ML RR-CDA.

Hình 24B và hình 24C thể hiện mức độ ức chế sinh trưởng của các cục khối u phổi ở ngoại vi sau khi dùng ML RR-CDA, so với đối chứng chất dẫn HBSS ở dạng đồ thị (B) và ở chính mô phổi ở dạng đồ thị (C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chất kích thích miễn dịch di-nucleotit vòng (cyclic –di-nucleotide - CDN) mới và có hoạt tính cao mà hoạt hóa DC thông qua thụ thể bào chất mới được phát hiện mà được gọi là STING (chất kích thích gen interferon – stimulator of interferon gene). Cụ thể, CDN 2', 5', 3', 5' theo sáng chế gây sản sinh Interferon typ I phụ thuộc vào STING.

Hiểu biết gần đây về thiết kế và phát triển các tá dược đã được thông báo nhờ một kiến thức cơ bản là các cấu trúc vi sinh vật bảo toàn đã được biết như là kiểu phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh (Pathogen-Associated Molecular Pattern - PAMP) sẽ được truyền tín hiệu bởi các thụ thể nhận biết kiểu hình của tế bào chủ (PRR), khơi mào chu trình truyền tín hiệu dẫn đến việc cảm ứng xytokin và chất hóa ứng động, và khơi mào đáp ứng miễn dịch thích ứng đặc hiệu. Cách mà bỏ thể PAMP của vi khuẩn tham gia vào hệ miễn dịch bẩm sinh sẽ định hướng sự phát triển của đáp ứng thích ứng mà là thích hợp nhằm tiêu diệt tác nhân gây bệnh xâm chiếm để không gây bệnh. Mục đích của thiết kế tá

được là để lựa chọn PAMP xác định hoặc tổng hợp các phân tử đặc hiệu với PRR được chỉ định để khởi mào đáp ứng mong muốn. Các tá được như monophosphoryl lipid A (MPL) và CpG là các PAMP mà được nhận biết bởi các thụ thể giống Toll (TLR), nhóm bao gồm các PRR liên màng truyền tín hiệu thông qua các phân tử thích ứng MyD88 và Trif và làm trung gian cảm ứng các xytokin tiền viêm phụ thuộc vào NF- κ B. MPL (chất chủ vận TLR-4) và CpG (chất chủ vận TLR-9) là các tá được tiên tiến về mặt lâm sàng, và là các thành phần của vaccin mà đã được FDA cấp phép sử dụng hoặc đang được xem xét. Trong khi TLR có mặt trên bề mặt tế bào (ví dụ, TLR-4) và endosom (ví dụ, CpG) nhạy với tác nhân gây bệnh ngoài tế bào và không bào, chu trình sinh trưởng của nhiều tác nhân gây bệnh bao gồm virus và vi khuẩn nội bào xảy ra trong bào tương. Việc phân chia khoang ngoại bào, không bào, và bào tương của PRR đã dẫn đến giả thiết rằng hệ miễn dịch bẩm sinh phân biệt được vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn không gây bệnh bằng cách theo dõi bào tương. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ nhận thấy rằng các chất chủ vận đặc hiệu với PRR chứa con đường kiểm soát bào tương mà khởi đầu cho việc phát triển của hệ miễn dịch bảo vệ chống lại tác nhân gây bệnh nội bào, và có liên quan đến thiết kế vaccin. Cùng các phối tử hướng đích này cũng sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển của các vaccin hữu hiệu hướng đích đến các khối u ác tính, được biết là cần đến tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ đặc hiệu khối u.

Sự hoạt hóa quá trình kiểm soát bào tương (Cytosolic Surveillance Pathway - CSP) là không thể thiếu được đối với sự phát triển của hệ miễn dịch bảo vệ đối với tác nhân gây bệnh nội bào. CSP phát hiện tác nhân gây bệnh vi khuẩn, virus, và sinh vật đơn bào, dẫn đến việc hoạt hóa trực truyền tín hiệu kinaza liên kết với TANK (TBK-1)/IRF-3 và sự sản sinh IFN- β và gen đồng điều hòa khác. Axit nucleic của cả virus và vi khuẩn đều hoạt hóa quá trình này, và sự cảm ứng IFN- β là độc lập với MyD88 và Trif. Trong interferon typ I được cho là chủ yếu gây đáp ứng chống virus ở vật chủ, sự cảm ứng IFN- β là dấu hiệu của sự sinh trưởng bào tương trong đại thực bào đã được chuyển nhiễm với vi khuẩn nội bào, *Listeria monocytogenes* (Lm). Việc phân chia đã biết rõ trong mô hình bệnh nhiễm vi khuẩn *Listeria* ở chuột nhắt, ngược lại Lm kiểu đại khởi mào cho miễn dịch tiềm tàng của tế bào T CD4 và CD8 mà bảo vệ chuột nhắt chống lại sự tiếp xúc vi khuẩn, việc chủng ngừa bằng Lm bị loại bỏ listeriolysin O (LLO) không tạo ra các tế bào T chức năng hoặc gây miễn dịch bảo vệ. Sự khác biệt này là bằng chứng cho việc cần phải có sự biểu hiện gen trong tế bào chủ và bào tương mà Lm tiếp cận để tế bào T chức năng

làm trung gian miễn dịch bảo vệ. Nồng độ của IFN- β trong các tế bào chủ bị lây nhiễm được điều tiết bởi bơm phun đa được chất Lm (MDR), mà tiết ra các phân tử nhỏ không liên quan về mặt cấu trúc, kể cả kháng sinh. IFN- β không được sản sinh ra trong các tế bào chủ đã nhiễm thể đột biến Lm LLO mà bị giới hạn ở tiêu thể thực bào. Lượng IFN- β bình thường được sản sinh trong đại thực bào *MyD88^{-/-}Trif^{-/-}* bị lây nhiễm mà thiếu hụt toàn bộ quá trình truyền tín hiệu do TLR gây ra. Các dữ liệu này thể hiện rằng mặc dù Lm liên quan đến TLR, một phản ứng viêm đối với Lm hoang, tế bào chủ CSP là cần thiết để phát triển của hệ miễn dịch bảo vệ, tương ứng với sự sản sinh IFN- β .

Đi-nucleotit vòng (CDN) hoạt hóa quá trình kiểm soát bào tương thông qua liên kết trực tiếp với PRR, STING bào tương. Interferon typ I đáp ứng với Lm và vi khuẩn nội bào bị lây nhiễm do việc tiết c-di-AMP hoặc dinucleotit vòng liên quan của nó (CDN), c-di-GMP, và sự liên kết trực tiếp của nó với DDX41 và DEAD (aspartat-glutamat-alanin-aspartat) helicaza hộp và STING (chất kích thích gen Interferon), một thụ thể mới được phát hiện của quá trình kiểm soát bào tương. CDN là thể mang thông tin thứ hai được biểu hiện ở hầu hết vi khuẩn và điều tiết các quá trình khác nhau, bao gồm tính linh động và sự tạo ra màng sinh học. Ngoài việc hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu TBK-1/IRF-3, trong đáp ứng với CDN liên kết, STING còn hoạt hóa I κ B kinaza, làm dịch chuyển yếu tố phiên mã NF- κ B vào nhân, hoạt hóa biểu hiện nhiều gen tiền viêm.

Cho đến gần đây, việc STING cảm biến ADN bào chất vẫn còn khó hiểu. Không giống như AIM2 mà gắn kết trực tiếp với dsADN, STING không có miền gắn kết với ADN rõ ràng. Liệu các chất cảm ứng ADN khác như DDX41, DNA-PK và DAI kinaza có phải là các thực thể trung gian của quá trình truyền tín hiệu dsADN thông qua STING hay không vẫn chưa được biết rõ. Câu hỏi này đã được giải đáp khi phát hiện GMP-AMP synthaza vòng (cGAS), nucleotidyl transferaza của tế bào chủ mà, trong đáp ứng với dsADN gắn kết, tổng hợp được thể mang thông tin thứ hai, đi-GMP-AMP vòng, mà gắn kết trực tiếp với STING và khơi mào một loạt quá trình truyền tín hiệu thông qua trục TBK-1/IRF-3, kết quả gây ra cảm ứng IFN. Ngoài ra, chất cảm biến AND của hệ miễn dịch bẩm sinh là cGAS sẽ tạo ra đi-nucleotit vòng không truyền thống mà hoạt hóa sự truyền tín hiệu STING. Không giống như thể mang thông tin thứ hai dinucleotit vòng tạo ra bởi vi khuẩn, trong đó cầu phosphat giữa các

nucleotit được nối với nhau nhờ liên kết bis-(3', 5'), cầu phosphat giữa các nucleotit trong GMP-AMP vòng được tổng hợp bằng cGAS được nối với nhau nhờ liên kết 2', 5' và 3',5' không truyền thống, được ký hiệu là c[G(2',5')pA(3',5')p]. Do đó, STING (Chất kích thích gen Interferon) đã nổi lên như một con đường trung tâm để gây cảm biến axit nucleic tác nhân gây bệnh trong bào tương, thông qua liên kết trực tiếp của dinucleotit vòng (CDN) tiết ra bởi vi khuẩn nội bào⁶, hoặc thông qua sự gắn kết của thể mang thông tin thứ hai c-GMP-AMP, được tổng hợp bởi GMP-AMP synthaza vòng của tế bào chủ (cGAS) đáp lại sự gắn kết với axit nucleic của tác nhân gây bệnh bào tương.

Các phân tử CDN nguyên thể nhạy với sự thoái biến do các phosphodiesteraza có mặt trong các tế bào chủ, ví dụ, trong tế bào biểu hiện kháng nguyên, mà tạo thành các chế phẩm vaccin chứa các phân tử CDN nguyên thể này. Hiệu lực của tá dược xác định có thể bị giảm do sự thoái biến này, vì tá dược không có khả năng liên kết và hoạt hóa đích PRR xác định. Hiệu lực thấp hơn của tá dược có thể đo được, ví dụ, bằng lượng giảm của sự biểu hiện gây ra của phân tử có ký hiệu trong hệ miễn dịch bẩm sinh (ví dụ, IFN- β), tương quan với hiệu lực vaccin yếu hơn, như được xác định theo mức độ đáp ứng miễn dịch kháng nguyên đặc hiệu đo được.

Theo sáng chế, dẫn xuất dithio-diphosphat 2',5',3',5' c-di-AMP được đề xuất. Quy trình tổng hợp các chất dẫn xuất dithio-diphosphat này tạo ra hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang, kể cả các chất dẫn xuất Rp,Rp, Sp,Sp, SpRp, và Rp,Sp. Các loại riêng biệt có thể được tách, và thể hiện các khác biệt đáng kể về đặc tính dược lý của chúng. Hợp chất theo sáng chế là Rp, Rp.

Định nghĩa

Thuật ngữ “dùng” như được dùng trong bản mô tả này liên quan đến người, động vật có vú, đối tượng là động vật có vú, động vật, đối tượng là thú y, đối tượng của giả dược, đối tượng nghiên cứu, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ không mang tính hạn chế việc tiếp xúc của phối tử, chất phản ứng, giả dược, phân tử nhỏ, dược chất, tác nhân điều trị bệnh, tác nhân chẩn đoán bệnh, hoặc dược phẩm ngoại sinh cho đối tượng, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, và các đối tượng tương tự. Ví dụ, “dùng” có thể được dùng để chỉ phương pháp điều trị, phương pháp dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu, giả dược, và thử nghiệm.

Việc điều trị tế bào bao gồm việc cho chất phản ứng tiếp xúc với tế bào, cũng như cho chất phản ứng tiếp xúc với dịch thể, khi dịch thể tiếp xúc với tế bào. "Dùng" còn bao hàm cả xử lý *in vitro* và *ex vivo*, ví dụ, xử lý tế bào, bằng chất phản ứng, tác nhân chẩn đoán bệnh, được phẩm liên kết, hoặc bằng tế bào khác. "Được dùng cùng với nhau" không có nghĩa là hai hoặc nhiều tác nhân được dùng như một được phẩm duy nhất. Mặc dù việc sử dụng được phẩm duy nhất được sáng chế dự định, song các tác nhân này có thể được phân phối cho đối tượng ở dạng dùng riêng rẽ, mà có thể được dùng cùng tại một thời điểm hoặc tại thời điểm khác nhau, và có thể qua cùng một đường dùng hoặc qua đường dùng khác nhau.

"Chất chủ vận" đề cập đến phối tử và thụ thể, chứa phân tử, phân tử kết hợp, phức, hoặc các chất phản ứng kết hợp, mà kích thích thụ thể này. Ví dụ, chất chủ vận yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF) có thể bao gồm GM-CSF, mutein hoặc dẫn xuất GM-CSF, chất có tác dụng giống peptit của GM-CSF, phân tử nhỏ có chức năng giống chức năng sinh học của GM-CSF, hoặc kháng thể mà kích thích thụ thể GM-CSF.

"Chất đối kháng" như đề cập đến phối tử và thụ thể, bao hàm phân tử, tổ hợp của các phân tử, hoặc phức, mà ức chế, làm mất tác dụng, điều tiết giảm, và/hoặc gây tê thụ thể. "Chất đối kháng" bao hàm chất phản ứng bất kỳ ức chế hoạt tính cơ định của thụ thể. Hoạt tính cơ định là hoạt tính mà thể hiện khi không có tương tác phối tử/thụ thể. "Chất đối kháng" còn bao hàm cả chất phản ứng bất kỳ mà ức chế hoặc ngăn ngừa hoạt tính kích thích (hoặc điều tiết) của thụ thể. Ví dụ, chất đối kháng thụ thể GM-CSF bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, kháng thể mà liên kết với phối tử (GM-CSF) và ngăn không cho nó gắn kết với thụ thể, hoặc kháng thể mà gắn kết với thụ thể và ngăn không cho phối tử không gắn kết với thụ thể, hoặc trong đó kháng thể phong bế thụ thể ở dạng bất hoạt.

Thuật ngữ "hầu như tinh khiết" liên quan đến CDN có nghĩa là các loại đặc hiệu chiếm ít nhất 50%, thường hơn là chiếm ít nhất 60%, thường là chiếm ít nhất 70%, thường hơn là chiếm ít nhất 75%, thường nhất chiếm ít nhất 80%, thường là chiếm ít nhất 85%, thường hơn là chiếm ít nhất 90%, thường nhất là chiếm ít nhất 95%, và thường là chiếm ít nhất 98% trọng lượng, hoặc lớn hơn, hoạt tính CDN có trong chế phẩm. Trọng lượng nước, dung dịch đệm, muối, chất tẩy rửa, chất khử, chất ức chế

proteaza, chất làm ổn định (kể cả protein được bổ sung như albumin), và tá được thường không được sử dụng để xác định độ tinh khiết.

Gắn kết “đặc hiệu” hoặc “có chọn lọc”, mà liên quan đến phối tử/thụ thể, axit nucleic/axit nucleic hỗ trợ, kháng thể/kháng nguyên, hoặc cặp gắn kết khác (ví dụ, xytokin với thụ thể xytokin) (trong bản mô tả này, mỗi chất thường được gọi là “phân tử sinh học đích” hoặc “đích”) biểu thị phản ứng gắn kết mà liên quan đến sự có mặt của đích trong quần thể không đồng nhất của các protein và các chất sinh học khác. Gắn kết đặc hiệu có thể, ví dụ, có ý nghĩa là gắn kết với hợp chất, phối tử axit nucleic, kháng thể, hoặc gắn kết với thành phần thu được từ vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể, của phương pháp dự định gắn kết với đích có ái lực thường là ít nhất lớn hơn 25%, thường hơn là lớn hơn ít nhất 50%, thường nhất là lớn hơn ít nhất 100% (2 lần), thông thường là lớn hơn ít nhất mười lần, thông thường là ít nhất lớn hơn 20 lần, và thường nhất là mạnh hơn ít nhất 100 lần ái lực với phân tử không phải là đích.

Thuật ngữ “phối tử” được dùng để chỉ phân tử nhỏ, axit nucleic, peptit, polypeptit, sacarit, polysacarit, glycan, glycoprotein, glycolipit, hoặc hỗn hợp của chúng mà gắn kết với phân tử sinh học đích. Trong khi các phối tử có thể là các chất chủ vận hoặc các chất đối kháng thụ thể, phối tử còn bao hàm cả tác nhân gắn kết mà không phải là chất chủ vận hoặc chất đối kháng, và không có đặc tính chất chủ vận hoặc chất đối kháng. Gắn kết đặc hiệu của phối tử với đích cùng nguồn gốc thường được thể hiện bằng “ái lực.” Theo các phương án được ưu tiên, các phối tử theo sáng chế gắn kết với ái lực nằm trong khoảng từ 10^4 M^{-1} đến khoảng 10^8 M^{-1} . Ái lực được tính là $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} là hằng số tốc độ phân ly, K_{on} là hằng số tốc độ kết hợp và K_d là hằng số ổn định).

Ái lực có thể được xác định tại thời điểm cân bằng bằng cách đo phân đoạn được gắn kết (r) của phối tử đánh dấu ở các nồng độ khác nhau (c). Dữ liệu được lập đồ thị bằng cách sử dụng phương trình Scatchard: $r/c = K(n-r)$: trong đó r = mol phối tử được liên kết /mol thụ thể tại thời điểm cân bằng; c = nồng độ của phối tử tự do tại thời điểm cân bằng; K = hằng số liên kết ổn định; và n = số vị trí gắn kết phối tử trên mỗi phân tử thụ thể. Bằng cách phân tích đồ họa, r/c được vẽ trên trục Y còn r trên trục X, do đó tạo ra đồ thị Scatchard. Phép đo ái lực bằng cách phân tích Scatchard là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem các tài liệu: van Erp *et al.*, *J. Immunoassay* 12:

425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988. Theo cách khác, ái lực có thể được đo theo phép chuẩn độ nhiệt lượng đẳng nhiệt (ITC). Trong thử nghiệm ITC thông thường, dung dịch chứa phối tử được chuẩn độ vào dung dịch chứa đích cùng nguồn gốc. Nhiệt lượng giải phóng ra từ tương tác của chúng (ΔH) được theo dõi theo thời gian. Khi các lượng liên tục của phối tử được chuẩn độ vào tế bào ITC, lượng nhiệt hấp thu hoặc giải phóng sẽ tỷ lệ với lượng gắn kết. Khi hệ này đạt đến trạng thái bão hòa, tín hiệu nhiệt bị giảm chỉ đến khi quan sát thấy sự tản nhiệt lượng. Sau đó, đường cong gắn kết thu được từ đồ thị nhiệt lượng của mỗi lần tiêm theo tỷ lệ giữa phối tử và đối tác gắn kết trong tế bào. Đường cong gắn kết được phân tích bằng mô hình gắn kết thích hợp để xác định K_B , n và ΔH . Lưu ý rằng $K_B = 1/K_d$.

Thuật ngữ “đối tượng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ người hoặc động vật không phải là người. Do đó, phương pháp và các dược phẩm theo sáng chế được áp dụng cho cả các bệnh ở người và bệnh thú y. Theo phương án nhất định, đối tượng là “bệnh nhân”, tức là người còn sống mà được chăm sóc y tế do bệnh hoặc tình trạng bệnh lý. Đối tượng bao gồm người không bị trạng thái đau ốm xác định mà đang được khảo sát về các dấu hiệu bệnh lý. Dược ưu tiên là đối tượng đã được chẩn đoán mắc bệnh ung thư cụ thể mà được hướng đích đến bởi các dược phẩm và phương pháp theo sáng chế. Các bệnh ung thư được ưu tiên điều trị bằng các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư biểu mô thận, u hắc tố, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư vú.

“Lượng có hiệu quả điều trị bệnh” được định nghĩa là lượng chất phản ứng hoặc dược phẩm đủ để mang lại lợi ích cho bệnh nhân, tức là làm giảm, phòng ngừa, hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng của tình trạng bệnh lý được điều trị. Khi tác nhân hoặc dược phẩm chứa tác nhân chẩn đoán bệnh, “lượng hiệu quả để chẩn đoán” được định nghĩa là lượng đủ để tạo ra dấu hiệu, hình ảnh, hoặc thông số chẩn đoán khác. Lượng hiệu quả của dược phẩm sẽ thay đổi theo các yếu tố như mức độ nhạy cảm của cá thể, lứa tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và đáp ứng đặc thù của cá thể. “Lượng có hiệu quả” bao gồm, không chỉ giới hạn ở, lượng mà có thể làm giảm, thay

đổi, làm giảm nhẹ, phòng ngừa, hoặc chẩn đoán triệu chứng hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn hoặc quá trình gây bệnh của chúng. Trừ khi có quy định khác, rõ ràng hoặc dựa vào ngữ cảnh, “lượng có hiệu quả” không chỉ giới hạn ở lượng tối thiểu đủ để làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý.

“Việc điều trị” hoặc “điều trị bệnh” (liên quan đến tình trạng bệnh lý hoặc bệnh) là cách để đạt được các kết quả có lợi hoặc các kết quả mong muốn kể cả và tốt hơn là các kết quả lâm sàng. Đối với các mục đích của sáng chế, các kết quả có lợi hoặc các kết quả mong muốn liên quan đến bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều kết quả sau: phòng bệnh, làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý liên quan đến bệnh, chữa bệnh, làm giảm bớt mức độ nghiêm trọng của bệnh, trì hoãn tiến triển của bệnh, làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh, tăng cường chất lượng sống của người bệnh, và/hoặc kéo thời gian sống sót. Tương tự, đối với các mục đích của sáng chế, các kết quả có lợi hoặc các kết quả mong muốn liên quan đến tình trạng bệnh lý bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều kết quả sau: phòng ngừa tình trạng bệnh lý, làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý, chữa trị tình trạng bệnh lý, làm giảm mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý, trì hoãn tiến triển của tình trạng bệnh lý, làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến tình trạng bệnh lý, tăng cường chất lượng sống của người bệnh, và/hoặc kéo dài thời gian sống sót. Ví dụ, theo các phương án, trong đó các dược phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, các kết quả có lợi hoặc các kết quả mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều kết quả sau: làm giảm mức độ tăng sinh (hoặc phá hủy) tế bào tân sinh hoặc tế bào ung thư, làm giảm mức độ di căn các tế bào của khối u tân sinh phát hiện được ở các bệnh ung thư, thu nhỏ kích thước của khối u, làm giảm các triệu chứng sinh ra từ bệnh ung thư, tăng cường chất lượng sống của bệnh nhân mắc bệnh ung thư, làm giảm liều lượng của các thuốc khác cần thiết để điều trị bệnh, trì hoãn tiến triển của bệnh ung thư, và/hoặc kéo dài thời gian sống sót của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư. Tùy theo ngữ cảnh, “việc điều trị” đối tượng có thể ám chỉ rằng đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh, ví dụ, trong tình huống mà đối tượng bị mắc rối loạn mong muốn được làm giảm bằng cách dùng chất phản ứng.

“Vaxin” bao hàm vaxin phòng ngừa. Vaxin còn bao hàm cả vaxin điều trị, ví dụ, vaxin được dùng cho động vật có vú mà bị tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn liên quan đến kháng nguyên hoặc epitop có trong vaxin.

Purin dinucleotit vòng

Các tế bào nhân sơ cũng như tế bào nhân chuẩn sử dụng nhiều phân tử nhỏ để truyền tín hiệu tế bào và giao tiếp trong và liên tế bào. Các nucleotit vòng như GMP mạch vòng, cAMP, v.v. đã được biết là có hoạt tính điều hòa và khơi mào trong tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn. Không giống như tế bào nhân chuẩn, các tế bào nhân sơ cũng sử dụng purin dinucleotit vòng làm các phân tử điều hòa. Ở sinh vật nhân sơ, việc ngưng tụ hai phân tử GTP được xúc tác bằng enzym điguanilat xyclaza (DGC) để tạo ra c-diGMP, mà là tác nhân điều hòa quan trọng trong vi khuẩn.

Nghiên cứu gần đây gợi ý rằng diGMP vòng hoặc các chất tương tự của nó cũng có thể kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch hoặc viêm ở bệnh nhân hoặc có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với vaxin bằng cách đóng vai trò tá được ở các động vật có vú. Việc phát hiện ADN lấy được từ tác nhân gây bệnh trong bào tương cần đến sự truyền tín hiệu thông qua kinaza liên kết với TANK 1 (TBK1) và yếu tố phiên mã nằm sau, yếu tố điều hòa IFN- 3 (IRF3). Một protein liên màng được gọi là STING (chất kích thích gen IFN; còn được gọi là MITA, ERIS, MPYS và TMEM173) có chức năng làm thụ thể truyền tín hiệu cho purin dinucleotit vòng này, gây ra sự kích thích trực truyền tín hiệu TBK1-IRF3 và đáp ứng interferon typ I phụ thuộc vào STING. Ví dụ, xem hình 1 trong tài liệu: Burdette *et al.*, *Nature* 478: 515-18, 2011 chỉ ra rằng STING liên kết trực tiếp với điguanilat monophosphat vòng, nhưng không liên kết với nucleotit hoặc axit nucleic không liên quan.

Purin dinucleotit vòng để sử dụng làm các tiền chất để thu được CDN theo sáng chế được mô tả một cách chi tiết, ví dụ, trong tài liệu: Gao *et al.*, *Cell* (2013) 153: 1094-1107, doi: 10.1016/j.cell.2013.04.046; các patent Mỹ số 7,709,458 và 7,592,326; WO2007/054279; và trong tài liệu Yan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem Lett.* 18: 5631 (2008). CDN này có thể được cải biến bằng cách áp dụng các kỹ thuật hóa hữu cơ chuẩn để tạo ra CDN theo sáng chế. CDN theo sáng chế là phosphorothioat.

Phosphorothioat là biến thể của nucleotit bình thường, trong đó một trong số các nguyên tử oxy không liên kết cầu được thế bằng lưu huỳnh. Việc lưu huỳnh hóa liên

kết giữa các nucleotit làm giảm đáng kể hoạt tính của endonucleaza, và exonucleaza, kể cả ADN POL 1 exonucleaza 5' đến 3' và 3' đến 5', nucleaza S1 và P1, ARNaza, nucleaza huyết thanh và phosphodiesteraza nọc độc rắn. Ngoài ra, hiệu quả của việc liên kết ngang lớp lipid kép được gia tăng.

Liên kết phosphorothioat liên kết vốn là không đối xứng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng mỗi phosphat trong cấu trúc này có thể tồn tại ở dạng R hoặc S. Do đó, có thể có các dạng Rp,Rp, Sp,Sp, Sp,Rp, và Rp,Sp.

Các chế phẩm chứa CDN theo sáng chế có thể được cho vật chủ dùng, riêng rẽ hoặc kết hợp với tá dược được dùng, với lượng đủ để gây ra, điều chỉnh, hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch thích hợp. Đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, cả đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu, đáp ứng vốn có, đáp ứng miễn dịch tiên phát, miễn dịch thích ứng, đáp ứng miễn dịch thứ phát, đáp ứng miễn dịch trí nhớ, miễn dịch hoạt hóa tế bào, miễn dịch tăng sinh tế bào, miễn dịch biệt hóa tế bào, và biểu hiện xytokin. Theo phương án nhất định, các chế phẩm chứa CDN được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chế phẩm khác bao gồm vacxin nhằm để kích thích đáp ứng miễn dịch với một hoặc nhiều kháng nguyên định trước; tá dược; các chất đối kháng quá trình CTLA-4 và PD-1, lipid, các liposom, các tác nhân hóa trị liệu, dòng tế bào điều biến miễn dịch, v.v..

Các chế phẩm chứa CDN có thể được dùng trước, sau, và/hoặc cùng với được phẩm hoặc phương thức điều trị hoặc phòng bệnh khác. Các được phẩm này có, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử đồng kích thích B7, intolokine-2, interferon- γ , GM-CSF, chất đối kháng CTLA-4, phối tử OX-40/OX-40, phối tử CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus đậu mùa ở súc vật, Bacille Calmette-Guerin (BCG), các liposom, phen, tá dược Freund hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh, nội độc tố đã khử độc, dầu khoáng, các chất hoạt động bề mặt như lipolexitin, rượu pluronic, polyanion, peptit, và nhũ tương dầu hoặc hydrocacbon. Các chất mang để gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào T mà ưu tiên kích thích đáp ứng tế bào T tan bào so với đáp ứng kháng thể được ưu tiên, mặc dù chất mang kích thích cả hai kiểu đáp ứng cũng có thể được dùng. Trong các trường hợp mà trong đó tác nhân là polypeptit, thì chính polypeptit này hoặc polynucleotit ghi mã polypeptit có thể được dùng. Chất mang có thể là tế bào, như tế

bào trình diện kháng nguyên (APC) hoặc tế bào tua. Các tế bào trình diện kháng nguyên bao gồm kiểu tế bào như tế bào đơn nhân lớn, các tế bào tua và tế bào B. Các tế bào trình diện kháng nguyên khác bao gồm bạch cầu đơn nhân to, tế bào Kupffer vùng rìa, tế bào tiểu thần kinh đệm, tế bào Langerhans, tế bào tua dạng bạch tuộc, tế bào tua có nang, và tế bào T. Các tế bào trình diện kháng nguyên tùy ý cũng có thể được sử dụng. Các ví dụ về các tế bào trình diện kháng nguyên tùy ý bao gồm tế bào hình sao, tế bào nang, nội mạc và nguyên bào sợi. Chất mang có thể là tế bào vi khuẩn được biến nạp để biểu hiện polypeptit hoặc để phân phối polynucleotit mà sau đó được biểu hiện trong các tế bào của cá thể được chủng ngừa. Các tá dược, như nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, có thể được bổ sung vào để làm tăng khả năng của vaccin khi gây ra, tăng cường, hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch. Các chất khác, như các xytokin, các chất hóa ứng động, và các trình tự axit nucleic vi khuẩn, như CpG, chất chủ vận thụ thể giống Toll (TLR) 9 cũng như các chất chủ vận khác đối với TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, bao gồm lipoprotein, LPS, monophosphoryl lipid A, axit lipoteichoic, imiquimod, resiquimod, và các chất chủ vận gen I tạo ra axit retinoic (RIG-I) khác như poly I:C, được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với các dược phẩm đã nêu cũng là các tá dược tiềm năng. Các ví dụ đại diện khác về các tá dược bao gồm tá dược tổng hợp QS-21 chứa saponin đồng nhất đã được tinh chế từ vỏ của *Quillaja saponaria* và *Corynebacterium parvum* (McCune *et al.*, *Cancer*, 1979; 43:1619). Cần phải hiểu rằng tá dược cần phải tối ưu hóa. Nói cách khác, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện thử nghiệm thông thường để xác định tá dược tốt nhất cần dùng.

Phương pháp dùng đồng thời với tác nhân điều trị bệnh khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Hardman, *et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).

Do tính chất của tá dược của hợp chất theo sáng chế, có thể sử dụng kết hợp với các phương thức điều trị khác bao gồm vacxin, tá dược, kháng nguyên, kháng thể, và chất điều biến miễn dịch khác. Các ví dụ được nêu dưới đây.

Tá dược

Ngoài purin dinucleotit vòng mô tả ở trên, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều chất khác mà, do bản chất của chúng, có thể tác động để kích thích hoặc sử dụng hệ miễn dịch theo cách khác để đáp ứng với các kháng nguyên ung thư có mặt trong tế bào khối u đã được làm bất hoạt. Các tá dược này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lipid, các liposom, vi khuẩn không hoạt động mà gây miễn dịch bẩm sinh (ví dụ, *Listeria monocytogenes* không hoạt động hoặc bị suy yếu), chế phẩm mà gây kích hoạt miễn dịch bẩm sinh thông qua các thụ thể giống Toll (TLR), các thụ thể giống (NOD) (NLR), các thụ thể giống gen tạo ra axit retinoic (RIG)-I- (RLR), và/hoặc các thụ thể lectin kiểu C (CLR). Các ví dụ về PAMP bao gồm lipoprotein, lipopolypeptit, peptidoglycan, zymosan, lipopolysaccharit, neisserial porin, flagelin, profilin, galactoxeromit, muramyl dipeptit. Peptidoglycan, lipoprotein, và các axit lipoteichoic là các thành phần của thành tế bào vi khuẩn Gram dương. Lipopolysaccharit được biểu hiện trong hầu hết các vi khuẩn, trong đó MPL là một ví dụ. Flagelin được dùng để chỉ thành phần cấu trúc của vi khuẩn có lông mà được tiết ra bởi vi khuẩn tác nhân gây bệnh và hội sinh. α -Galactosylxeromit (α -GalCer) là chất hoạt hóa của tế bào chết tự nhiên T (NKT). Muramyl dipeptit là motif peptidoglycan hoạt tính sinh học thông thường đối với vi khuẩn. Danh mục này không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế. Các hỗn hợp tá dược được ưu tiên được mô tả dưới đây.

Các chất đối kháng con đường CTLA-4 và PD-1

CTLA-4 được cho là chất điều hòa âm quan trọng của đáp ứng miễn dịch thích ứng. Các tế bào T hoạt hóa sẽ điều hòa tăng CTLA-4, mà liên kết với CD80 và CD86 trên các tế bào trình diện kháng nguyên có ái lực cao hơn CD28, do đó việc ức chế tế bào T sẽ kích thích mức độ biểu hiện gen IL-2 và sự tăng sinh tế bào T. Các tác dụng chống khối u của việc phong bế CTLA4 đã được quan sát thấy ở mô hình chuột đồng bị bệnh ung thư biểu mô ruột kết, bệnh ung thư tuyến tiền liệt di căn, và u hắc tố di căn.

Ipilimumab (Yervoy™) và tremelimumab là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người mà liên kết với CTLA4 của người và ngăn không cho nó tương tác với CD80 và CD86. Các nghiên cứu pha I và II bằng cách sử dụng ipilimumab và tremelimumab đã chứng minh hoạt tính lâm sàng ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư. Chất điều biến miễn dịch âm tính khác mà có thể được hướng đến nhờ chiến lược tương tự bao gồm quá trình chết tế bào theo chương trình 1, chất làm yếu tế bào B và tế bào lympho T, yếu tố sinh trưởng biến nạp beta β , intolokin-10, và yếu tố sinh trưởng nội mô mạch.

PD-1 là chất điều hòa âm khác của đáp ứng miễn dịch thích ứng mà được biểu hiện trên các tế bào T đã được hoạt hóa. PD-1 liên kết với B7-H1 và B7-DC, và việc liên kết với PD-1 ức chế sự hoạt hóa tế bào T. Tác dụng chống khối u đã được chứng minh bằng quá trình phong bế PD-1. BMS-936558, MK3475, CT-011, AMP-224 và MDX-1106 đã được thông báo rằng trong tài liệu chuyên ngành là các ví dụ về chất phong bế PD-1 mà có thể được sử dụng theo sáng chế.

Các chất chủ vận TLR

Thuật ngữ “thụ thể giống Toll” (hoặc “TLR”) được dùng trong bản mô tả này để chỉ một thành viên của họ thụ thể giống Toll bao gồm các protein hoặc đoạn của chúng mà nhạy với sản phẩm vi sinh vật và/hoặc khơi mào đáp ứng miễn dịch thích ứng. Theo một phương án, TLR hoạt hóa tế bào tua (DC). Các thụ thể giống Toll (TLR) là nhóm bao gồm các thụ thể nhận biết mô hình mà ban đầu được xác định là tác nhân cảm biến của hệ miễn dịch bẩm sinh nhận biết tác nhân gây bệnh vi sinh vật. TLR bao gồm họ các phân tử xuyên màng bảo toàn chứa vùng ecto của các đoạn lặp giàu leuxin, miền liên màng và miền nội bào TIR (Toll/IL-1R). TLR nhận biết các cấu trúc khác biệt trong vi khuẩn, thường được gọi là “PAMP” (kiểu phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh). Phôi tử gắn kết với TLR hỗ trợ một loạt quá trình truyền tín hiệu trong tế bào mà sản sinh ra các yếu tố liên quan đến bệnh viêm và miễn dịch.

Ở người, mười TLR đã được xác định. TLR được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bao gồm TLR-1,-2,-4,-5, và -6, trong khi TLR-3, -7/8, và -9 được biểu hiện trong khoang ER. Các phân nhóm tế bào tua ở người có thể được xác định trên cơ sở của kiểu biểu hiện TLR khác biệt. Ví dụ, phân nhóm dạng tủy hoặc “thông thường” của DC (mDC) biểu hiện TLR 1 đến 8 khi bị kích thích, và một loạt chất đánh dấu

hoạt hóa (ví dụ, CD80, CD86, MHC nhóm I và II, CCR7), các xytokin tiền viêm, và các chất hóa ứng động được sinh ra. Kết quả của sự kích thích này và biểu hiện thu được là cung cấp thông tin cho tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ đặc hiệu với kháng nguyên. Các DC này cần có khả năng tăng cường hấp thu kháng nguyên và trình diện chúng ở dạng thích hợp với tế bào T. Trái lại, phân nhóm dạng tương bào của DC (pDC) chỉ biểu hiện TLR7 và TLR9 khi hoạt hóa, bằng cách hoạt hóa các tế bào NK cũng như tế bào T. Vì việc diệt các tế bào của khối u có thể tác động bất lợi đến chức năng DC, đã có gợi ý rằng việc hoạt hóa DC bằng các chất chủ vận TLR có thể là có lợi để cung cấp thông tin cho hệ miễn dịch chống u trong phép điều trị miễn dịch để điều trị bệnh ung thư. Điều này cũng đã gợi ý rằng việc điều trị thành công bệnh ung thư vú bằng cách sử dụng bức xạ và phương pháp hóa trị cần phải hoạt hóa TLR4.

Các chất chủ vận TLR đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất sau:

- Pam3Cy, chất chủ vận TLR-1/2;
- CFA, chất chủ vận TLR-2;
- MALP2, chất chủ vận TLR-2;
- Pam2Cy, chất chủ vận TLR-2;
- FSL-1, chất chủ vận TLR-2;
- Hib-OMPC, chất chủ vận TLR-2;
- polyribosinic: axit polyriboxytidic (Poly I:C), chất chủ vận TLR-3;
- axit polyadenosin-polyuridylic (poly AU), chất chủ vận TLR-3;
- axit polyinosinic-polyxytidylic đã được làm ổn định bằng poly-L-lysin và carbometylxenluloza (Hiltonol®), chất chủ vận TLR-3;
- monophosphoryl lipit A (MPL), chất chủ vận TLR-4;
- LPS, chất chủ vận TLR-4;
- flagelin, chất chủ vận TLR-5;
- sialyl-Tn (STn), hydrat cacbon liên quan đến MUC1 muxin trên nhiều tế bào ung thư của người và chất chủ vận TLR-4;
- imiquimod, chất chủ vận TLR-7;
- resiquimod, chất chủ vận TLR-7/8;
- loxoribin, chất chủ vận TLR-7/8; và

CpG dinucleotit không được metyl hóa (CpG-ODN), chất chủ vận TLR-9.

Do tính chất tá được, chất chủ vận TLR tốt hơn là được dùng kết hợp với vaccin, các tá được và/hoặc chất điều biến miễn dịch khác, và có thể được kết hợp thành nhiều hỗn hợp khác nhau. Do đó, theo phương án nhất định, purin dinucleotit vòng mà liên kết với STING và gây hoạt hóa TBK1 phụ thuộc vào STING và tế bào khối u đã được làm bất hoạt mà biểu hiện và tiết một hoặc nhiều xytokin kích thích sự cảm ứng, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua, như được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cùng với một hoặc nhiều chất chủ vận TLR nhằm mục đích điều trị bệnh.

Điều trị bằng kháng thể

Độc tính đối với tế bào gián tiếp do tế bào phụ thuộc vào kháng thể (Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity - ADCC) là cơ chế bảo vệ miễn dịch do tế bào gây ra mà nhờ đó tác động lên tế bào của hệ miễn dịch sẽ chủ động phân giải tế bào đích, có các kháng nguyên bề mặt tế bào đã được liên kết bởi các kháng thể đặc hiệu. Đây là một trong số các cơ chế mà thông qua đó, các kháng thể, là một phần của đáp ứng miễn dịch thể dịch, có thể hoạt động để hạn chế và ngăn chặn sự nhiễm trùng. ADCC truyền thống được tạo ra bởi các tế bào diệt tự nhiên (NK); tế bào đơn nhân lớn, các bạch cầu trung tính và tế bào ưa eosin cũng có thể là trung gian cho ADCC. ADCC là cơ chế hoạt động quan trọng của các kháng thể đơn dòng điều trị bệnh, bao gồm trastuzumab và rituximab, chống lại khối u. Các hợp chất theo sáng chế có thể hoạt động để tạo ra ADCC.

Sau đây là danh mục làm ví dụ của các kháng thể mà có thể được sử dụng cùng với hợp chất theo sáng chế.

Muromonab-CD3: được dùng để ngăn ngừa sự đào thải cơ quan cấp tính, ví dụ, thận, mảnh cấy ghép. Các phiên bản được làm giống như phiên bản của người cho thấy triển vọng ức chế việc phân hủy tự miễn dịch của các tế bào beta ở bệnh đái tháo đường typ 1.

Infliximab (Remicade®) và adalimumab (Humira®): liên kết với yếu tố hoại tử u-alpha (TNF- α). Được sử dụng trong một số bệnh viêm như bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh Crohns.

Omalizumab (Xolair®). Liên kết với IgE bằng cách ngăn IgE không liên kết với các tế bào nuôi. Được sử dụng để trị bệnh hen dị ứng.

Daclizumab (Zenapax®). Liên kết với phân tử thụ thể IL-2 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T được hoạt hóa. Được dùng để ngăn ngừa sự thải bỏ cấy ghép thận đã được cấy ghép.

Rituximab (tên thương mại = Rituxan®). Liên kết với phân tử CD20 được tìm thấy trên hầu hết các tế bào B và được sử dụng để điều trị u bạch huyết tế bào B.

Ibritumomab (tên thương mại = Zevalin®). Đây là kháng thể đơn dòng chống lại phân tử CD20 trên tế bào B (và u bạch huyết) đã tiếp hợp với các đồng vị. Được cho bệnh nhân u bạch huyết sử dụng có bổ sung Rituxan.

Tositumomab (Bexxar®). Đây là thể tiếp hợp của kháng thể đơn dòng chống lại CD20 và đồng vị phóng xạ iod-131 (¹³¹I).

Cetuximab (Erbix®). Phong bế HER1, một thụ thể đối với yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF) mà được phát hiện trên một số tế bào của khối u (một số bệnh ung thư vú, u bạch huyết).

Trastuzumab (Herceptin®). Phong bế HER2, yếu tố sinh trưởng thụ thể được biểu hiện quá mức ở 20% bệnh ung thư vú.

Adcetris®. Thụ thể tiếp hợp của kháng thể đơn dòng mà liên kết với CD30, phân tử bề mặt tế bào được biểu hiện bởi các tế bào u bạch huyết nhưng không phát hiện được trên các tế bào gốc bình thường cần thiết để phục hồi tủy xương.

Alemtuzumab (Campath-1H®). Liên kết với CD52, phân tử được tìm thấy trên các tế bào lympho và làm suy yếu cả tế bào T và tế bào B. Đã làm thuyên giảm bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính và có hứa hẹn trong việc phòng ngừa đào thải cấy ghép thận.

Lym-1 (Oncolym®). Liên kết với kháng nguyên tương thích với mô được giải mã bằng HLA-DR mà có thể được biểu hiện ở mức độ cao trên tế bào của u bạch huyết.

Ipilimumab (Yervoy®) hoạt động để làm tăng đáp ứng miễn dịch của chính cơ thể với khối u.

Vitaxin. Liên kết với integrin (α -v/ β -3) mạch được tìm thấy trên mạch máu của các loại u nhưng không được tìm thấy trên mạch máu nuôi các mô bình thường. Trong các thử nghiệm lâm sàng pha II, Vitaxin đã thể hiện triển vọng thu nhỏ các u rắn mà không gây ra tác dụng phụ.

Bevacizumab (Avastin®). Liên kết với yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) ngăn không cho nó gắn kết với thụ thể của nó. Được dùng để điều trị bệnh ung thư kết tràng.

Abciximab (ReoPro®).Ức chế sự kết tập tiểu cầu bằng cách gắn kết thụ thể trên bề mặt của chúng mà thường được liên kết với fibrinogen. Hữu dụng để ngăn ngừa sự tắc nghẽn mạch vành ở các bệnh nhân mà bị tạo hình mạch.

Các tác nhân phân phối

Liposom là nang được tạo ra từ một lớp (“unilamellar”) hoặc nhiều lớp (“multilamellar”) phospholipit. Do đặc tính lưỡng cực của khối tạo ra phospholipit, các liposom thường bao gồm lớp ưa nước tiếp xúc với bề mặt bên ngoài ưa nước và bao lấy nhân ưa nước. Tính linh hoạt của các liposom khi kết hợp với thành phần ưa nước/kỵ nước, bản chất không độc của chúng, sự thoái biến sinh học, sự tương thích với mô, khả năng điều chỉnh, gây cảm ứng miễn dịch tế bào, đặc tính giải phóng chậm và tăng độ hấp thu bởi tế bào đơn nhân lớn, khiến cho chúng trở thành ứng viên hấp dẫn để phân phối các kháng nguyên.

Tài liệu WO2010/104833 mô tả các chế phẩm điều chế chứa liposom thích hợp. Các chế phẩm chứa liposom, trong bản mô tả này được gọi là Vesivax® (Molecular Express, Inc.), chứa hoặc không chứa “polypeptit hoặc hydrat cacbon sinh miễn dịch” nêu trên, có thể chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung như peptidoglycan, lipopeptit, lipopolysacarit, monophosphoryl lipit A, axit lipoteichoic, resiquimod, imiquimod, flagelin, các oligonucleotit chứa motif CpG không metyl hóa, beta-galactosylxeramit, muramyl dipeptit, axit retinoic tran, ARN sợi đôi virus, protein sốc nhiệt, dioctadexyldimethylamoni bromua, các chất hoạt động bề mặt cation, chất kháng thụ thể giống Toll, dimyristoyltrimethylamonipropan, và các chất chủ vận thụ thể giống nod. Có lợi là, nếu các chế phẩm chứa liposom này có thể được dùng để phân phối CDN theo sáng chế.

Hơn nữa, trong khi các chế phẩm chứa liposom nêu trên sử dụng “chất dẫn xuất steroid” như một mỏ neo để gắn polypeptit hoặc hydrat cacbon sinh miễn dịch vào liposom, steroid có thể đơn giản là steroid không tiếp hợp như cholesterol.

Phương pháp thích hợp để bào chế các liposom từ hỗn hợp lipid là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem tài liệu: Basu & Basu, *Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, 2002; Gregoriadis, *Liposome Technology, 3rd Edition*, Informa HealthCare, 2006. Phương pháp được ưu tiên bao gồm phương pháp ép đùn, đồng nhất hóa, và siêu âm đã được bộc lộ ở đây. Phương pháp làm ví dụ nhằm bào chế các liposom để dùng trong sáng chế, mà bao gồm việc làm khô hỗn hợp lỏng, tiếp theo là hydrat hóa trong chất dẫn có nước và xử lý bằng siêu âm để tạo ra các liposom, đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2010/104833.

Theo phương án nhất định, các liposom được cung cấp nằm trong khoảng cỡ trung bình cụ thể. Cỡ liposom có thể được chọn, ví dụ, bằng cách ép đùn chất dẫn có nước chứa các liposom qua màng có cỡ lỗ chọn trước và thu gom nguyên liệu chảy qua màng này. Theo phương án được ưu tiên, liposom được chọn hầu như có bán kính nằm trong khoảng từ 50nm đến 500nm, tốt hơn nữa là hầu như có bán kính nằm trong khoảng từ 50nm đến 200nm, và tốt nhất là hầu như có bán kính nằm trong khoảng từ 50nm đến 150nm. Thuật ngữ “hầu như” được dùng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh này có nghĩa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa 80%, và tốt nhất là ít nhất 90% liposom nằm trong khoảng được chỉ định.

Các tá dược lipid và giống lipid khác mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm nhũ tương dầu trong nước (o/w) (xem, ví dụ tài liệu: Muderhwa *et al.*, *J. Pharmaceut. Sci.* 88: 1332–9, 1999)), VesiVax® TLR (do Molecular Express, Inc. cung cấp), digitonin (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,698,432), và lipid glucopyranosyl (ví dụ, xem đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100310602).

Hạt có cỡ hạt nano cũng là hệ phân phối được chất thích hợp đối với hầu hết các đường dùng. Qua nhiều năm, nhiều loại polyme tự nhiên và tổng hợp đã được khai thác để điều chế hạt có cỡ hạt nano, trong đó poly(axit lactic) (PLA), poly(axit glycolic) (PGA), và copolyme của chúng (PLGA) đã được khảo sát sâu rộng do sự tương thích với mô và sự thoái biến sinh học của chúng. Hạt có cỡ hạt nano và chất

mang nano khác đóng vai trò chất mang tiềm năng đối với một vài nhóm dược chất như các dược chất chống ung thư, các dược chất chống tăng huyết áp, các chất điều biến miễn dịch, và các hormon; và đại phân tử như axit nucleic, các protein, peptit, và các kháng thể. Ví dụ, xem tài liệu: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21:387-422, 2004; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 1:22-30, 2005.

Các tác nhân hóa trị liệu

Theo các phương án bổ sung, phương pháp khác còn bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hiệu quả của một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu như một phép điều trị bệnh bổ sung. Theo phương án nhất định, một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu được chọn từ abirateron axetat, altretamin, anhydrovindblastin, auristatin, bexaroten, bicalutamid, BMS 184476, 2,3,4,5,6-pentafluor-N-(3-fluor-4-methoxyphenyl)benzen sulfonamid, bleomycin, N,N-dimethyl-L-valyl-L-valyl-N-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolin-t-butylamid, cachectin, cediranib, clorambucil, cyclophosphamid, 3',4'-đidehydro-4'-deoxy-8'-norvin-calceculin, docetaxol, doxorubicin, cyclophosphamid, carboplatin, carmustin, cisplatin, cryptophycin, cyclophosphamid, cytarabin, đacarbazin (DTIC), dactinomycin, daunorubicin, dexifosfamid, doxorubicin (adriamycin), etoposid, 5-fluorouracil, finasterid, flutamid, hydroxyuracil và hydroxyuretan, ifosfamid, liarsol, lonidamin, lomustin (CCNU), MDV3100, meclizolam (nitơ mù tạt), melphalan, mivobulin isethionat, rhizoxin, sunitinib, streptozocin, mitomycin, metotrexat, taxan, nilutamid, onapriston, paclitaxel, prednimustin, procabazatin, RPR109881, stramustin phosphat, tamoxifen, tasonermin, taxol, tretinoin, vinblastin, vincristin, vindesine sulfat, và vinorelbine.

Dòng tế bào điều biến miễn dịch

“Tế bào khối u đã được làm bất hoạt” nghĩa là tế bào của khối u ("nội sinh" hoặc "dị sinh" với bệnh nhân) mà đã được xử lý để ngăn chặn sự phân chia của tế bào. Đối với các mục đích của sáng chế, các tế bào này bảo toàn tính sinh miễn dịch và hoạt tính chuyển hóa của chúng. Các tế bào này của khối u được cải biến bằng công nghệ di truyền để biểu hiện gen chuyển mà được biểu hiện bên trong bệnh nhân là một phần của phép điều trị bệnh ung thư. Do đó, chế phẩm hoặc vaccin theo sáng chế chứa các tế bào tân sinh (ví dụ, khối u) mà nội sinh hoặc dị sinh với bệnh nhân đang tiếp nhận trị liệu và tốt nhất là cùng kiểu tế bào của khối u mà đang gây bệnh ở bệnh nhân. Ví

dụ, bệnh nhân mắc u hắc tố sẽ thường được dùng tế bào cải biến bằng công nghệ di truyền thu được từ u hắc tố. Phương pháp làm bất hoạt các tế bào của khối u để áp dụng theo sáng chế, như việc chiếu xạ, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các tế bào không hoạt hóa của khối u theo sáng chế được cho bệnh nhân dùng cùng với một hoặc nhiều phân tử hoặc tác nhân đồng kích thích. Tác nhân đồng kích thích được ưu tiên chứa một hoặc nhiều xytokin kích thích sự cảm ứng, bổ sung, và/hoặc sự thành thực của tế bào tua. Phương pháp đánh giá tác nhân đồng kích thích này là đã biết trong tài liệu chuyên ngành. Sự cảm ứng và thành thực của DC thường được đánh giá theo mức tăng biểu hiện trong các phân tử trên màng như CD80 và CD86, và/hoặc tiết các xytokin tiền viêm, như IL-12 và interferon typ I sau khi bị kích thích.

Theo các phương án được ưu tiên, chính các tế bào không hoạt hóa của khối u được cải biến để biểu hiện và tiết ra một hoặc nhiều xytokin kích thích sự tạo ra, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua. Sáng chế được bộc lộ bằng một số thuật ngữ làm ví dụ liên quan đến việc sử dụng GM-CSF. Do đó, bằng cách làm ví dụ, tế bào của khối u có thể biểu hiện gen chuyển ghi mã GM-CSF như đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,637,483, 5,904,920, 6,277,368 và 6,350,445, cũng như trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100150946, mà các tài liệu này rõ ràng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Một dạng tế bào ung thư được cải biến bằng công nghệ di truyền biểu hiện GM-CSF hoặc "vaccine tế bào biểu hiện xytokin" để điều trị bệnh ung thư tụy được bộc lộ trong các patent Mỹ số 6,033,674 và 5,985,290.

Các xytokin thích hợp khác mà có thể được biểu hiện bởi các tế bào không hoạt hóa của khối u và/hoặc các tế bào thay thế bên ngoài, hoặc cùng với, GM-CSF bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều phối tử CD40, IL-12, CCL3, CCL20, và CCL21. Danh mục này không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mặc dù tốt hơn là các tế bào khối u đã được bất hoạt được cho đối tượng dùng biểu hiện một hoặc nhiều xytokin quan tâm, dòng tế bào khối u có thể là kèm theo dòng tế bào đã được bất hoạt bên ngoài mà biểu hiện và tiết một hoặc nhiều xytokin kích thích sự cảm ứng, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua. Dòng tế bào bên ngoài có thể cung cấp toàn bộ các xytokin kích thích sự cảm ứng, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua, hoặc có thể cung cấp các xytokin kích thích sự

cảm ứng, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua được biểu hiện và tiết ra nhờ các tế bào không hoạt hóa của khối u. Ví dụ, dòng tế bào bên ngoài biểu hiện xytokin điều biến miễn dịch đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 6,464,973, và 8,012,469, trong các tài liệu: Dessureault *et al.*, *Ann. Surg. Oncol.* 14: 869-84, 2007, và Eager and Nemunaitis, *Mol. Ther.* 12: 18-27, 2005.

"Polypeptit của yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF)" có nghĩa là xytokin hoặc đoạn của chúng có hoạt tính điều biến miễn dịch và có mức độ tương tự trình tự axit amin ít nhất khoảng 85% với số hiệu lưu giữ GenBank AAA52122.1.

Vacxin

Theo phương án nhất định, các dược phẩm chứa CDN được dùng kết hợp với một hoặc nhiều vacxin nhằm kích thích đáp ứng miễn dịch với một hoặc nhiều kháng nguyên định trước. Các ví dụ về các kháng nguyên đích mà có thể được sử dụng theo sáng chế được liệt kê trong bảng sau. Kháng nguyên đích còn có thể là đoạn hoặc polypeptit dung hợp chứa phần kháng nguyên có hoạt tính miễn dịch được liệt kê trong bảng này. Không được dự tính giới hạn phạm vi của sáng chế ở danh mục này.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
Kháng nguyên của khối u	
Mesothelin	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (ví dụ, xem cả: Hassan, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:3937-3942; Muminova, <i>et al.</i> (2004) <i>BMC Cancer</i> 4:19; Iacobuzio-Donahue, <i>et al.</i> (2003) <i>Cancer Res.</i> 63:8614-8622).
Protein kèm theo khối u Wilms-1 (Wt-1), bao gồm dạng đồng chức năng A; dạng đồng chức năng B; dạng đồng chức năng C; dạng đồng chức năng D.	Dạng đồng chức năng WT-1 A (Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_000378; NP_000369). Dạng đồng chức năng WT-1 B (Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_024424; NP_077742). Dạng đồng chức năng WT-1 C (Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_024425; NP_077743). Dạng đồng chức năng WT-1 D (Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_024426; NP_077744).
Enzym chymotrypsin của lớp sừng (stratum corneum chymolytic enzyme - SCCE), và các biến thể của chúng.	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_005046; NM_139277; AF332583. Ví dụ, xem cả các tài liệu: Bondurant, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:3446-3454; Santin, <i>et al.</i> (2004) <i>Gynecol. Oncol.</i> 94:283-288; Shigemasa, <i>et al.</i> (2001) <i>Int. J. Gynecol. Cancer</i>

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	11:454-461; Sepehr, <i>et al.</i> (2001) <i>Oncogene</i> 20:7368-7374.
Protein A có liên quan về chuỗi thuộc nhóm I MHC (MICA); Protein A có liên quan về chuỗi thuộc nhóm I MHC (MICB).	Ví dụ, xem các tài liệu: Groh, <i>et al.</i> (2005) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102:6461-6466; Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrin và các peptit thu được từ gastrin; gastrin/thụ thể CCK-2 (cũng được gọi là CCK-B).	Harris, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:5624-5631; Gilliam, <i>et al.</i> (2004) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 30:536-543; Laheru and Jaffee (2005) <i>Nature Reviews Cancer</i> 5:459-467.
Glypican-3 (kháng nguyên, ví dụ, của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan và u hắc tố).	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_004484. Nakatsura, <i>et al.</i> (2003) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 306:16-25; Capurro, <i>et al.</i> (2003) <i>Gastroenterol.</i> 125:89-97; Nakatsura, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:6612-6621).
Protein giống Coactosin.	Nakatsura, <i>et al.</i> (2002) <i>Eur. J. Immunol.</i> 32:826-836; Laheru and Jaffee (2005) <i>Nature Reviews Cancer</i> 5:459-467.
Kháng nguyên tế bào gốc của tuyến tiền liệt (PSCA).	Số hiệu lưu giữ Genbank số AF043498; AR026974; AR302232 (ví dụ, xem cả các tài liệu: Argani, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:4320-4324; Christiansen, <i>et al.</i> (2003) <i>Prostate</i> 55:9-19; Fuessel, <i>et al.</i> (2003) 23:221-228).
Axit phosphatase của tuyến tiền liệt (PAP); kháng nguyên đặc hiệu của tuyến tiền liệt (PSA); PSM; PSMA.	Small, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Clin. Oncol.</i> 18:3894-3903; Altwein and Luboldt (1999) <i>Urol. Int.</i> 63:62-71; Chan, <i>et al.</i> (1999) <i>Prostate</i> 41:99-109; Ito, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer</i> 103:242-250; Schmittgen, <i>et al.</i> (2003) <i>Int. J. Cancer</i> 107:323-329; Millon, <i>et al.</i> (1999) <i>Eur. Urol.</i> 36:278-285.
Sáu kháng nguyên biểu mô liên màng của tuyến tiền liệt (STEAP).	Ví dụ, xem tài liệu: Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Kháng nguyên của khối u ung thư biểu mô của tuyến tiền liệt (PCTA-1).	Ví dụ, xem tài liệu: Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; Số hiệu lưu giữ Genbank số L78132.
Gen cảm ứng khối u tiền liệt tuyến-1 (PTI-1).	Ví dụ, xem tài liệu: Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
Gen đặc hiệu của tuyến tiền liệt tương đồng với thụ thể liên hợp với protein G.	Ví dụ, xem tài liệu: Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442).
Prostaza (serin proteaza được điều tiết bởi antrogon).	Ví dụ, xem tài liệu: Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442; Số hiệu lưu giữ Genbank số BC096178; BC096176; BC096175.
Proteinaza 3.	Số hiệu lưu giữ Genbank số X55668.
Các kháng nguyên của bệnh ung thư tinh hoàn, ví dụ, NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1.	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_001327 (NY-ESO-1) (ví dụ, xem cả các tài liệu: Li, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:1809-1814; Chen, <i>et al.</i> (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> 101(25):9363-9368; Kubuschok, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer.</i> 109:568-575; Scanlan, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Immun.</i> 4:1; Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164; Dalerba, <i>et al.</i> (2001) <i>Int. J. Cancer</i> 93:85-90; Ries, <i>et al.</i> (2005) <i>Int. J. Oncol.</i> 26:817-824.
MAGE-A1, MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125.	Otte, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Res.</i> 61:6682-6687; Lee, <i>et al.</i> (2003) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 100:2651-2656; Sarcevic, <i>et al.</i> (2003) <i>Oncology</i> 64:443-449; Lin, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:5708-5716.
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:3157-3165; Scarcella, <i>et al.</i> (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:335-341.
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
Họ DAM của gen, ví dụ, DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, <i>et al.</i> (1998) <i>Cancer Res.</i> 58:2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, <i>et al.</i> (2004) <i>Dig. Dis. Sci.</i> 49:1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 190:1793-1800.
CAMEL.	Slager, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Immunol.</i> 172:5095-5102; Slager, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Gene Ther.</i> 11:227-236.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
Các kháng nguyên liên quan đến bệnh ung thư ruột kết, ví dụ, NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
N-Axetylglucosaminyl-tranferaza V (GnT-V).	Dosaka-Akita, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1773-1779.
Yếu tố kéo dài 2 bị đột biến (ELF2M).	Renkvist, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 50:3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 112:661-668;
BRDT.	Scanlan, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, <i>et al.</i> (2003) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 29:900-903.
RAGE.	Ví dụ, xem các tài liệu: Li, <i>et al.</i> (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 164:1389-1397; Shirasawa, <i>et al.</i> (2004) <i>Genes to Cells</i> 9:165-174.
MUM-1 (u hắc tố phổ biến bị đột biến); MUM-2; đột biến MUM-2 Arg-Gly; MUM-3.	Gueguen, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Immunol.</i> 160:6188-6194; Hirose, <i>et al.</i> (2005) <i>Int. J. Hematol.</i> 81:48-57; Baurain, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Immunol.</i> 164:6057-6066; Chiari, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:5785-5792.
Kháng nguyên LDLR/ protein dung hợp FUT của u hắc tố.	Wang, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Exp. Med.</i> 189:1659-1667.
Một loạt các kháng nguyên NY-REN của bệnh ung thư thận.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:456-464.
Một loạt kháng nguyên NY-BR của bệnh ung thư vú, ví dụ, NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immunity</i> 1:4.
BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, <i>et al.</i> (2004) <i>Breast J.</i> 10:475-480; Nicoletto, <i>et</i>

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	<i>al.</i> (2001) <i>Cancer Treat Rev.</i> 27:295-304.
Protein dung hợp DEK/CAN.	Von Lindern, <i>et al.</i> (1992) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 12:1687-1697.
Ras, ví dụ, ras hoang, ras chứa đột biến ở mã bộ ba 12, 13, 59, hoặc 61, ví dụ, đột biến G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	Số hiệu lưu giữ Genbank số P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. Ví dụ, xem cả, Số hiệu lưu giữ Genbank số M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.
BRAF (dạng đồng chức năng của RAF).	Tannapfel, <i>et al.</i> (2005) <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 123:256-2601; Tsao and Sober (2005) <i>Dermatol. Clin.</i> 23:323-333.
Các kháng nguyên của u hắc tố, bao gồm các kháng nguyên của tế bào u hắc tố HST-2.	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481. See, e g., Suzuki, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Immunol.</i> 163:2783-2791.
Survivin	Số hiệu lưu giữ Genbank số AB028869; U75285 (ví dụ, xem cả các tài liệu: Tsuruma, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Translational Med.</i> 2:19 (11 pages); Pisarev, <i>et al.</i> (2003) <i>Clin. Cancer Res.</i> 9:6523-6533; Siegel, <i>et al.</i> (2003) <i>Br. J. Haematol.</i> 122:911-914; Andersen, <i>et al.</i> (2002) <i>Histol. Histopathol.</i> 17:669-675).
MDM-2	NM_002392; NM_006878 (ví dụ, xem cả các tài liệu: Mayo, <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:5013-5016; Demidenko and Blagosklonny (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3653-3660).
Các protein liên kết với Metyl-CpG (MeCP2; MBD2).	Muller, <i>et al.</i> (2003) <i>Br. J. Cancer</i> 89:1934-1939; Fang, <i>et al.</i> (2004) <i>World J. Gastroenterol.</i> 10:3394-3398.
NA88-A.	Moreau-Aubry, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Exp. Med.</i> 191:1617-1624.
Histon deacetylaza (HDAC), ví dụ, HDAC5.	Waltregny, <i>et al.</i> (2004) <i>Eur. J. Histochem.</i> 48:273-290; Scanlan, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047.
Xyclophilin B (Cyp-B).	Tamura, <i>et al.</i> (2001) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 92:762-767.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
CA 15-3; CA 27,29.	Clinton, <i>et al.</i> (2003) <i>Biomed. Sci. Instrum.</i> 39:408-414.
Protein sốc nhiệt Hsp70.	Faure, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:863-870.
Họ GAGE/PAGE, ví dụ, PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:1445-1448.
Các họ MAGE-A, B, C, và D. MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6.	Lucas, <i>et al.</i> (2000) <i>Int. J. Cancer</i> 87:55-60; Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immun.</i> 1:4.
Kinesin 2; yếu tố điều biến nhân tố TATA 1; protein khối u D53; NY	Scanlan, <i>et al.</i> (2001) <i>Cancer Immun.</i> 30:1-4.
Alpha-fetoprotein (AFP)	Grimm, <i>et al.</i> (2000) <i>Gastroenterol.</i> 119:1104-1112.
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:686-695; Sasatomi, <i>et al.</i> (2002) <i>Cancer</i> 94:1636-1641; Matsumoto, <i>et al.</i> (1998) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 89:1292-1295; Tanaka, <i>et al.</i> (2000) <i>Jpn. J. Cancer Res.</i> 91:1177-1184.
Kháng nguyên được biểu hiện ưu tiên của u hắc tố (PRAME).	Matsushita, <i>et al.</i> (2003) <i>Leuk. Lymphoma</i> 44:439-444; Oberthuer, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4307-4313.
Kháng nguyên của phôi bị ung thư (CEA), peptit tăng cường chủ vận CAP1 - 6D.	Số hiệu lưu giữ Genbank số <u>M29540</u> ; E03352; X98311; M17303 (ví dụ, xem cả các tài liệu: Zaremba (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4570-4577; Sarobe, <i>et al.</i> (2004) <i>Curr. Cancer Drug Targets</i> 4:443-454; Tsang, <i>et al.</i> (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:2439-2449; Fong, <i>et al.</i> (2001) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 98:8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Clin. Immunol.</i> 24:571-578; Disis and Cheever (1997) <i>Adv. Cancer Res.</i> 71:343-371.
Cdk4; cdk6; p16 (INK4); protein Rb.	Ghazizadeh, <i>et al.</i> (2005) <i>Respiration</i> 72:68-73; Ericson, <i>et al.</i> (2003) <i>Mol. Cancer Res.</i> 1:654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:2974-2980.
Telomeraza (TERT).	Nair, <i>et al.</i> (2000) <i>Nat. Med.</i> 6:1011-1017.
707-AP.	Takahashi, <i>et al.</i> (1997) <i>Clin. Cancer Res.</i> 3:1363-1370.
Annexin, ví dụ, Annexin II.	Zimmerman, <i>et al.</i> (2004) <i>Virchows Arch.</i> 445:368-374.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldda, <i>et al.</i> (2000) <i>Blood</i> 95:1007-1013; Hakansson, <i>et al.</i> (2004) <i>Leukemia</i> 18:538-547; Schwartz, <i>et al.</i> (2003) <i>Semin. Hematol.</i> 40:87-96; Lim, <i>et al.</i> (1999) <i>Int. J. Mol. Med.</i> 4:665-667.
BCL2; BLC6; protein CD10.	Iqbal, <i>et al.</i> (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:159-166.
CDC27 (là kháng nguyên của u hắc tố).	Wang, <i>et al.</i> (1999) <i>Science</i> 284:1351-1354.
Protein sinh dục 17 (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21.	Arora, <i>et al.</i> (2005) <i>Mol. Carcinog.</i> 42:97-108.
Các protein liên quan đến Tyrosinaza 1 và 2 (TRP-1 và TRP-2).	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_001922. (ví dụ, xem cả tài liệu: Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Gp100/pmel-17.	Số hiệu lưu giữ Genbank số AH003567; U31798; U31799; U31807; U31799 (ví dụ, xem cả tài liệu: Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
TARP.	Ví dụ, xem các tài liệu: Clifton, <i>et al.</i> (2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 101:10166-10171; Virok, <i>et al.</i> (2005) <i>Infection Immunity</i> 73:1939-1946.
Các protein liên quan đến tyrosinaza 1 và 2 (TRP-1 và TRP-2).	Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_001922. (ví dụ, xem cả tài liệu Bronte, <i>et al.</i> (2000) <i>Cancer Res.</i> 60:253-258).
Thụ thể melanocortin 1 (MC1R); MAGE-3; gp100; tyrosinaza; dopachrom tautomeraza (TRP-2); MART-1.	Salazar-Onfray, <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4348-4355; Reynolds, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Immunol.</i> 161:6970-6976; Chang, <i>et al.</i> (2002) <i>Clin. Cancer Res.</i> 8:1021-1032.
MUC-1; MUC-2.	Ví dụ, xem các tài liệu: Davies, <i>et al.</i> (1994) <i>Cancer Lett.</i> 82:179-184; Gambus, <i>et al.</i> (1995) <i>Int. J. Cancer</i> 60:146-148; McCool, <i>et al.</i> (1999) <i>Biochem. J.</i> 341:593-600.
Spas-1.	Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20020150588 của Allison và các đồng tác giả.
CASP-8; FLICE; MACH.	Mandruzzato, <i>et al.</i> (1997) <i>J. Exp. Med.</i> 186:785-793.
CEACAM6; CAP-1.	Duxbury, <i>et al.</i> (2004) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 317:837-843; Morse, <i>et al.</i> (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:1331-1338.
HMGB1 (protein liên kết ADN và xytokin).	Brezniceanu, <i>et al.</i> (2003) <i>FASEB J.</i> 17:1295-1297.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
ETV6/AML1.	Codrington, <i>et al.</i> (2000) <i>Br. J. Haematol.</i> 111:1071-1079.
Các dạng đột biến và hoang của tous polyposis coli (APC); beta-catenin; c-met; p53; E-cadherin; xyclooxygenaza-2 (COX-2) u tuyến.	Clements, <i>et al.</i> (2003) <i>Clin. Colorectal Cancer</i> 3:113-120; Gulmann, <i>et al.</i> (2003) <i>Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.</i> 11:230-237; Jungck, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Colorectal. Dis.</i> 19:438-445; Wang, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Surg. Res.</i> 120:242-248; Abutaily, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Pathol.</i> 201:355-362; Liang, <i>et al.</i> (2004) <i>Br. J. Surg.</i> 91:355-361; Shirakawa, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4342-4348.
Kháng nguyên của bệnh ung thư biểu mô tế bào thận được liên kết bởi mAB G250.	Mulders, <i>et al.</i> (2003) <i>Urol. Clin. North Am.</i> 30:455-465; Steffens, <i>et al.</i> (1999) <i>AntiCancer Res.</i> 19:1197-1200.
EphA2	Ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0281783 A1; Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_004431 (của người); Số hiệu lưu giữ Genbank số NM_010139 (chuột nhắt); Số hiệu lưu giữ Genbank số AB038986 (một phần trình tự của gà); Số hiệu lưu giữ Genbank số NP_004422, AAH37166, và AAA53375 (của người); Số hiệu lưu giữ Genbank số NP_034269 (chuột nhắt), AAH06954 (chuột nhắt), XP_345597 (chuột cống), và BAB63910 (của gà).
EGFRvIII	Ví dụ, xem, WO/2012/068360
Kháng nguyên <i>Francisella tularensis</i>	
<i>Francisella tularensis</i> A và B.	Hệ gen đầy đủ của loài phụ Schu S4 (Số hiệu lưu giữ Genbank số AJ749949); của loài phụ Schu 4 (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_006570). Protein của màng bên ngoài (43 kDa) Bevanger, <i>et al.</i> (1988) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 27:922-926; Porsch-Ozcurumez, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.</i> 11:1008-1015). Thành phần kháng nguyên của <i>F. tularensis</i> chứa, ví dụ, 80 kháng nguyên, bao gồm chaperonin 10 kDa và 60 kDa (Havlasova, <i>et al.</i> (2002) <i>Proteomics</i> 2:857-86), nucleosit diphosphat kinaza, isoxitrat dehydrogenaza, protein liên kết với ARN Hfq, chaperon ClpB (Havlasova, <i>et al.</i> (2005) <i>Proteomics</i> 5:2090-2103). Ví dụ, xem cả các tài liệu: Oyston and Quarry (2005) <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> 87:277-281; Isherwood, <i>et al.</i> (2005) <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 57:1403-1414; Biagini, <i>et al.</i> (2005) <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 382:1027-1034.
Kháng nguyên của bệnh sốt rét	

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
Protein Circumsporozoite (CSP); SSP2; HEP17; các đoạn tương đồng Exp-1 phát hiện thấy ở <i>P. falciparum</i> ; và LSA-1.	Ví dụ, xem các tài liệu: Haddad, <i>et al.</i> (2004) <i>Infection Immunity</i> 72:1594-1602; Hoffman, <i>et al.</i> (1997) <i>Vaccine</i> 15:842-845; Oliveira-Ferreira and Daniel-Ribeiro (2001) <i>Mem. Inst. Oswaldo Cruz</i> , Rio de Janeiro 96:221-227. CSP (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AB121024). SSP2 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AF249739). LSA-1 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số Z30319).
Protein surface hồng cầu bị nhiễm Ring (RESA); protein bề mặt thể hoa thị 2 (MSP2); Spf66; protein bề mặt thể hoa thị 1 (MSP1); 195A; BVp42.	Ví dụ, xem các tài liệu: Stirnadel, <i>et al.</i> (2000) <i>Int. J. Epidemiol.</i> 29:579-586; Krzych, <i>et al.</i> (1995) <i>J. Immunol.</i> 155:4072-4077. Cũng xem, Good, <i>et al.</i> (2004) <i>Immunol. Rev.</i> 201:254-267; Good, <i>et al.</i> (2004) <i>Ann. Rev. Immunol.</i> 23:69-99. MSP2 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số X96399; X96397). MSP1 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số X03371). RESA (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số X05181; X05182).
Kháng nguyên màng đỉnh 1 (AMA1).	Ví dụ, xem tài liệu: Gupta, <i>et al.</i> (2005) <i>Protein Expr. Purif.</i> 41:186-198. AMA1 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số A`13; AJ494905; AJ490565).
Virus và kháng nguyên virus	
Viêm gan A	Số hiệu lưu giữ Genbank số, ví dụ, NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Viêm gan B	Hệ gen đầy đủ (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Viêm gan C	Hệ gen đầy đủ (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263).
Viêm gan D	Số hiệu lưu giữ Genbank số, ví dụ, NC_001653; AB118847; AY261457.
Virus gây u nhú ở người, bao gồm tất cả 200+ kiểu phụ (được phân chia thành 16 nhóm), như là các kiểu phụ có nguy cơ cao 16, 18, 30, 31, 33, 45.	Ví dụ, xem các tài liệu: Trimble, <i>et al.</i> (2003) <i>Vaccine</i> 21:4036-4042; Kim, <i>et al.</i> (2004) <i>Gene Ther.</i> 11:1011-1018; Simon, <i>et al.</i> (2003) <i>Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.</i> 109:219-223; Jung, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Microbiol.</i> 42:255-266; Damasus-Awatai and Freeman-Wang (2003) <i>Curr. Opin. Obstet. Gynecol.</i> 15:473-477; Jansen and Shaw (2004) <i>Annu. Rev. Med.</i> 55:319-331; Roden and Wu (2003) <i>Expert Rev. Vaccines</i> 2:495-516; de Villiers, <i>et al.</i> (2004) <i>Virology</i> 324:17-24; Hussain and Paterson (2005) <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> 54:577-586; Molijn, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Clin. Virol.</i> 32

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	(Suppl. 1) S43-S51. Số hiệu lưu giữ Genbank số AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).
Virut ưa tế bào lympho trong tế bào T của người (HTLV) kiểu I và II, bao gồm các kiểu phụ HTLV typ I toàn cầu, Trung Phi, và vùng Melanesia nước Úc, và các kiểu phụ HTLV typ II Iia, Iib, Iic, và Iid.	Ví dụ, xem các tài liệu: Capdepon, <i>et al.</i> (2005) <i>AIDS Res. Hum. Retrovirus</i> 21:28-42; Bhigjee, <i>et al.</i> (1999) <i>AIDS Res. Hum. Restrovirus</i> 15:1229-1233; Vandamme, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Virol.</i> 72:4327-4340; Vallejo, <i>et al.</i> (1996) <i>J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.</i> 13:384-391. HTLV typ I (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY563954; AY563953. HTLV typ II (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số L03561; Y13051; AF139382).
<i>Coronaviridae</i> , bao gồm coronavirut, như coronavirut SARS (SARS-CoV), và Torovirut.	Ví dụ, xem các tài liệu: Brian and Baric (2005) <i>Curr. Top. Microbiol. Immunol.</i> 287:1-30; Gonzalez, <i>et al.</i> (2003) <i>Arch. Virol.</i> 148:2207-2235; Smits, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:9567-9577; Jamieson, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1263-1269 (Số hiệu lưu giữ Genbank số AY348314; NC_004718; AY394850).
Virut Rubella.	Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001545; AF435866.
Virus quai bị, bao gồm kiểu gen A, C, D, G, H, và I.	Ví dụ, xem tài liệu: Orvell, <i>et al.</i> (2002) <i>J. Gen. Virol.</i> 83:2489-2496. Ví dụ, xem Số hiệu lưu giữ Genbank số AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
Virut Cocksackie A chứa kiểu huyết thanh 1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, và 24 (cũng được gọi là virut đường ruột ở người C; HEV-C).	Ví dụ, xem tài liệu: Brown, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:8973-8984. Số hiệu lưu giữ Genbank số AY421768; AY790926; X67706.
Virut Cocksackie B chứa các kiểu phụ 1-6.	Ví dụ, xem các tài liệu: Ahn, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Med. Virol.</i> 75:290-294; Patel, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Virol. Methods</i> 120:167-172; Rezig, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Med. Virol.</i> 72:268-274. Số hiệu lưu giữ Genbank số X05690.
Virut đường ruột ở người, ví dụ, bao gồm virut đường ruột ở người A (HEV-A, CAV2 to CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, và EV71) và còn bao gồm HEV-B (CAV9, CBV1 đến CBV6, E1 đến E7, E9, E11 đến E21, E24 đến E27, E29 đến E33, và EV69 và E73), cũng như HEV.	Ví dụ, xem tài liệu: Oberste, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Virol.</i> 78:855-867. Virut đường ruột của người A (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001612); virut đường ruột của người B (NC_001472); virut đường ruột của người C (NC_001428); virut đường ruột của người D (NC_001430). Virut đường ruột của chim A (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_003988).
Virut gây bệnh bại liệt bao gồm PV1, PV2, và PV3.	Ví dụ, xem He, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:4827-4835; Hahsido, <i>et al.</i> (1999) <i>Microbiol. Immunol.</i> 43:73-77.

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	Số hiệu lưu giữ Genbank số AJ132961 (typ 1); AY278550 (typ 2); X04468 (typ 3).
Virut gây bệnh viêm não do virut, bao gồm bệnh viêm não ở ngựa, bệnh viêm não ở ngựa Venezuela (VEE) (chứa kiểu phụ IA, IB, IC, ID, IIIC, IIID), bệnh viêm não ở ngựa Đông Âu (EEE), bệnh viêm não ở ngựa Tây Âu (WEE), bệnh viêm não St. Louis, bệnh viêm não thung lũng Murray Valley (Úc), bệnh viêm não Nhật Bản, và bệnh viêm não do ve truyền gây ra.	Ví dụ, xem các tài liệu: Hoke (2005) <i>Mil. Med.</i> 170:92-105; Estrada-Franco, <i>et al.</i> (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:2113-2121; Das, <i>et al.</i> (2004) <i>Antiviral Res.</i> 64:85-92; Aguilar, <i>et al.</i> (2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:880-888; Weaver, <i>et al.</i> (2004) <i>Arch. Virol. Suppl.</i> 18:43-64; Weaver, <i>et al.</i> (2004) <i>Annu. Rev. Entomol.</i> 49:141-174. Tác nhân gây bệnh viêm não ở ngựa miền đông (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_003899; AY722102); tác nhân gây bệnh viêm não ở ngựa miền tây (NC_003908).
Virut gây bệnh herpes ở người, bao gồm xytomegalovirut (CMV), virut Epstein-Barr (EBV), Virut gây bệnh herpes ở người -1 (HHV-1), HHV-2, HHV-3, HHV-4, HHV-5, HHV-6, HHV-7, HHV-8, virut gây bệnh herpes B, virut gây bệnh herpes simplex kiểu 1 và 2 (HSV-1, HSV-2), và virut gây bệnh thủy đậu (VZV).	Ví dụ, xem tài liệu: Studahl, <i>et al.</i> (2000) <i>Scand. J. Infect. Dis.</i> 32:237-248; Padilla, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Suppl. 1) S103-S110; Jainkittivong and Langlais (1998) <i>Oral Surg. Oral Med.</i> 85:399-403. Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001806 (virut gây bệnh herpes 1); NC_001798 (virut gây bệnh herpes 2); X04370 và NC_001348 (virut gây bệnh herpes 3); NC_001345 (virut gây bệnh herpes 4); NC_001347 (virut gây bệnh herpes 5); X83413 và NC_000898 (virut gây bệnh herpes 6); NC_001716 (virut gây bệnh herpes 7). Virut gây bệnh herpes ở người typ 6 và 7 (HHV-6; HHV-7) được nêu, ví dụ, trong, Padilla, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70 (Suppl. 1) S103-S110. Virut gây bệnh herpes ở người 8 (HHV-8), bao gồm kiểu phụ A-E, được nêu, ví dụ, trong tài liệu: Treurnicht, <i>et al.</i> (2002) <i>J. Med. Virol.</i> 66:235-240.
HIV-1 bao gồm nhóm M (kể cả kiểu phụ A đến J) và nhóm O (bao gồm các kiểu phụ phân biệt được bất kỳ) (HIV-2, kể cả kiểu phụ A-E).	Ví dụ, xem tài liệu: Smith, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Med. Virol.</i> 56:264-268. Ví dụ, cũng xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; và AJ508596.
Virut Epstein-Barr (EBV), kể cả kiểu phụ A và B.	Ví dụ, xem tài liệu: Peh, <i>et al.</i> (2002) <i>Pathology</i> 34:446-450. Chủng virut Epstein-Barr B95-8 (Số hiệu lưu giữ Genbank số V01555).
Reovirut, bao gồm các kiểu huyết thanh và các chủng 1, 2, và 3, typ 1 Lang, typ 2 Jones,	Ví dụ, xem các tài liệu: Barthold, <i>et al.</i> (1993) <i>Lab. Anim. Sci.</i> 43:425-430; Roner, <i>et al.</i> (1995) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 92:12362-12366; Kedl, <i>et al.</i> (1995) <i>J.</i>

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
và typ 3 Dearing.	<i>Virol.</i> 69:552-559. Số hiệu lưu giữ Genbank số K02739 (protein bề mặt gen sigma-3).
Kiểu phụ cytomegalovirut (CMV) bao gồm CMV kiểu phụ I-VII.	Ví dụ, xem các tài liệu: Chern, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Infect. Dis.</i> 178:1149-1153; Vilas Boas, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Med. Virol.</i> 71:404-407; Trincado, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Med. Virol.</i> 61:481-487. Số hiệu lưu giữ Genbank số X17403.
Rinovirut, kể cả tất cả các kiểu huyết thanh.	Rhinovirut ở người 2 (Số hiệu lưu giữ Genbank số X02316); Rhinovirut ở người B (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001490); Rhinovirut ở người 89 (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001617); Rhinovirut ở người 39 (Số hiệu lưu giữ Genbank số AY751783).
Adenovirut, kể cả tất cả các kiểu huyết thanh.	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.
Filovirut, kể cả virut Marburg và virut Ebola, và các dòng như Ebola-Sudan (EBO-S), Ebola-Zaire (EBO-Z), và Ebola-Reston (EBO-R).	Ví dụ, xem các tài liệu: Geisbert and Jahrling (1995) <i>Virus Res.</i> 39:129-150; Hutchinson, <i>et al.</i> (2001) <i>J. Med. Virol.</i> 65:561-566. Virut Marburg (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001608). Virut Ebola (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenavirut, kể cả virut gây bệnh viêm màng não căn nguyên từ tế bào ưa lympho ruột (LCM), virut Lassa, virut Junin, và virut Machupo.	Virut Junin, đoạn S (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_005081); virut Junin, đoạn L (Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_005080).
Virut gây bệnh dại.	Ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663.
Arbovirut, kể cả virut tây sông Nil, virut gây bệnh sốt xuất huyết 1 đến 4, virut gây sốt căn nguyên từ ve Colorado, virut Sindbis, <i>Togaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> , <i>Bunyaviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Orthomyxoviridae</i> , và virut tương tự.	Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 1 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AB195673; AY762084). Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 2 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 3 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY923865; AT858043). Virut gây bệnh sốt xuất huyết typ 4 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY947539; AY947539; AF326573). Virut Sindbis (ví

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	dự, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virut tây sông Nil (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001563; AY603654).
Virut gây bệnh thủy đậu bao gồm virut orthopox (virut gây bệnh đậu mùa, virut gây bệnh thủy đậu ở khỉ, virut gây bệnh thủy đậu ở súc vật, virut gây bệnh thủy đậu ở bò), virut yatapox (virut tanapox, virut gây bệnh ung thư ở khỉ Yaba), virut parapox, và virut molluscipox.	Viriola virus (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Sốt vàng	Ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_002031; AY640589; X03700.
Hantavirut, kể cả các kiểu huyết thanh Hantaan (HTN), Seoul (SEO), Dobrava (DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU), và Saaremaa giống Dobrava (SAAV).	Ví dụ, xem các tài liệu: Elgh, <i>et al.</i> (1997) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 35:1122-1130; Sjolander, <i>et al.</i> (2002) <i>Epidemiol. Infect.</i> 128:99-103; Zeier, <i>et al.</i> (2005) <i>Virus Genes</i> 30:157-180. Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_005222 và NC_005219 (Hantavirut). Ví dụ, cũng xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_005218; NC_005222; NC_005219.
Flavivirut, bao gồm virut gây bệnh sốt xuất huyết, virut gây bệnh viêm não Nhật Bản, virut tây sông Nil, và virut gây bệnh sốt vàng.	Ví dụ, xem tài liệu: Mukhopadhyay, <i>et al.</i> (2005) <i>Nature Rev. Microbiol.</i> 3:13-22. Số hiệu lưu giữ GenBank NC_001474 và AY702040 (gây bệnh sốt xuất huyết). Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001563 và AY603654.
Virut gây bệnh sởi.	Ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AB040874 và AY486084.
Virut gây bệnh cận cúm ở người (HPV), kể cả HPV typ 1-56.	Virut gây bệnh cận cúm ở người 2 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AB176531; NC003443). Virut gây bệnh cận cúm ở người 3 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001796).
Virut cúm, kể cả virut gây bệnh cúm typ A, B, và C.	Influenza nucleocapsid (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY626145). Influenza hemagglutinin (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY627885; AY555153). Influenza neuraminidaza (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY555151; AY577316). Protein nền của Influenza 2 (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY626144). Protein cơ bản từ Influenza 1 (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY627897). Protein của axit polymeraza của Influenza (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY627896). Nucleoprotein

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
	của Influenza (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ GenBank AY627895).
Các kiểu phụ của Influenza A, ví dụ, virus gây bệnh ở lợn (SIV): Influenza A H1N1 và virus gây bệnh cúm ở lợn.	Hemagglutinin của H1N1 (Số hiệu lưu giữ Genbank số S67220). Protein nền từ Influenza A (Số hiệu lưu giữ Genbank số AY700216). Nucleoprotein H5H1 của virus gây bệnh cúm A (Số hiệu lưu giữ Genbank số AY646426). Haemagglutinin của H1N1 (Số hiệu lưu giữ Genbank số D00837). Xem cả số hiệu lưu giữ Genbank số BD006058; BD006055; BD006052. Ví dụ, xem cả tài liệu: Wentworth, <i>et al.</i> (1994) <i>J. Virol.</i> 68:2051-2058; Wells, <i>et al.</i> (1991) <i>J.A.M.A.</i> 265:478-481.
Virus gây bệnh hợp bào hô hấp (RSV), kể cả nhóm phụ A và nhóm phụ B.	Virus gây bệnh hợp bào hô hấp (RSV) (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY353550; NC_001803; NC001781).
Rotavirus, kể cả rotavirus A đến E ở người, rotavirus ở bò, rotavirus ở khỉ nâu rhesus, và tái cấu trúc RVV của người.	Rotavirus ở người C đoạn 8 (Số hiệu lưu giữ Genbank số AJ549087); protein capsid bao ngoài của chủng rotavirus ở người G9 (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số DQ056300); Protein không cấu trúc 4 chủng B của rotavirus ở người (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY548957); protein capsid chủ yếu bên trong chủng rotavirus ở người (ví dụ, xem, Số hiệu lưu giữ Genbank số AY601554).
Polyomavirus, kể cả virus ở khỉ 40 (SV40), virus JC (JCV) và virus BK (BKV).	Ví dụ, xem các tài liệu: Engels, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Infect. Dis.</i> 190:2065-2069; Vilchez and Butel (2004) <i>Clin. Microbiol. Rev.</i> 17:495-508; Shivapurkar, <i>et al.</i> (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3757-3760; Carbone, <i>et al.</i> (2003) <i>Oncogene</i> 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, <i>et al.</i> (2004) <i>Virology</i> 318:1-9 (hệ gen đầy đủ SV40, ví dụ, có Số hiệu lưu giữ Genbank số NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562).
Coltivirus, bao gồm virus sốt có các nguyên tử ve Colorado, virus Eyach.	Attoui, <i>et al.</i> (1998) <i>J. Gen. Virol.</i> 79:2481-2489. Các đoạn của virus Eyach (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702; NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003699; NC_003701; NC_003706; NC_003700; AF282471; AF282477).

Bảng 1. Kháng nguyên

Kháng nguyên	Tham chiếu
Calcivirut, kể cả các nhóm gen Norwalk, nhóm Snow Mountain (SMA), và Saaporo.	virut Snow Mountain (ví dụ, xem số hiệu lưu giữ Genbank số AY134748).
Parvoviridae, kể cả dependovirut, parvovirut (kể cả parvovirut B19), và erythrovirut.	Ví dụ, xem các tài liệu: Brown (2004) <i>Dev. Biol.</i> (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, <i>et al.</i> (2005) <i>Ann. Rheum. Dis.</i> 64:780-782; Ziyaeyan, <i>et al.</i> (2005) <i>Jpn. J. Infect. Dis.</i> 58:95-97; Kaufman, <i>et al.</i> (2005) <i>Virology</i> 332:189-198.

Các sinh vật khác mà là thích hợp với các kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các giống *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pyogenes* (Strep nhóm A), *Streptococcus agalactia* (Strep nhóm B), *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* (kể cả *typhi*, *typhimurium*), *enterica* (kể cả *Helicobacter pylori* *Shigella flexneri* và các giống *shigella* nhóm D khác), các giống *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella pneumonia*, các loài khuẩn thoi (kể cả *C. difficile*), *Vibrio parahaemolyticus* và *V. vulnificus*. Không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế bằng danh mục này.

Dược phẩm

Thuật ngữ “dược chất” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất hóa học dùng để chữa trị, điều trị, hoặc ngăn ngừa bệnh và phải được Cơ quan quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ (hoặc một tổ chức tương đương không phải ở Hoa Kỳ của nó) cấp phép để kê đơn hoặc bán không cần đơn thuốc. Chi tiết về các kỹ thuật bào chế và việc dùng các dược phẩm này có thể được dự định trong tài liệu: Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 21st Edition (Mack Publishing Co., Easton, PA) và Nielloud and Marti-Mestres, *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc, New York).

Để đạt được mục đích của sáng chế này, dược phẩm có thể được dùng qua nhiều đường bao gồm đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, xông hít, khu trú, hoặc qua đường trực tràng ở dạng các chế phẩm chứa các chất mang, các tá dược và chất dẫn

được dụng. Thuật ngữ ngoài đường tiêu hóa được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường sử dụng dưới da, tĩnh mạch, bắp, trong động mạch, trong da, nội tủy mạc và ngoài màng cứng bằng nhiều loại kỹ thuật tiêm truyền. Việc sử dụng trong động mạch và tĩnh mạch như được áp dụng trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng thông qua ống thông. Sử dụng qua ống thông mạch vành và khoang chứa mạch vành cũng được dự định. Việc dùng các hợp chất theo sáng chế vào trong khối u có thể hoạt hóa một cách trực tiếp sự thâm nhập DC tại chỗ, thúc đẩy một cách trực tiếp sự làm chết theo chương trình tế bào của khối u hoặc làm các tế bào của khối u nhạy với các tác nhân độc đối với tế bào. Thuật ngữ đường miệng được dùng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường tiêu hóa, qua đường miệng, hoặc được phân phối qua đường dưới lưỡi hoặc đặt trong má. Các chế phẩm dùng qua đường miệng bao gồm đồ uống lỏng, đồ ăn dạng lỏng, cũng như viên tròn.

Dược phẩm có thể ở dạng bất kỳ thích hợp đối với phương pháp dùng được dự định. Ví dụ, khi được sử dụng qua đường miệng, các viên nén, viên dẹt, viên ngậm, huyền phù chứa nước hoặc trong dầu, bột hoặc hạt phân tán được, nhũ tương, viên nang cứng hoặc viên nang mềm, siro hoặc cồn ngọt có thể được bào chế. Dược phẩm được dự định dùng qua đường miệng có thể được sản xuất theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để sản xuất dược phẩm và các dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân bao gồm chất tạo ngọt, tác nhân tạo vị, tác nhân tạo màu và chất bảo quản, để tạo ra chế phẩm điều chế có mùi vị dễ chịu. Viên nén chứa dược chất kết hợp với tá dược được dụng không độc mà là thích hợp để điều chế viên nén là có thể chấp nhận được. Các tá dược có thể, ví dụ, là chất pha loãng trợ, như canxi hoặc natri cacbonat, lactoza, canxi hoặc natri phosphat; các tác nhân tạo hạt và các chất gây rã, như tinh bột ngô, hoặc axit alginic; các tác nhân kết dính, như tinh bột, gelatin hoặc acacia; và các tác nhân làm trơn; như magie stearat, axit stearic hoặc bột talc. Các viên nén có thể không được bao, hoặc có thể được bao theo các kỹ thuật đã biết bao gồm lớp bao tan trong ruột, bao tan trong ruột kết, hoặc bao vi nang để trì hoãn sự phân rã và hấp phụ trong đường dạ dày-ruột non và/hoặc tạo ra tác dụng kéo dài trong thời gian dài. Ví dụ, chất giải phóng chậm dược chất như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat riêng rẽ hoặc cùng với sáp có thể được sử dụng.

Chế phẩm bào chế để dùng qua đường miệng cũng có thể được trình bày ở dạng viên nang gelatin, trong đó dược chất được trộn với chất pha loãng rắn trơ, ví dụ, canxi phosphat hoặc cao lanh, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm, trong đó hoạt chất được trộn với môi trường nước hoặc môi trường dầu, như dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ô liu.

Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng huyền phù chứa nước kết hợp với tá dược thích hợp để sản xuất huyền phù chứa nước. Các tá dược này bao gồm tác nhân tạo huyền phù, như natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxypropyl metyloxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrrolidon, gôm tragacan và gôm acacia, và các tác nhân phân tán hoặc thấm ướt như phosphatit có trong tự nhiên (ví dụ, lexitin), sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (ví dụ, polyoxyetylen stearat), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, heptadecaetylenoxyetanol), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este một phần thu được từ axit béo và anhydrit hexitol (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat). Huyền phù chứa nước còn có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản như etyl hoặc n-propyl p-hydroxy-benzoat, một hoặc nhiều tác nhân tạo màu, một hoặc nhiều tác nhân tạo vị và một hoặc nhiều chất tạo ngọt, như sucroza hoặc sacarin.

Các huyền phù trong dầu có thể được bào chế bằng cách tạo huyền phù hoạt chất trong dầu thực vật, như dầu lạc, dầu ô liu, dầu vừng hoặc dầu dừa, hoặc dầu khoáng như parafin lỏng. Các loại huyền phù dùng qua đường miệng có thể chứa chất làm đặc, như sáp ong, parafin cứng hoặc rượu xetylic. Các chất tạo ngọt, như nêu trên, và các tác nhân tạo vị có thể được bổ sung vào để tạo ra chế phẩm điều chế dùng qua đường miệng có mùi vị dễ chịu. Các chế phẩm này có thể được bảo quản bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa như axit ascorbic.

Bột và hạt phân tán được theo sáng chế này là thích hợp để điều chế huyền phù chứa nước bằng cách bổ sung nước để làm cho hoạt chất kết hợp với tác nhân phân tán hoặc thấm ướt, tác nhân tạo huyền phù, và một hoặc nhiều chất bảo quản. Chất phân tán hoặc chất thấm ướt hoặc chất tạo huyền phù thích hợp được minh họa, ví dụ, bằng các chất nêu trên. Các tá dược khác, ví dụ, các tác nhân tạo ngọt, điều vị và tạo màu, cũng có thể có mặt.

Dược phẩm được mô tả còn có thể ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật, như dầu oliu hoặc dầu lạc, dầu khoáng, như parafin lỏng, hoặc hỗn hợp của các dầu này. Các tác nhân nhũ hóa thích hợp bao gồm gồm có trong tự nhiên, như gồm acaxia và gồm tragacan, phosphatit có trong tự nhiên, như lexitin đậu tương, este hoặc este một phần thu được từ các axit béo và anhydrit hexitol, như sorbitan monooleat, và các sản phẩm ngưng tụ của este một phần với etylen oxit, như polyoxyetylen sorbitan monooleat. Nhũ tương còn có thể chứa các tác nhân tạo ngọt và tạo vị.

Siro và cồn ngọt có thể được bào chế bằng các chất tạo ngọt, như glyxerol, sorbitol hoặc sucroza. Các chế phẩm này còn có thể chứa chất làm dịu, chất bảo quản, điều vị hoặc chất tạo màu.

Dược phẩm được mô tả có thể ở dạng chế phẩm điều chế vô trùng dùng để tiêm, như huyền phù chứa nước hoặc dầu vô trùng dùng để tiêm. Huyền phù này có thể được bào chế theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng chất phân tán hoặc chất thấm ướt hoặc chất tạo huyền phù thích hợp nêu trên. Chế phẩm điều chế vô trùng dùng để tiêm còn có thể là dung dịch hoặc huyền phù vô trùng dùng để tiêm trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc được chấp nhận để dùng ngoài đường tiêu hóa như dung dịch trong 1,3-butan-diol hoặc được bào chế ở dạng bột được làm đông khô. Các chất dẫn và các dung môi chấp nhận được mà có thể sử dụng được bao gồm nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô khuẩn có thể thường được dùng làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Đối với mục đích này, dầu nhẹ không bay hơi thơm bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm monoglyxerit hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, các axit béo như axit oleic có thể được dùng theo cách tương tự để điều chế thuốc tiêm.

Lượng hoạt chất mà có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều đơn thay đổi tùy theo vật chủ được điều trị bệnh và cách dùng cụ thể. Ví dụ, dạng thuốc giải phóng theo thời gian được dự định để người dùng qua đường miệng có thể chứa 20mg đến 500mg hoạt chất với chất mang với lượng thích hợp và thuận tiện mà có thể thay đổi trong khoảng từ 5% đến 95% tổng lượng dược phẩm. Tốt hơn là, dược phẩm này cần được bào chế mà cung cấp các lượng dễ đo khi sử dụng. Thông thường, lượng hiệu quả cần được dùng qua đường nội hấp nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến

100mg/kg và phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm, ví dụ, lứa tuổi và thể trọng của đối tượng (ví dụ, động vật có vú như người), tình trạng bệnh lý chính xác cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của nó, đường dùng, và cuối cùng sẽ phụ thuộc vào sự suy xét của bác sỹ kê đơn hoặc bác sỹ thú y. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng liều lượng đặc hiệu đối với mỗi bệnh nhân cụ thể sẽ phụ thuộc vào nhiều loại yếu tố bao gồm hoạt tính của hợp chất cụ thể được sử dụng, lứa tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của cá thể được điều trị; thời gian và đường dùng; tốc độ bài tiết; các thuốc khác mà đã được dùng; và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý cụ thể đang được điều trị, cũng như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Như nêu trên, chế phẩm bào chế được mô tả thích hợp để dùng qua đường miệng có thể được trình bày ở dạng các đơn vị riêng biệt như viên nang, viên con nhộng hoặc viên nén mà mỗi viên chứa hoạt chất với lượng định trước trước ở dạng bột hoặc hạt; ở dạng dung dịch hoặc huyền phù trong chất lỏng nước hoặc chất lỏng không phải là nước, hoặc ở dạng nhũ tương lỏng dầu trong nước hoặc nhũ tương lỏng nước-trong-dầu. Dược phẩm này còn có thể được dùng ở dạng viên thuốc lớn, thuốc bột trộn đường hoặc thuốc nhào.

Viên nén có thể được tạo ra bằng cách nén hoặc đúc, tùy ý với một hoặc nhiều thành phần phụ trợ. Các viên nén có thể được bào chế bằng cách, dùng máy thích hợp, nén hoạt chất thích hợp ở dạng chảy tự do như bột hoặc hạt, tùy ý đã được trộn với chất kết dính (ví dụ, povidon, gelatin, hydroxypropyl etyl xenluloza), chất làm trơn, chất pha loãng trợ, chất bảo quản, chất gây rã (ví dụ, natri tinh bột glycolat, povidon liên kết ngang, natri carboxymetyl xenluloza liên kết ngang), chất hoạt động bề mặt hoặc chất phân tán. Các viên nén đúc có thể được tạo ra trong máy thích hợp bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm hợp chất đã được nghiền thành bột được làm ẩm bằng chất pha loãng lỏng trợ. Các viên nén tùy ý có thể được bao hoặc có khía và có thể được bào chế để tạo ra sự giải phóng chậm hoặc có kiểm soát hoạt chất trong đó bằng cách sử dụng, ví dụ, hydroxypropyl methylxenluloza theo tỷ phần thay đổi để tạo ra profin giải phóng mong muốn. Các viên nén tùy ý có thể được tạo ra với vỏ bao tan trong ruột hoặc tan trong ruột kết để giải phóng một phần trong ruột mà không phải là dạ dày. Điều này là đặc biệt có lợi với các hợp chất có công thức 1 vì các hợp chất này dễ bị thủy phân bằng axit.

Chế phẩm bào chế thích hợp để dùng khu trú trong miệng bao gồm viên ngậm chứa hoạt chất trong chất nền có mùi vị, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacan; viên nhỏ kẹo mềm chứa hoạt chất trong nền trơn như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acaxia; và nước súc miệng chứa hoạt chất trong chất mang lỏng thích hợp.

Chế phẩm bào chế để dùng qua đường trực tràng có thể được trình bày ở dạng viên đặt trong hậu môn với chất nền thích hợp, ví dụ, là bơ cacao hoặc salixylat.

Chế phẩm bào chế thích hợp để dùng qua đường âm đạo có thể được trình bày ở dạng viên đặt âm đạo, nút gạc, kem bôi, gel, bột nhào, chế phẩm dạng bột hoặc chế phẩm dùng để xịt chứa, ngoài hoạt chất, chất mang như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là thích hợp.

Chế phẩm bào chế thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô khuẩn đẳng trương trong nước và trong chất dẫn không phải là nước có thể chứa các chất chống oxy hóa, các dung dịch đệm, chất kháng khuẩn và chất tan mà khiến cho chế phẩm này duy nhất đẳng trương với máu của người nhận dự định; và các loại huyền phù trong nước và trong chất dẫn không phải là nước có thể chứa các tác nhân tạo huyền phù và các tác nhân làm đặc. Các chế phẩm này có thể được chứa trong vật chứa kín chứa một liều duy nhất hoặc nhiều liều, ví dụ, ống và lọ thuốc tiêm, và có thể được bảo quản trong điều kiện được sấy khô ở nhiệt độ thấp (đã được làm đông khô) mà chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô khuẩn, ví dụ, nước dùng để tiêm, ngay lập tức trước khi dùng. Các dung dịch và huyền phù dùng để tiêm có thể được chuẩn bị từ bột, hạt và viên nén vô khuẩn thuộc các kiểu nêu trên.

Như được dùng trong bản mô tả này, muối được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: axetat, pyridin, amoni, piperazin, dietylamin, nicotinamit, formic, ure, natri, kali, canxi, magie, kẽm, lithi, xinamic, metylamino, metansulfonic, picric, tartric, trietylamino, đimetylamino, và tris(hydroxymetyl)aminometan. Muối được dụng khác đã được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết.

Lượng hiệu quả đối với bệnh nhân cụ thể có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh lý được điều trị, sức khỏe tổng thể của bệnh nhân, đường dùng và liều dùng và mức độ nghiêm trọng của tác dụng phụ. Hướng dẫn về phương pháp điều trị và chẩn đoán bệnh đã được nêu trong tài liệu (xem, ví dụ, tài liệu: Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca

Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK).

Lượng hiệu quả có thể được sử dụng thành một liều, nhưng không giới hạn ở một liều. Do đó, việc dùng có thể là hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bảy, mười tám, mười chín, hai mươi, hoặc nhiều hơn, lần sử dụng được phẩm. Khi dùng được phẩm theo phương pháp theo sáng chế nhiều hơn một lần, thì các lần dùng có thể cách nhau một khoảng thời gian là một phút, hai phút, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, hoặc nhiều phút, cách nhau khoảng một giờ, hai giờ, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 giờ, và tương tự. Trong phạm vi giờ, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là cộng hoặc trừ thời gian bất kỳ trong thời gian 30 phút. Các lần dùng cũng có thể cách nhau một khoảng thời gian là một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, bảy ngày, tám ngày, chín ngày, mười ngày, 11 ngày, 12 ngày, 13 ngày, 14 ngày, 15 ngày, 16 ngày, 17 ngày, 18 ngày, 19 ngày, 20 ngày, 21 ngày, và kết hợp chúng. Sáng chế không chỉ giới hạn ở các khoảng cách giữa các lần dùng liều cách nhau đều đặn, mà còn bao gồm các liều được dùng cách nhau bởi các khoảng thời gian không bằng nhau.

Chế độ dùng liều, ví dụ, một lần/tuần, hai lần/tuần, ba lần/tuần, bốn lần/tuần, năm lần/tuần, sáu lần/tuần, bảy lần/tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, bốn tuần một lần, năm tuần một lần, và tương tự, là có sẵn đối với sáng chế. Lịch trình dùng liều bao gồm việc sử dụng trong một khoảng thời gian, ví dụ, một tuần, hai tuần, ba tuần, bốn tuần, năm tuần, sáu tuần, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, bảy tháng, tám tháng, chín tháng, mười tháng, mười một tháng, và mười hai tháng.

Sáng chế đề xuất các chu kỳ lịch trình dùng liều nêu trên. Chu kỳ có thể được lặp lại khoảng, ví dụ, bảy ngày một lần; 14 ngày một lần; 21 ngày một lần; 28 ngày một lần; 35 ngày một lần; 42 ngày; 49 ngày một lần; 56 ngày một lần; 63 ngày một lần; 70 ngày một lần; và các khoảng thời gian tương tự. Thời gian không dùng liều có thể là trong vòng một chu kỳ, khi khoảng cách thời gian có thể là khoảng, ví dụ, bảy ngày; 14 ngày; 21 ngày; 28 ngày; 35 ngày; 42 ngày; 49 ngày; 56 ngày; 63 ngày; 70 ngày; và các khoảng thời gian tương tự. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là cộng hoặc trừ một ngày, cộng hoặc trừ hai ngày, cộng hoặc trừ ba ngày, cộng hoặc trừ

bốn ngày, cộng hoặc trừ năm ngày, cộng hoặc trừ sáu ngày, hoặc cộng hoặc trừ bảy ngày.

Phương pháp dùng đồng thời với tác nhân điều trị bệnh khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Hardman, *et al.* (eds.) (2001) Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).

Như đã nêu, tốt hơn nếu các chế phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng dược phẩm để phân phối ngoài đường tiêu hóa hoặc trong ruột. Dược phẩm thông thường để dùng cho động vật chứa chất dẫn dược dụng như dung dịch nước, các tá dược không độc kể cả các muối, các chất bảo quản, các dung dịch đệm và các chất tương tự. Ví dụ, xem tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., Easton ed., Mack Publishing Co., các trang 1405-1412 và 1461-1487 (1975); *The National Formulary XIV*, 14th Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, DC (1975). Các ví dụ về dung môi không phải là nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật và các este hữu cơ dùng để tiêm như etyloleat. Các chất mang trong nước bao gồm nước, dung dịch cồn/nước, dung dịch nước muối, các chất dẫn để dùng ngoài đường tiêu hóa như natri clorua, dextroza Ringer, v.v. Các chất dẫn dùng qua đường tĩnh mạch bao gồm chất lỏng và chất độn dinh dưỡng. Chất bảo quản bao gồm các tác nhân diệt vi khuẩn, các chất chống oxy hóa, các chất chelat hóa và các khí trơ. Độ pH và nồng độ chính xác của các thành phần dược phẩm được điều chỉnh theo cách thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc sử dụng lặp lại vaccin (nhắc lại cùng loại) cụ thể có hiệu quả đã được chứng minh là làm tăng cường đáp ứng thể dịch. Cách này có thể là không hữu hiệu về mặt tăng cường miễn dịch tế bào vì sự miễn dịch trước đó với vật truyền này có xu hướng gây tổn hại đến sự biểu hiện kháng nguyên và việc tạo ra tín hiệu viêm thích hợp. Một cách để giải quyết vấn đề này là dùng liên tục vaccin mà sử dụng các hệ phân phối kháng nguyên khác nhau (nhắc lại khác loại). Trong chế độ nhắc lại khác loại, ít nhất một lần phân phối ban đầu hoặc nhắc lại sẽ phân phối tế bào khối u đã được làm bất

hoạt/được phẩm chứa purin dinucleotit vòng theo sáng chế. Phần khác loại của chế độ này có thể phân phối kháng nguyên bằng cách áp dụng một hoặc nhiều chiến lược sau:

vi khuẩn đã được bất hoạt hoặc suy yếu hoặc virus chứa kháng nguyên quan tâm, mà là các phần tử đã được xử lý bằng điều kiện gây biến tính ở mức độ nào đó để làm cho chúng không hoạt động hoặc không hiệu nghiệm trong việc làm tăng mức độ xâm lấn của tác nhân gây bệnh;

các kháng nguyên đã được tinh chế, mà thường các kháng nguyên được tạo ra trong tự nhiên đã được tinh chế từ dịch nuôi cấy tế bào của tác nhân gây bệnh hoặc mô mẫu chứa tác nhân gây bệnh, hoặc phiên bản tái tổ hợp của chúng;

các vector phân phối virus hoặc vi khuẩn sống đã được xử lý theo cách tái tổ hợp để biểu hiện và/hoặc tiết ra kháng nguyên ở tế bào chủ của đối tượng. Các chiến lược này dựa vào việc làm giảm độc (ví dụ, bằng công nghệ di truyền) các vector virus hoặc vi khuẩn thành không gây bệnh và không độc;

vật truyền của tế bào biểu hiện kháng nguyên (APC), như vector tế bào tua (DC), bao gồm các tế bào đã được nạp lên kháng nguyên, hoặc đã được chuyển nhiễm với chế phẩm chứa axit nucleic ghi mã kháng nguyên (ví dụ, Provenge® (do Dendreon Corporation cung cấp) dùng để điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt di căn kháng lại việc cắt mổ);

các chất dẫn phân phối kháng nguyên ở liposom; và

vector ADN trần và các vật truyền ARN trần mà có thể được dùng bằng súng bắn gen, xung điện, bóng vi khuẩn, các vi cầu, vi hạt, liposom, phần tử polycation có kích thước nano, và các yếu tố tương tự.

Vaccine ban đầu và vaccine nhắc lại có thể được dùng qua đường dùng bất kỳ hoặc kết hợp các đường dùng sau. Theo một khía cạnh, vaccine ban đầu và vaccine nhắc lại được dùng qua cùng đường dùng. Theo khía cạnh khác, vaccine ban đầu và vaccine nhắc lại được dùng qua các đường dùng khác nhau. Thuật ngữ “đường dùng khác nhau” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí khác nhau trên cơ thể, ví dụ, vị trí trong miệng, không phải bao gồm miệng, trong ruột, ngoài đường tiêu hóa, trực tràng, trong u cục (hạch bạch huyết), bao gồm tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da, trong bắp, trong khối u, xung quanh khối u, đường truyền, màng nhầy, trong mũi, trong khoang

não tủy hoặc dịch não tủy, và vị trí tương tự, cũng như qua các đường dùng khác nhau, ví dụ, đường miệng, qua đường tĩnh mạch, và trong bắp.

Lượng hiệu quả của vacxin ban đầu và nhắc lại có thể được sử dụng thành một liều, nhưng không giới hạn ở một liều. Do đó, vacxin có thể được dùng hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bảy, mười tám, mười chín, hai mươi, hoặc nhiều liều. Khi vacxin được dùng nhiều hơn một lần, thì các lần dùng có thể cách nhau khoảng thời gian là một phút, hai phút, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, hoặc nhiều phút, cách nhau khoảng một giờ, hai giờ, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 giờ, và tương tự. Trong phạm vi giờ, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là cộng hoặc trừ khoảng thời gian bất kỳ trong thời gian 30 phút. Các lần dùng còn có thể cách nhau một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, bảy ngày, tám ngày, chín ngày, mười ngày, 11 ngày, 12 ngày, 13 ngày, 14 ngày, 15 ngày, 16 ngày, 17 ngày, 18 ngày, 19 ngày, 20 ngày, 21 ngày, và kết hợp chúng. Sáng chế không chỉ giới hạn ở các khoảng cách sử dụng liều cách nhau đều đặn, mà còn bao gồm cả việc dùng cách nhau bởi các khoảng thời gian khác nhau, như lịch trình ban đầu bao gồm việc dùng vào ngày 1, ngày 4, ngày 7, và ngày 25, đây chỉ là một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được làm rõ hơn qua các ví dụ minh họa sáng chế. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Phương pháp tổng quát

Các dung môi khan và các chất phản ứng thích hợp để tổng hợp oligonucleotit pha dung dịch được mua và xử lý trong argon hoặc nitơ khô bằng cách áp dụng kỹ thuật làm khô. Các phản ứng liên hợp và đóng vòng amidit được thực hiện trong axetonitril khan hoặc pyridin trong argon hoặc nitơ khô. Các nguyên liệu ban đầu đối với tất cả các phản ứng trong pyridin khan được sấy khô bằng cách cô (ba lần) từ pyridin. Sắc ký điều chế cực nhanh trên silicagel được thực hiện bằng cách sử dụng Fluka 60A loại độ tinh khiết cao hoặc silic đioxit loại Merck 9385 bằng cách sử dụng gradien metanol trong diclometan. Sắc ký lỏng cao áp phân tích được thực hiện trên hệ sắc ký lỏng cao áp Varian ProStar 210 với thiết bị dò mảng diot quang ProStar 330

kiểm soát ở 254nm bằng cách sử dụng cột Varian Microsorb 10 micron C18 250x4,6mm hoặc Varian 3 micron C18 100x4,6mm và gradien TEAA 10mm và axetonitril. Sắc ký lỏng cao áp điều chế được thực hiện trên hệ sắc ký lỏng cao áp LC20-AP Shimadzu điều chế, có lắp bộ dò SPD-20A UV/Vis kiểm soát ở bước sóng 254nm trên cột Varian Microsorb 60-8 C-18 41,6 x 250mm bằng cách sử dụng gradien của TEAA 10mm và axetonitril với lưu tốc 50ml/phút. Việc chiết pha rắn bằng cách sử dụng C-18 Sep-Pak (Waters) được thực hiện khi nạp 3% (trọng lượng). LC/MS (ESI/APCI) thu được trên dụng cụ Shimadzu 2010EV đơn tứ cực với bộ dò PDA, MS, và ELSD bằng cách áp dụng sắc ký lỏng cao áp phân tích Shimadzu LC20D. Phổ khối FT-ICR phân giải cao do cả M Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory tại Yale University ở New Haven, CT, và QB3/Chemistry Mass Spect Lab tại UC Berkeley cung cấp.

Phổ ^1H , ^{31}P , ^1H - ^1H COSY (phổ tương quan 2D NMR), ^1H - ^{31}P HMBC (phổ tương quan đa liên kết nhân khác loại) là cần thiết đối với d6-DMSO với 10uL D_2O (trì hoãn 16 giờ sau khi bổ sung D_2O) ở 45°C trên quang phổ kế Varian INOVA-500nMR vận hành ở 500 MHz trong thời gian 1 giờ và 202 MHz trong ^{31}P . FID thu được được chuyển sang PC và được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm xử lý NMR hạt của Acorn NMR Inc. Mức độ dịch chuyển hóa học được tham chiếu đến dung môi DMSO, 2,50 phần triệu đối với ^1H . Trên mỗi khuyến cáo IUPAC để tham chiếu đến phổ NMR, mức độ dịch chuyển hóa học ^{31}P được tham chiếu bằng cách sử dụng “thang đồng hóa” đối với tần số ^1H tuyệt đối là 0 phần triệu. Một vài trong số các phổ ^1H và ^{31}P được thu trên quang phổ kế JEOL ECX-400nMR vận hành ở 400MHz đối với ^1H và 162MHz đối với ^{31}P .

Phổ gradien COSY là cần thiết trong kiểm trị số tuyệt đối bằng cách sử dụng 2048 điểm dữ liệu trong chiều trực tiếp và 256 điểm trong chiều gián tiếp. Cả hai chiều được lọc giảm nhiễu bằng cách sử dụng hàm sinebell bình phương. Chiều gián tiếp được đánh số 0 để thu được ma trận cuối cùng có kích thước 2048x2048 điểm và độ phân giải 3,91Hz/điểm dữ liệu theo cả hai chiều.

Nhiệm vụ hóa học vùng trên liên kết phosphodiester: các thử nghiệm ^1H - ^1H COSY kết hợp với ^1H - ^{31}P HMBC (và trong một số trường hợp là loại phân liên hợp phospho) được dùng để thu được bằng chứng trực tiếp rằng hóa học vùng của liên kết

phosphodiester là 2', 5'-3', 5' (xem phần bàn luận trong thử nghiệm đối với hợp chất 9a và hình 3A-G). Các thử nghiệm ^1H - ^{31}P HMBC tương tự xác nhận rằng hóa học vùng không truyền thống (2', 5'-3', 5') trên liên kết phosphodiester của tất cả dinucleotit vòng được tổng hợp sau khi loại nhóm bảo vệ silyl hoặc trao đổi ion cuối cùng.

Nhiệm vụ của các chất đồng phân không đối quang RR và RS (các sản phẩm CDN chính của trình tự tổng hợp) theo phương pháp đã được nêu trong tài liệu chuyên ngành (Zhao *et al. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 289:352-378, 2009).

Tất cả các sản phẩm CDN (hình 2A-2C) đều có độ tinh khiết $\geq 95\%$ như được biểu thị bằng phân tích sắc ký lỏng cao áp pha đảo C18 (dò UV ở 254nm)

Các chữ viết tắt và các chữ rút gọn: Guanin = G. Isobutyryl guanin = G^{ib}. 4,4-đimethoxytrityl =DMT. $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ = CEO. *tert*-butyldimethylsilyl = TBS. adenin = A. benzoyl adenin = A^{Bz}. vòng-[A(2',5')pA(3',5')p] = ML-CDA = hợp chất 19a (muối TEA). dithio-[R_P, R_P]-vòng-[A(2',5')pA(3',5')p] = ML-RR-CDA = hợp chất 19b (muối TEA); hợp chất 21 (muối natri); hợp chất 22 (muối amoni). dithio-[R_P, S_P]-vòng-[A(2',5')pA(3',5')p] = ML-RS-CDA = hợp chất 19c (muối TEA). vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] = ML-CDG = hợp chất 9a (muối TEA). dithio-[R_P, R_P]-vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] = ML-RR-CDG = hợp chất 9b (muối TEA). dithio-[R_P, S_P]-vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] = ML-RS-CDG = hợp chất 9c (muối TEA). vòng[G(2',5')pA(3',5')p] = ML-cGAMP. Dithio-[R_P, R_P]-vòng-[G(2',5')pA(3',5')p] = ML-RR-cGAMP = hợp chất 20 (muối TEA). monothio-vòng-[A(2',5')pA(3',5')Rp] = ML-3',5'-R-CDA = hợp chất 19d (muối TEA). 2'-O-myristoyl- vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] = C14-ML-CDG = hợp chất 10 (muối TEA). ML-cGAMP = 2',3'-cGAMP = vòng-[G(2',5')pA(3',5')p] = hợp chất 23 (muối TEA)

ML-cGAMP (cấu trúc của hợp chất 23 trên Hình 2c) đã được chuẩn bị nhờ enzym thu được từ cGAS trong tế bào và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế.

Ví dụ 2. Thử nghiệm chung đối với loạt ML-CDG (hình 2a): tổng hợp [G(2',5')pG(3',5')p] vòng hợp chất 9a (Không phải là một phần của sáng chế).

1) Ví dụ điều chế hợp chất 3. 0,18ml (10mmol) nước và 1,23g (6mmol) pyridini trifloaxetat được bổ sung vào dung dịch chứa 4,87g (5,0mmol) N²-isobutyryl-5'-O-

(4,4'-đimetoxytrityl)-2'-O-*tert*-butylđimetylsilyl-3'-O-[(2-xyanoetyl)-N,N-điisopropylaminophinyl]guanosin (1) trong 25ml axetonitril. Sau 5 phút khuấy ở nhiệt độ trong phòng, 25ml t-butylamin được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất 2 ở dạng bột mà sau đó được làm bay hơi đồng thời với axetonitril (2x50ml). Dung dịch chứa 0,9ml (50mmol) nước và 60ml axit đicloaxetic 6% (thể tích) trong điclometan (44mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất 2 trong 60ml điclometan. Sau 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tối bằng cách bổ sung pyridin (7,0ml, 87mmol). Hỗn hợp phản ứng này được cô thành dầu mà được làm khô bằng ba lần làm đồng bay hơi bằng 40ml axetonitril khan, lần cuối cùng thu được hợp chất 3 trong thể tích 12ml.

2) Điều chế dung dịch khô chứa hợp chất 4. N²-isobutyryl-5'-O-(4,4'-đimetoxytrityl)-3'-O-*tert*-butylđimetylsilyl-2'-O-[(2-xyanoetyl)-N,N-điisopropylaminophinyl]guanosin (hợp chất 4, 6,33g, 6,5mmol) được hòa tan trong 40ml khan axetonitril và làm khô bằng ba lần làm đồng bay hơi bằng 40ml axetonitril khan, lần cuối cùng thu được 20ml. Mười rây phân tử cỡ 3Å được bổ sung vào và dung dịch này được bảo quản trong khí quyển argon đến khi sử dụng.

3) Kết hợp hợp chất 3 và hợp chất 4 để, sau khi oxy hóa và loại nhóm trityl, tạo ra dime mạch thẳng 2',5' 6a. Hợp chất 4 được sấy khô đồng sôi (6,5mmol) trong 20ml axetonitril được bổ sung qua xi lanh vào hợp chất 3 (5,0mmol). Sau 5 phút khuấy ở nhiệt độ trong phòng, 2,37ml (15mmol) 5,5M t-butylhydroperoxit trong decan được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, phản ứng được làm lạnh đến 0 °C, và dung dịch chứa 1,25g NaHSO₃ trong 2,5ml nước được bổ sung vào, bề nước đá được loại bỏ, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng này được cô thành bột, mà sau đó được hòa tan trong 80ml điclometan. Dung dịch chứa 0,9ml nước và 80ml axit đicloaxetic 6% (thể tích) trong điclometan được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. 50ml pyridin được bổ sung vào để tối axit đicloaxetic. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất 6a thô ở dạng rắn.

4) Đóng vòng hợp chất 6a để tạo ra hợp chất 7a. Hợp chất 6a được hòa tan trong 50ml pyridin khan và 5ml (theo tỷ lệ 1/10 tổng thể tích phản ứng, khoảng 0,5mmol) được chuyển qua xi lanh vào 150ml pyridin khô. Phần này được cô đến thể tích khoảng 100ml. Sau đó, 2-clo-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxit (DMOCP, 0,35 g, 1,8mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. 0,32ml nước được bổ sung ngay lập tức vào, tiếp theo bổ sung 0,16g iot, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch chứa 350ml nước chứa 0,1g NaHSO₃ và khuấy trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. 2g NaHCO₃ được bổ sung từ từ vào và khuấy, sau đó được rót vào phễu chiết và chiết bằng 400ml etyl axetat:dietylete 1:1. Lớp nước lại được chiết bằng 400ml etyl axetat:dietylete 1:1, và các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 0,75g hỗn hợp chứa hợp chất 7a, vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] được bảo vệ hoàn toàn.

5) Loại nhóm bảo vệ đối với hợp chất 7a thô bằng metylamin để tạo ra hợp chất thô 8a. 18 ml metylamin trong etanol khan (33% trọng lượng) được bổ sung vào 750mg hợp chất 7a và hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 90 phút, tại thời điểm đó, phân tích theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được cô để tạo ra dầu mà khi xử lý bằng 10ml hexan/etyl axetat (50:50) thu được chất rắn màu trắng đục. Dung môi nghiền/rửa được gạn và cạn dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để thu được 240mg chất rắn màu trắng đục.

6) Sắc ký lỏng cao áp điều chế hợp chất thô 8a. Phần chứa 120mg hợp chất thô 8a được đưa vào dung dịch chứa 5ml CH₃CN/10mm trong trietylamoni axetat trong nước (20/80). Sau khi lọc bằng PTFE cỡ 0,45 micron, mẫu tiêm được đưa lên cột C-18 Dynamax (40x250mm). Việc rửa giải được thực hiện bằng gradien axetonitril và 10mm trietylamoni axetat trong nước (CH₃CN 20% đến 50% trong thời gian 20 phút với lưu lượng 50ml/phút). Các phân đoạn sắc ký lỏng cao áp thu được từ hai lần chạy sắc ký lỏng cao áp chứa hợp chất 8a tinh khiết được thu gom, làm bay hơi để loại bỏ CH₃CN và làm đông khô để loại bỏ hầu hết nước còn lại và làm bay hơi dung dịch đậm đặc, sau khi làm khô đông sôi bằng axetonitril (3x4ml), thu được 42mg hợp chất

tinh khiết 8a dưới dạng muối bis-triethylamoni. (Cũng có thể hoãn phép tinh chế sắc ký lỏng cao áp điều chế đến sau bước cuối cùng). HRMS (FT-ICR) m/z : $[M-H]^+$ theo tính toán đối với $C_{32}H_{51}N_{10}O_{14}P_2Si_2$ 917,2606; theo thử nghiệm 917,2622. 1H NMR (DMSO- d_6 + vết D_2O) 45°C δ 8,22 (1H, s), 7,85 (1H, s), 5,76-5,79 (2H, dd), 5,21 (1H, m), 4,85 (1H, m), 4,58 (1H, t), 4,49 (1H, d), 4,31 (1H, m), 4,21 (1H, m), 3,97 (1H, d), 3,83 (3H, m), 2,94 (12H, m), 1,12 (18H, t), 0,90 (9H, s), 0,72 (9H, s), 0,14 (6H, d), 0,09 (3H, s), -0,02 (3H, s). ^{31}P NMR (DMSO- d_6 + vết D_2O) 45°C. δ -1,26, -2,02 (hình 3a-3c).

7) Loại bỏ nhóm bảo vệ đối với các nhóm TBS trong hợp chất 8a bằng triethylamin trihydroflorua, trung hòa bằng TEAB, và chiết pha rắn bằng C-18 Sep-Pak để thu được hợp chất tinh khiết 9a dưới dạng muối bis-triethylamoni. 1,0ml triethylamin trihydroflorua được bổ sung vào 40mg hợp chất 8a. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 giờ. Sau khi xác nhận phản ứng hoàn thành theo phương pháp sắc ký phân tích lỏng cao áp, mẫu được trung hòa bằng cách bổ sung nhỏ giọt vào 12ml dung dịch triethylamoni bicacbonat 1M ướp lạnh. Dung dịch trung hòa được loại muối trên Waters C-18 Sep-Pak và sản phẩm này được rửa giải bằng dung dịch chứa CH_3CN /10mM triethylamoni axetat trong nước (theo tỷ lệ 1:1). CH_3CN được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và dung dịch nước còn sót lại được làm đông lạnh và làm đông khô qua đêm. Làm bay hơi nhiều lần bằng metanol (3x3ml) và lần làm bay hơi cuối cùng từ 50% axetonitril trong metanol (1x3ml) thu được 29,3mg vòng-[G(2',5')pG(3',5')p] (hợp chất 9a) dưới dạng muối bis-triethylamoni. HRMS (FT-ICR) m/z : $[M-H]^+$ theo tính toán đối với $C_{20}H_{23}N_{10}O_{14}P_2$ 689,0876; theo thử nghiệm 689,0874. 1H NMR (DMSO- d_6 + vết D_2O) 45°C δ 7,92 (1H, s), 7,90 (1H, s), 5,82 (1H, d), 5,80 (1H, d), 4,97 (1H, m), 4,85 (1H, m), 4,68 (1H, m), 4,31 (1H, d), 4,21 (1H, t), 4,10 (2H, m), 3,79 (3H, m), 2,91 (14H, m), 1,13 (22H, t). ^{31}P NMR (DMSO- d_6) 45°C. δ 1,80, -1,05.

Thời gian lưu sắc ký lỏng cao áp của hợp chất 9a là 7,25 phút so với 9,3 phút đối với c-di-GMP bằng cách sử dụng gradien 2% đến 20% CH_3CN trong 10mM triethylamoni axetat trong thời gian 20 phút trên cột C-18 (3 micron, 100x4,6mm, 0,6ml/phút) HRMS (FT-ICR) xác nhận công thức nguyên tố mong muốn: $[M-H]^+$ theo tính toán đối với $C_{20}H_{23}N_{10}O_{14}P_2$ 689,0876; theo thử nghiệm 689,0874. ^{31}P NMR của

hợp chất **9a** thể hiện hai pic (liên hợp 1:1) ở 2,03 và -0,95 phần triệu phù hợp với liên kết hỗn hợp 2',5'/3',5' (cả c[G(3',5')pG(3',5')p] và c[G(2',5')pG(2',5')p], ví dụ, sẽ chỉ thu được một tín hiệu ^{31}P NMR do tính đối xứng). Bằng chứng trực tiếp đối với hóa học vùng của liên kết phosphodiester thu được nhờ 1H-1H COSY kết hợp với thử nghiệm loại bỏ liên kết với phospho, và nhờ NMR hai chiều ^1H - ^{31}P HMBC (hình 3b và 3c). Các proton anome (H-1) xuất hiện ở dạng vạch đôi xen phủ của vạch đôi (hoặc vạch ba) ở 5,82 phần triệu. Ký hiệu "A" được đặt cho proton (H-1) anome trong trường dưới và "B" được đặt cho proton anome trong trường trên của nó. Bắt đầu với proton anome trong cả thử nghiệm 1H-1H COSY "A" và "B" ribosa (hình 3b) cho phép ký hiệu H-2A (4,96 phần triệu), H-3A (4,31 phần triệu), cũng như H-2B (4,67 phần triệu) và H-3B (4,84 phần triệu). Chiếu xạ phospho trường dưới (2,03 phần triệu) sẽ chuyển hóa H-3B đa vạch với vạch đôi, trong khi chiếu xạ phospho trường trên (-0,95 phần triệu) dẫn đến sự đơn giản hóa của phức đa vạch H-2A. Trong cả hai thử nghiệm loại bỏ liên kết 5' ribosa metylen, đa vạch đều quan sát được. ^1H - ^{31}P HMBC hai chiều xác nhận kết quả của thử nghiệm loại bỏ liên kết. 1H-1H COSY dẫn đến các thử nghiệm loại bỏ liên kết kết hợp với phospho và ^1H - ^{31}P HMBC đã cung cấp căn cứ trực tiếp cho việc hóa học vùng của liên kết phosphodiester là 2',5'/3',5' và hợp chất **9a** là [G(2',5')pG(3',5')p] vòng.

Ví dụ 3. Thử nghiệm chung đối với một loạt ML-CDA (hình 2b): tổng hợp muối Na [A(2',5')pA(3',5')p] vòng hợp chất 21 (xem hợp chất trên hình 2c).

1) Điều chế hợp chất 13.

0,18ml (10mmol) nước và 1,20g (6,2mmol) pyridini trifloaxetat được bổ sung vào dung dịch chứa 5g (5,15mmol) N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-đimethoxytrityl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-[(2-xyanoetyl)-N,N-diisopropylaminophenyl]adenosin (**11**) trong 25ml axetonitril. Sau 5 phút khuấy ở nhiệt độ trong phòng, 25ml *tert*-butylamin được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất **12** ở dạng bột mà sau đó được làm bay hơi đồng thời với axetonitril (2x50ml), sau đó được hòa tan trong 60ml diclometan. Dung dịch chứa nước (0,9ml, 50mmol) và 60ml axit đicloaxetic 6% (thể tích) (44mmol) trong diclometan được bổ sung vào dung dịch này. Sau 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách

bổ sung pyridin (7,0ml, 87mmol), và cô thành dầu mà được làm khô bằng ba lần đồng bay hơi bằng 40ml khan axetonitril, lần cuối cùng thu được hợp chất 13 với thể tích 12ml.

2) Điều chế dung dịch khô chứa hợp chất 14.

N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-đimetoxytrityl)-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-O-[(2-xyano-etyl)-N,N-điisopropylaminophenyl]adenosin (14, 6,4g, 6,6mmol) được hòa tan trong 40ml axetonitril khan và làm khô bằng ba lần đồng bay hơi bằng 40ml axetonitril khan, lần cuối cùng thu được 20ml. Mười rây phân tử cỡ 3Å được bổ sung vào và dung dịch này được bảo quản trong khí quyển argon đến khi sử dụng.

3) Điều chế hợp chất 2',5'-monothio-dime mạch thẳng 16.

Hợp chất 14 (6,4g, 6,6mmol) đã được làm khô đồng sôi trong 20ml axetonitril được bổ sung qua xi lanh vào dung dịch chứa hợp chất 13 (5,15mmol) trong 12ml axetonitril khan. Sau 5 phút khuấy ở nhiệt độ trong phòng, 1,14g (5,6mmol) 3-((N,N-đimetylaminometylidene)amino)-3H-1,2,4-đithiazol-5-thion (DDTT) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được cô và dầu còn lại được hòa tan trong 80ml điclorometan. Nước (0,9ml, 50mmol) và 80ml 6% (thể tích) axit đicloaxetic (58mmol) trong điclorometan được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. 50ml pyridin được bổ sung vào để tủa axit đicloaxetic. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất thô 16b ở dạng rắn.

4) Đóng vòng và lưu huỳnh hóa hợp chất 16b để tạo ra chất đồng phân không đối quang vòng-đithio được bảo vệ 17b và 17c.

Hợp chất 16b được hòa tan trong 150ml pyridin khô mà được cô đến thể tích khoảng 100ml. Sau đó, 2-clo-5,5-đimetyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxit (DMOCP, 3,44g, 18mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. 3,2ml nước được bổ sung ngay lập tức vào tiếp theo bổ sung 3-H-1,2-benzodithiol-3-on (1,3g, 7,7mmol) vào, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được rót vào 700ml nước chứa 20g NaHCO₃ và khuấy trong thời gian 5 phút ở

nhiệt độ trong phòng, sau đó được rót vào phễu chiết và chiết bằng 800ml etyl axetat:dietyl ete theo tỷ lệ 1:1. Lớp nước lại được chiết bằng 600ml etyl axetat:dietyl ete theo tỷ lệ 1:1. Các lớp hữu cơ được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra khoảng 11g dầu chứa hợp chất đồng phân không đối quang 17b và 17c.

5) Sắc ký cột silicagel hỗn hợp thô chứa hợp chất 17b và 17c.

Hỗn hợp hợp chất thô nêu trên được hòa tan trong điclorometan và đưa lên cột 250g silic đioxit. Hợp chất đồng phân không đối quang mong muốn được rửa giải ra khỏi cột bằng cách sử dụng gradien metanol trong điclorometan (0% đến 10%). Các phân đoạn chứa hợp chất đồng phân mong muốn không đối quang 17b và 17c được kết hợp và cô, thu được 2,26g gồm khoảng 50% hợp chất 17b và 50% hợp chất 17c.

6) Loại nhóm bảo vệ đối với hợp chất đồng phân không đối quang 17b và 17c được bảo vệ đầy đủ vòng thành hợp chất thô 18b và 18c.

2,26g hợp chất thô 17b và 17c thu được từ cột silicagel được chuyển sang ống thủy tinh chịu được áp suất. Dung dịch chứa 60ml metanol và 60ml dung dịch nước amoniac đậm đặc được bổ sung vào và ống nghiệm này được làm tăng nhiệt độ và khuấy trong bể dầu ở 50°C trong thời gian 16 giờ (các lần chạy gần đây là 12 giờ tính từ khi nguyên liệu ban đầu được tiêu thụ tại thời điểm này). Hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến gần nhiệt độ môi trường, được sục dòng nitơ khí trong thời gian 30 phút, và sau đó được chuyển sang bình đáy tròn lớn. Hầu hết các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm một cách cẩn thận để tránh tạo bọt và bắn lên. Nếu nước vẫn còn, cần được làm đông lạnh và làm đông khô đến khô.

7) Sắc ký lỏng cao áp điều chế tinh chế hợp chất thô 18b và 18c để thu được hợp chất 18b tinh khiết.

Hỗn hợp chứa hợp chất thô 18b và 18c được làm đông khô được đưa vào khoảng 50ml dung dịch chứa CH₃CN/10mm trietylamoni axetat trong nước (60/40). Sau khi lọc qua PTFE0 có giếng cỡ 45 micron, phần mẫu 4ml đến 5ml được đưa lên cột C-18 Dynamax (40x250mm). Việc rửa giải được thực hiện bằng gradien axetonitril và 10mM trietylamoni axetat trong nước (30% đến 50% CH₃CN trong thời gian 20 phút với lưu lượng 50ml/phút). Các phân đoạn thu được từ các lần chạy sắc ký lỏng cao áp điều chế chứa hợp chất tinh khiết 18b được thu gom, làm bay hơi để loại bỏ CH₃CN và

làm đông khô để thu được 360mg hợp chất tinh khiết 18b (chất đồng phân không đối quang R_pR_p -) dưới dạng muối bis-triethylamoni.

8) Loại bỏ nhóm bảo vệ đối với hai nhóm TBS chứa trong hợp chất 18b bằng triethylamin trihydroflorua, trung hòa bằng TEAB, chiết pha rắn bằng C-18 Sep-Pak và làm đông khô nhanh để thu được hợp chất tinh khiết 19b dưới dạng muối bis-triethylamoni.

8a) 5,0ml triethylamin trihydroflorua nguyên chất được bổ sung vào 270mg (0,24mmol) hợp chất 18b. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 40 giờ. Sau khi xác nhận phản ứng hoàn thành theo phương pháp sắc ký phân tích lỏng cao áp, mẫu được trung hòa bằng cách bổ sung nhỏ giọt vào 45ml dung dịch triethylamoni bicacbonat 1M lạnh, được khuấy. Dung dịch trung hòa được loại muối trên Waters C-18 Sep-Pak và sản phẩm này được rửa giải bằng dung dịch chứa $\text{CH}_3\text{CN}/10\text{mM}$ triethylamoni axetat trong nước (theo tỷ lệ 5:1). CH_3CN được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và dung dịch nước còn sót lại được làm đông lạnh và làm đông khô. Nhiều lần làm đông khô nhanh từ nước thu được 122mg (57%) dithio- (R_p,R_p) -[vòng-A(2',5')pA(3',5')p] (hợp chất 19b) dưới dạng muối bis-triethylamoni.

8b) 90mg (0,08mmol) hợp chất 18b được làm đông bay hơi ba lần bằng 10ml axetonitril khô. Cặn khô được đưa vào 0,4ml pyridin khan. Bình có giềng thông hình kim được đặt trong bể dầu ở 50°C , và 0,62ml triethylamin trihydroflorua và 1,0ml triethylamin được bổ sung đồng thời vào hỗn hợp đang được khuấy này. Hỗn hợp này được khuấy ở 50°C trong thời gian hai giờ. Sau khi xác nhận phản ứng hoàn thành theo phương pháp sắc ký phân tích lỏng cao áp, mẫu được trung hòa bằng cách bổ sung nhỏ giọt vào 25ml dung dịch triethylamoni bicacbonat 1M lạnh, khuấy. Dung dịch trung hòa được loại muối trên Waters C-18 Sep-Pak và sản phẩm này được rửa giải bằng dung dịch chứa $\text{CH}_3\text{CN}/10\text{mM}$ triethylamoni axetat trong nước (theo tỷ lệ 1:4). CH_3CN được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và dung dịch nước còn sót lại được làm đông lạnh và làm đông khô. Nhiều lần làm đông khô nhanh từ nước thu được 54mg (76%) dithio- (R_p,R_p) -[vòng-A(2',5')pA(3',5')p] (hợp chất 19b) dưới dạng muối bis-triethylamoni.

8c) biến thể của việc loại nhóm bảo vệ TEA-HF bằng cách làm nóng trong TEA-HF nguyên chất ở 45°C, tiếp theo là làm trung hòa TEAB, loại muối Sep-Pak và làm đông khô nhanh.

TEA•3HF (1ml, 6,1mmol) được bổ sung vào hợp chất 18b (41mg, 0,04mmol) trong bình có lắp giếng thông hình kim và hỗn hợp này được khuấy ở 45°C. Quy trình phản ứng được kiểm soát bằng LC và khi tiêu thụ hết nguyên liệu ban đầu và các chất tương tự mono-TBS (~2 giờ). Hỗn hợp này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được hút bằng pipet từ từ vào dung dịch chứa TEAB 1M (4,9ml) và TEA (1,6ml) ở 0°C và độ pH bazơ yếu được xác nhận bằng giấy thử độ pH. Dung dịch trung hòa được loại muối trên Waters C-18 Sep-Pak (10g) và sản phẩm được rửa giải bằng dung dịch chứa 15% CH₃CN/10mM triethylamoni axetat trong nước. Làm đông khô nhanh thu được 21mg (64%) hợp chất 19b (bis-triethylamoni muối) dưới dạng chất rắn màu trắng. Phân tích theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp phân tích (dung dịch chứa 2% đến 20% Axetonitril/10nM chất đệm TEAA – 20 phút) thể hiện độ tinh khiết > 95% (hình 3h). ¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 8,58 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,12 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,92 (d, *J* = 7,0, 1H), 5,30 (td, *J* = 8,5, 4,0, 1H), 5,24-5,21 (m, 1H), 5,03 (dd, *J* = 7,5, 4,5, 1H), 4,39 (d, *J* = 4, 1H), 4,23 (dd, *J* = 10,5, 4,0, 1H), 4,18 (s, 1H), 4,14-4,08 (m, 2H), 3,85-3,83 (m, 1H), 3,73 (d, *J* = 12,0, 1H), 3,06 (q, *J* = 7,5, 12H), 1,15 (t, *J* = 7,5, 1H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 58,81, 52,54; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₄O₁₀N₁₀P₂S₂ (M – H)[–] 689,0521, theo thử nghiệm 689,0514.

8d) Có thể xử lý hỗn hợp phản ứng TEA-HF thông qua việc làm kết tủa axeton như đã được bộc lộ trong tài liệu của Gaffney và các đồng tác giả 2010, nhưng các tác giả sáng chế thu được sản phẩm sạch hơn ở một mức độ nhất định bằng cách sử dụng các cải biến đã được bộc lộ trong phần 8a-8c nêu trên.

10) chuyển hóa thành muối natri

Muối ML-RR-CDA bis-TEA (hợp chất 19b) dễ dàng được chuyển hóa thành muối natri được dụng (hợp chất 21) bằng cách trao đổi ion nêu dưới đây.

ML-RR-CDA•2Na⁺ (hợp chất 21). BT AG ® 50W-X2 Resin 100- 200 Mesh, dạng hydro (100mg) được tạo huyền phù với nước đã khử ion được nhồi vào cột Bio-spin ®. Lượng dư nước đã khử ion được tháo kiệt nhờ trọng lực. 3 tầng thể tích dung

dịch NaOH 1M (1ml) được cho qua cột nhờ trọng lực tiếp theo là 5 tầng thể tích nước đã khử ion (2ml). Sau khi xả kiệt lượng dư nước đã khử ion nhờ trọng lực, dung dịch chứa ML-RR-CDA•2TEA (19b, 10mg) trong nước đã khử ion (1ml) được nạp vào cột. Cột này được rửa giải bằng 5 tầng thể tích nước đã khử ion (2ml), các phân đoạn được gom và kiểm tra hoạt tính bằng UV qua đĩa TLC và đèn UV. Các phân đoạn đáng quan tâm được gom, làm đông lạnh, và làm đông khô qua đêm để thu được ML-RR-CDA•2Na⁺ định lượng, ¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-30μL D₂O) δ 8,54 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,167 (s, 1H), 6,09 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,92 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,26 (td, *J* = 8,5, 4,5, 1H), 5,21-5,19 (m, 1H), 5,01 (dd, *J* = 7,5, 4,5, 1H), 4,42 (d, *J* = 4, 1H), 4,23 (dd, *J* = 10,5, 5,0, 1H), 4,17 (s, 1H), 4,15-4,00 (m, 2H), 3,90-3,82 (m, 1H), 3,73-3,70 (m, 1H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-30μl D₂O) δ 58,85, 51,53 (hình 3d-3g); HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₃O₁₀N₁₀P₂S₂ (M – H)[–] 689,0521, theo thử nghiệm 689,0503.

Thu được bằng chứng trực tiếp đối với hóa học vùng của liên kết phosphodiester bằng 1H-1H COSY kết hợp với NMR hai chiều ¹H-³¹P HMBC (hình 3e – 3g) tương tự như loạt thử nghiệm ML-CDG (như mô tả ở trên).

ML-RR-CDG (hợp chất 9b). Hợp chất 9b được tổng hợp tương tự như ML-CDG theo quy trình thử nghiệm loạt ML-CDG (như mô tả ở trên) bằng các cải biến sau (hình 2a): e) DDTT; h) 3-H-1,2-benzodithiol-3-on; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 7,98 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 5,85 (d, *J* = 9,0, 1H), 5,80 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,25-5,23 (m, 1H), 5,12 (dd, *J* = 8,5, 4,5, 1H), 4,73 (dd, *J* = 8,0, 4,5, 1H), 4,42 (d, *J* = 4,0, 1H), 4,22 (t, *J* = 7,5, 1H), 4,14-4,10 (m, 2H), 3,94-3,90 (m, 2H), 3,77-3,73 (m, 1H), 3,05 (q, *J* = 7,0, 12H), 1,160 (t, *J* = 7,0, 1H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 59,09, 50,37; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₃O₁₂N₁₀P₂S₂ (M – H)[–] 721,0419, theo thử nghiệm 721,0410.

ML-RS-CDG (hợp chất 9c). Hợp chất 9c được tổng hợp tương tự như ML-CDG theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDG (đoạn [0011])) với các cải biến sau (hình 2a): e) DDTT; h) 3-H-1,2-benzodithiol-3-on; k) chất đồng phân không đối quang [Rp, Sp] 8c được gom; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

^1H NMR (500MHz, 45°C, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ -15 μl D_2O) δ 8,01 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 5,86 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,79 (d, $J = 8,0$, 1H), 5,29 (dd, $J = 8,5$, 4,0, 1H), 5,20-5,19 (m, 1H), 4,68 (dd, $J = 8,5$, 4,0, 1H), 4,21 đến 4,18 (m, 2H), 4,10 đến 4,05 (m, 3H), 3,71-3,68 (m, 2H), 2,96 (q, $J = 7,0$, 12H), 1,13 (t, $J = 7,0$, 18H); ^{31}P NMR (200MHz, 45°C, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ -15 μl D_2O) δ 59,89, 57,17; HRMS (FT-ICR) m/z theo tính toán đối với $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\text{N}_{10}\text{P}_2\text{S}_2$ ($\text{M} - \text{H}$) $^-$ 721,041904, theo thử nghiệm 721,04143.

C14-ML-CDG (hợp chất 10): hợp chất có công thức 10 (hình 2c) đã được tổng hợp tương tự như ML-CDG theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDG (đoạn [0011]) với các cải biến sau (hình 2a): n) anhydrit myristic, DMF.

3,7ml DMF, 0,3ml pyridin, và 128mg (0,292mmol) anhydrit myristic được bổ sung vào muối bis- triethylamin của hợp chất 9a (0,260g, 0,291mmol). Hỗn hợp phản ứng này được tăng nhiệt độ trong tổng thời gian 5 giờ ở 60°C, làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được tôi bằng 100ul dung dịch MeOH. Vết LC thể hiện 25% chuyển hóa thành sản phẩm mới và phần còn lại của khối lượng xuất hiện trong thời gian lưu là của nguyên liệu ban đầu. Lượng sản phẩm chính được xác nhận dưới dạng sản phẩm C14-axyl hóa bằng LC/MS ở kiểu âm, trong đó m/z ($\text{M}-1$) là 899 (theo tính toán đối với $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_2^-$: 889,3). Sau khi làm bay hơi, cặn được đưa vào 2ml CH_3CN , 3ml dung dịch chứa 0,1M TEAA và lượng MeOH đủ để biến hầu hết nguyên liệu thành dung dịch. Sau khi ly tâm nhanh để loại bỏ lượng nhỏ chất dạng hạt, dung dịch này được tinh chế thay sắc ký lỏng cao áp điều chế C18 bằng cách sử dụng gradien 25% $\rightarrow$ 50% CH_3CN trong TEAA 10mM trong thời gian 20 phút. Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và làm đông khô đến khô để thu được 36mg C14-ML-CDG hợp chất 10 (muối triethylamoni) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (500MHz, 45°C, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ -15 μl D_2O) δ 8,00 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 5,98 (d, $J = 7,5$, 1H), 5,83 (d, $J = 8,5$, 1H), 5,76 (dd, $J = 7,5$, 4,5, 1H), 5,15-5,10 (m, 1H), 4,90-4,85 (m, 1H), 4,36 (d, $J = 4,5$, 1H), 4,30-4,27 (m, 1H), 4,07 (s, 1H), 3,94-3,90 (m, 3H), 3,82-3,78 (m, 1H), 3,04 (q, $J = 7,0$, 12H), 2,37-2,23 (m, 2H), 1,51 đến 1,43 (m, 2H), 1,28-1,14 (m, 38H), 0,85 (t, $J = 7,0$, 3H); ^{31}P NMR (200MHz, 45°C, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ -15 μl D_2O) δ -1,36, -2,12; HRMS (FT-ICR) m/z theo tính toán đối với $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_{15}\text{N}_{10}\text{P}_2$ ($\text{M} - \text{H}$) $^-$ 899,2860, theo thử nghiệm 899,2834.

ML-CDA (hợp chất 19a). Hợp chất có công thức 19a đã được tổng hợp tương tự như ML-RR-CDA theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDA (đoạn [0020]) với các cải biến sau (hình 2b): e) t-BuOOH; h) I₂/H₂O; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 8,44 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 6,08 (d, *J* = 8,0, 1H), 5,90 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,10-5,0 (m, 3H), 4,30 (d, *J* = 4,5, 1H), 4,3-4,19 (m, 1H), 4,14 (d, *J* = 1,5, 1H), 4,05 (q, *J* = 11,5, 2H), 3,78-3,75 (m, 2H), 2,90 (q, *J* = 7,5, 18H), 1,08 (t, *J* = 7,0, 27H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 1,67, -0,47; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₄O₁₂N₁₀P₂ (M – H)[–] 657,097763, theo thử nghiệm 657,09680.

ML-RS-CDA (hợp chất 19c). Hợp chất có công thức 19c đã được tổng hợp tương tự như ML-RR-CDA theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDA (đoạn [0020]) với các cải biến sau (hình 2b): k) chất đồng phân không đối quang [Rp, Sp] 18c được gom; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 8,52 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,10 (d, *J* = 8,5, 1H), 5,90 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,45 (dd, *J* = 8,5, 4,5, 1H), 5,31-5,26 (m, 1H), 5,00 (dd, *J* = 8,5, 4,5, 1H), 4,41-4,36 (m, 1H), 4,22 (d, *J* = 5,0, 1H), 4,14-4,07 (m, 3H), 3,70-3,67 (m, 3H), 2,84 (q, *J* = 7,0, 19H), 1,08 (t, *J* = 7,5, 29H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 59,98, 57,35; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₄O₁₀N₁₀P₂S₂ (M – 2 H+Na)[–] 711,0340, theo thử nghiệm 711,0316.

ML-3'-5'-R-CDA (hợp chất 19e). Hợp chất có công thức 19e đã được tổng hợp tương tự như ML-RR-CDA theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDA (đoạn [0020]) với các cải biến sau (hình 2b): e) t-BuOOH; h) 3-H-1,2-benzodithiol-3-on; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μl D₂O) δ 8,49 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 6,09 (d, *J* = 8,5, 1H), 5,90 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,23 (dd, *J* = 8,0, 5,0, 1H), 5,12-5,04 (m, 2H), 4,31 (d, *J* = 4,5, 1H), 4,21-4,14 (m, 3H), 4,10 (q, *J* = 11,0, 1H), 3,80-3,71 (m, 2H), 2,85 (q, *J* = 7,0, 18H), 1,08 (t, *J* = 7,5, 27H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-15μL D₂O) δ 59,32, -0,37; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₃O₁₁N₁₀P₂S (M – H)[–] 673,0749, theo thử nghiệm 673,0729.

ML-RR-CDA (hợp chất 22) dưới dạng muối amoniac. Hợp chất 22 đã được tổng hợp tương tự như ML-RR-CDA theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDA (đoạn [0020]) với các cải biến sau (hình 2b): n) BT AG ® 50W-X2 Resin 100-200 Mesh, dạng hydro, 1M NH₄OH. ¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-30µl D₂O) δ 8,80 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,39 (s, 2H), 6,45 (d, *J* = 10,0, 1H), 6,34 (s, 1H), 5,50 (td, *J* = 10,5, 4,5, 1H), 5,21-5,15 (m, 1H), 5,02 (d, *J* = 4,0, 1H), 4,92 (d, *J* = 4,5, 1H), 4,61-4,49 (m, 2H), 4,30-4,27 (m, 2H); ¹HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₃O₁₀N₁₀P₂S₂ (M – H)[–] 689,0521, theo thử nghiệm 689,0504.

ML-RR-cGAMP (hợp chất 20). Hợp chất 20 (hình 2c) được tổng hợp tương tự như ML-RR-CDA theo các quy trình của loạt thử nghiệm ML-CDA (đoạn [0020]) với các cải biến sau (hình 2b): d) pyr, 4; n) thu được dưới dạng muối TEA, không cần trao đổi ion.

¹H NMR (500MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-30µl D₂O) δ 8,34 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 5,91 (d, *J* = 7,5, 1H), 5,86 (d, *J* = 8,5, 1H), 5,29-5,23 (m, 1H), 5,17-5,14 (m, 1H), 5,02 (dd, *J* = 7,5, 4,0, 1H), 4,41 (d, *J* = 4,5, 1H), 4,25 (dd, *J* = 5,0, 10,5, 1H), 4,13-4,03 (m, 3H), 3,95-3,85 (m, 1H), 3,78-3,74 (m, 1H), 2,84 (q, *J* = 7,5, 18H), 1,08 (t, *J* = 7,5, 28H); ³¹P NMR (200MHz, 45°C, (CD₃)₂SO-30µl D₂O) δ 58,81, 50,91; HRMS (FT-ICR) *m/z* theo tính toán đối với C₂₀H₂₃O₁₁N₁₀P₂S₂ (M – H)[–] 705,0470, theo thử nghiệm 705,0451.

Ví dụ 4. Các chất dẫn xuất được thế 2' và 3 của riboza

Các ví dụ về chất dẫn xuất có ứng dụng theo sáng chế được thể hiện trên hình 4-6.

Ví dụ 5. Biểu hiện interferon typ I tạo ra CDN

Để xác định mức độ tương đối interferon typ I đã được tạo ra trong các tế bào của người bằng từng phân tử trong số các phân tử nguyên thể và dẫn xuất như là dấu hiệu về hiệu lực của tá dược, 4x10⁵ tế bào THP1-Blue™ ISG (dòng tế bào đơn nhân to của người đã được chuyển nhiễm với gen thông báo phosphataza kiềm của phôi được tiết ra bởi IRF (do Invivogen cung cấp) mà biểu hiện phosphataza kiềm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu bao gồm năm yếu tố đáp ứng kích thích IFN) được ủ với 100µM [G(3',5')pG(3',5')p] (CDG) vòng, [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (liên kết hỗn hợp, hoặc

ML-CDG), hoặc HBSS trong thời gian 30 phút ở 37°C với 5% CO₂. Sau 30 phút, các tế bào được rửa và được cấy lên đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS, và ủ ở 37°C với 5% CO₂. Dịch nổi nuôi cấy tế bào thu được từ từng mẫu được gom sau khi ủ qua đêm, và 20µl dung dịch nổi cấy tế bào được bổ sung vào 180µl dung dịch chứa chất phản ứng QUANTI-Blue (do Invivogen cung cấp) và ủ trong thời gian 45 phút để đánh giá mảnh protein interferon typ I. Mức độ hấp thu ở bước sóng 655nm được đọc 3 phút một lần bằng cách sử dụng quang phổ kế Versa Max kinetic (do Molecular Diagnostics cung cấp).

Như được thể hiện trên hình 7, [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG) tạo ra lượng IFN-β cao hơn đáng kể so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng trong một khoảng thời gian. Các kết quả này thể hiện rằng chế phẩm điều chế tinh khiết của [G(2',5')pG(3',5')p] vòng sẽ hoạt hóa đáp ứng miễn dịch bẩm sinh hơn là [G(3',5')pG(3',5')p] vòng trong dòng tế bào đơn nhân to của người.

Để xác định lượng IFN-α, -β và -γ gây ra bởi [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG) so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng như là một dấu hiệu của hiệu lực hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh, 1x 10⁶ PBMC nguyên bản phân lập được từ bốn người cho độc lập được ủ trong đĩa đáy chữ U có 96 giếng trong thời gian 30 phút ở 37°C, 5% CO₂ với 5µm hoặc 0,5µm [G(3',5')pG(3',5')p] vòng (CDG) hoặc [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG), 1µg/ml ADN kích thích Interferon (ISD), hoặc 4µg/ml Poly (I:C) bằng cách sử dụng tác nhân chuyển nhiễm Effectene (do Qiagen cung cấp) để chuyển các phân tử vào PBMC. ISD (ADN kích thích interferon) là độc lập với TLR (Stetson, D.B. *et al.*, *Immunity* 24, 93–103, January 2006) và truyền tín hiệu thông qua cGAS, và do đó phụ thuộc vào STING, trong khi Poly (I:C) có thể truyền tín hiệu thông qua cả hai quá trình TLR3 và RIG-I, và do đó độc lập với STING. Sau 30 phút, các tế bào này được rửa và thay thế bằng môi trường RPMI chứa 10% FBS và ủ ở 37°C, 5%CO₂. Sau khi ủ 6 giờ, một phần các tế bào được thu gom và đánh giá theo định lượng RT-PCR thời gian thực về sự biểu hiện gen của các xytokin interferon alpha typ I 2 (IFNA2) và interferon beta 1 (IFNB1), và interferon gama gen xytokin typ II (IFNG). Mức độ biểu hiện gen được xác định bằng phép định lượng RT-PCR thời gian thực bằng cách sử dụng hệ tinh chế ARN PrimePCR và phân tích ADN hỗ trợ, và chạy trên thiết bị quay vòng gen CFX96 (tất cả đều là của BioRad). Mức biểu hiện chuẩn được

xác định đối với mỗi gen, mà là nguyên nhân của sự khác biệt về hiệu quả khi khuếch đại PCR đối với đích ($E_{\text{đích}}$) và tham chiếu ($E_{\text{tham chiếu}}$), và chuyển đơn vị số liệu thô trên thang logarith Cycle Threshold (CT) thành đơn vị tuyến tính của mức độ biểu hiện chuẩn hóa. Gen tham chiếu được sử dụng là GUSB và PGK1, xác nhận gen để có hệ số tương quan (CV) thấp hơn 0,5 và trị số M thấp hơn 1, và do đó không thay đổi trong các điều kiện xử lý khác nhau. Để tiếp cận mức độ protein tiết của các xytokin này, dịch nổi được thu gom từ các tế bào còn lại sau 24 giờ ủ và lượng IFN- α và - γ được xác định bằng máy đếm tế bào mảng bi (cytometric bead array - CBA, do BD Biosciences cung cấp), trong khi lượng IFN- β được xác định theo phương pháp ELISA (PBL).

Như được thể hiện trên hình 8, mức độ biểu hiện gen của interferon alpha 2 (IFNA2) cao hơn đáng kể đối với [G(2',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m trong cả bốn người cho. Tương tự, mức độ biểu hiện gen của interferon beta 1 (IFNB1) cao hơn đáng kể đối với [G(2',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m trong cả bốn người cho. Mức độ biểu hiện gen interferon gama (IFNG) được tạo ra ở mức độ cao hơn đáng kể đối với [G(2',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng trong cả bốn người cho. Các dữ liệu này cho thấy hiệu lực tăng cường của [G(2',5')pG(3',5')p] vòng so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng để gây biểu hiện gen của các xytokin miễn dịch bẩm sinh cơ bản trong nhiều loại người cho.

Như được thể hiện trên hình 9(a), lượng IFN- α tiết ra trong PBMC người nguyên thể bằng [G(2',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m là cao hơn so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng ở cùng liều lượng hoặc liều lượng thấp hơn trong cả bốn người cho. Trên hình 9(b), lượng IFN- β , như đánh giá được theo ELISA, đối với [G(2',5')pG(3',5')p] vòng ở 5 μ m cũng cao hơn so với lượng được tạo ra bởi [G(3',5')pG(3',5')p] vòng, cũng như đối với mẫu đối chứng ISD và Poly I:C trong cả bốn người cho. Hình 9(c) thể hiện phát hiện tương tự đối với IFN- γ tiết ra, như đánh giá được theo CBA. Ở cả 5 μ m và 0,5 μ m, [G(2',5')pG(3',5')p] vòng tạo ra lượng IFN- γ lớn hơn [G(3',5')pG(3',5')p] vòng ở cùng liều, và lượng này còn lớn hơn trong các mẫu đối chứng ISD và Poly I:C trong cả bốn người cho. Các dữ liệu này thể hiện hiệu lực gia tăng của [G(2',5')pG(3',5')p] vòng so với [G(3',5')pG(3',5')p] vòng để kích thích việc sản sinh

IFN typ I và II, yếu tố quan trọng để gây ra sự miễn dịch bẩm sinh ở nhiều người cho mẫu.

Để xác định lượng tương đối của IFN- β đã được tạo ra trong các tế bào của người bằng mỗi phân tử trong các phân tử nguyên thể hoặc dẫn xuất như là dấu hiệu của hiệu lực tá được, 4×10^5 tế bào THP1-Blue, dòng tế bào đơn nhân to của người đã được chuyển nhiễm với gen thông báo phosphataza kiềm của phôi tiết ra được tạo ra bởi IRF (do Invivogen cung cấp), ủ với $50 \mu\text{M}$ [G(3',5')pG(3',5')p] vòng (CDG), [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (liên kết hỗn hợp, hoặc ML-CDG), [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDG), so với [A(3',5')pA(3',5')p] (CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (liên kết hỗn hợp, hoặc ML-CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA), hoặc đối chứng là môi trường trong thời gian 30 phút ở 37°C với CO_2 5%. Sau 30 phút, các tế bào này được rửa và được cấy lên đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS, và ủ ở 37°C với 5% CO_2 . Dịch nổi nuôi cấy tế bào thu được từ từng mẫu được gom sau khi ủ qua đêm, và $20 \mu\text{l}$ dịch nổi nuôi cấy tế bào được bổ sung vào $180 \mu\text{l}$ dung dịch chứa chất phản ứng QUANTI-Blue (Invivogen) và ủ trong thời gian 45 phút. Mức độ hấp thu ở bước sóng 655nm được đọc 15 phút một lần bằng cách sử dụng quang phổ kế SpectraMax (Molecular Diagnostics).

Như được thể hiện trên hình 10, dẫn xuất [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp,Rp (ML RR-CDG) tạo ra lượng IFN- β lớn hơn đáng kể so với vòng c-đi-GMP (CDG không được cải biến) hoặc các phân tử CDG được cải biến. Tương tự, phân tử [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) tạo ra IFN- β với lượng lớn hơn đáng kể so với CDA không được cải biến hoặc các phân tử ML CDA. Các kết quả này thể hiện rằng các chế phẩm điều chế tinh khiết chứa các chất dẫn xuất ML RR-CDN hoạt hóa đáp ứng miễn dịch bẩm sinh hơn là các phân tử CDN ban đầu ở dòng tế bào đơn nhân to của người.

Nhằm xác định khả năng tương đối của các phân tử dẫn xuất để hoạt hóa các đáp ứng miễn dịch, các hợp chất CDN được cho các con chuột nhắt cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi dùng (với tổng thể tích $100 \mu\text{l}$ trong HBSS) ở các liều lượng $50 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ và $0,5 \mu\text{m}$ bằng cách dùng dưới da vào phần thân của đuôi. Các con chuột nhắt được đánh giá sau 24 giờ về khả năng hoạt hóa miễn dịch tế bào lympho bằng cách phân loại tế bào được

hoạt hóa huỳnh quang (FACS) theo điều biến tăng biểu hiện CD69 bề mặt trên các tế bào diệt tự nhiên (NK), tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, so với đối chứng kiểu tương đương IgG1.

Như được thể hiện trên các hình 11(a-c), phân tử [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDG) gây kích hoạt miễn dịch NK và các tế bào T theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Phân tử [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) cũng gây hoạt hóa NK và tế bào T, mặc dù với mức độ kém hơn so với phân tử ML RR-CDG. Cả phân tử ML RR-CDN đều gây hoạt hóa tế bào miễn dịch tốt hơn so với các phân tử ML CDN ở cùng một liều lượng. Các dữ liệu này minh họa đặc tính kích hoạt miễn dịch các phân tử của ML RR-CDN so với các phân tử ML CDN, và cụ thể là làm tăng khả năng gây hoạt hóa tế bào miễn dịch tiềm năng của phân tử ML RR-CDG.

Ví dụ 6. Mức độ kháng tăng cường của Rp,Rp dithio CDN đối với các phosphodiesteraza

Lượng interferon typ I đã được tạo ra trong các tế bào của người được đo để đánh giá hiệu lực các chất dẫn xuất Rp monothio và Rp, Rp dithio, oxo không được xử lý và được xử lý bằng phosphodiesteraza. Năm hợp chất ([A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML-CDA), Rp monothio ([A(2',5')pA(3',5')p] vòng monothio Rp (ML R-CDA), Rp, Rp dithio ([A(3',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (RR-CDA), và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) được xử lý bằng 160 µg phosphodiesteraza nọc độc rắn (SVPD) thu được từ *Crotalus adamanteus* (do Sigma cung cấp), 2,5mU nucleaza P1 (NP1) thu được từ *Penicillium citrinum* (do Sigma cung cấp) hoặc được xử lý theo cách bất chức. 7µg mỗi hợp chất được pha loãng trong dung dịch đậm SVPD (1X PBS và 0,6mM MgCl₂), dung dịch đậm NP1 (30mM Na Axetat, độ pH=5,3, 2mM ZnCl₂) hoặc không được xử lý và sau đó được ủ trong thời gian 2 giờ ở 37°C, tiếp theo đun sôi trong thời gian 10 phút để làm bất hoạt nucleaza. 4x10⁵ tế bào THP1-Blue™ ISG (dòng tế bào đơn nhân to của người đã được chuyển nhiễm với gen thông báo phosphataza kiềm của phôi tiết ra bởi IRF (do Invivogen cung cấp) mà biểu hiện phosphataza kiềm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu bao gồm năm yếu tố đáp ứng kích thích IFN) được ủ với 50µM phân tử được xử lý theo cách bất chức, được xử lý bằng SVPD hoặc được xử lý bằng NP1. Sau 30

phút, các tế bào này được rửa và được đưa lên đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS, và ủ ở 37°C với 5% CO₂. Dịch nổi nuôi cấy tế bào thu được từ từng mẫu được gom sau 16 giờ ủ, và 20µl dịch nuôi cấy tế bào dịch nổi được bổ sung vào 180µl dung dịch chứa chất phản ứng QUANTI-Blue (do Invivogen cung cấp) và ủ trong thời gian 25 phút để đánh giá lượng protein interferon typ I. Đọc ở bước sóng hấp thụ 655nm bằng quang phổ kế Versa Max (do Molecular Diagnostics cung cấp).

Như được thể hiện trên hình 12, các hợp chất Rp, Rp đithio không được xử lý, [A(3',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (RR-CDA) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) là chất tiềm năng tạo ra interferon typ I so với oxo ([A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML-CDA) và các phân tử dẫn xuất Rp monothio. ([A(2',5')pA(3',5')p] vòng monothio Rp (ML R-CDA) CDN. Các tác giả sáng chế đã đánh giá hoạt tính của các chất dẫn xuất CDN sau khi xử lý bằng phosphodiesteraza SVPD, mà phân cắt cả liên kết 2'-5' và 3'-5' phosphodiester, hoặc bằng NP1, mà phân cắt một cách chọn lọc liên kết 3'-5' phosphodiester (*Pino, et al, (2008) Journal of Biological Chemistry, 283, 36494-36503*). hình 12 cho thấy rằng các hợp chất Rp, Rp đithio, [A(3',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (RR-CDA) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) vẫn giữ được hiệu lực của nó sau khi xử lý bằng SVPD và NP1, trong khi oxo ([A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML-CDA) mất hoạt tính sau khi phân cắt bằng cả SVPD và NP1. Dẫn xuất Rp monothio ([A(2',5')pA(3',5')p] vòng monothio Rp (ML R-CDA) chứa phân tử thể thio đơn lẻ trên liên kết 3'-5 phosphodiester vẫn giữ được hoạt tính sau khi phân cắt bằng NP1, nhưng dễ bị xử lý bằng SVPD, mà phân cắt liên kết 2'-5' phosphodiester. Độ nhạy cảm khác biệt của các chất dẫn xuất oxo, Rp monothio và Rp, Rp đithio đối với việc phân cắt bằng SVPD hoặc NP1 xác nhận cấu trúc của các chất dẫn xuất Rp monothio và Rp, Rp đithio. Các kết quả này còn thể hiện ứng dụng các chất dẫn xuất Rp, Rp đithio do sức kháng của chúng đối với sự phân cắt bằng các phosphodiesteraza có mặt trong huyết thanh và/hoặc trong các tế bào chủ, do đó gây hoạt hóa sự truyền tín hiệu miễn dịch bẩm sinh một cách hữu hiệu hơn, và làm tăng hiệu quả điều trị chống khối u *in vivo*, như được thể hiện ở đây.

Ví dụ 7. Các phân tử dẫn xuất CDN tổng hợp hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu của tất cả các alen STING của người

Để xác định tính đáp ứng của năm biến thể STING của người tự nhiên đã biết (được ký hiệu là WT, REF, HAQ, AQ và Q) cho các phân tử nguyên thể và dẫn xuất, các dòng tế bào 293T nhóm thận của phôi người (HEK) mà biểu hiện các alen STING của người được tạo ra. Dòng tế bào 293T HEK ban đầu không biểu hiện STING nội sinh, sao cho đáp ứng của alen STING biểu hiện ngoại sinh có thể được đánh giá. Các plasmit MSCV2.2 ghi mã hSTING(REF)-GFP, hSTING(WT)-GFP, hSTING(HAQ)-GFP, hSTING(Q)-GFP và mSTING(WT)-GFP do Vance Laboratory tại UC Berkeley cung cấp. HSTING(AQ)-GFP thu được từ hSTING(Q)-GFP bằng cách sử dụng kit đột biến gen định hướng điểm QuickChange (Stratagene). Trình tự của alen hSTING(REF) còn được gọi là alen Barber (*Ishikawa, H., và Barber, G.N. (2008). Nature 455, 674–678*), và có trình tự tham chiếu NCBI NP_938023.1. Sự khác biệt axit amin giữa hSTING(REF) và các alen STING WT, HAQ, AQ và Q của người được thể hiện trên hình 13, mà được phỏng theo Yi và các đồng tác giả, *Plos One 8: e77846 (2013)*. Các dòng tế bào được lấy từ HEK 293T thích hợp biểu hiện mỗi alen STING cá thể của người được tạo ra bằng cách phân loại FACS các tế bào GFP dương tính bằng cách sử dụng thiết bị phân loại tế bào Mo Flo của Cancer Research Laboratory Flow Cytometry Facility tại UC Berkeley. 1×10^4 tế bào HEK293T STING được gieo mầm trong đĩa có 96 lỗ và một cách nhất thời được chuyển nhiễm (bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000) bằng 50 ng plasmit thông báo IFN- β của người (pLuc-IFN- β) biểu hiện đoạn khởi đầu IFN- β của người trước gen thông báo luxiferaza và 10 ng TK-renilla để chuẩn tắc. 24 giờ sau, các tế bào này được kích thích bằng các phân tử CDN nguyên thể và dẫn xuất tổng hợp bằng cách sử dụng phép thẩm thấu digitonin để đảm bảo sự hấp thu đồng nhất. Mỗi dòng tế bào STING được kích thích bằng 10 μ M [G(3',5')pA(3',5')p] vòng (cGAMP), [G(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML-cGAMP), [G(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-cGAMP), [A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA), [A(3',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (RR-CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML-CDA), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA), [G(3',5')pG(3',5')p] vòng (CDG), [G(3',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (RR-CDG), [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG) hoặc [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDG) trong 25 μ l dung dịch đệm

digitonin (50mM HEPES, 100mM KCL, 3mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 85mM Sucroza, 0,2% BSA, 1mM ATP, 0,1mM GTP, 10ug/ml digitonin). Sau 20 phút, các hỗn hợp kích thích được loại bỏ và 200ul môi trường RPMI tiêu chuẩn được bổ sung vào. Sau khi kích thích trong thời gian 6 giờ, dịch phân giải tế bào được chuẩn bị và hoạt tính gen thông báo được đo bằng cách sử dụng Hệ thử nghiệm Luxiferaza kép (Promega) trên máy đo mức độ phát quang Spectramax M3.

Hình 14 thể hiện sự kích thích của các dòng tế bào HEK293 ghi mã các alen biến dị STING của người bằng cách đo số lần tăng lượng gen thông báo IFN β -LUC đã được tạo ra (vẽ sơ đồ RLU theo trục y). Như được thể hiện trên hình 14, các hợp chất liên kết hỗn hợp Rp, Rp đithio, [G(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-cGAMP), [G(2',5')pG(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDG) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) đã tạo ra các hoạt tính gen thông báo IFN β nhờ các alen STING của người. Alen STING dai dẳng của người, hSTING (REF) và hSTING (Q), đáp ứng kém với sự kích thích do các phân tử nguyên thể có liên kết cầu phosphat giữa các nucleotit truyền thống: [G(3',5')pA(3',5')p] vòng (cGAMP), [A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA); và, [G(3',5')pG(3',5')p] vòng (CDG). Ngược lại, các dòng tế bào biểu hiện alen STING dai dẳng của người đáp ứng với sự kích thích do [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) tổng hợp: ML RR-CDA; ML RR-CDG; và, ML RR-cGAMP. Các tế bào biểu hiện STING của chuột nhất đáp ứng với tất cả các phân tử được thử nghiệm, thể hiện rằng các phân tử dẫn xuất CDN tổng hợp được cải biến là thích hợp để hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu STING của người. Các kết quả này thể hiện rằng các hợp chất liên kết hỗn hợp Rp, Rp đithio, [G(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-cGAMP), [G(2',5')pG(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDG) và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) hoạt hóa tất cả các alen STING của người được thử nghiệm, cho thấy rằng các phân tử này sẽ gây ra một cách hữu hiệu miễn dịch bẩm sinh ở một quần thể lớn người.

Để thể hiện rằng các phân tử dẫn xuất CDN tổng hợp làm thành thực các tế bào tua của người (DC), các bạch cầu đơn nhân to CD14⁺ thu được từ PBMC người được điều trị trong thời gian 6 ngày bằng 50ng/ml GM-CSF và 25ng/ml IL-4. Bảy ngày sau, DC được lấy từ bạch cầu đơn nhân to được kích thích bằng LPS (1 μ g/ml) hoặc CDN (50 μ M) được

bổ sung một cách trực tiếp vào môi trường này. Sau 48 giờ, mức độ biểu hiện bề mặt của MHC Nhóm I (HLA-ABC), CD80, CD83 và CD86 được xác định bằng cách phong bế FACS trong quần thể DC CD11c⁺. Hình 15A là đồ thị biểu thị mức độ trung bình của cường độ phát quang trung bình (MFI) sau khi kích thích bằng các phân tử CDN được thể hiện trên hình này. Cũng được thể hiện trên hình 15B là sơ đồ đại diện cho sự biểu hiện CD80, CD86, CD83 và MHC Nhóm I (HLA-ABC) ở DC của người. Sơ đồ đặc trưng ứng với tế bào không bị kích thích, đường nét đứt thể hiện sự kích thích LPS, và đường liền nét thể hiện sự kích thích [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA). Các kết quả này thể hiện rằng các phân tử CDN tổng hợp có cấu trúc chứa phân tử thể Rp, Rp dithio của các nguyên tử oxy không tham gia vào cầu phosphat giữa nucleotit kết hợp với cấu trúc cầu phosphat 2'-5, 3'-5' không truyền thống hoặc liên kết hỗn hợp (ML) hoạt hóa sự truyền tín hiệu trong tất cả các alen STING của người, và hoạt hóa sự thành thực DC của người.

Ví dụ 8. Đáp ứng tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên do CDN tạo ra

Để xác định đáp ứng tế bào T CD8 đặc hiệu với OVA đã được tạo ra bởi các phân tử dinucleotit vòng khác nhau, chuột nhắt C57BL/6 (n=5) được gây miễn dịch dưới da bằng 0µg (không CDN) hoặc 5µg hoặc 25µg [G(2',5')pG(3',5')p] (liên kết hỗn hợp hoặc ML-CDG) được bào chế trong 2% squalen-và-nước với 10µg protein lòng trắng trứng. Bảy ngày sau khi chủng ngừa, máu được gom từ mỗi con chuột, và PBMC được chuẩn bị. 5×10⁴ PBMC được kích thích qua đêm trong thử nghiệm ELISpot IFN γ chỉ với một mình môi trường (không kích thích) hoặc với 1µM OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptit với sự có mặt của 1×10⁵ tế bào lá lách không nhiễm bệnh để làm tế bào nuôi. IFN γ ELISpot được hiện hình và định lượng bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa CTL và phần mềm ImmunoSpot.

Như được thể hiện trên hình 16, cả hai liều lượng [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG) đều gây đáp ứng miễn dịch CD8 đặc hiệu với OVA ở chuột nhắt C57BL/6. Các đáp ứng này cao hơn đáng kể so với đáp ứng gây ra bởi đối chứng không được kích thích và bởi nhóm đối chứng không CDN. Các kết quả này thể hiện rằng các chế phẩm chứa [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML-CDG) với kháng nguyên có thể kích thích đáp ứng tế bào T CD8 đặc hiệu với kháng nguyên *in vivo*.

Để xác định xem liệu sự truyền tín hiệu STING là cần thiết để c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) gây ra đáp ứng tế bào T CD8 đặc hiệu với OVA, chuột nhắt C57BL/6 (n=3 hoặc 5) và chuột nhắt goldenticket (n=3) được gây miễn dịch dưới da bằng 0 μ g (không có CDN) hoặc 25 μ g c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) được bào chế trong 2% squalen-và-nước với 10 μ g protein lòng trắng trứng. Bảy ngày sau khi chủng ngừa, máu được gom từ mỗi con chuột, và PBMC được chuẩn bị. 5 $\times 10^4$ PBMC được kích thích qua đêm trong thử nghiệm IFN γ ELISpot chỉ với một mình môi trường (không bị kích thích) hoặc với 1 μ M OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptit với sự có mặt của 1 $\times 10^5$ tế bào lá lách không nhiễm bệnh để làm tế bào nuôi. IFN γ ELISpot được hiện hình và định lượng bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa CTL và phần mềm ImmunoSpot.

Hình 17 cho thấy rằng c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) gây đáp ứng tế bào T CD8 đặc hiệu với OVA mà phụ thuộc vào sự có mặt của phân tử STING chức năng. Trong chuột nhắt hoang C57BL/6 có phân tử STING chức năng, được phẩm chứa c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) và protein lòng trắng trứng gây đáp ứng miễn dịch OVA₂₅₇₋₂₆₄ đáng kể so với đối chứng không bị kích thích và đối chứng không CDN. Ở chuột nhắt goldenticket, mà không biểu hiện phân tử STING chức năng (Sauer, Infection and Immunity 2011), đáp ứng đặc hiệu với OVA gây ra bởi c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) khác biệt không đáng kể so với đáp ứng đặc hiệu với OVA gây ra bởi được phẩm đối chứng mà không chứa CDN (không có CDN). Các kết quả này cho thấy rằng đáp ứng miễn dịch gây ra bởi c[G(2',5')pG(3',5')p] (ML-CDG) cần có phân tử STING chức năng.

Ví dụ 9. Dữ liệu so sánh với các chất dẫn xuất CDN khác

Để đánh giá khả năng của các phân tử dẫn xuất khi thúc đẩy miễn dịch chống u, các tế bào u hắc tố B16 (5 $\times 10^4$ tế bào trong 100 μ l PBS) được cấy dưới da trong phần thắt lưng của các con chuột nhắt cái C57BL/6 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột mỗi nhóm). Việc điều trị bắt đầu khi các loại u đạt đến thể tích khoảng 75mm³, vào ngày thứ 14 sau khi cấy khối u dưới da. Các hợp chất CDN được dùng (25 μ g trong tổng thể tích 40 μ l HBSS) bằng cách dùng dưới da vào tâm khối u bằng cách sử dụng kim cỡ 27. Tiêm lặp lại ba ngày một lần, tổng cộng tiêm ba lần vào trong khối u. CDN được thử là [G(3',5')pG(3',5')p] vòng (CDG); [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (liên kết hỗn hợp, hoặc ML CDG); [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDG);

[A(3',5')pA(3',5')p] vòng (CDA); [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (liên kết hỗn hợp, hoặc ML CDA); và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA).

Như được thể hiện trên hình 18, các chất dẫn xuất ML RR-CDG và ML RR-CDA có hiệu quả chống khối u tiềm năng, so với các phân tử vòng dinucleotit vòng ML CDG và vòng ML CDA. Phân tử ML RR-CDA gây thải bỏ khối u ở mức độ đáng kể hơn so với dẫn xuất ML CDA ($P = 0,0004$, thử nghiệm t của student), và các con chuột gần như không còn khối u trong nhóm khối u ML RR-CDG vào ngày 44 sau khi cấy ghép khối u dưới da. Các dữ liệu này minh họa hiệu lực tăng cường của các chất dẫn xuất ML RR-CDN so với các phân tử dẫn xuất ML CDN, và hiệu quả chống khối u đáng kể của các phân tử ML RR-CDN trong mô hình chuột bị u hắc tố B16.

Để đánh giá tiếp khả năng của các phân tử dẫn xuất khi thúc đẩy miễn dịch chống u, các tế bào ung thư biểu mô ruột kết CT26 (2×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) được cấy dưới da qua đường tĩnh mạch vào các con chuột nhắt cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi và đánh giá về thời gian sống còn lại. Các hợp chất CDN (25 μ g trong tổng thể tích là 100 μ l HBSS) được dùng một ngày sau khi cấy ghép khối u dưới da bằng cách dùng dưới da vào đáy đuôi. Con chuột được tăng cường điều trị bằng cách tiêm thêm một tuần trong tổng cộng hai lần chủng ngừa.

Như được thể hiện trên hình 19A, [G(2',5')pG(3',5')p] vòng dithio Rp,Rp (ML RR-CDG) tạo ra tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể so với phân tử [G(2',5')pG(3',5')p] vòng (ML CDG) ($P = 0,0018$, thử nghiệm log-rank), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio và Rp, Rp (ML RR-CDA) tạo ra tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể so với phân tử [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML CDA) ($P = 0,0005$, thử nghiệm log-rank). Điều này minh họa hiệu quả chống khối u đáng kể của các chất dẫn xuất ML RR-CDN so với các phân tử dẫn xuất ML CDN trong mô hình di căn phổi mà sống sót CT26. Các kết quả này thể hiện rằng các phân tử dẫn xuất CDN có thể được dùng một cách thành công qua đường dưới da.

Để thể hiện rằng việc hoạt hóa quá trình cung cấp thông tin cho tế bào T bắt nguồn từ khối u và hiệu quả chống khối u do các phân tử dẫn xuất CDN gây ra không bị hạn chế ở một khối u kiểu và cơ sở gen của chuột, khả năng của CDN tổng hợp khi thúc đẩy miễn dịch chống u ở các mô hình khối u khác được thử nghiệm. Các tế bào ung thư biểu mô ruột kết CT26 (1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) hoặc các tế bào ung

thư biểu mô tuyến vú 4T1 (1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) được cấy dưới da trên sườn các con chuột nhắt cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột mỗi nhóm). Việc điều trị bắt đầu khi các loại u đạt đến thể tích khoảng 75mm³, mà vào khoảng ngày 14 sau khi cấy ghép khối u dưới da. Các hợp chất [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) hoặc các hợp chất [G(2',5')pG(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDG) (25 μ g trong tổng thể tích là 40 μ l HBSS), hoặc đối chứng HBSS là chất dẫn, và [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) (50 μ g trong tổng thể tích là 40 μ l HBSS) hoặc HBSS đối chứng là chất dẫn, được dùng dưới da vào tâm khối u bằng cách sử dụng kim cỡ 27. Tiêm lặp lại ba ngày một lần, tổng cộng ba lần tiêm vào trong khối u.

Như được thể hiện trên hình 19B, ML RR-CDG ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của khối u trong số 7 trong 8 con chuột nhắt, trong khi ML RR-CDA ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của khối u của tất cả các khối u đã được tạo ra. Như được thể hiện trên hình 19C, dẫn xuất ML RR-CDA ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của khối u của tất cả khối u vú 4T1 đã được tạo ra. Các dữ liệu này minh họa hiệu quả vượt trội và hiệu quả chống khối u ổn định của các chất dẫn xuất RpRp đithio vòng dinucleotit (ML RR-CDN) liên kết hỗn hợp tổng hợp ở nhiều mô hình khối u.

Ví dụ 10. Hiệu quả chống khối u do CDN gây ra phụ thuộc vào STING

Để xác định xem liệu các tác động của các phân tử dẫn xuất có phụ thuộc vào STING hay không, các tế bào u hắc tố B16 (5×10^4 tế bào trong 100 μ l PBS) được cấy dưới da trên sườn phải của chuột nhắt cái STING^{-/-} goldenticket 6 đến 8 tuần tuổi, hoặc chuột nhắt C57BL/6 đối chứng hoang (5 con chuột mỗi nhóm). Việc điều trị bắt đầu bằng các loại u đạt đến thể tích khoảng 75mm³, vào ngày thứ 14 sau khi cấy ghép khối u dưới da. Các hợp chất được dùng là [G(2',5')pG(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDG) (25 μ g trong tổng thể tích 40 μ l HBSS), [A(2',5')pA(3',5')p] vòng đithio Rp, Rp (ML RR-CDA) (50 μ g trong tổng thể tích 40 μ l HBSS), chất chủ vận CpG 1668 TLR9 (50 μ g trong tổng thể tích 40 μ l HBSS), hoặc đối chứng HBSS là chất dẫn. Chuột nhắt được điều trị bằng cách dùng dưới da vào tâm khối u chỉ bằng cách sử dụng kim cỡ 27. Tiêm lặp lại ba ngày một lần, tổng cộng ba lần tiêm vào trong khối u.

Như được thể hiện trên hình 20A, chất dẫn xuất ML RR-CDN gây ức chế đáng kể khối ở chuột nhắt C57BL/6 hoang so với đối chứng HBSS, và ở mức độ đáng kể

hơn so với sự ức chế khối u của chất chủ vận CpG 1668 TLR9 ($P = 0,03$, thử nghiệm t của Student's). Trên hình 20B, sự sinh trưởng của khối u không bị ức chế bởi ML RR-CDG hoặc ML RR-CDA, thể hiện rằng hiệu quả chống khối u quan sát được ở chuột nhắt C57BL/6 hoang (hình 20A) là hoàn toàn tùy thuộc vào quá trình truyền tín hiệu STING chức năng. Trái lại, sự sinh trưởng của khối u của CpG 1668 là tương tự ở cả chuột nhắt hoang và STING^{-/-}, so với đối chứng HBSS ($P = 0,03$, thử nghiệm t của Student's), thể hiện rằng hoạt động của hợp chất này độc lập với STING.

Ví dụ 11. Các chất dẫn xuất CDN gây miễn dịch tế bào T đặc hiệu chống khối u hữu hiệu và ổn định

Để xác định xem liệu các phân tử dẫn xuất CDN tổng hợp có gây ra gây miễn dịch tế bào T chống khối u hữu hiệu và ổn định hay không, các con chuột nhắt cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột mỗi nhóm) được cấy dưới da bằng các tế bào ung thư biểu mô ruột kết CT26 (1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS). Chuột nhắt được điều trị bằng hợp chất có công thức [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) (50 μ g trong tổng thể tích 40 μ l HBSS) hoặc đối chứng HBSS là chất dẫn, và sự sinh trưởng của khối u được kiểm soát như trong ví dụ nêu trên. Con chuột được lấy máu vào ngày thứ 18 sau khi cấy ghép khối u dưới da và PBMC được tách thay gradient Ficoll (Miltenyi Biotech). 5×10^4 PBMC được kích thích qua đêm trong thử nghiệm IFN γ ELISpot chỉ bởi một mình môi trường (không bị kích thích), hoặc bởi 1 μ M peptit AH1 kháng nguyên thải bỏ khối u bị hạn chế bởi H-2 L^d nội sinh với sự có mặt của 1×10^5 tế bào lá lách không nhiễm bệnh để làm tế bào nuôi. Các đĩa IFN- γ ELISpot được hiện hình và định lượng bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa CTL và phần mềm ImmunoSpot. Vào ngày thứ 55 sau khi cấy ghép khối u dưới da, các con chuột nhắt còn sống và chuột nhắt đối chứng không nhiễm bệnh có số ngày tuổi phù hợp được cấy dưới da trên sườn đối diện bằng các tế bào của khối u CT26 hoặc 4T1 (đều là 1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) (4 chuột nhắt mỗi nhóm), và kiểm soát sự sinh trưởng của khối u này.

Như được thể hiện trên hình 21A, tất cả các con chuột nhắt được điều trị bằng ML RR-CDA đều không cho bệnh ung thư biểu mô ruột kết CT26 đã được thiết lập phát triển. Để chứng minh rằng tác dụng này là do sự gây ra đáp ứng miễn dịch thích ứng tế bào T do CDN gây ra, PBMC vào ngày thứ 18 sau khi tạo ra khối u được đánh

giá bằng lượng sản sinh IFN- γ nhờ thử nghiệm, đáp lại sự kích thích bằng kháng nguyên của khối u nội sinh AH1. Như được thể hiện trên hình 21B, PBMC phân lập được từ chuột nhất được điều trị bằng ML RR-CDA tạo ra lượng IFN- γ lớn hơn đáng kể đáp lại sự kích thích peptit AH1, so với nhóm đối chứng được điều trị HBSS ($P = 0,003$, thử nghiệm t của Student). Ngoài ra, trên hình 21C, chuột nhất còn sống được thử nghiệm tiếp bằng khối u đối bên thể hiện tác dụng bảo vệ hoàn toàn đối với cùng khối u kiểu CT26, trong khi không ức chế sự sinh trưởng của khối u kiểu 4T1. Các dữ liệu này minh họa khả năng của ML RR-CDA gây ra miễn dịch chống u do tế bào T đặc hiệu với khối u gây ra hiệu quả và ổn định mà gây ra sự thải bỏ cả hai khối u được điều trị, và quần thể tế bào T trí nhớ đặc hiệu với kháng nguyên của khối u thích hợp mà có thể không được dùng liều quyết định để loại bỏ khối u.

Để xác định xem liệu các phân tử dẫn xuất CDN có gây miễn dịch chống u hữu hiệu và ổn định trong mô hình khối u khác hay không, các con chuột nhất cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột mỗi nhóm) được cấy dưới da bằng các tế bào ung thư biểu mô tuyến vú 4T1 (1×10^5 tế bào trong $100 \mu\text{l}$ PBS). Các con chuột được điều trị bằng hợp chất có công thức $[A(2',5')pA(3',5')p]$ vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) ($50 \mu\text{g}$ trong tổng thể tích là $40 \mu\text{l}$ HBSS), hoặc đối chứng HBSS là chất dẫn, như trong thử nghiệm nêu trên. Vào ngày thứ 35 sau khi cấy ghép khối u dưới da, các con chuột nhất còn sống và chuột nhất đối chứng không nhiễm bệnh có số ngày tuổi phù hợp được cấy dưới da trên sườn đối diện bằng các tế bào của khối u CT26 hoặc 4T1 (đều là 1×10^5 tế bào trong $100 \mu\text{l}$ PBS) (4 con chuột mỗi nhóm), và kiểm soát sự sinh trưởng của khối u này.

Như được thể hiện trên hình 22A, và được minh họa trong phần trên, việc điều trị bệnh bằng ML RR-CDA ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của khối u ung thư biểu mô tuyến vú 4T1 đã được thiết lập. Ngoài ra, trên hình 22B, việc thử nghiệm lại bằng các tế bào của khối u 4T1 trên sườn đối diện tạo ra tác dụng bảo vệ hoàn toàn. Việc thử nghiệm lại bằng khối u CT26 sinh miễn dịch cũng mang lại tác dụng bảo vệ hoàn toàn, cho thấy rằng các loại u này có các kháng nguyên tương tự của khối u, tạo ra một bằng chứng khác về hiệu lực của các phân tử dẫn xuất CDN tổng hợp.

Ví dụ 12. Sự hoạt hóa cung cấp thông tin cho tế bào T khơi mào khối u bằng cách tiêm các chất dẫn xuất tổng hợp CDN vào trong khối u để gây ra sự ức chế khối u xa đích.

Các ví dụ nêu trong bản mô tả này thể hiện rằng việc tiêm các chất dẫn xuất tổng hợp CDN vào trong khối u (IT) dẫn đến sự thu hút và phá hủy khối u bền vững, nhờ hoạt hóa các xytokin tiền viêm phụ thuộc vào STING, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sự phát triển của tế bào miễn dịch T đặc hiệu với khối u có hiệu quả. Sự tạo ra tế bào miễn dịch T đặc hiệu với khối u phụ thuộc vào STING bảo vệ các con chuột chống lại sự tiếp xúc tiếp theo với khối u tự rưng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết bệnh ung thư tiến triển thành di căn, và để có hiệu quả, các phép điều trị cần ức chế sự phát triển của khối ngoại biên. Việc điều trị một hoặc các tổn thương được chọn mà ức chế sự phát triển của khối u trong các vùng khối u không được xử lý ở ngoại biên được biết là tác dụng xa đích. Để thử nghiệm xem việc tiêm các chất dẫn xuất tổng hợp CDN vào IT của khối u được chọn có ức chế sự phát triển của khối u không được xử lý ở ngoại biên hay không, (A) các tế bào ung thư biểu mô ruột kết CT26 (1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) và (B) các tế bào ung thư biểu mô tuyến vú 4T1 (1×10^5 tế bào trong 100 μ l PBS) được cấy dưới da trên sườn đối diện của các con chuột nhất cái Balb/c 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột nhất mỗi nhóm). Việc điều trị bắt đầu khi các loại u đạt đến thể tích khoảng 75 mm^3 , vào ngày thứ 13 sau khi cấy ghép khối u dưới da. Hợp chất có công thức Rp, Rp [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio (ML RR-CDA) (50 μ g trong tổng thể tích là 40 μ l HBSS), hoặc HBSS đối chứng là chất dẫn, được dùng dưới da vào trung tâm của khối u tiên phát (bên phải) chỉ bằng cách sử dụng kim cỡ 27. Tiêm lặp lại ba ngày một lần, tổng cộng là ba lần tiêm vào trong khối u.

Như được thể hiện trên hình 23, hợp chất [A(2',5')pA(3',5')p] vòng dithio Rp, Rp (ML RR-CDA) gây ức chế hoàn toàn u nguyên phát được xử lý ở cả chuột mang khối u CT26 (hình 23A) và chuột mang khối u 4T1 (hình 23B), so với HBSS đối chứng là chất dẫn. Ngoài ra, sự phát triển của khối u đối bên (không được xử lý) ở cả hai mô hình khối u cũng được ức chế đáng kể, so với đối chứng HBSS (Hình 23 AP = 0,0011, Hình 23 BP = 0,0019, thử nghiệm student's *t*-). Các dữ liệu này minh họa hiệu

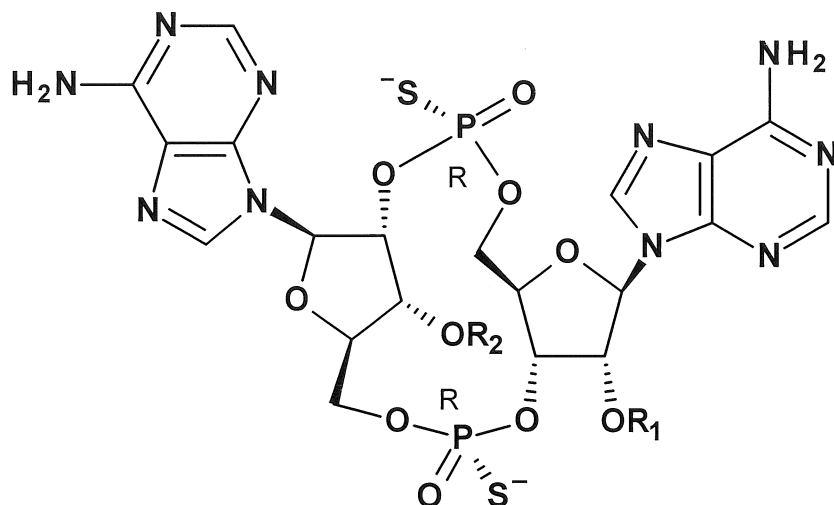
quả chống khối u đáng kể của dẫn xuất ML RR-CDA khi được tiêm vào u nguyên phát, cũng như tác dụng miễn dịch chống khối u xa đích đáng kể.

Để xác định xem liệu các chất dẫn xuất tổng hợp CDN có thúc đẩy miễn dịch chống u xa đích trong mô hình khối u thay thế và cơ sở gen chuột nhắt, các chuột nhắt cái C57BL/6 6 đến 8 tuần tuổi (8 con chuột nhắt mỗi nhóm) được cấy dưới da bằng các tế bào u hắc tố B16 (5×10^4 tế bào trong 100 μ l PBS) trong sườn phải. Một tuần sau, chuột nhắt được cấy dưới da qua đường tĩnh mạch bằng 1×10^5 tế bào u hắc tố B16 để khu trú vào phổi, cùng với nhóm gồm chuột nhắt đối chứng có cùng số ngày tuổi không mang bệnh. Khi khối u dưới da sườn đạt đến khoảng 75 mm³ vào ngày thứ 13, chuột nhắt được điều trị vào trong khối u bằng Rp, Rp dithio [A(2',5')pA(3',5')p] vòng (ML RR-CDA) (50 μ g trong tổng thể tích là 40 μ l HBSS) hoặc HBSS đối chứng là chất dẫn, trong ba lần tiêm như quy trình đã nêu. Vào ngày thứ 28 sau khi dưới da cấy khối u dưới da (ngày 21 sau khi qua đường tĩnh mạch cấy dưới da), chuột nhắt được cho chết không đau và phổi được thu gom và được cố định (10% Formalin đệm trung tính), và số lượng cục khối u phổi được đếm bằng cách sử dụng kính hiển vi giải phẫu.

Như được thể hiện trên hình 24A, và trong các thử nghiệm nêu trên, việc điều trị bệnh bằng ML RR-CDA ức chế đáng kể sự sinh trưởng của khối u sườn khởi phát, so với nhóm đối chứng HBSS ($P < 0,001$, thử nghiệm t theo student). Ngoài ra, trên hình 24B và được thể hiện trên hình 24C, việc điều trị bệnh bằng dẫn xuất CDN ức chế đáng kể sự phát triển của các cục khối u phổi ở ngoại vi, so với các nhóm điều trị bằng HBSS (chỉ qua đường tĩnh mạch) và không mang khối u. Các kết quả nêu ở đây thể hiện rằng việc tiêm vào trong khối u (IT) các chất dẫn xuất CDN tổng hợp tạo ra tác dụng trị khối u xa đích, như được thể hiện bởi sự hủy hoại khối u đã được xử lý, do hoạt hóa các xytokin tiền viêm phụ thuộc vào STING và phát hiện miễn dịch tế bào T đặc hiệu với khối u hữu hiệu, mà sau đó, ức chế sự phát triển của khối u không được xử lý ở ngoại vi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:

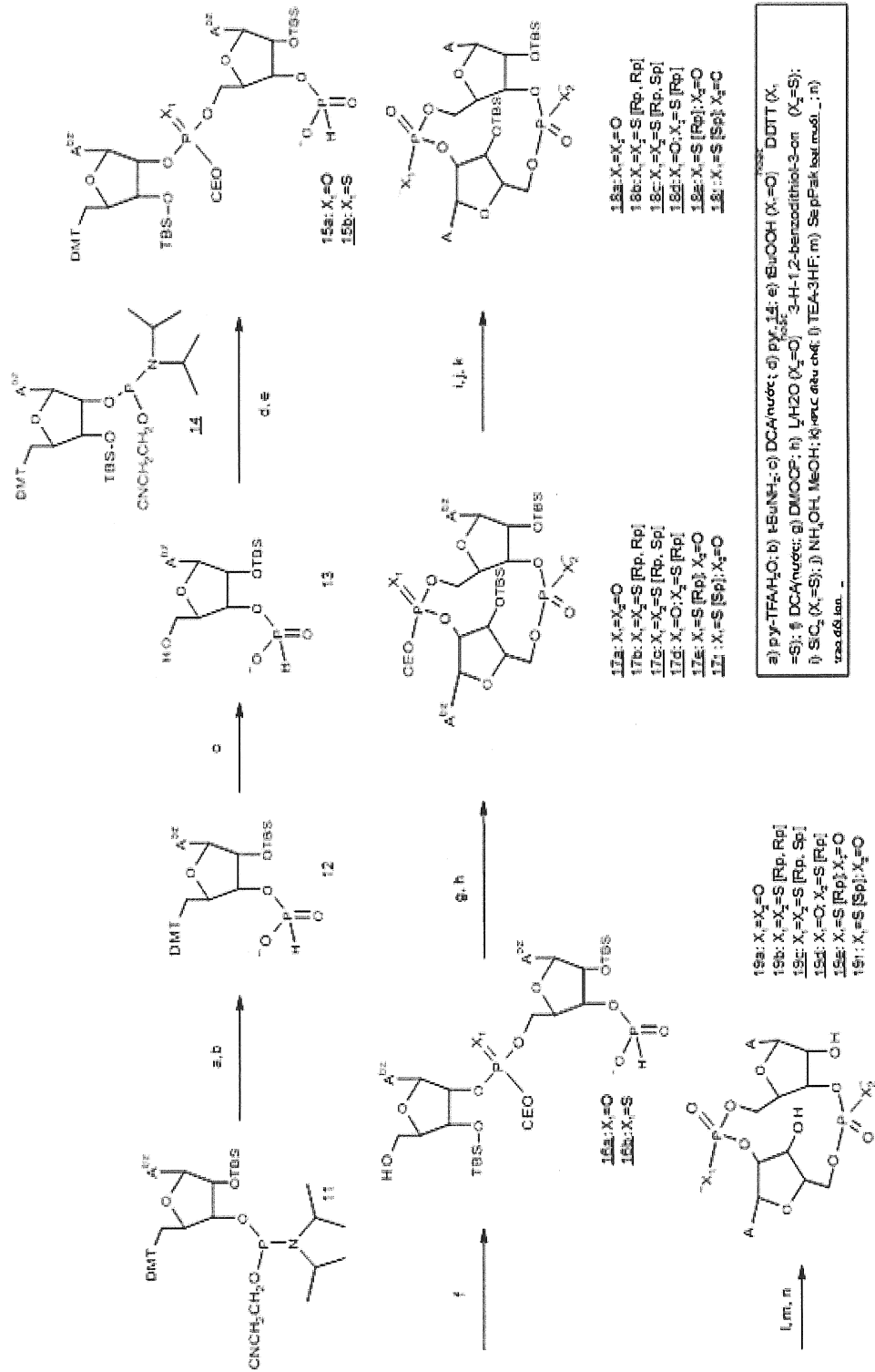


trong đó R_1 and R_2 là mỗi H, hoặc muối được dụng của nó.

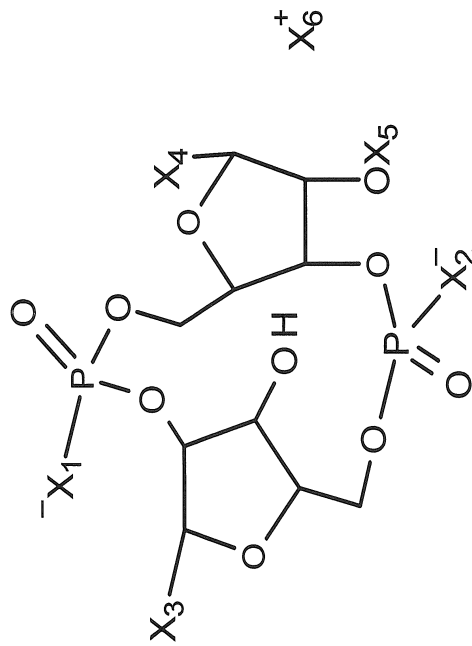
2. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 và tá được dụng.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa chất dẫn phân phối mà làm gia tăng mức độ hấp thu trong tế bào và/hoặc tính ổn định của hợp chất.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chất dẫn phân phối chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm có lipid, nang nhiều lớp có liên kết ngang giữa hai lớp, hạt kích thước nanomet trên cơ sở poly(axit D,L-lactic-co-glycolic) [PLGA] hoặc hạt kích thước nanomet trên cơ sở poly anhydrit thoái biến sinh học hoặc vi hạt, và hạt xốp kích thước nanomet được phủ hai lớp lipid.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm này còn chứa chất đối kháng CTLA-4, chất chủ vận TLR, CpG, monophosphoryl lipid A, và/hoặc tế bào khối u đã được làm bất hoạt mà biểu hiện và tiết một hoặc nhiều xytokin kích thích sự cảm ứng, sự bổ sung và/hoặc sự thành thực của tế bào tua.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó tế bào khối u đã được làm bất hoạt biểu hiện và tiết phối tử GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70 hoặc FLT-3.

7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn nhằm các mục đích gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên khi chế phẩm này được dùng cho cá thể.

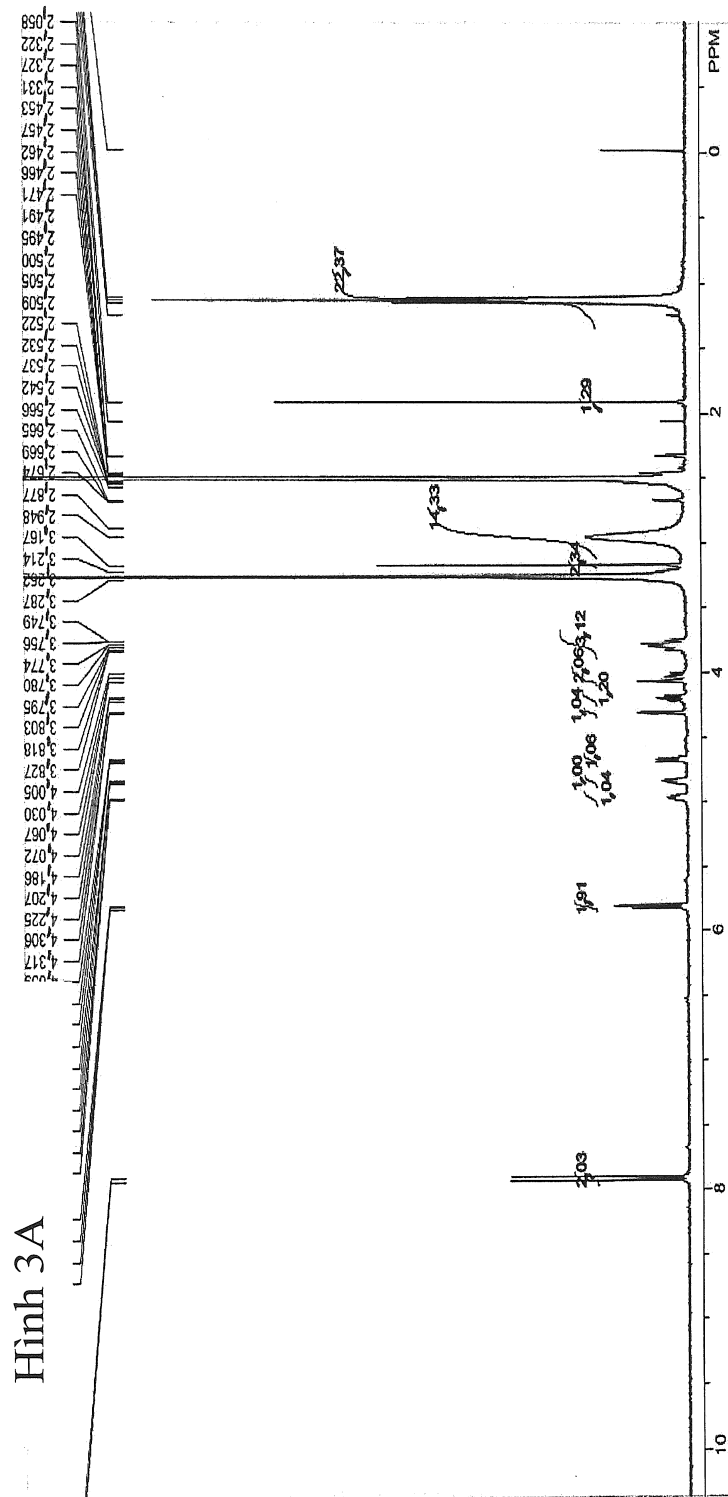
Hình 2B



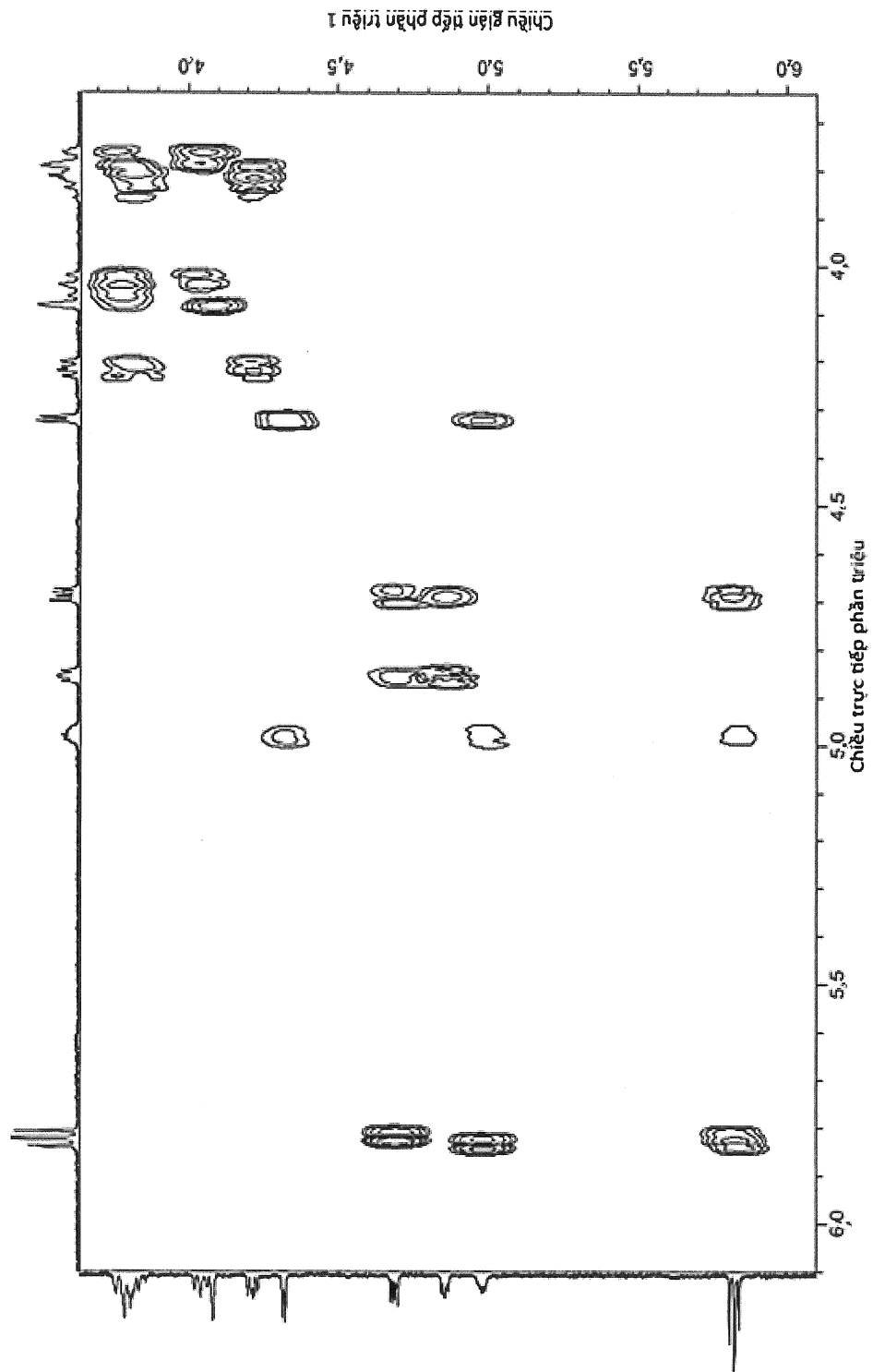
Hình 2C



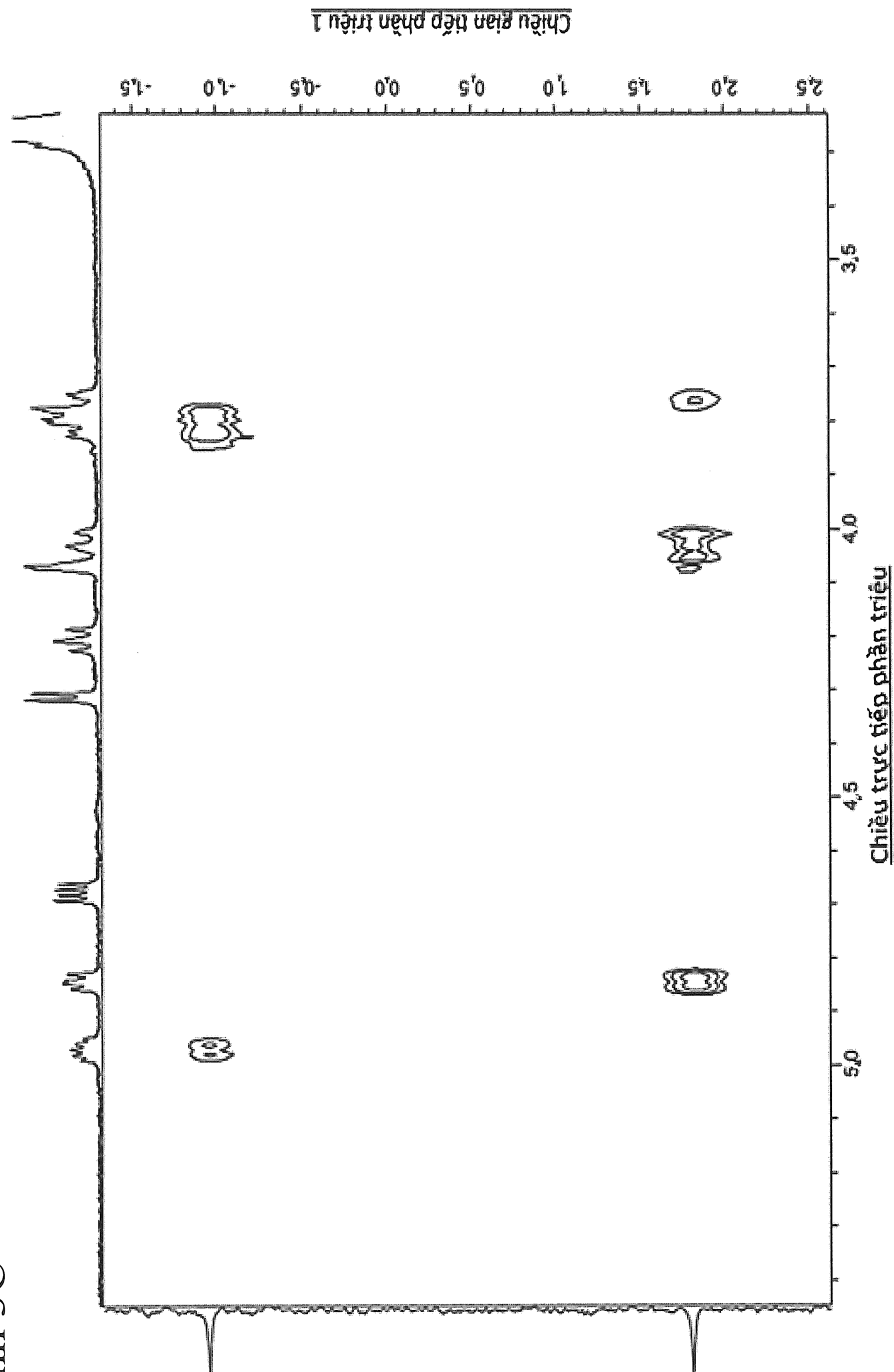
- 10) $X_1 = X_2 = O$; $X_3 = G$; $X_4 = G$; $X_5 = CO(CH_2)_{12}CH_3$; $X_6 = 2TEAH$
 20) $X_1 = X_2 = S$ [Rp,Rp]; $X_3 = G$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2TEAH$
 21) $X_1 = X_2 = S$ [Rp,Rp]; $X_3 = A$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2Na$
 22) $X_1 = X_2 = S$ [Rp,Rp]; $X_3 = A$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2NH_4$
 23) $X_1 = X_2 = O$; $X_3 = G$; $X_4 = A$; $X_5 = H$; $X_6 = 2TEAH$



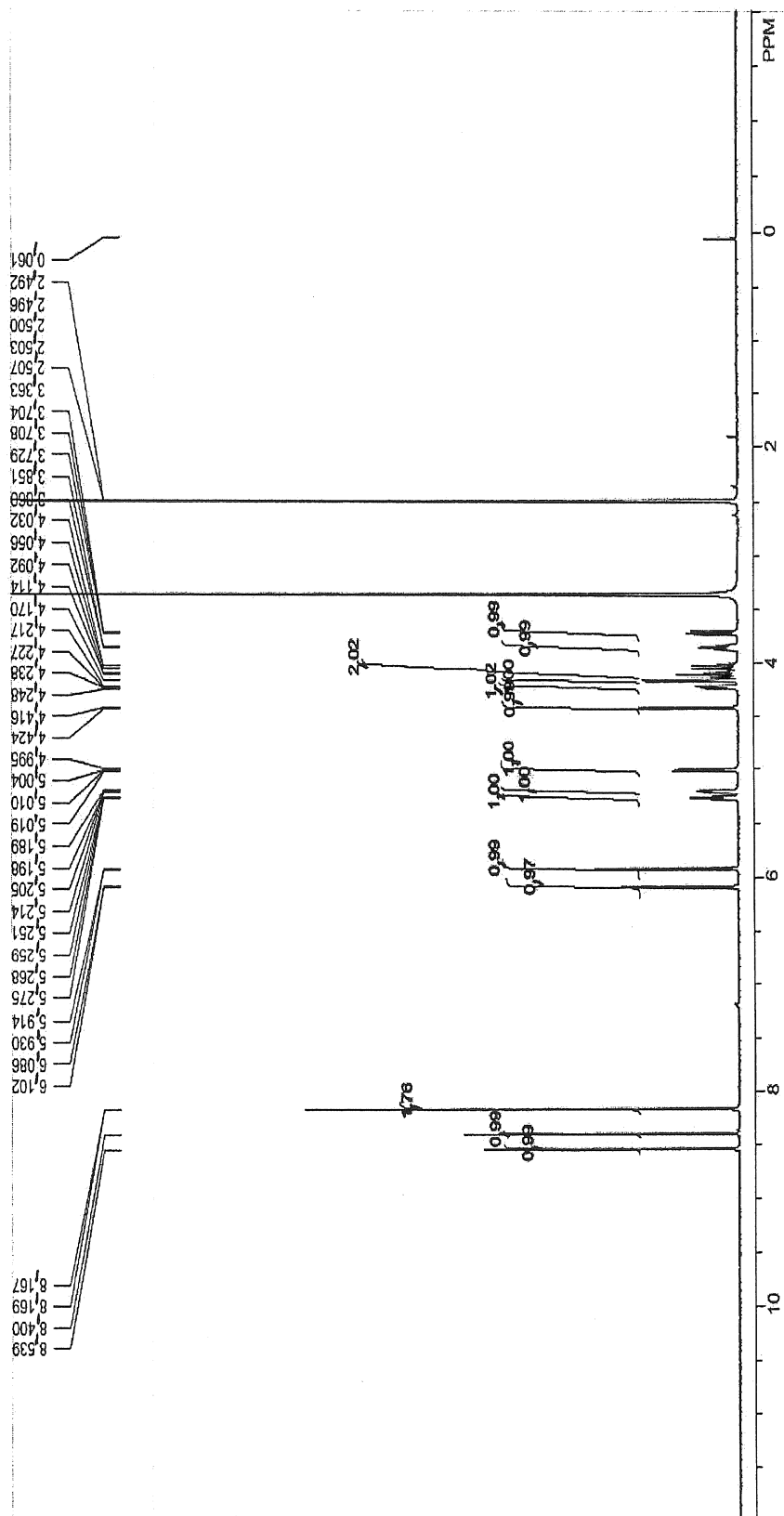
Hình 3B



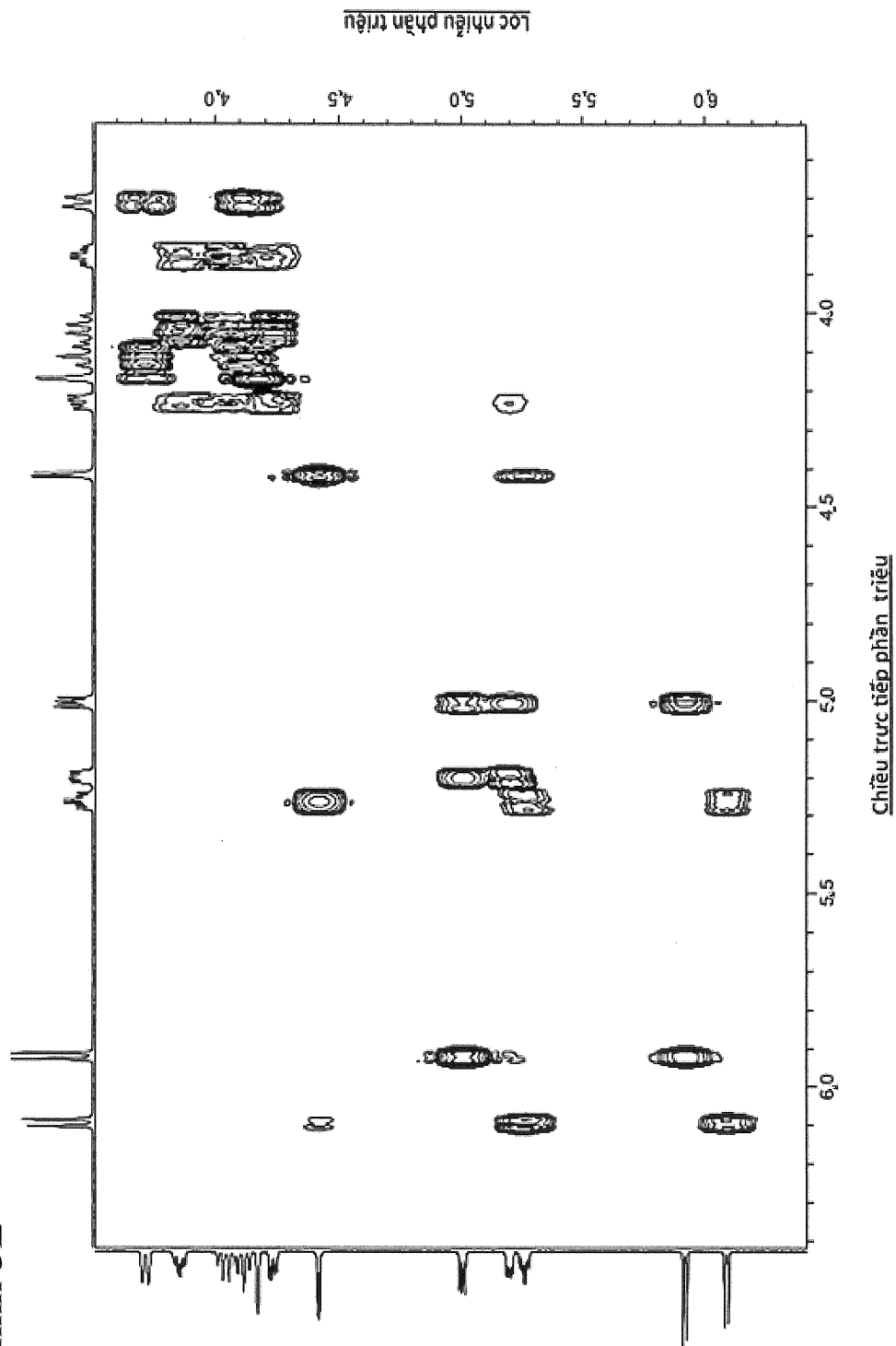
Hình 3C



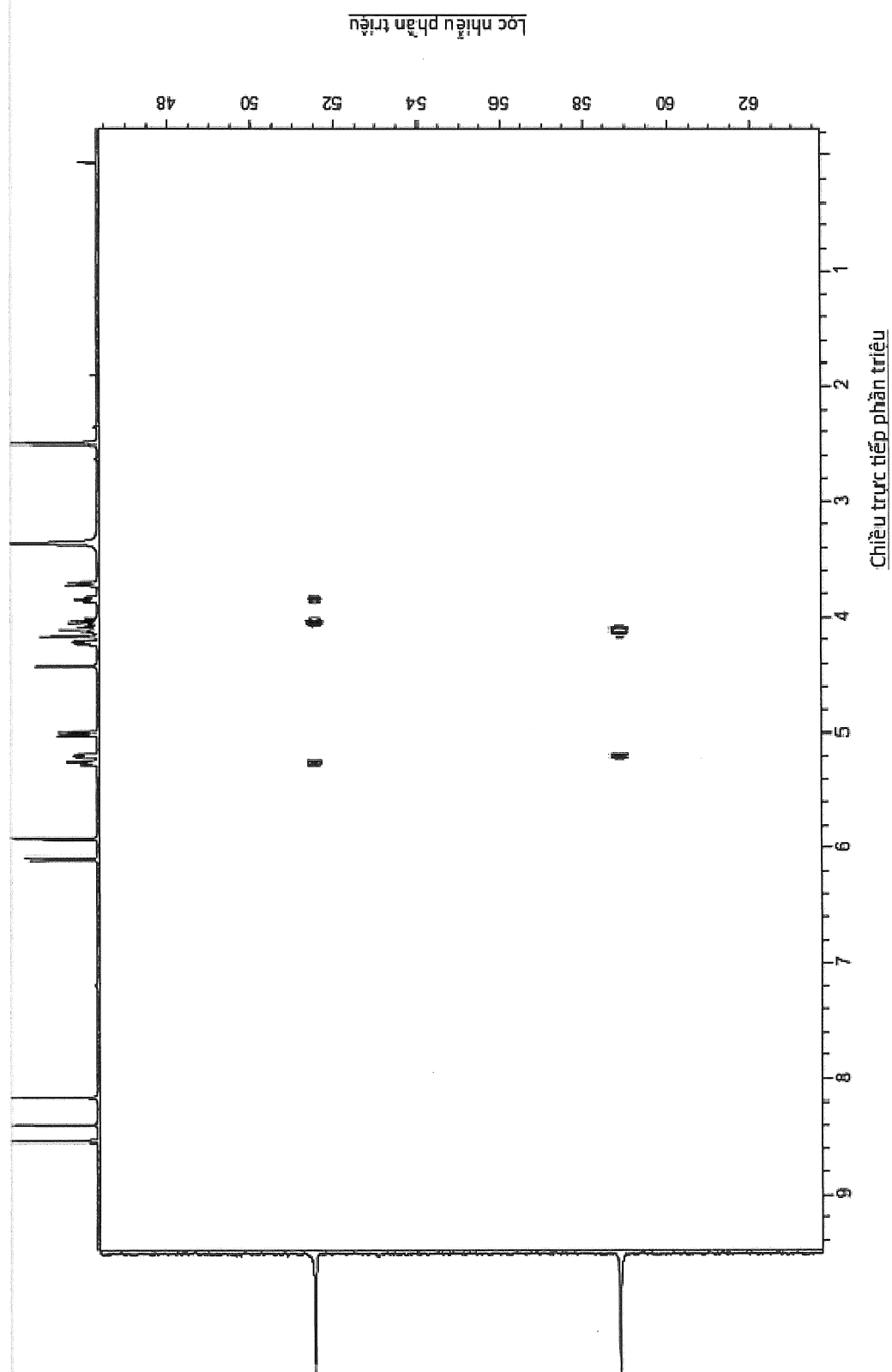
Hình 3D



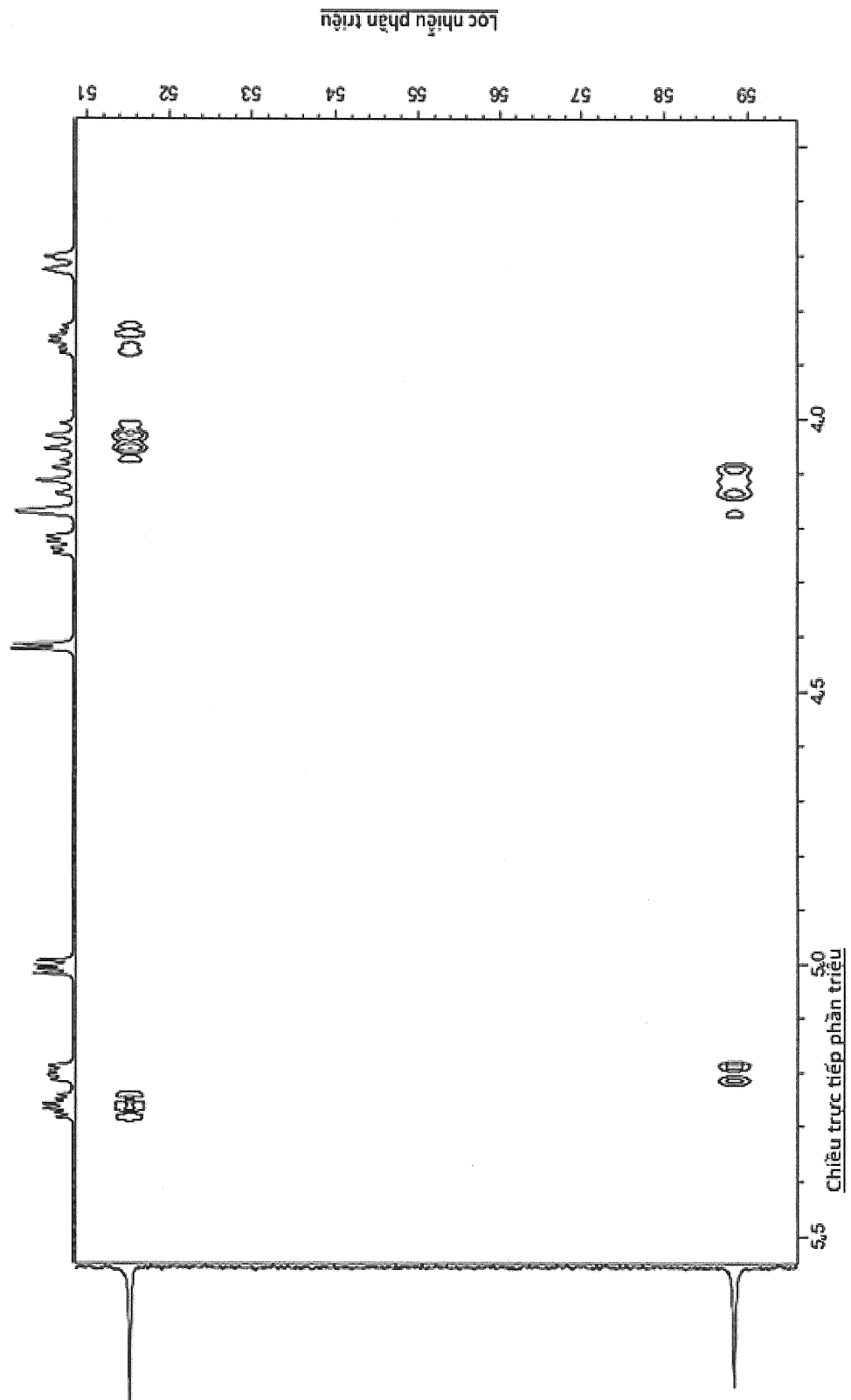
Hình 3E



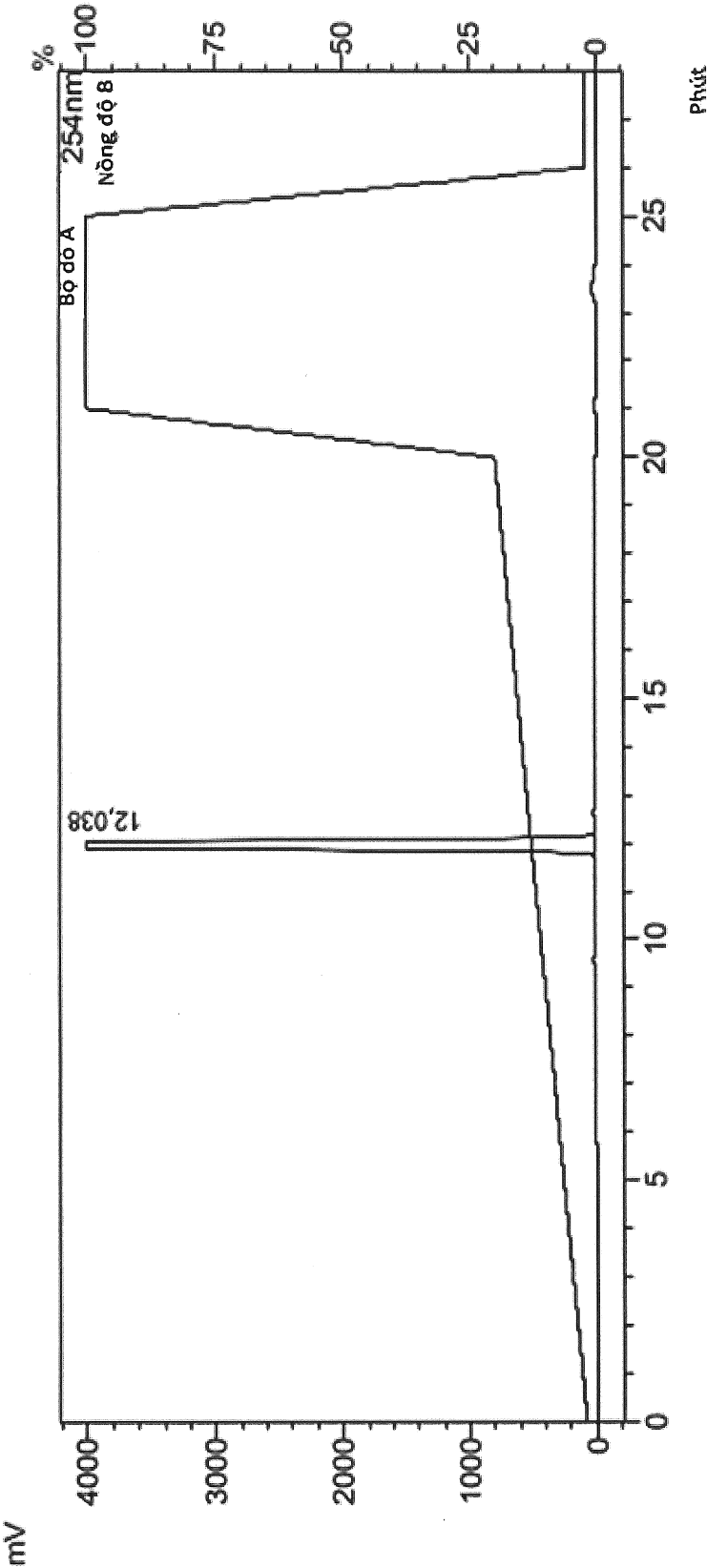
Hình 3F



Hình 3G



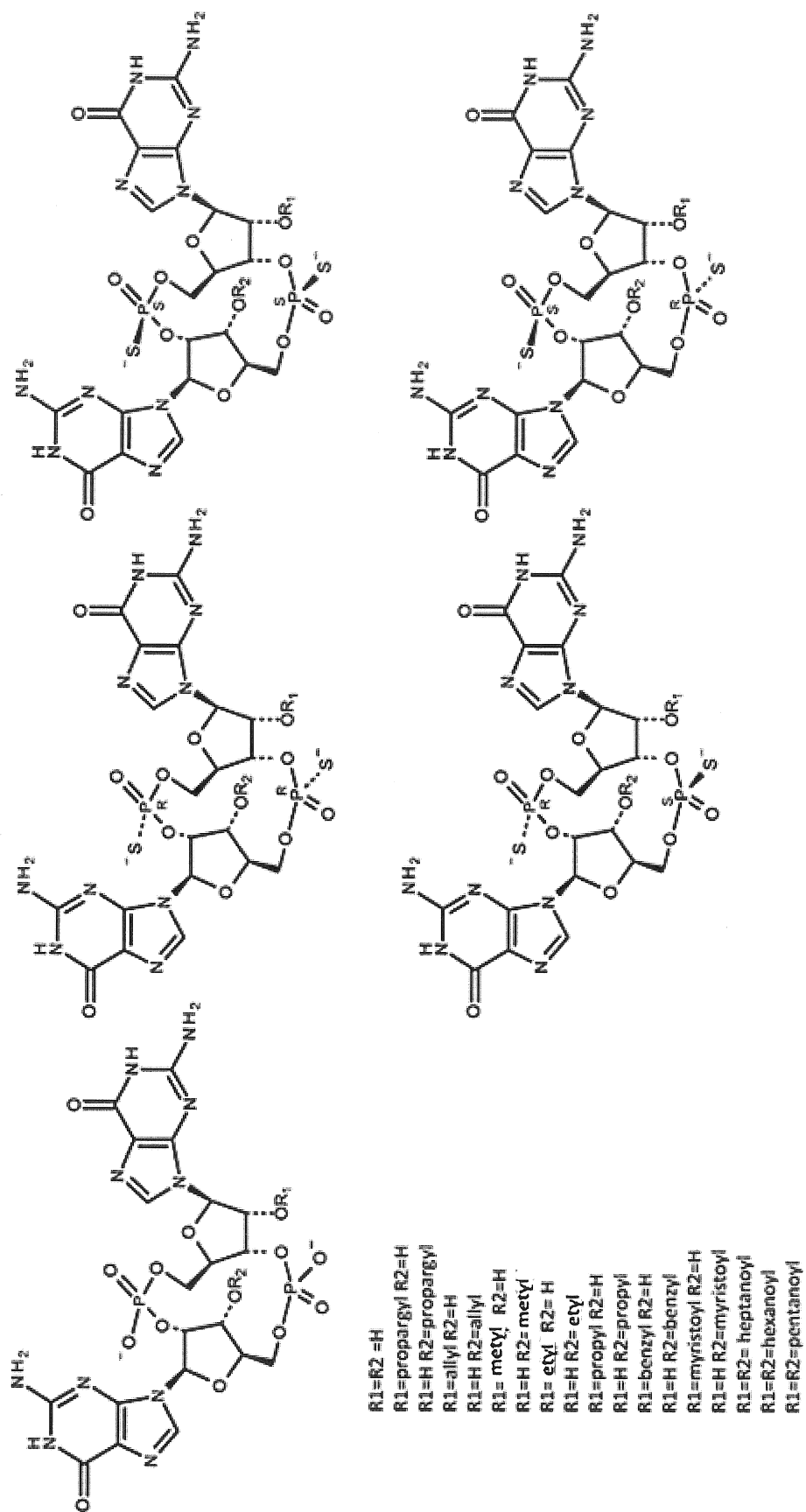
Hình 3H



<Bảng đỉnh>
Bộ dò A 254nm

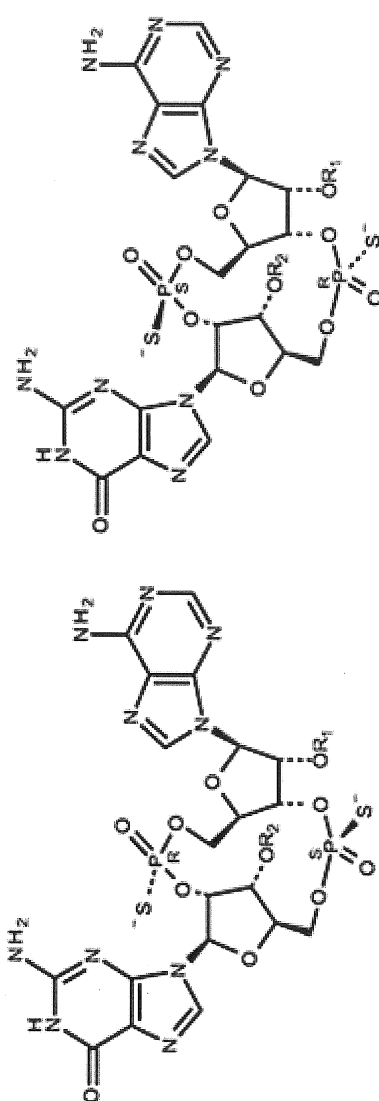
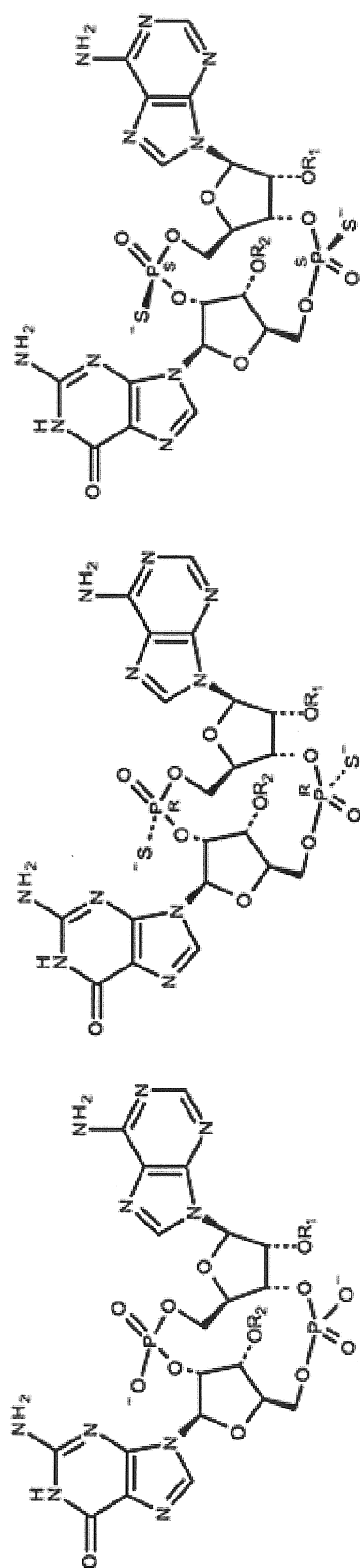
Đỉnh #	Thời gian lưu	Diện tích	% diện tích
1	12.038	57113226	100.000
Tổng số		57113226	100.000

Hình 4



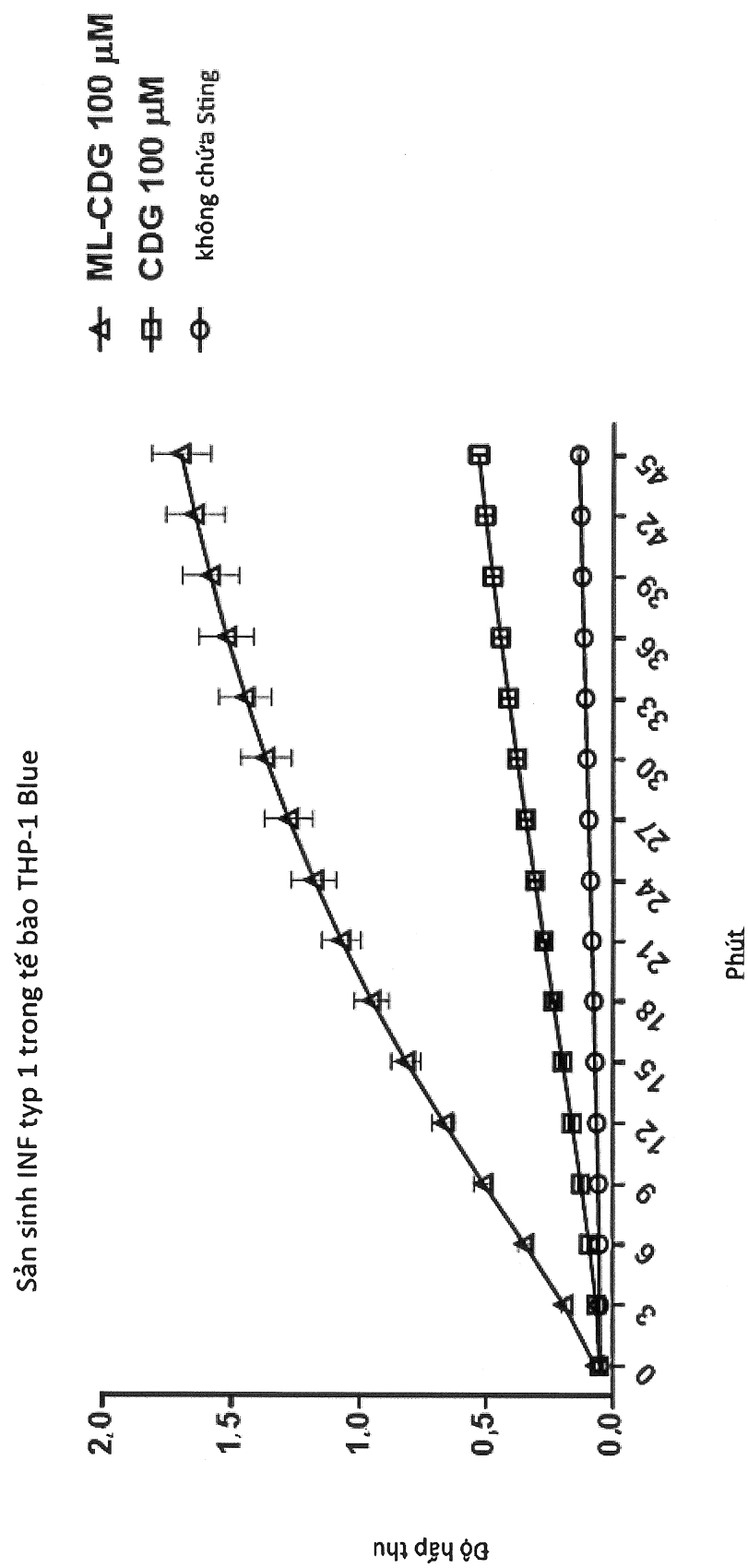
[illegible]

Hình 6

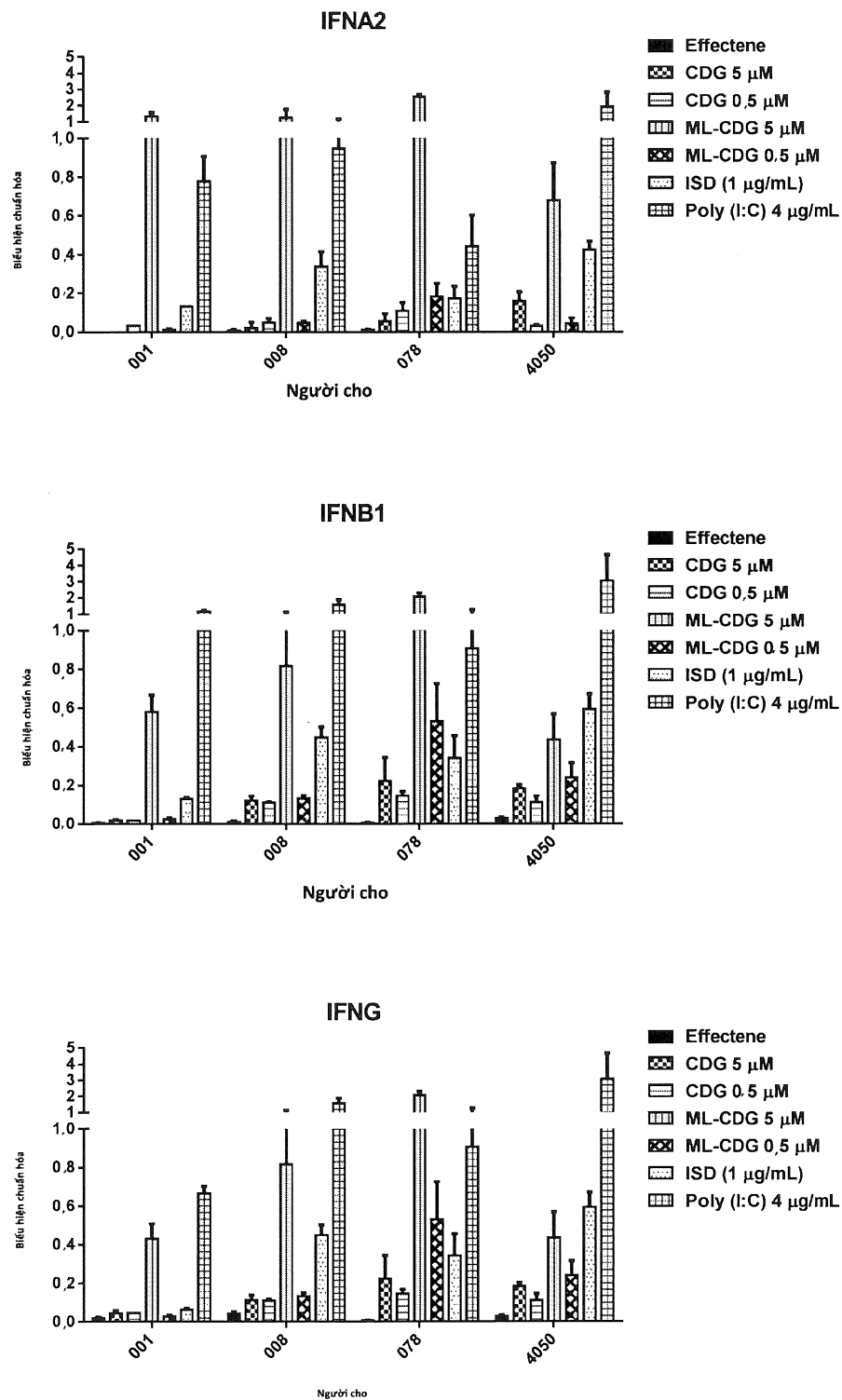


R1=R2=H
 R1=propargyl R2=H
 R1=H R2=propargyl
 R1=allyl R2=H
 R1=H R2=allyl
 R1=methyl R2=H
 R1=H R2=methyl
 R1=ethyl R2=H
 R1=H R2=ethyl
 R1=propyl R2=H
 R1=H R2=propyl
 R1=benzyl R2=H
 R1=H R2=benzyl
 R1=myristoyl R2=H
 R1=H R2=myristoyl
 R1=R2=heptanoyl
 R1=R2=pentanoyl

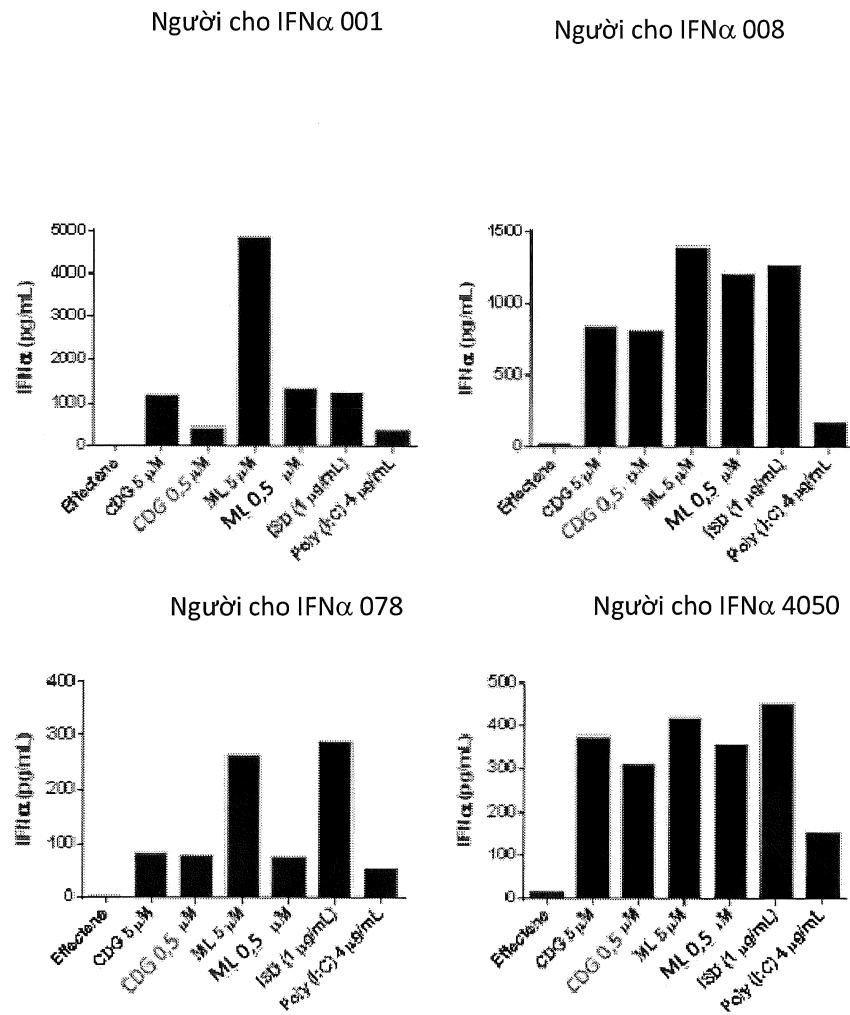
Hình 7



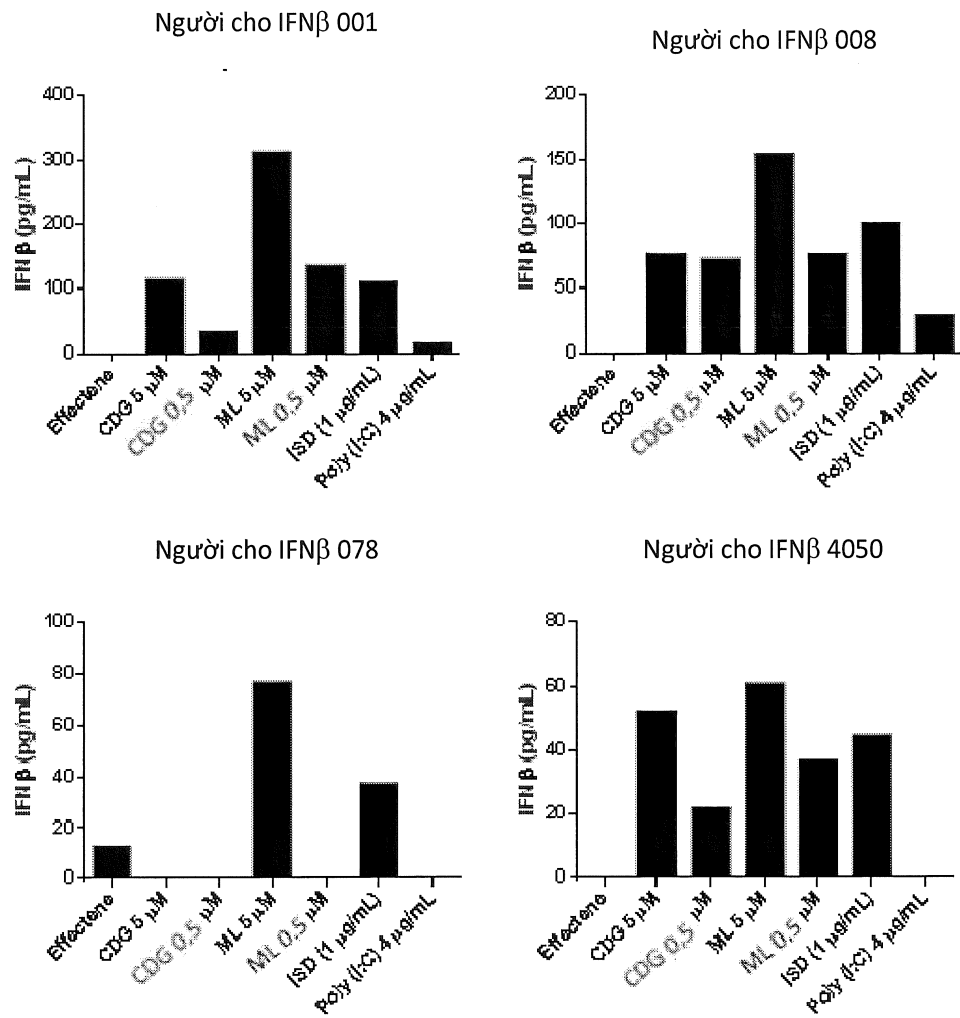
Hình 8



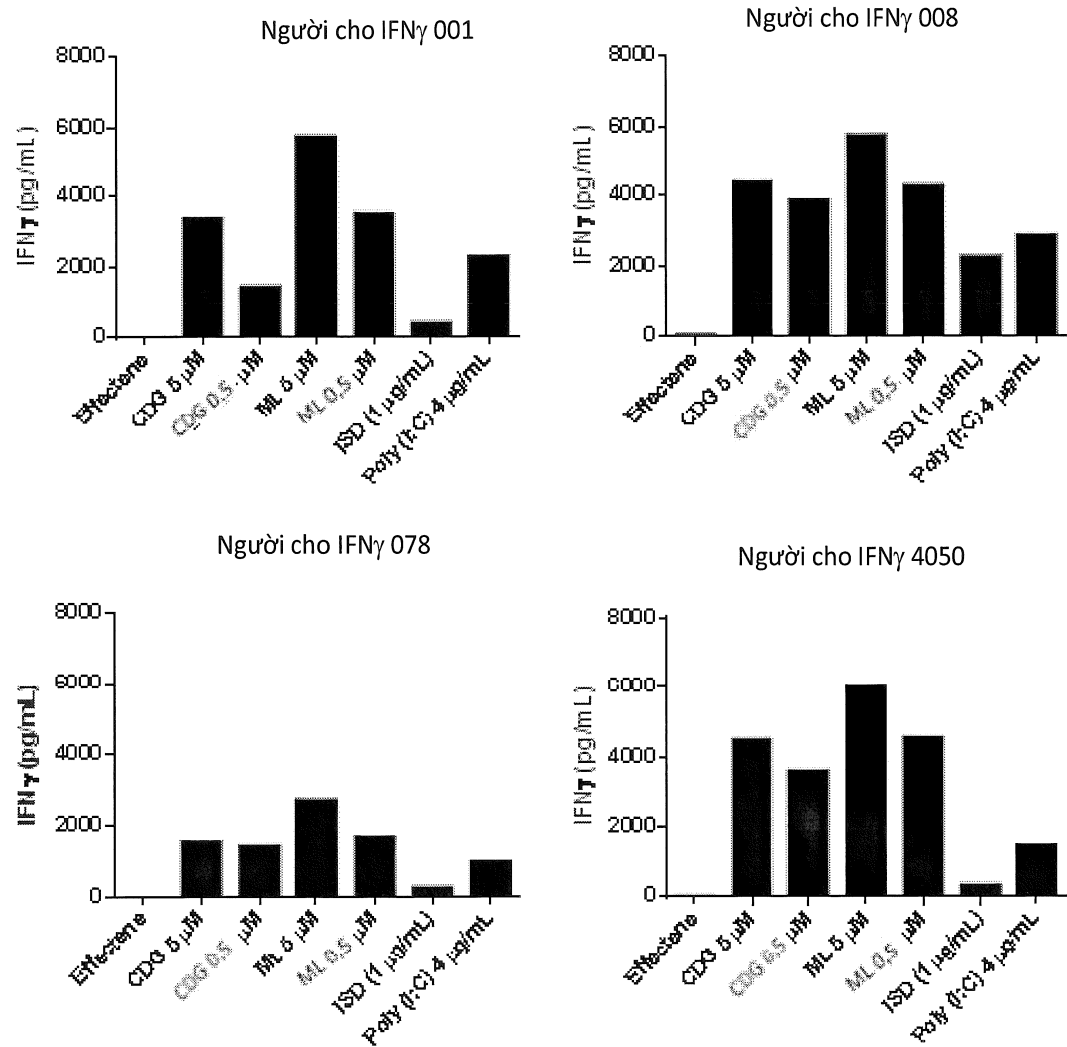
Hình 9(a)



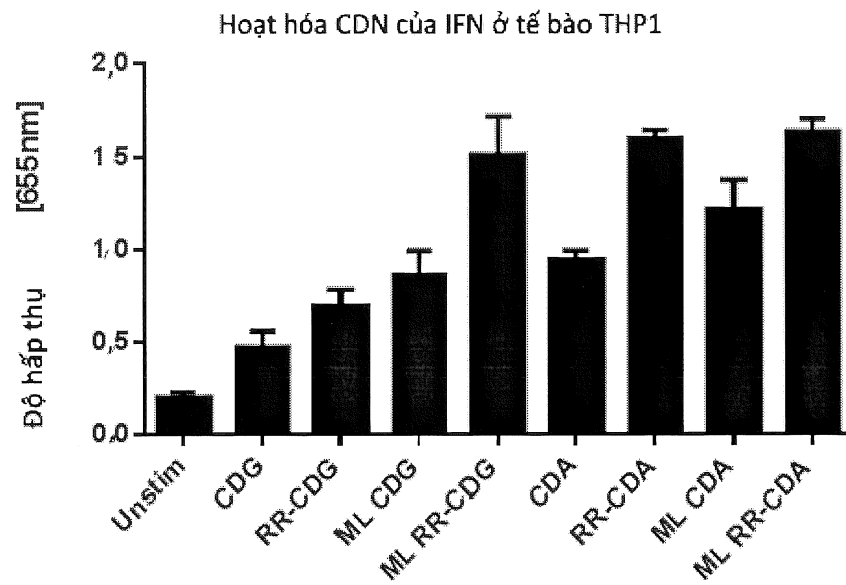
Hình 9(b)



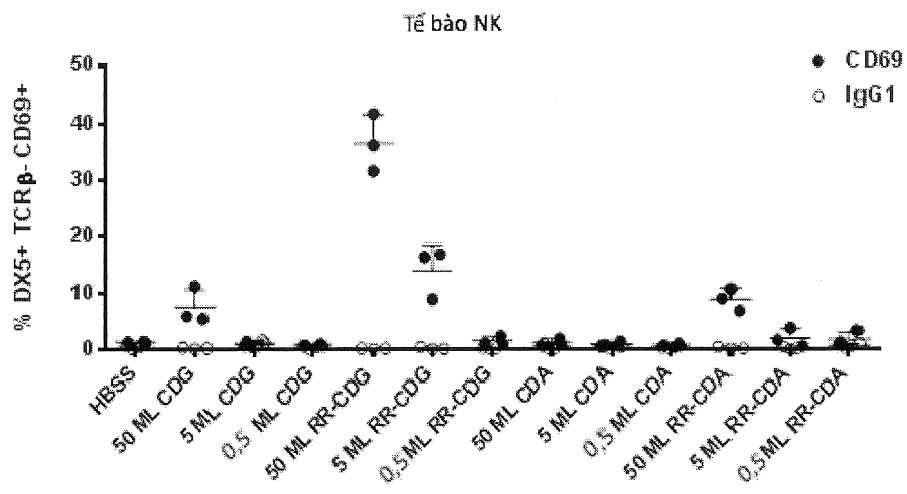
Hình 9(c)



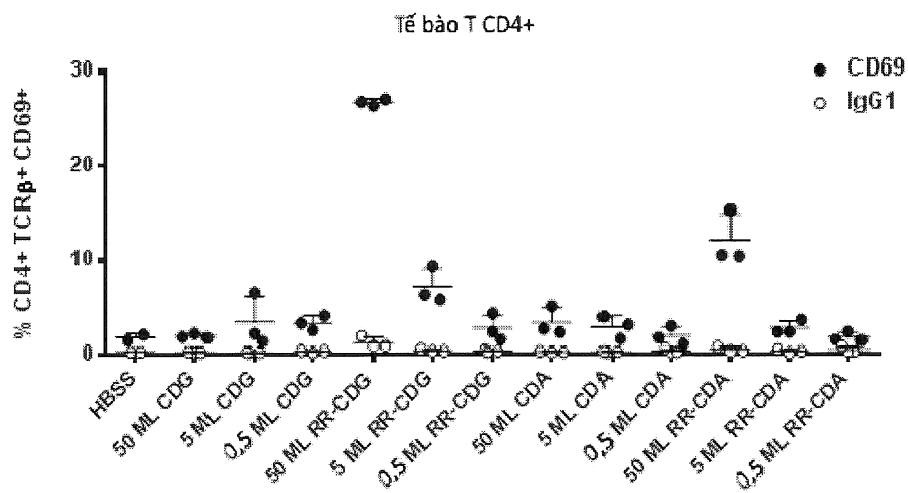
Hình 10



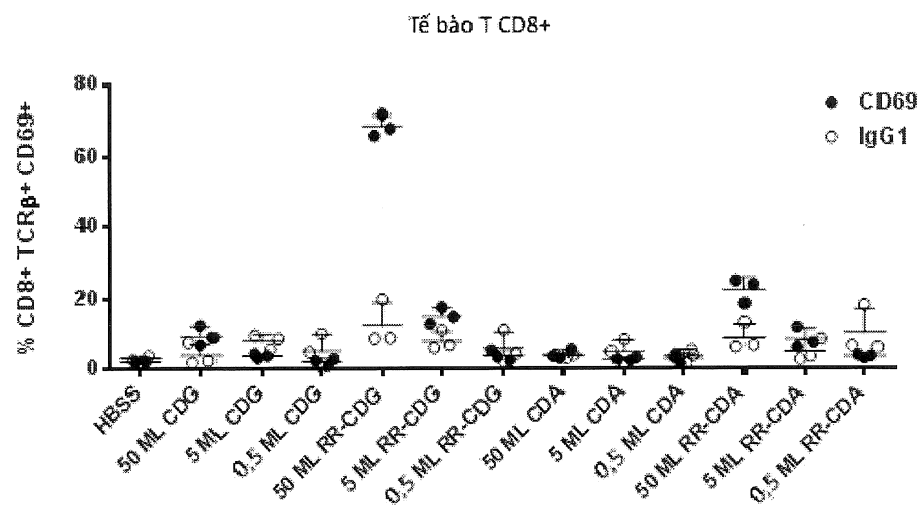
Hình 11A



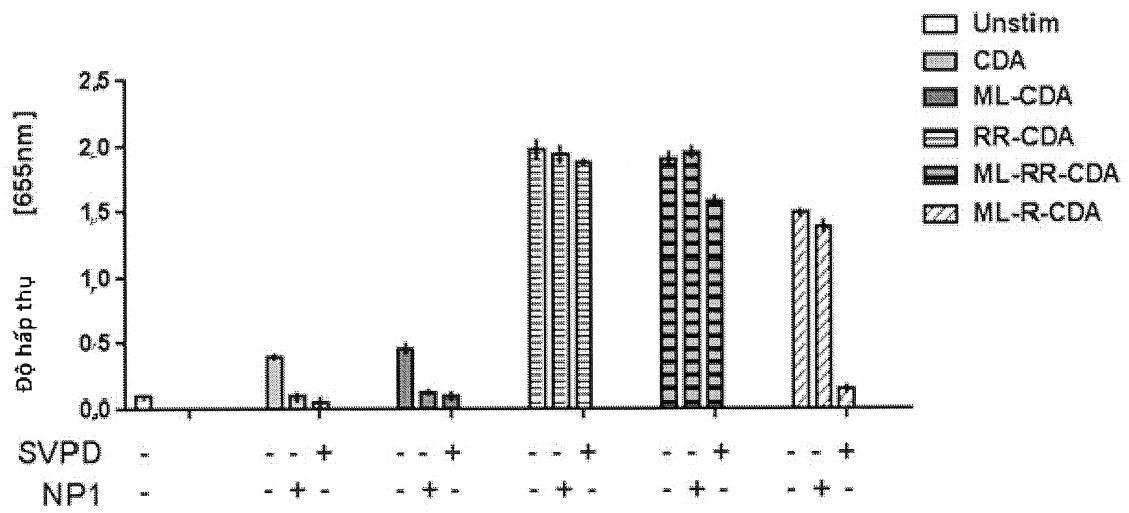
Hình 11B



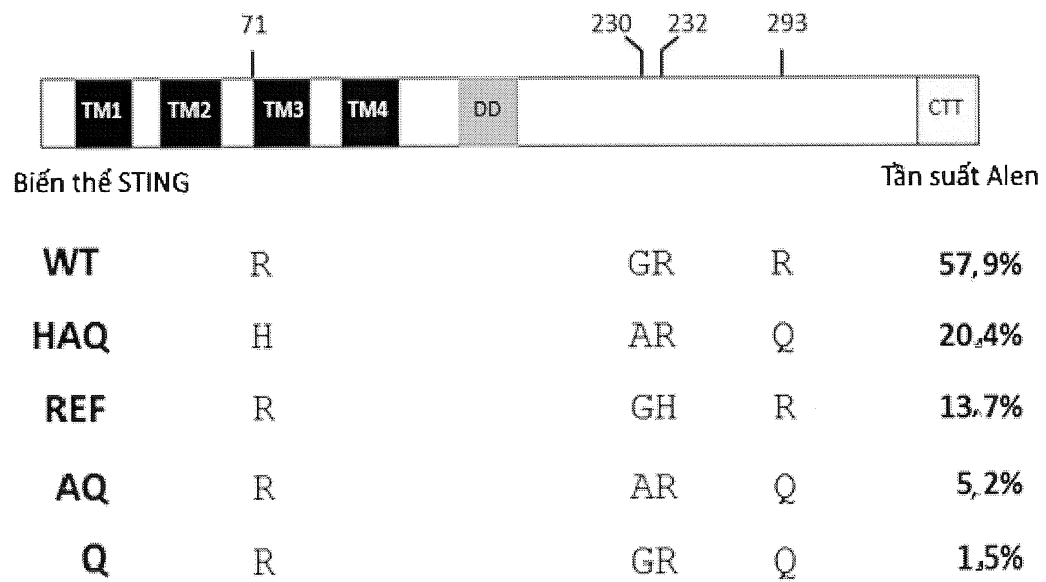
Hình 11C



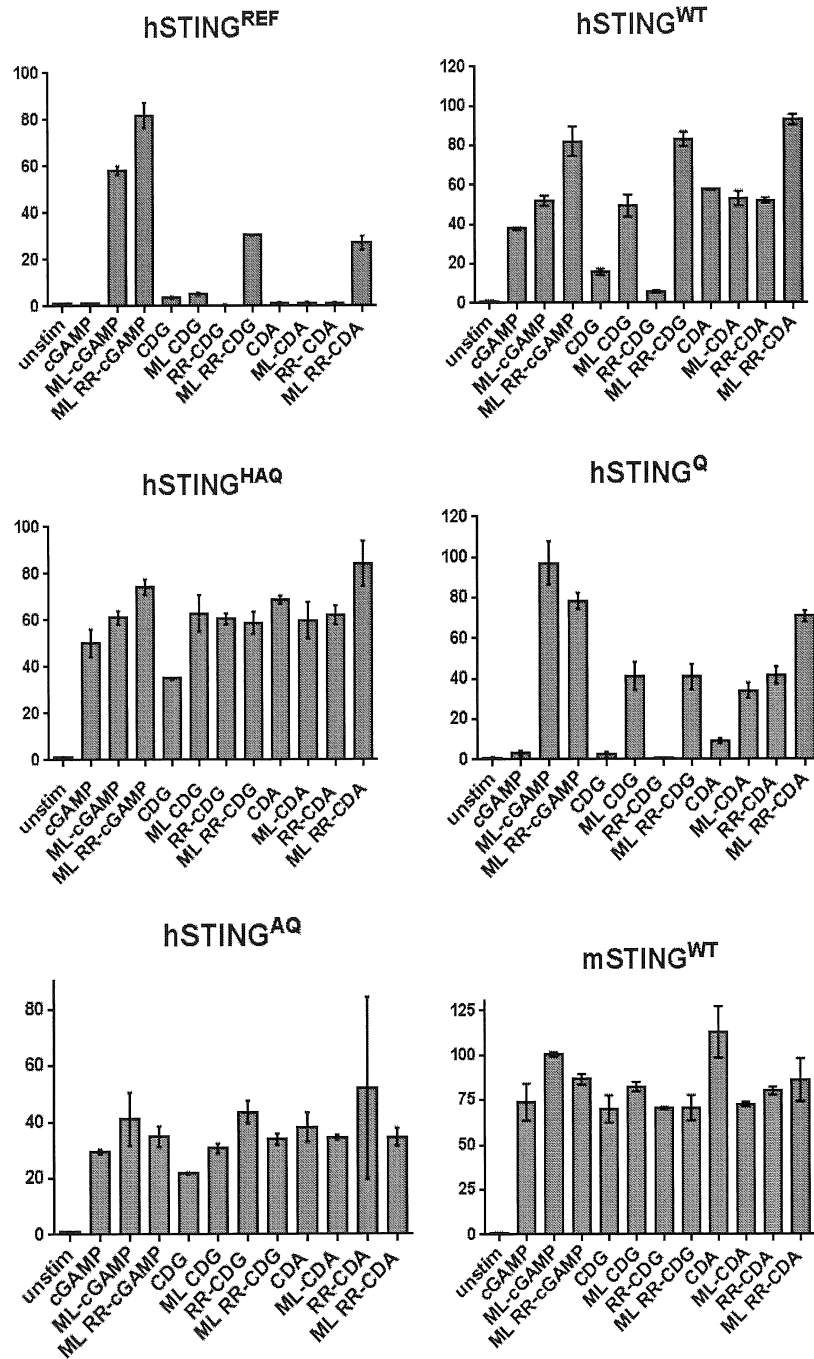
Hình 12



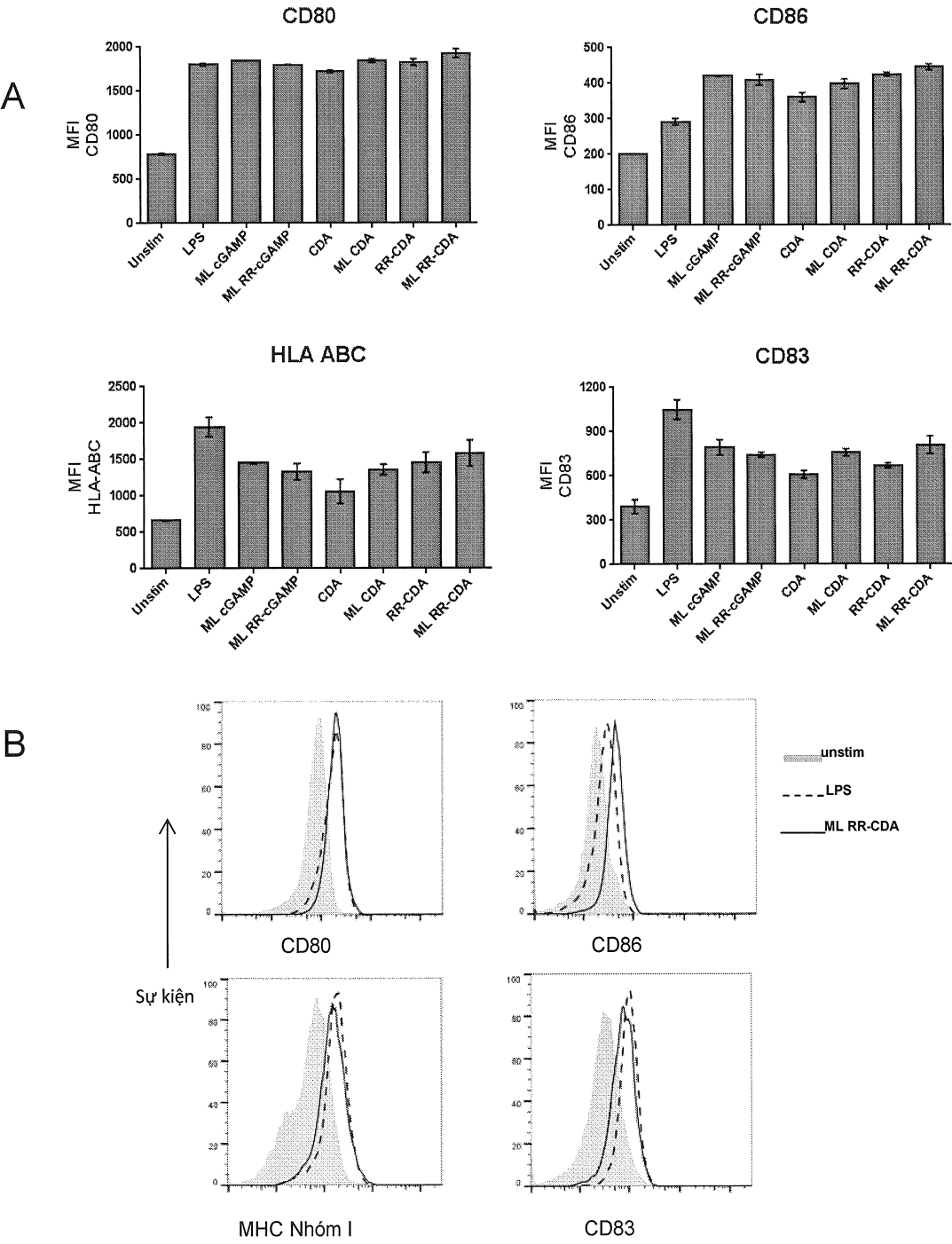
Hình 13



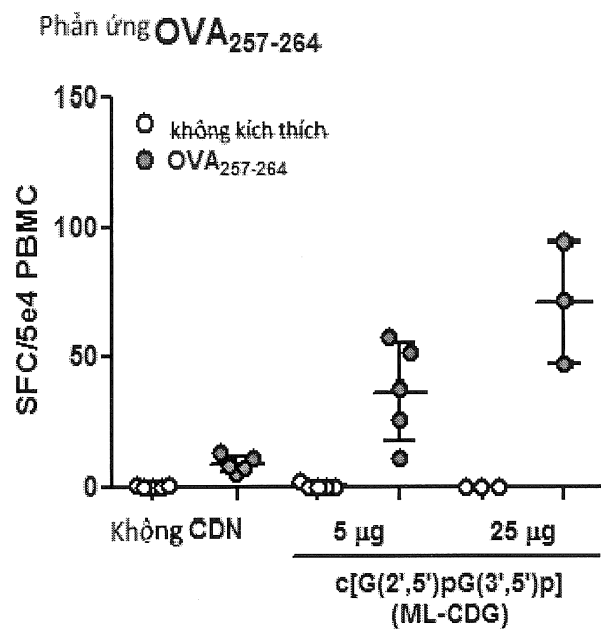
Hình 14



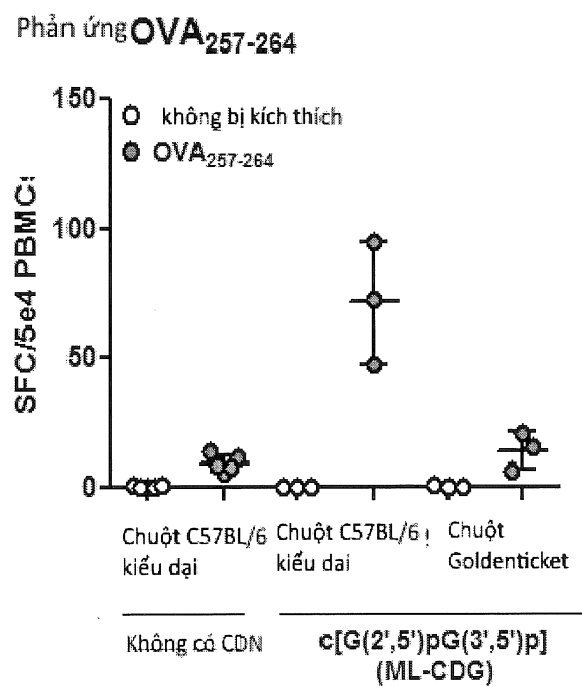
Hình 15



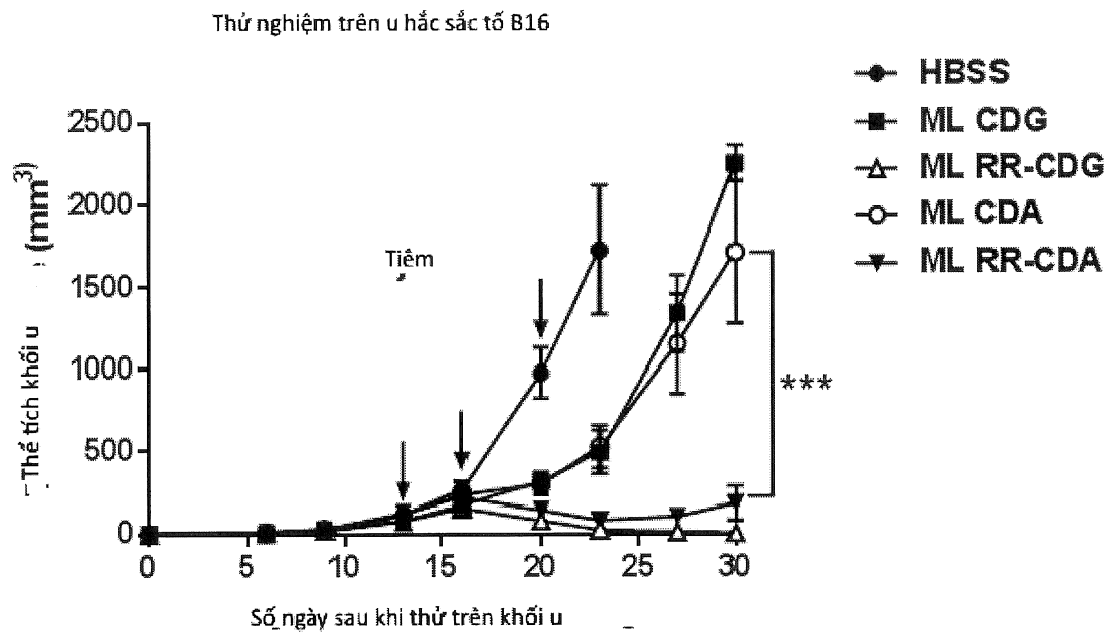
Hình 16



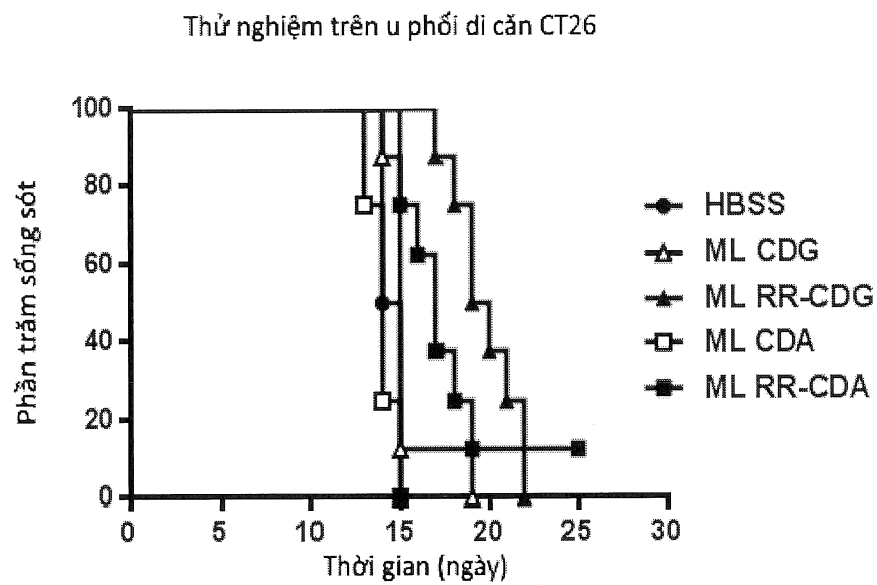
Hình 17



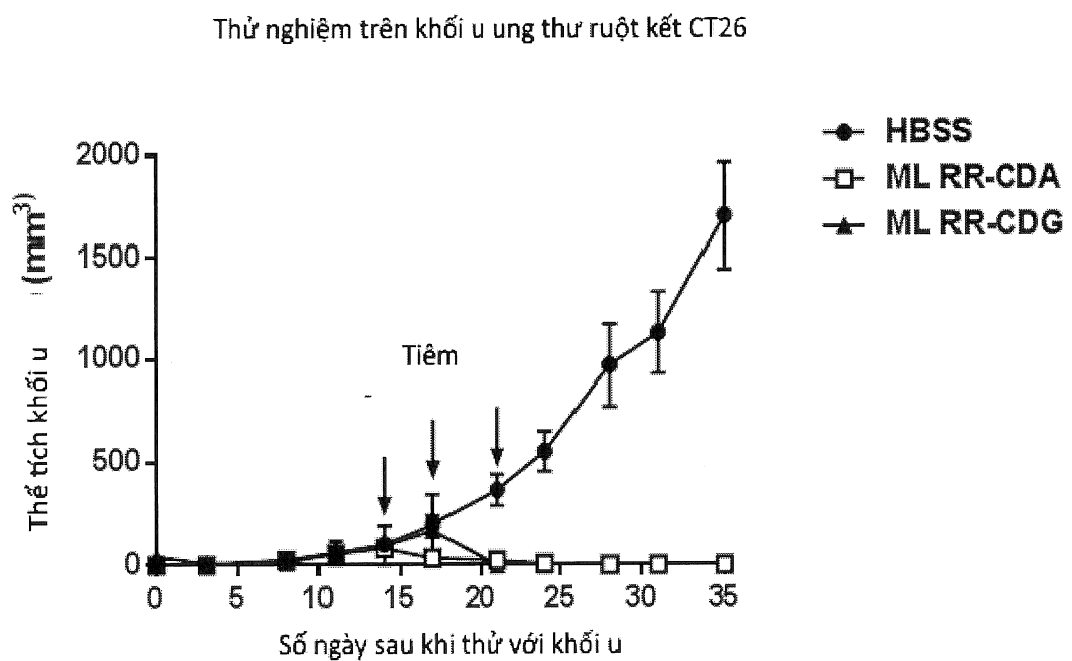
Hình 18



Hình 19A

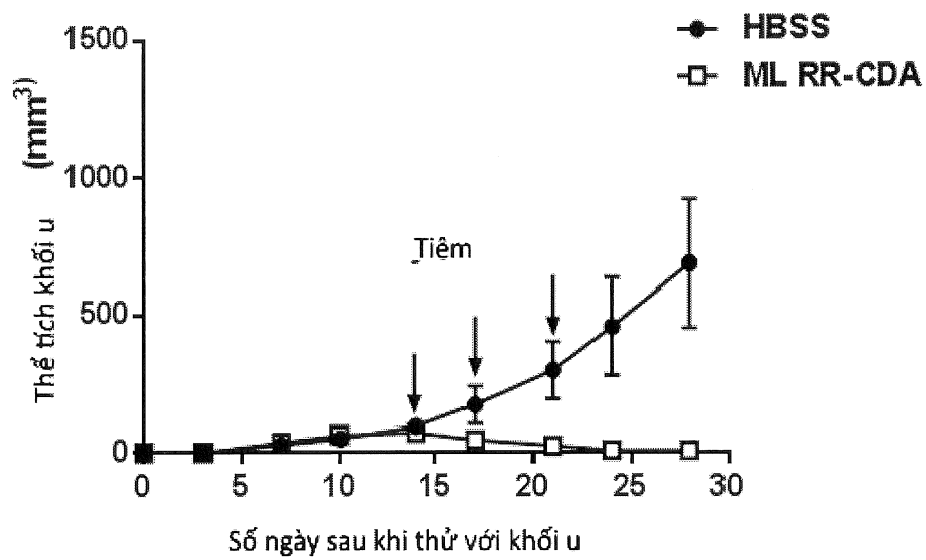


Hình 19B



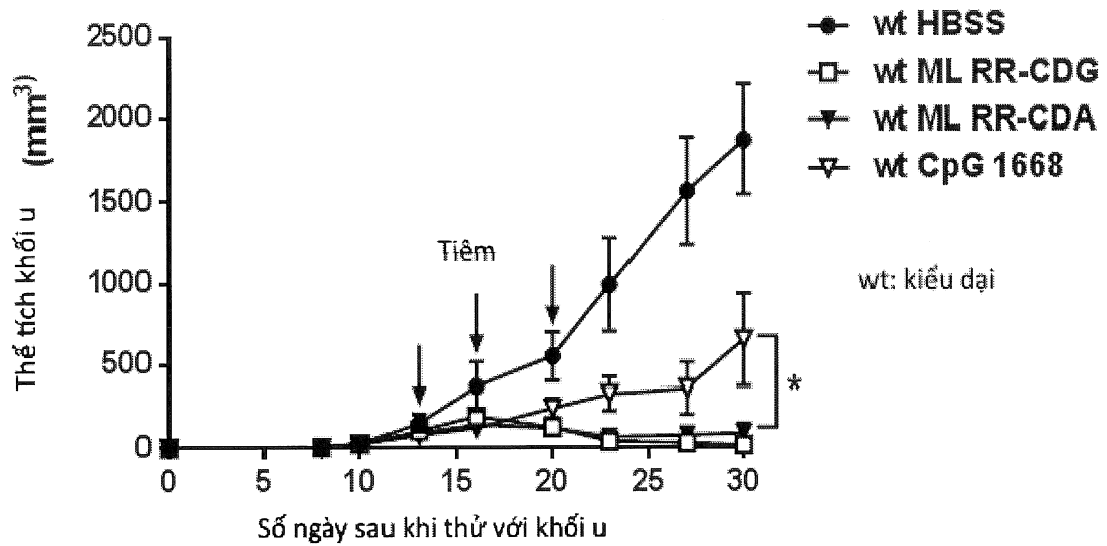
Hình 19C

Thử nghiệm trên khối u ung thư vú eT1



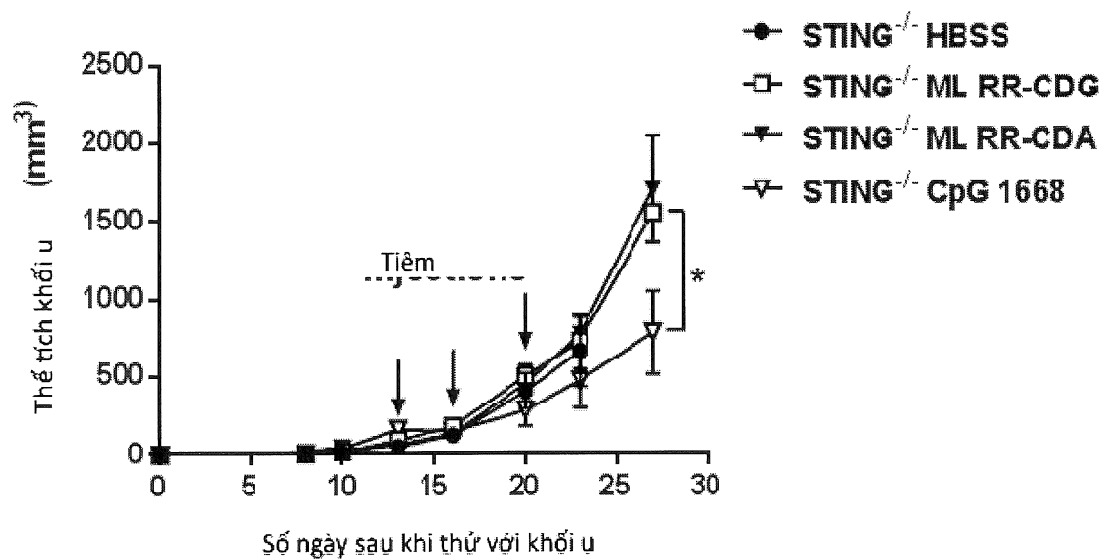
Hình 20A

Sự tăng trưởng của khối u B16 kiểu đại

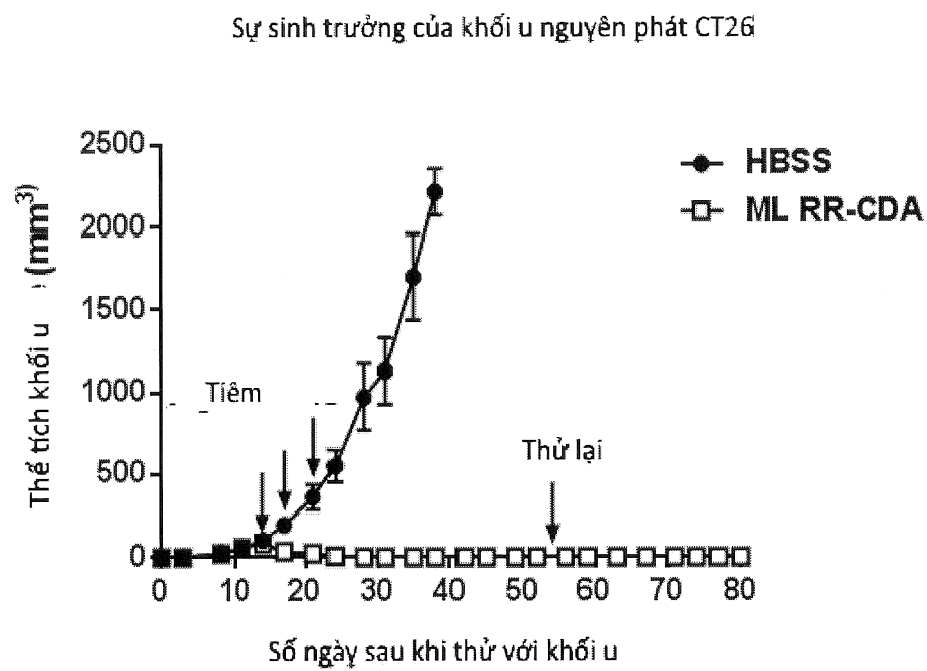


Hình 20B

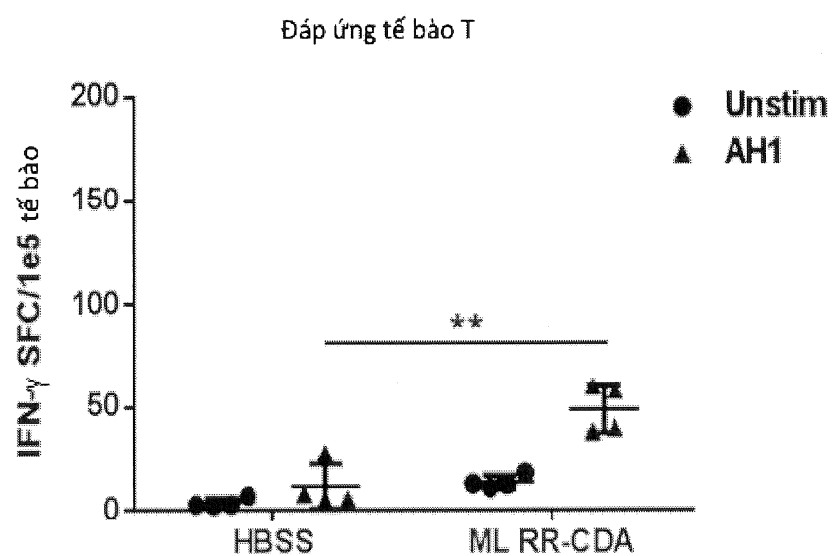
Sự tăng trưởng của khối u B16 ở Goldenticket



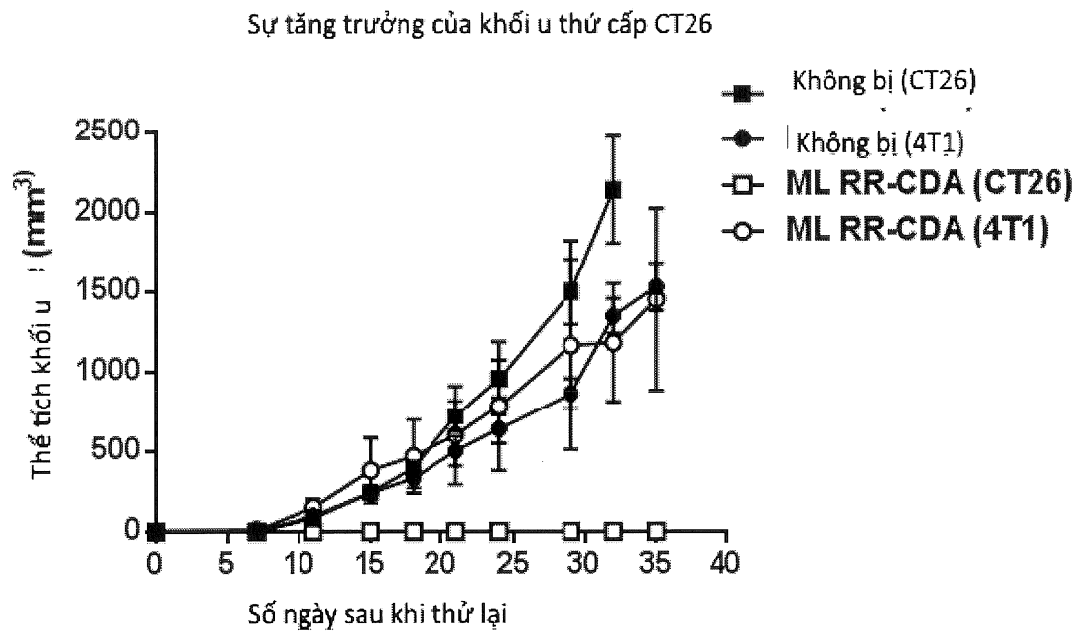
Hình 21A



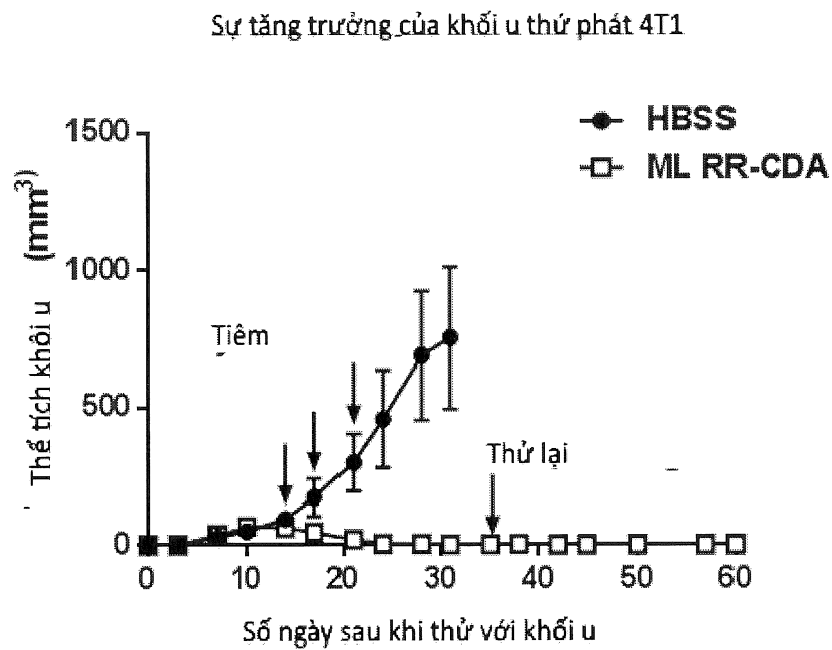
Hình 21B



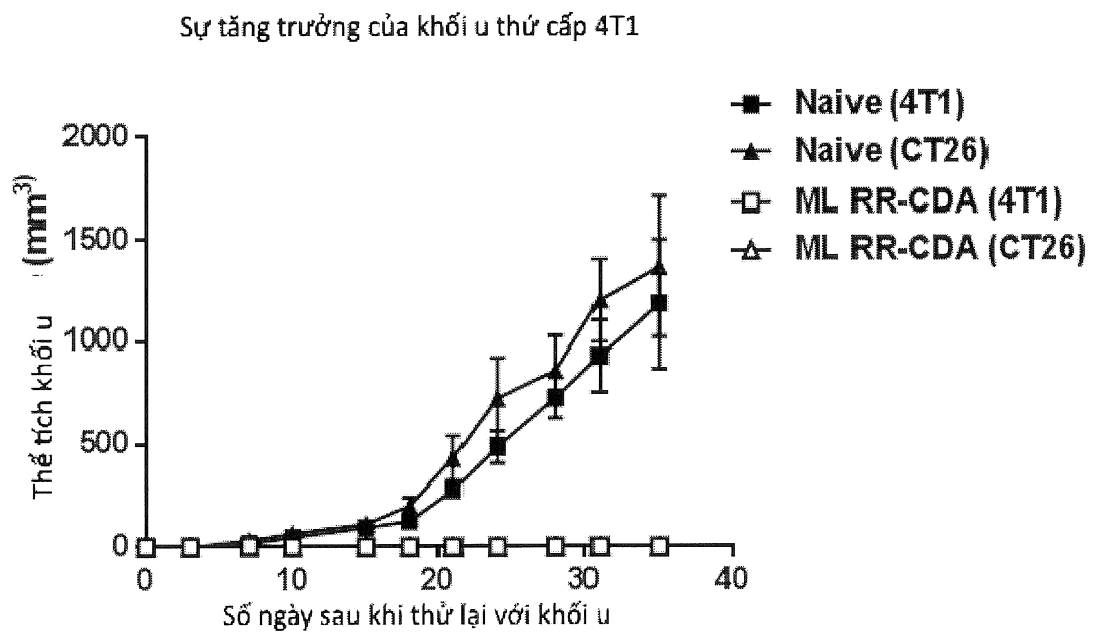
Hình 21C



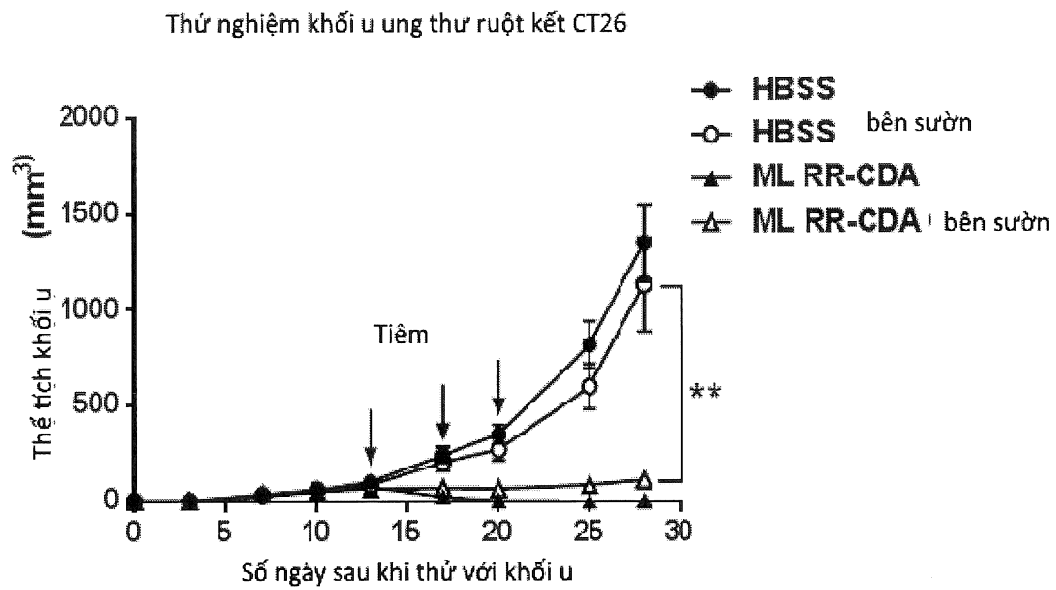
Hình 22A



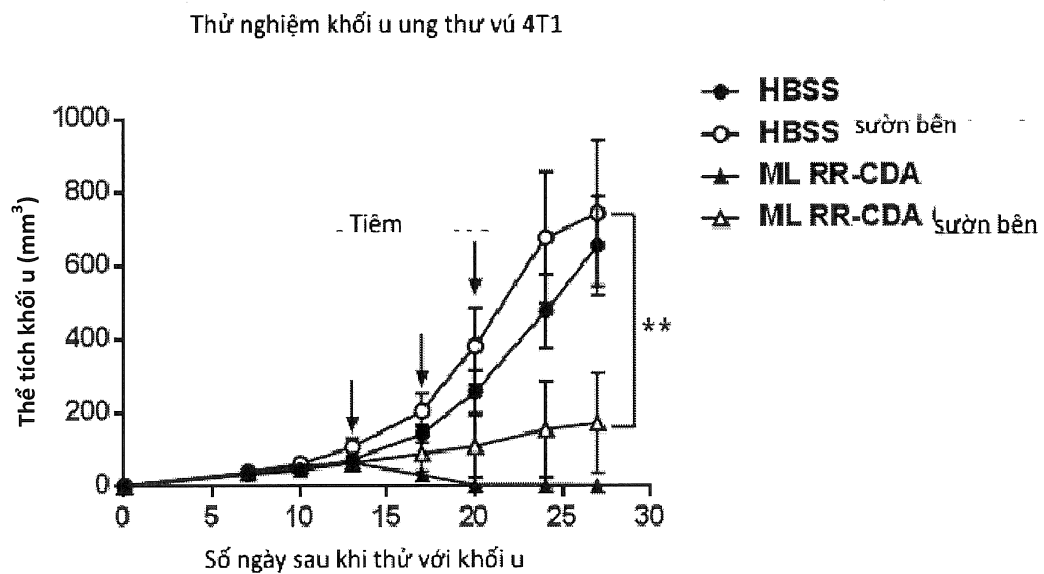
HÌNH 22B



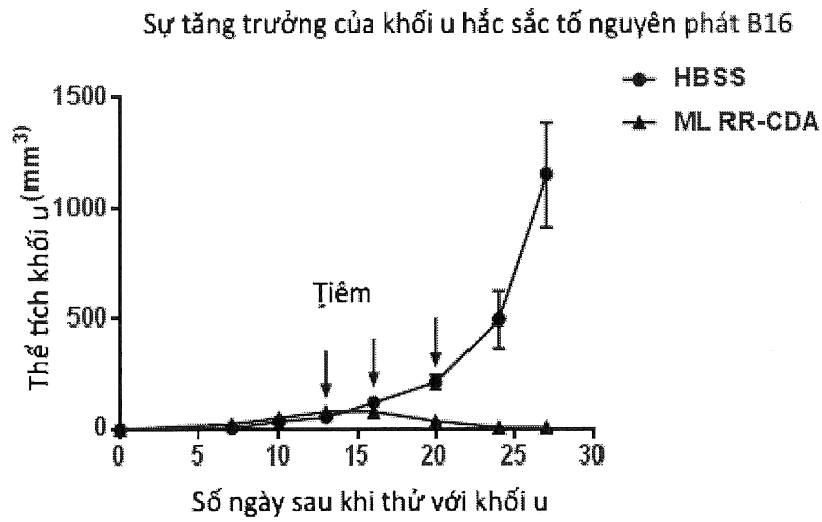
Hình 23A



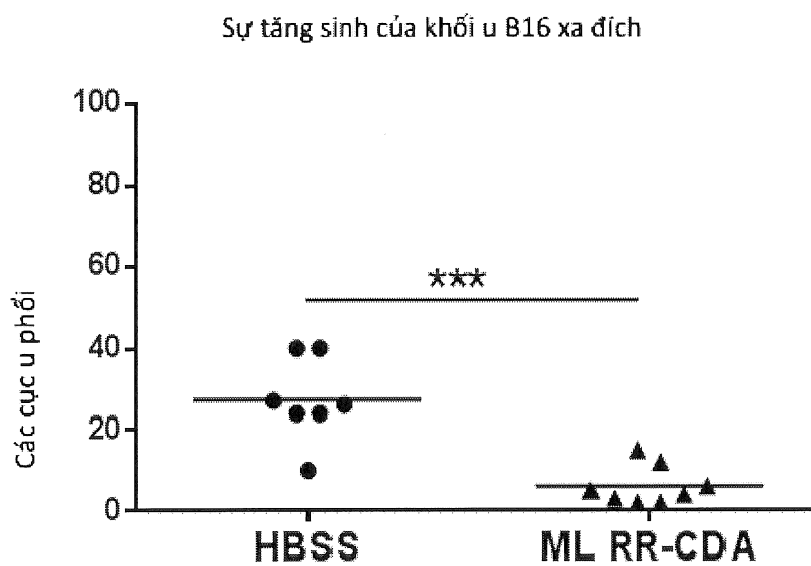
Hình 23B



Hình 24A

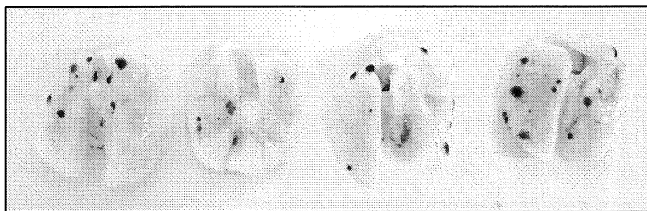


Hình 24B



Hình 24C

HBSS



ML RR-CDA

