



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

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

(11)



1-0028880

(51)^{2019.01} C12N 15/09; A61K 39/39; A61P 37/04; (13) B
A61K 39/00; A61P 35/00

(21) 1-2019-05833

(22) 29/03/2017

(86) PCT/JP2017/013025 29/03/2017

(87) WO 2018/179172 A1 04/10/2018

(45) 25/07/2021 400

(43) 30/01/2020 382A

(73) Shionogi & Co., Ltd. (JP)

1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan

(72) KUGIMIYA, Akira (JP); TANINO, Tetsuya (JP); SEKIGUCHI, Mitsuaki (JP);

MITSUOKA, Yasunori (JP); KURODA, Norikazu (JP); NAKAMURA, Jun (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

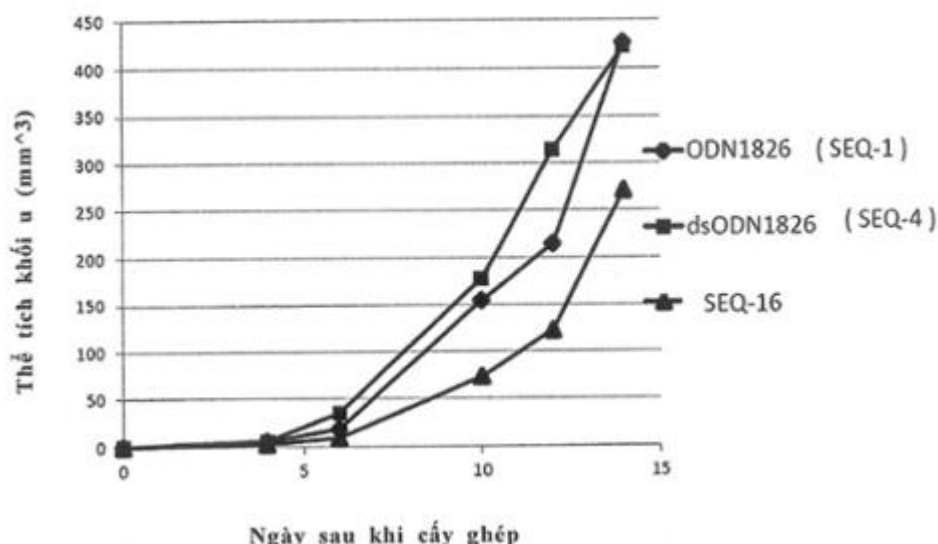
(54) DƯỢC PHẨM CHỨA OLIGONUCLEOTIT SỢI KÉP

(57) Sáng chế đề cập đến oligonucleotit sợi kép bao gồm oligonucleotit CpG được đề cập dưới đây, ở dạng dẫn xuất axit nucleic có hoạt tính kích thích miễn dịch.

Tá dược bao gồm oligonucleotit sợi kép, trong đó

sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit,

sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, và lipit liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất axit nucleic có hoạt tính kích thích miễn dịch. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến oligonucleotit sợi kép trong đó sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG, và sợi thứ hai liên kết với lipit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vaccin vốn là thuốc dùng cho bệnh nhiễm khuẩn hoặc ung thư sử dụng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên. Tá dược là hợp chất có hoạt tính kích thích miễn dịch mà được sử dụng để tăng cường hiệu quả hoặc độ bền của vaccin, và các loại tá dược khác nhau như muối nhôm, nhũ tương và liposom đã được nghiên cứu hoặc phát triển (tài liệu phi sáng chế 1 hoặc tương tự).

Oligodeoxynucleotit sợi đơn bao gồm motif dinucleotit của xytosin guanin (5'-CpG-3') (ssCpG ODN) được biết đến là một trong số các tá dược. ssCpG ODN là các phối tử của thụ thể giống Toll 9 (Toll-like receptor 9, TLR9), và các tác nhân gây cảm ứng cực kỳ hiệu quả của các đáp ứng miễn dịch Th1 hoặc lympho bào T độc tế bào (cytotoxic T-lymphocyte, CTL) thông qua TLR9 để kích thích hệ miễn dịch. Tuy nhiên, có các vấn đề liên quan đến độ ổn định, tính độc, dược động học in vivo hoặc vấn đề tương tự của các ssCpG ODN khi sử dụng một mình. Phương pháp mà ssCpG ODN được kết nang trong hạt nano được tạo ra từ lớp kép lipit (tài liệu phi sáng chế 2), phương pháp mà lipit liên kết với đầu 5' của ssCpG ODN (tài liệu phi sáng chế 3 hoặc tài liệu phi sáng chế 1) hoặc phương pháp tương tự được biết đến là biện pháp để giải quyết các vấn đề này.

Hơn nữa, đã biết rằng đặc tính của tá dược bị biến mất khi ssCpG ODN được sử dụng làm ADN sợi kép (dsCpG ODN) bằng cách ủ sợi thứ nhất và sợi thứ hai (tài liệu phi sáng chế 4). Tài liệu phi sáng chế 5 bộc lộ rằng khi chỉ có một mình thì dsCpG ODN không thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch, nhưng khi dsCpG ODN được kết nang trong hạt lipofectin, thì dsCpG ODN bao gồm motif CpG hoặc motif GpC lại thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2013/151771

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Trends in immunology, 2009, 30(1), 23-32

Tài liệu phi sáng chế 2: Advanced Drug Delivery Review, 2009, 61(3), 233-242

Tài liệu phi sáng chế 3: Nature, 2014, 507, 519-522

Tài liệu phi sáng chế 4: Eur. J. Immunol., 2003, 33, 1382-1392

Tài liệu phi sáng chế 5: BMB reports, 2010, 43(3), 164-169

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được sáng chế giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất các dẫn xuất axit nucleic mới có hoạt tính kích thích miễn dịch, các dẫn xuất này hữu ích để làm tá dược cho vaccin và/hoặc để làm chính vaccin.

Cách thức giải quyết vấn đề

Tài liệu phi sáng chế 4 và tài liệu phi sáng chế 5 bộc lộ rằng việc cho sử dụng dsCpG ODN không thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch. Hơn nữa, tài liệu phi sáng chế 5 bộc lộ rằng khi dsCpG ODN được kết nang trong hạt lipofectin, dsCpG ODN bao gồm motif CpG (ODN4531) hoặc motif GpC (ODN4531GC) gây ra sự biểu hiện IL-8 và HLR-DRA, nghĩa là bằng phương pháp độc lập với trình tự CG. Dựa trên sự việc là dsCpG ODN bị thoái biến nhanh trong tế bào so với ssCpG ODN, tài liệu này gợi ý rằng lý do mà dsCpG ODN được kết nang trong hạt lipofectin lại thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch là việc kết nang dsCpG ODN có thể bảo vệ nó không bị thoái biến nhanh (trang 165, cột bên phải, dòng 14 đến 16).

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu chuyên sâu để tổng hợp oligonucleotit sợi kép (oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế), trong đó sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG, và sợi thứ hai là oligonucleotit bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất và liên kết với lipit. Họ phát hiện ra rằng tính cảm ứng của CTL đặc hiệu kháng nguyên bởi vaccin được tăng cường và thể hiện tác dụng chống khối u bằng cách cho sử dụng oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế làm tá dược cùng với peptit kháng nguyên của khối u (khi oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế được sử dụng làm tá dược, nó cũng được gọi là “tá dược theo sáng chế”). Ngoài ra, họ phát

hiện ra rằng có oligonucleotit sợi kép liên kết lipit trong sáng chế mà tự nó thể hiện tác dụng chống khối u mạnh, nghĩa là, có tính hữu ích để làm vaccin chống ung thư (khi oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế được sử dụng làm vaccin, nó cũng được gọi là “vaccin theo sáng chế”). Nghĩa là, oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch. Hơn nữa, oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế có độ ổn định chuyển hóa, độ tan trong nước cao, và ít tính độc nên đủ an toàn để dùng làm thuốc.

Ví dụ, khi tá dược theo sáng chế trong đó sợi thứ hai là oligonucleotit ADN, oligonucleotit gồm các dẫn xuất nucleosit có OMe ở vị trí 2' của đường hoặc oligonucleotit gồm các dẫn xuất nucleosit có F ở vị trí 2' của đường được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, chúng thể hiện tính cảm ứng CTL tăng cường hoặc tác dụng chống khối u mạnh so với ssCpG ODN (ví dụ, kết quả 1-A, B, kết quả 7-A, B và kết quả 9-A, B trong Ví dụ 3). Mặt khác, oligonucleotit sợi kép liên kết lipit trong đó sợi thứ hai là oligonucleotit ARN (SEQ-40) không có tác dụng chống khối u (Kết quả 7-B).

Khi tá dược theo sáng chế trong đó lipit bao gồm hai trong số các mạch axyl có từ 14 đến 24 nguyên tử cacbon liên kết ở đầu 3' hoặc 5' của sợi thứ hai được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, tá dược này thể hiện tác dụng chống khối u mạnh so với ssCpG ODN (ví dụ, kết quả 2-A, B trong ví dụ 3). Mặt khác, khi oligonucleotit sợi kép trong đó lipit bao gồm hai mạch axyl có 10 nguyên tử cacbon liên kết ở đầu 5' của sợi thứ hai (SEQ-12) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, nó không thể hiện tác dụng chống khối u tăng cường so với ssCpG ODN. Ngoài ra, khi tá dược theo sáng chế trong đó lipit bao gồm hai trong số các mạch axyl có từ 12 đến 20 nguyên tử cacbon liên kết ở đầu 3' hoặc 5' của sợi thứ hai, và hơn nữa lipit liên kết ở đầu kia được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, tá dược này thể hiện tính cảm ứng CTL tăng cường hoặc tác dụng chống khối u mạnh so với ssCpG ODN (ví dụ, kết quả 3-A, B trong ví dụ 3).

Khi tá dược theo sáng chế trong đó chiều dài của sợi thứ hai bằng 50% đến 100% chiều dài của sợi thứ nhất (oligonucleoti CpG) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, tá dược này thể hiện mức độ cảm ứng CTL

tăng cường hoặc tác dụng chống khối u mạnh so với ssCpG ODN (ví dụ, kết quả 4-A, B, kết quả 5-A, kết quả 8-A, B và kết quả 9-A, B trong ví dụ 3).

Khi tá dược theo sáng chế trong đó lipit liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối oligonucleotit (ví dụ, dGdG, dTdT và dAdA) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u, tá dược này thể hiện mức độ cảm ứng CTL tăng cường hơn hoặc tác dụng chống khối u mạnh hơn so với tá dược theo sáng chế không có đoạn nối (ví dụ, kết quả 8-A, B trong ví dụ 3).

Ngoài ra, các oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế không có tính độc toàn thân, và điều này gợi ý về độ an toàn cao (ví dụ 5).

Hơn nữa, kết quả gây miễn dịch bằng tá dược theo sáng chế và protein PCR-V có nguồn gốc từ *Pseudomonas aeruginosa* vốn là nguyên nhân gây bệnh nhiễm khuẩn cũng gợi ý về hoạt tính kích thích miễn dịch ở dạng tá dược của vacxin đối với bệnh nhiễm khuẩn (ví dụ 6).

Khi tá dược theo sáng chế trong đó lipit liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối oligonucleotit (dGdGdGdGdG) (SEQ-121) được sử dụng một mình, tá dược này thể hiện tác dụng chống khối u mạnh so với ssCpG ODN (ví dụ 4).

Như vậy, sáng chế đề cập đến các đối tượng sau đây.

(A1) Oligonucleotit sợi kép, trong đó

sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit,

sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, nhưng ngoại trừ oligonucleotit ARN,

chiều dài của sợi thứ hai lớn hơn hoặc bằng 50% chiều dài của sợi thứ nhất, và

lipit bao gồm (các) mạch hydrocacbon chứa từ 12 đến 30 nguyên tử C liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.

(A2) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A1), trong đó oligonucleotit của sợi thứ hai là oligonucleotit gồm nucleosit ADN và/hoặc các dẫn xuất nucleosit.

(A3) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A2), trong đó dẫn xuất nucleosit là nucleosit có nhóm thế ở vị trí 2' của đường và/hoặc nucleosit có cấu trúc cầu giữa vị trí 4' và vị trí 2' của đường.

(A4) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A3), trong đó cấu trúc cầu giữa

vị trí 4' và vị trí 2' của đường là 4'-(CH₂)_m-O-2', trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4.

(A5) Oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A4), trong đó lipit là diaxyl lipit.

(A6) Oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A5), trong đó lipit liên kết ở đầu 3' và/hoặc đầu 5' của sợi thứ hai.

(A7) Oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A6), trong đó đoạn nối là đoạn nối oligonucleotit.

(A8) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A7), trong đó đoạn nối là - (dX¹)u-, trong đó từng nhóm X¹ độc lập là A, G, C hoặc T, và u là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

(A9) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A1) được chọn từ nhóm gồm SEQ-61, SEQ-119, SEQ-121, SEQ-170 và SEQ-192.

(A10) Oligonucleotit sợi kép theo mục (A1) được chọn từ nhóm gồm SEQ-59, SEQ-166, SEQ-168, SEQ-216, SEQ-272, SEQ-280, SEQ-290, SEQ-294, SEQ-310, SEQ-373 và SEQ-384.

(A11) Dược phẩm bao gồm oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A10).

(A12) Dược phẩm theo mục (A11), còn bao gồm kháng nguyên.

(A13) Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn, bao gồm bước cho sử dụng oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A10).

(A14) Sử dụng oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A10) để sản xuất tác nhân dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn.

(A15) Oligonucleotit sợi kép theo mục bất kỳ trong số các mục từ (A1) đến (A10) dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn.

(A16) Dược phẩm theo mục (A12), trong đó kháng nguyên là kháng nguyên vi sinh vật, kháng nguyên tự thân hoặc chất gây nghiện.

(A18) Dược phẩm theo mục (A16), trong đó kháng nguyên vi sinh vật là kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên virus hoặc kháng nguyên ký sinh

trùng.

(A18) Dược phẩm theo mục (A16), trong đó kháng nguyên tự thân là kháng nguyên khối u, kháng nguyên liên quan đến bệnh Alzheimer, kháng nguyên đối với kháng thể người, hoặc kháng nguyên mà được biểu hiện từ các yếu tố retrovirut nội sinh của người.

(A19) Dược phẩm theo mục (A16), trong đó chất gây nghiện là nicotin hoặc cocain.

(A20) Phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục (A12), (A16) đến (A19) với lượng hữu hiệu.

(A21) Phương pháp theo mục (A20), trong đó đáp ứng miễn dịch là sự tăng tính cảm ứng của lympho bào T độc tế bào đặc hiệu so với đối chứng.

(A22) Phương pháp theo mục (A20) hoặc (A21), trong đó đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn.

Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các đối tượng sau đây.

(B1) Tá dược gồm oligonucleotit sợi kép, trong đó sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit, sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, và

lipit liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.

(B2) Tá dược theo mục (B1), trong đó oligonucleotit của sợi thứ hai là oligonucleotit gồm nucleosit ADN và/hoặc các dẫn xuất nucleosit.

(B3) Tá dược theo mục (B2), trong đó dẫn xuất nucleosit là nucleosit có nhóm thế ở vị trí 2' của đường và/hoặc nucleosit có cấu trúc cầu giữa vị trí 4' và vị trí 2' của đường.

(B4) Tá dược theo mục (B3), trong đó nhóm thế là OCH_3 .

(B5) Tá dược theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B1) đến (B4), trong đó lipit là diaxyl lipit.

(B6) Tá dược theo mục (B5), trong đó mạch axyl của diaxyl lipit có từ 14 đến 30 nguyên tử cacbon.

(B7) Tá dược theo mục (B5) hoặc (B6), trong đó lipit liên kết ở đầu 5' của sợi thứ hai.

(B8) Tá dược theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B1) đến (B7), trong đó chiều dài của sợi thứ hai lớn hơn hoặc bằng 50% chiều dài của sợi thứ nhất.

(B9) Tá dược theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B1) đến (B9), trong đó đoạn nối là đoạn nối oligonucleotit.

(B10) Tá dược theo mục (B9), trong đó đoạn nối là dX^1dX^2 , trong đó X^1 hoặc X^2 là A, G, C hoặc T.

(B11) Chế phẩm vaccin bao gồm kháng nguyên và tá dược theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B1) đến (B10).

(B12) Chế phẩm vaccin theo mục (B11), trong đó kháng nguyên là kháng nguyên vi sinh vật, kháng nguyên tự thân hoặc chất gây nghiện.

(B13) Chế phẩm vaccin theo mục (B12), trong đó kháng nguyên vi sinh vật là kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên virus hoặc kháng nguyên ký sinh trùng.

(B14) Chế phẩm vaccin theo mục (B12), trong đó kháng nguyên tự thân là kháng nguyên khối u, kháng nguyên liên quan đến bệnh Alzheimer, kháng nguyên đối với kháng thể người, hoặc kháng nguyên mà được biểu hiện từ các yếu tố retrovirus nội sinh của người.

(B15) Chế phẩm vaccin theo mục (B12) trong đó chất gây nghiện là nicotin hoặc cocain.

(B16) Phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng chế phẩm vaccin theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B11) đến (B15) với lượng hữu hiệu.

(B17) Phương pháp theo mục (B16), trong đó đáp ứng miễn dịch là sự tăng tính cảm ứng của lympho bào T độc tế bào đặc hiệu được cảm ứng so với đối chứng.

(B18) Phương pháp theo mục (B16) hoặc (B17), trong đó đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn.

(B19) Phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chế phẩm vaccin theo mục bất kỳ trong số các mục từ (B11) đến (B14) với lượng hữu hiệu để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn so với đối chứng.

Hiệu quả của sáng chế

Oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội chống lại kháng nguyên đích. Không phát hiện thấy tính độc toàn thân, và do đó chúng được dự định sử dụng làm thuốc ở dạng tá dược cho vacxin hoặc chính vacxin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN1826, SEQ-1), dsCpG ODN (SEQ-4) hoặc tá dược theo sáng chế (SEQ-16) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.2 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN1826, SEQ-1) hoặc tá dược theo sáng chế có lipit ở cả hai đầu (SEQ-46 hoặc SEQ-48) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.3 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN1826, SEQ-1), ssCpG ODN mang phối tử lipit (SEQ-2) hoặc tá dược theo sáng chế mà chiều dài của sợi hỗ trợ là khác biệt (SEQ-8 hoặc SEQ-10) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.4 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN1826, SEQ-1), ssCpG ODN mang phối tử lipit (SEQ-2), tá dược theo sáng chế (SEQ-26) hoặc Montanide được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.5 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN1826, SEQ-1), ssCpG ODN mang phối tử lipit (SEQ-2) hoặc tá dược theo sáng chế (SEQ-38) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.6 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49), tá dược theo sáng chế mà chiều dài của sợi hỗ trợ là khác biệt (SEQ-51 hoặc SEQ-61) hoặc tá dược theo sáng chế có đoạn nối (SEQ-63 hoặc SEQ-65) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.7 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá dược theo sáng chế trong đó monome nucleic của sợi hỗ trợ là 2'-OMe-ARN (SEQ-67 hoặc SEQ-69) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.8 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá dược theo sáng chế có đoạn nối oligonucleotit (SEQ-119 hoặc

SEQ-192) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.9 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá được theo sáng chế có đoạn nối oligonucleotit (SEQ-121) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.10 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá được theo sáng chế có đoạn nối oligonucleotit (SEQ-152 hoặc SEQ-158) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.11 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá được theo sáng chế trong đó lipit liên kết ở đầu 3' và/hoặc đầu 5' (SEQ-188, SEQ-192 hoặc SEQ-194) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.12 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá được theo sáng chế có đoạn nối oligonucleotit (SEQ-164) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.13 thể hiện tác dụng chống khối u khi ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc tá được theo sáng chế trong đó lipit liên kết chỉ ở đầu 3' (SEQ-170) được sử dụng cùng với peptit kháng nguyên của khối u (peptit TRP2).

Fig.14 thể hiện tác dụng chống khối u của ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49) hoặc vacxin theo sáng chế (SEQ-121) khi vắng mặt peptit kháng nguyên của khối u.

Fig.15 thể hiện hiệu giá kháng thể sau khi sử dụng dưới da vacxin kháng nguyên PCRV cùng với ssCpG ODN (ODN2006, SEQ-49), tá được theo sáng chế (SEQ-61 hoặc SEQ-121) hoặc tá được Freund.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây, trừ khi được nêu theo cách khác, sẽ được sử dụng theo nghĩa thường dùng trong lĩnh vực.

Trong sáng chế, phương pháp thao tác di truyền mà đã biết rõ trong lĩnh vực thì có thể được sử dụng. Ví dụ, đây là phương pháp được mô tả trong Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012), hoặc Current Protocols Essential Laboratory

Techniques, Current Protocols (2012).

Các thuật ngữ được sử dụng trong phần mô tả này được giải thích dưới đây. Mỗi thuật ngữ, trừ khi được nêu theo cách khác, có cùng ý nghĩa khi nó được sử dụng một mình hoặc cùng với các thuật ngữ khác.

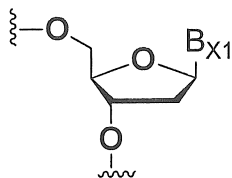
Trong phần mô tả này, “tá được” dùng để chỉ hợp chất có hoạt tính kích thích miễn dịch mà được sử dụng để tăng cường hiệu quả hoặc độ bền của đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên vaccin.

“Nucleosit” dùng để chỉ hợp chất trong đó bazơ axit nucleic và đường được liên kết bởi liên kết N-glycosit.

“Oligonucleotit” dùng để chỉ các nucleotit trong đó một số loại nucleotit giống nhau hoặc khác nhau được liên kết bởi liên kết giữa các nucleosit như liên kết phosphodiester.

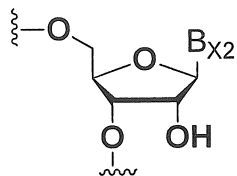
Liên kết giữa đường và đường trong oligonucleotit (liên kết giữa các nucleosit) có thể là liên kết có axit nucleic tự nhiên, phosphodiester (D-oligo), liên kết được cải biến nhân tạo hoặc liên kết không có nguyên tử phospho. Liên kết bất kỳ mà đã biết rõ trong lĩnh vực này thì đều có thể được sử dụng. Các ví dụ về liên kết được cải biến nhân tạo là phosphorothioat (S-oligo), methylphosphonat (M-oligo) và boranophosphat. Hơn nữa, liên kết được mô tả trong WO2013/022966, WO2011/005761, WO2014/012081, WO2015/125845 hoặc tài liệu tương tự thì đều có thể được sử dụng. Ví dụ về liên kết không có nguyên tử phospho là nhóm thế hóa trị hai được tạo dẫn xuất từ carboxycyl không thơm hoặc nhóm tương tự được thế bằng alkyl, carboxycyl không thơm, haloalkyl hoặc halogen. Ví dụ có thể kể đến là nhóm thế hóa trị hai được tạo dẫn xuất từ siloxan, sulfua, sulfoxit, sulfon, axetyl, axetyl format, axetyl thioformat, axetyl metylen format, axetyl thioformat, alkenyl, sulfamat, metylenimino, metylenhydrazino, sulfonat, sulfonamit, amit hoặc nhóm tương tự. Trong oligonucleotit, các liên kết có thể là giống hoặc khác nhau.

Trong phần mô tả này, “nucleosit ADN” hoặc “nucleosit ARN” dùng để chỉ nucleosit ADN tự nhiên hoặc nucleosit ARN tự nhiên, và một phần của nucleotit, mà là 1 đơn vị cho hợp phần oligonucleotit. “Nucleosit ADN tự nhiên” là hợp chất như dưới đây.



trong đó B_{X1} là adenin, guanin, xytosin hoặc thymin.

“Nucleosit ARN tự nhiên” là hợp chất như dưới đây.



trong đó B_{X2} là adenin, guanin, xytosin hoặc turaxil.

“Oligonucleotit ADN” dùng để chỉ oligonucleotit mà một số nucleosit ADN được liên kết, và “oligonucleotit ARN” dùng để chỉ oligonucleotit mà một số nucleosit ARN được liên kết.

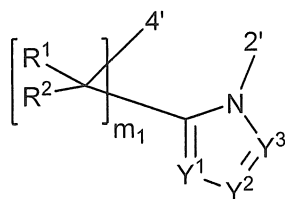
Trong phần mô tả này, “dẫn xuất nucleosit” dùng để chỉ nucleosit có bazơ nucleic và/hoặc phần đường của nucleosit ADN hoặc nucleosit ARN được cải biến nhân tạo. Dạng cải biến cho nucleosit bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực này thì đều có thể được sử dụng.

Các ví dụ về dạng cải biến cho bazơ nucleic là 5-metylxytosin, 5-hydroxy methylxytosin và 5-propynylxytosin.

Ví dụ về cải biến đối với phần đường là nhóm thế ở vị trí 2' của đường. Các ví dụ có thể kể đến là 2'-F, 2'-OCH₃ (2'-OMe) và 2'-OCH₂CH₂OCH₃ (2'-MOE).

Ví dụ khác có thể kể đến là cấu trúc cầu sau đây giữa vị trí 4' và vị trí 2' của đường.

4'-(CR¹R²)_m-O-2', 4'-(CR¹R²)_m-S-2', 4'-(CR¹R²)_m-O-C(=O)-2', 4'-(CR¹R²)_m-NR³-O-(CR¹R²)_{m1}-2', 4'-(CR¹R²)_{m1}-C(=O)-NR³-2', 4'-(CR¹R²)_{m2}-C(=O)-NR³-Y⁴-2', 4'-(CR¹R²)_{m1}-SO₂-NR³-2', hoặc



trong đó

Y⁴ là O, S, NH hoặc CH₂,

mỗi nhóm R^1 độc lập là nguyên tử hydro, halogen, xyano, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế hoặc alkynyl được thế hoặc không được thế,

mỗi nhóm R^2 độc lập là nguyên tử hydro, halogen, xyano, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế hoặc alkynyl được thế hoặc không được thế,

R^3 là nguyên tử hydro, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế, alkynyl được thế hoặc không được thế, carboxycyl thơm được thế hoặc không được thế, carboxycyl không thơm được thế hoặc không được thế, heteroxycyl thơm được thế hoặc không được thế, heteroxycyl không thơm được thế hoặc không được thế, carboxycylalkyl thơm được thế hoặc không được thế, carboxycylalkyl không thơm được thế hoặc không được thế, heteroxycylalkyl thơm được thế hoặc không được thế hoặc heteroxycylalkyl không thơm được thế hoặc không được thế,

Y^1 là CR^4 hoặc N,

Y^2 là CR^5 hoặc N,

Y^3 là CR^6 hoặc N,

R^4 , R^5 và R^6 độc lập là nguyên tử hydro, halogen, xyano, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế, alkynyl được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, alkyloxy được thế hoặc không được thế, alkylcarbonylamino được thế hoặc không được thế, alkenylcarbonylamino được thế hoặc không được thế, alkynylcarbonylamino được thế hoặc không được thế, alkylcarbamoyl được thế hoặc không được thế, alkenylcarbamoyl được thế hoặc không được thế, hoặc alkynylcarbamoyl được thế hoặc không được thế,

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4,

m_1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3, và

m_2 là 0 hoặc 1.

Tốt hơn, nếu R^1 và R^2 là nguyên tử hydro.

Tốt hơn, nếu R^3 là nguyên tử hydro, alkyl, alkenyl, alkynyl, carboxycyl thơm, carboxycyl không thơm, heteroxycyl thơm, heteroxycyl không thơm, carboxycylalkyl thơm, carboxycylalkyl không thơm,

heteroxyclylalkyl thơm hoặc heteroxyclylalkyl không thơm, và có thể có một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm α .

Nhóm α : nhóm hydroxyl, alkyl, alkyloxy, mercapto, alkylthio, amino, alkylamino và halogen.

Tốt hơn, nếu cấu trúc cầu là 4'-(CR¹R²)_m-O-2' hoặc 4'-(CR¹R²)_{m1}-C(=O)-NR³-2' (AmNA, axit nucleic có liên kết cầu),

trong đó,

mỗi nhóm R¹ độc lập là nguyên tử hydro, halogen, xyano, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế hoặc alkynyl được thế hoặc không được thế,

mỗi nhóm R² độc lập là nguyên tử hydro, halogen, xyano, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế hoặc alkynyl được thế hoặc không được thế,

R³ là nguyên tử hydro, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế hoặc alkynyl được thế hoặc không được thế,

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và

m₁ là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 2.

Tốt hơn nữa, nếu cấu trúc cầu là 4'-(CH₂)_m-O-2', trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, hoặc 4'-C(=O)-NR³-2', trong đó R³ là nguyên tử hydro hoặc alkyl.

4'-(CH₂)_m-O-2', trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tốt hơn nữa là 4'-CH₂-O-2' (LNA, Locked nucleic acid (axit nucleic bị khóa)). Các ví dụ và các phương pháp cho việc điều chế được mô tả trong WO98/39352, WO2003/068795, WO2005/021570 hoặc tài liệu tương tự.

Tốt hơn nữa, nếu 4'-C(=O)-NR³-2', trong đó R³ là nguyên tử hydro hoặc alkyl, là 4'-C(=O)-NCH₃-2'. Các ví dụ và các phương pháp cho việc điều chế được mô tả trong WO2011/052436.

Các ví dụ về dạng cải biến đã được biết rõ của nucleotit và phương pháp cải biến trong lĩnh vực này được mô tả trong các tài liệu sáng chế sau đây.

WO98/39352, WO99/014226, WO2000/056748, WO2005/021570, WO2003/068795, WO2011/052436, WO2004/016749, WO2005/083124,

WO2007/143315, WO2009/071680, WO2014/112463, WO2014/126229 và tài liệu tương tự.

“Halogen” bao gồm nguyên tử flo, nguyên tử clo, nguyên tử brom và nguyên tử iot. Nguyên tử flo và nguyên tử clo được đặc biệt ưu tiên.

“Alkyl” bao gồm nhóm hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 15 nguyên tử cacbon, tốt hơn là từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon và thậm chí tốt hơn nữa là từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, n-hexyl, isohexyl, n-heptyl, isoheptyl, n-octyl, isooctyl, n-nonyl và n-dexyl.

Phương án được ưu tiên của “alkyl” là metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl hoặc n-pentyl. Phương án được ưu tiên hơn là metyl, etyl, n-propyl, isopropyl hoặc tert-butyl.

“Alkenyl” bao gồm nhóm hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon, tốt hơn là từ 2 đến 10 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon và còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, có một hoặc nhiều liên kết đôi ở vị trí bất kỳ. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm vinyl, alyl, propenyl, isopropenyl, butenyl, isobutenyl, prenyl, butadienyl, pentenyl, isopentenyl, pentadienyl, hexenyl, isohexenyl, hexadienyl, heptenyl, octenyl, nonenyl, dextenyl, undextenyl, dodextenyl, tridextenyl, tetradextenyl và pentadextenyl.

Phương án được ưu tiên của “alkenyl” là vinyl, allyl, propenyl, isopropenyl hoặc butenyl.

“Alkynyl” bao gồm nhóm hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 2 đến 10 nguyên tử cacbon, tốt hơn là từ 2 đến 8 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon và còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, có một hoặc nhiều liên kết ba ở (các) vị trí bất kỳ. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm etynyl, propynyl, butynyl, pentynyl, hexynyl, heptynyl, octynyl, nonynyl và dextynyl. Hơn nữa, nhóm này có thể có (các) liên kết đôi ở (các) vị trí bất kỳ.

Phương án được ưu tiên của “alkynyl” là etynyl, propynyl, butynyl

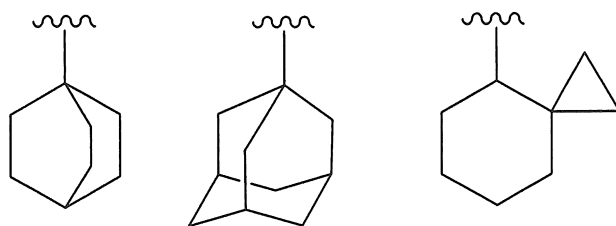
hoặc pentynyl.

“Carboxyclyl thơm” có nghĩa là nhóm hydrocacbon vòng thơm ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng. Các ví dụ có thể kể đến là phenyl, naphtyl, antryl và phenantryl.

Phương án được ưu tiên của “carboxyclyl thơm” là phenyl.

“Carboxyclyl không thơm” có nghĩa là nhóm hydrocacbon vòng no hoặc nhóm hydrocacbon vòng không thơm chưa no, là dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng. Các ví dụ về nhóm carboxyclyl không thơm, mà ở dạng đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, bao gồm nhóm vòng ngưng tụ trong đó carboxyclyl không thơm, mà ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, được ngưng tụ với vòng “carboxyclyl thơm” trên đây.

Ngoài ra, các ví dụ về “carboxyclyl không thơm” còn bao gồm nhóm có liên kết cầu và nhóm tạo ra vòng spiro như sau:



Tốt hơn, nếu carboxyclyl không thơm, mà là đơn vòng, là carboxyclyl chứa từ 3 đến 16 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là từ 3 đến 12 nguyên tử cacbon và còn tốt hơn nữa là từ 4 đến 8 nguyên tử cacbon. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl, xyclooctyl, xyclononyl, xyclodecyl, xyclopropenyl, xyclobutenyl, xyclopentenyl, xyclohexenyl, xycloheptenyl và xyclohexadienyl.

Các ví dụ về carboxyclyl không thơm, mà ở dạng đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, bao gồm indanyl, indenyl, axenaphtyl, tetrahydronaphtyl và florenyl.

“Heteroxyclyl thơm” có nghĩa là xyclyl thơm, mà ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn độc lập từ O, S và N.

Các ví dụ về nhóm heteroxyclyl thơm, mà ở dạng đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, bao gồm nhóm vòng ngưng tụ trong đó heteroxyclyl thơm, mà ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, được ngưng tụ với vòng

“carboxyclyl thơm” và/hoặc “carboxyclyl không thơm” trên đây.

Tốt hơn, nếu heteroxyclyl thơm, mà ở dạng đơn vòng, là vòng có 5 đến 8 cạnh và tốt hơn nữa là 5 đến 6 cạnh. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm pyrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, pyridyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, triazolyl, triazinyl, tetrazolyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, oxazolyl, oxadiazolyl, isothiazolyl, thiazolyl và thiadiazolyl.

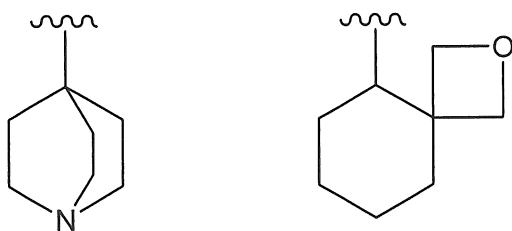
Các ví dụ về heteroxyclyl thơm, mà ở dạng hai vòng, bao gồm indolyl, isoindolyl, indazolyl, indoliziny, quinoliny, isoquinoliny, xinoliny, phtalazinyl, quinazoliny, naphtyridiny, quinoxaliny, puriny, pteridinyl, benzimidazolyl, benzisoxazolyl, benzoxazolyl, benzoxadiazolyl, benzisothiazolyl, benzothiazolyl, benzothiadiazolyl, benzofuryl, isobenzofuryl, benzothienyl, benzotriazolyl, imidazopyridyl, triazolopyridyl, imidazothiazolyl, pyrazinopyridazinyl, oxazolopyridyl và thiazolopyridyl.

Các ví dụ về heteroxyclyl thơm, mà ở dạng đa vòng có ba hoặc nhiều vòng, bao gồm carbazolyl, acridiny, xantenyl, phenothiaziny, phenoxathiiny, phenoxazinyl và dibenzofuryl.

“Heteroxyclyl không thơm” có nghĩa là xyclyl không thơm, mà ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, S và N.

Các ví dụ về nhóm heteroxyclyl không thơm, mà ở dạng đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, bao gồm nhóm vòng ngưng tụ trong đó heteroxyclyl không thơm, mà ở dạng đơn vòng hoặc đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, được ngưng tụ với vòng “carboxyclyl thơm”, “carboxyclyl không thơm” và/hoặc “heteroxyclyl thơm” trên đây.

Ngoài ra, các ví dụ về “heteroxyclyl không thơm” cũng bao gồm nhóm có liên kết cầu và nhóm tạo ra vòng spiro như sau:



Tốt hơn, nếu heteroxyclyl không thơm, mà ở dạng đơn vòng, là vòng

có 3 đến 8 cạnh và tốt hơn nữa là 5 đến 6 cạnh. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm dioxanyl, thiiranyl, oxiranyl, oxetanyl, oxathiolanyl, azetidiny, thianyl, thiazolidiny, pyrrolidiny, pyrroliny, imidazolidiny, imidazoliny, pyrazolidiny, pyrazoliny, piperidyl, piperaziny, morpholiny, morpholino, thiomorpholiny, thiomorpholino, dihydropyridyl, tetrahydropyridyl, tetrahydrofuryl, tetrahydropyranly, dihydrothiazolyl, tetrahydrothiazolyl, tetrahydroisothiazolyl, dihydrooxaziny, hexahydroazepiny, tetrahydrodiazepiny, tetrahydropyridaziny, hexahydropyrimidiny, dioxolanyl, dioxaziny, aziridiny, dioxoliny, oxepanyl, thiolanyl, thiiny và thiaziny.

Các ví dụ về heterocyclyl không thơm, mà ở dạng đa vòng có hai hoặc nhiều vòng, bao gồm indoliny, isoindoliny, cromanyl and isocromanyl.

“Alkyloxy” dùng để chỉ nhóm trong đó “alkyl” liên kết với nguyên tử oxy. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm metyloxy, etyloxy, n-propyloxy, isopropyloxy, n-butyloxy, tert-butyloxy, isobutyloxy, sec-butyloxy, pentyloxy, isopentyloxy và hexyloxy.

Phương án được ưu tiên của “alkyloxy” là metyloxy, etyloxy, n-propyloxy, isopropyloxy hoặc tert-butyloxy.

“Haloalkyl” có nghĩa là nhóm trong đó một hoặc nhiều “halogen” liên kết với “alkyl”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm monoflometyl, monofloetyl, monoflopropyl, 2,2,3,3,3-pentafloropropyl, monoclometyl, triflometyl, triclometyl, 2,2,2-trifloetyl, 2,2,2-tricloetyl, 1,2-dibromoetyl, và 1,1,1-trifloropropan-2-yl.

Phương án được ưu tiên của “haloalkyl” là triflometyl hoặc triclometyl.

“Alkylthio” có nghĩa là nhóm trong đó “alkyl” liên kết với nguyên tử lưu huỳnh.

“Alkylamino” bao gồm monoalkylamino và dialkylamino.

“Monoalkylamino” có nghĩa là nhóm trong đó nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm amino được thay bằng “alkyl”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm metylamino, etylamino và isopropylamino. Tốt hơn, nếu nhóm này là metylamino hoặc etylamino.

“Dialkylamino” có nghĩa là nhóm trong đó hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm amino được thay bằng hai nhóm “alkyl”. Hai nhóm alkyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm dimethylamino, diethylamino, N, N-diisopropylamino, N-metyl-N-ethylamino và N-isopropyl-N-ethylamino. Tốt hơn, nếu nhóm này là dimethylamino hoặc diethylamino.

“Alkylcarbonylamino” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm amino được thay bằng một hoặc hai nhóm alkylcarbonyl. Hai nhóm alkylcarbonyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ bao gồm methylcarbonylamino, ethylcarbonylamino, propylcarbonylamino, isopropylcarbonylamino, tert-butylcarbonylamino, isobutylcarbonylamino, sec-butylcarbonylamino, dimethylcarbonylamino, diethylcarbonylamino và N, N-diisopropylcarbonylamino.

Phương án được ưu tiên của “alkylcarbonylamino” là methylcarbonylamino và ethylcarbonylamino.

“Alkenylcarbonylamino” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm amino được thay bằng một hoặc hai nhóm alkenylcarbonyl. Hai nhóm alkenylcarbonyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm vinylcarbonylamino và propenylcarbonylamino.

“Alkynylcarbonylamino” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm amino được thay bằng một hoặc hai nhóm alkynylcarbonyl. Hai nhóm alkynylcarbonyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm etynylcarbonylamino và propynylcarbonylamino.

“Alkylcarbamoyl” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm carbamoyl được thay bằng một hoặc hai nhóm “alkyl”. Hai nhóm alkyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm methylcarbamoyl, ethylcarbamoyl, dimethylcarbamoyl và diethylcarbamoyl.

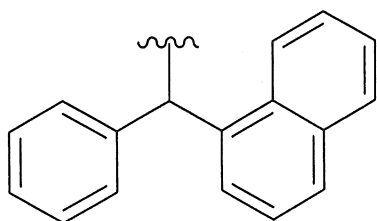
“Alkenylcarbamoyl” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm carbamoyl được thay bằng một

hoặc hai nhóm “alkenyl”. Hai nhóm alkenyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm vinylcarbamoyl và propenylcarbamoyl.

“Alkynylcarbamoyl” dùng để chỉ nhóm trong đó một hoặc hai nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử nitơ của nhóm carbamoyl được thay bằng một hoặc hai nhóm “alkynyl”. Hai nhóm alkynyl này có thể là giống hoặc khác nhau. Các ví dụ bao gồm etynylcarbamoyl và propynylcarbamoyl.

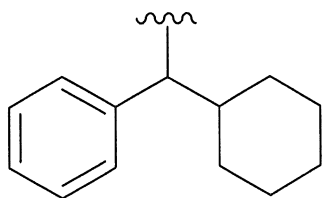
Phần alkyl của “carboxycylalkyl thơm”, “carboxycylalkyl không thơm”, “heteroxycylalkyl thơm” hoặc “heteroxycylalkyl không thơm” là giống như “alkyl”.

“Carboxycylalkyl thơm” dùng để chỉ alkyl được thế bằng một hoặc nhiều “carboxycyl thơm”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm benzyl, phenetyl, phenylpropyl, benzhydryl, trityl, naphtylmetyl và nhóm có công thức



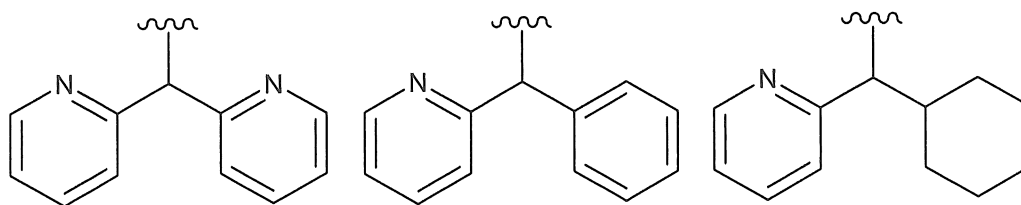
Phương án được ưu tiên của “carboxycylalkyl thơm” là benzyl, phenetyl hoặc benzhydryl.

“Carboxycylalkyl không thơm” dùng để chỉ alkyl được thế bằng một hoặc nhiều “carboxycyl không thơm”. “Carboxycylalkyl không thơm” cũng bao gồm “carboxycylalkyl không thơm” trong đó phần alkyl được thế bằng “carboxycyl không thơm”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm xyclopropylmetyl, xyclobutylmetyl, xyclopentylmetyl, xyclohexylmetyl và nhóm có công thức

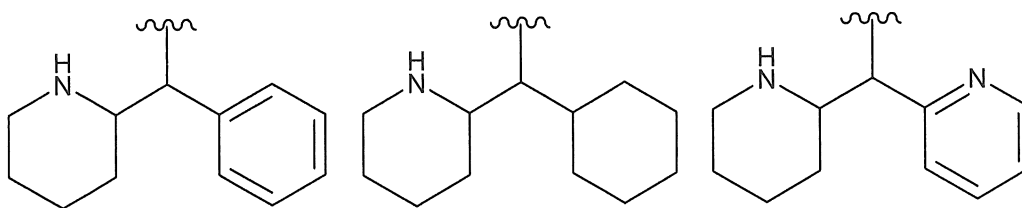


“Heteroxycylalkyl thơm” dùng để chỉ alkyl được thế bằng một hoặc nhiều “heteroxycyl thơm”. “Heteroxycylalkyl thơm” cũng bao gồm “heteroxycylalkyl thơm” trong đó phần alkyl được thế bằng “carboxycyl thơm” và hoặc “carboxycyl không thơm”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm pyridylmetyl, furanylmetyl, imidazolylmetyl, indolylmetyl,

benzothiophenylmetyl, oxazolylmetyl, isoxazolylmetyl, thiazolylmetyl, isothiazolylmetyl, pyrazolylmetyl, isopyrazolylmetyl, pyrrolidinylmetyl, benzoxazolylmetyl và nhóm có công thức



“Heteroxyclylalkyl không thơm” dùng để chỉ alkyl được thế bằng một hoặc nhiều “heteroxyclyl không thơm”. “Heteroxyclylalkyl không thơm” cũng bao gồm “heteroxyclylalkyl không thơm” trong đó phần alkyl được thế bằng “carboxyclyl thơm”, “carboxyclyl không thơm” và/hoặc “heteroxyclyl thơm”. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm tetrahydropyranylmetyl, morpholinyletyl, piperidinyletyl, piperazinyletyl và nhóm có công thức



Ví dụ về các nhóm thế cho “alkyl được thế hoặc không được thế”, “alkenyl được thế hoặc không được thế”, “alkynyl được thế hoặc không được thế”, “alkyloxy được thế hoặc không được thế”, “alkylcarbonylamino được thế hoặc không được thế”, “alkenylcarbonylamino được thế hoặc không được thế”, “alkynylcarbonylamino được thế hoặc không được thế”, “alkylcarbamoyl được thế hoặc không được thế”, “alkenylcarbamoyl được thế hoặc không được thế”, hoặc “alkynylcarbamoyl được thế hoặc không được thế” bao gồm các nhóm thế sau đây. Nguyên tử cacbon ở (các) vị trí bất kỳ có thể được liên kết với một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm thế sau đây.

Nhóm thế: halogen, hydroxy, carboxy, amino, imino, hydroxyamino, hydroxyimino, formyl, formyloxy, carbamoyl, sulfamoyl, sulfanyl, sulfino, sulfo, thioformyl, thiocarboxy, dithiocarboxy, thiocarbamoyl, xyano, nitro, nitroso, azit, hydrazino, ureide, amidino, guanidino, trialkylsilyl, alkyloxy, alkenyloxy, alkynyloxy, haloalkyloxy, alkylcarbonyl, alkenylcarbonyl, alkynylcarbonyl, monoalkylamino, dialkylamino, alkylsulfonyl, alkenylsulfonyl, alkynylsulfonyl, monoalkylcarbonylamino,

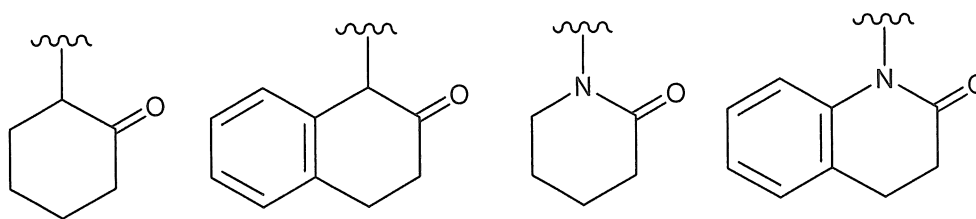
dialkylcarbonylamino, monoalkylsulfonylamino, dialkylsulfonylamino, alkylimino, alkenylimino, alkynylimino, alkylcarbonylimino, alkenylcarbonylimino, alkynylcarbonylimino, alkyloxyimino, alkenyloxyimino, alkynyloxyimino, alkylcarbonyloxy, alkenylcarbonyloxy, alkynylcarbonyloxy, alkyloxycarbonyl, alkenyloxycarbonyl, alkynyloxycarbonyl, alkylsulfanyl, alkenylsulfanyl, alkynylsulfanyl, alkylsulfinyl, alkenylsulfinyl, alkynylsulfinyl, monoalkylcarbamoyl, dialkylcarbamoyl, monoalkylsulfamoyl, dialkylsulfamoyl, carboxycyl thơm, carboxycyl không thơm, heteroxycyl thơm, heteroxycyl không thơm, carboxycyloxy thơm, carboxycyloxy không thơm, heteroxycyloxy thơm, heteroxycyloxy không thơm, carboxycylcarbonyl thơm, carboxycylcarbonyl không thơm, heteroxycylcarbonyl thơm, heteroxycylcarbonyl không thơm, carboxycyloxycarbonyl thơm, carboxycyloxycarbonyl không thơm, heteroxycyloxycarbonyl thơm, heteroxycyloxycarbonyl không thơm, carboxycylalkoxy thơm, carboxycylalkoxy không thơm, heteroxycylalkoxy thơm, heteroxycylalkoxy không thơm, carboxycylalkoxycarbonyl thơm, carboxycylalkoxycarbonyl không thơm, heteroxycylalkyloxycarbonyl thơm, heteroxycylalkyloxycarbonyl không thơm, carboxycylalkylamino thơm, carboxycylalkylamino không thơm, heteroxycylalkylamino thơm, heteroxycylalkylamino không thơm, carboxcylsulfanyl thơm, carboxcylsulfanyl không thơm, heteroxcylsulfanyl thơm, heteroxcylsulfanyl không thơm, carboxcylsulfonyl không thơm, carboxcylsulfonyl thơm, heteroxcylsulfonyl thơm, và heteroxcylsulfonyl không thơm. Hơn nữa, nhóm thế có thể có một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm α trên đây.

Ví dụ về các nhóm thế trên vòng “carboxycyl thơm”, “carboxycyl không thơm”, “heteroxycyl thơm” hoặc “heteroxycyl không thơm” của “carboxycyl thơm được thế hoặc không được thế”, “carboxycyl không thơm được thế hoặc không được thế”, “heteroxycyl thơm được thế hoặc không được thế” và “heteroxycyl không thơm được thế hoặc không được thế” bao gồm các nhóm thế sau đây. Nguyên tử ở (các) vị trí bất kỳ có thể được liên kết với một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm thế sau đây.

Nhóm thế: halogen, hydroxy, carboxy, amino, imino, hydroxyamino, hydroxyimino, formyl, formyloxy, carbamoyl, sulfamoyl, sulfanyl, sulfino, sulfo, thioformyl, thiocarboxy, dithiocarboxy, thiocarbamoyl, xyano, nitro, nitroso, azit, hydrazino, ureide, amidino, guanidino, trialkylsilyl, alkyl, alkenyl, alkynyl, haloalkyl, alkyloxy, alkenyloxy, alkynyloxy, haloalkyloxy, alkyloxyalkyl, alkyloxyalkyloxy, alkylcarbonyl, alkenylcarbonyl, alkynylcarbonyl, monoalkylamino, dialkylamino, alkylsulfonyl, alkenylsulfonyl, alkynylsulfonyl, monoalkylcarbonylamino, dialkylcarbonylamino, monoalkylsulfonylamino, dialkylsulfonylamino, alkylimino, alkenylimino, alkynylimino, alkylcarbonylimino, alkenylcarbonylimino, alkynylcarbonylimino, alkyloxyimino, alkenyloxyimino, alkynyloxyimino, alkylcarbonyloxy, alkenylcarbonyloxy, alkynylcarbonyloxy, alkyloxycarbonyl, alkenyloxycarbonyl, alkynyloxycarbonyl, alkylsulfanyl, alkenylsulfanyl, alkynylsulfanyl, alkylsulfinyl, alkenylsulfinyl, alkynylsulfinyl, monoalkylcarbamoyl, dialkylcarbamoyl, monoalkylsulfamoyl, dialkylsulfamoyl, carboxycyl thơm, carboxycyl không thơm, heteroxycyl thơm, heteroxycyl không thơm, carboxycyloxy thơm, carboxycyloxy không thơm, heteroxycyloxy thơm, heteroxycyloxy không thơm, carboxycylcarbonyl thơm, carboxycylcarbonyl không thơm, heteroxycylcarbonyl thơm, heteroxycylcarbonyl không thơm, carboxycyloxy carbonyl thơm, carboxycyloxy carbonyl không thơm, heteroxycyloxy carbonyl thơm, heteroxycyloxy carbonyl không thơm, carboxycylalkyl thơm, carboxycylalkyl không thơm, heteroxycylalkyl thơm, heteroxycylalkyl không thơm, carboxycylalkyloxy thơm, carboxycylalkyloxy không thơm, heteroxycylalkyloxy carbonyl thơm, carboxycylalkyloxy carbonyl không thơm, heteroxycylalkyloxy carbonyl thơm, heteroxycylalkyloxy carbonyl không thơm, carboxycylalkyloxyalkyl thơm, carboxycylalkyloxyalkyl không thơm, heteroxycylalkyloxyalkyl thơm, heteroxycylalkyloxyalkyl không thơm, carboxycylalkylamino thơm, carboxycylalkylamino không thơm, heteroxycylalkylamino thơm, heteroxycylalkylamino không thơm, carboxycylsulfanyl thơm, carboxycylsulfanyl không thơm,

heteroxyclylsulfanyl thơm, heteroxyclylsulfanyl không thơm, carboxyclylsulfonyl không thơm, carboxyclylsulfonyl thơm, heteroxyclylsulfonyl thơm, và heteroxyclylsulfonyl không thơm. Hơn nữa, nhóm thế có thể có một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm α trên đây.

Ngoài ra, “carboxyclyl không thơm được thế hoặc không được thế” và “heteroxyclyl không thơm được thế hoặc không được thế” có thể được thế bằng “oxo”. Trong trường hợp này, điều này có nghĩa là nhóm trong đó hai nguyên tử hydro trên nguyên tử cacbon được thế như dưới đây.



Ở đây, sáng chế được giải thích chi tiết.

Oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế gồm oligonucleotit sợi kép, trong đó

sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit,

sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, và

lipid liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.

Tốt hơn nữa, nếu oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế là oligonucleotit sợi kép, trong đó

sợi thứ nhất là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit,

sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, nhưng trừ oligonucleotit ARN,

chiều dài của sợi thứ hai lớn hơn hoặc bằng 50% chiều dài của sợi thứ nhất, và

lipid bao gồm (các) mạch hydrocacbon chứa từ 12 đến 30 nguyên tử C liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.

Sợi thứ nhất của oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế là oligonucleotit CpG gồm từ 8 đến 50 nucleotit.

“Oligonucleotit CpG” dùng để chỉ oligonucleotit sợi đơn bao gồm

dinucleotit của motif xytosin guanin không được metyl hóa (5'-CpG-3') (motif CpG) và đã biết rõ rằng hợp chất này có thể hữu ích để làm tá dược cho vaccin vì nó gây ra đáp ứng miễn dịch tập nhiễm thông qua TLR9 (Nat Rev Drug Discov, 2006, 5, 471-484, Expert Rev Vaccines., 2011, 10(4), 499-511). Oligonucleotit CpG dùng cho sáng chế bao gồm ít nhất một motif CpG và có thể bao gồm vài motif CpG.

Chiều dài của oligonucleotit CpG dùng cho sáng chế nằm trong khoảng từ 8 đến 50 nucleotit. Ví dụ, chiều dài này nằm trong khoảng từ 8 đến 50 nucleotit, từ 8 đến 40 nucleotit, từ 8 đến 30 nucleotit, từ 10 đến 25 nucleotit, từ 15 đến 25 nucleotit hoặc từ 18 đến 25 nucleotit.

Để làm “oligonucleotit CpG”, không bị giới hạn cụ thể ở oligonucleotit CpG, mà đã biết đối với hoạt tính kích thích miễn dịch trong lĩnh vực này thì đều có thể được sử dụng. Ví dụ, oligonucleotit CpG hoặc phương pháp điều chế hợp chất này được mô tả trong WO2006/065751, WO2007/092315, WO2008/068638, WO2010/067262, WO2010/125480, WO2014/047588, WO2014/134698, WO2015/041318, US2011/0300163 hoặc tài liệu tương tự. Oligonucleotit CpG có thể được tổng hợp theo phương pháp được mô tả trong các tài liệu nêu trên.

Oligonucleotit CpG được phân loại dựa trên trình tự, cấu trúc bậc hai và tác dụng đối với tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC), thành lớp A, lớp B, lớp C, lớp P hoặc lớp S (Advanced drug delivery reviews, 2009, 61(3),195-204).

Lớp A: ODN1585, ODN2216, ODN2336 hoặc tương tự;

Lớp B: ODNBW006, ODN D-SL01, ODN1668 (WO2005/063264), OND1826 (WO2007/030580), OND2006 (CpG7909, PF-3512676) (WO98/18810), ODN2007, ODN684 hoặc tương tự; và

Lớp C: ODN D-SL03, ODN 2395, ODN M362 hoặc tương tự. Các thành phần này có thể mua được ở InvivoGen ở dạng thuốc thử nghiên cứu. Ngoài ra,

CpG-28 (WO2000/056342),

CpG-685(GNKG-168) (Blood, 2010, 115(24), 5041),

CpG-ODN C274 (PLoS ONE, 2013, 8(4), e62373),

KSK-13 (KSK-CpG) (US7408050),
 CpG ODN 10104 (CpG-10104) (Drug Data Rep, 2006, 28(3), 258),
 CpG ODN-1585 (WO2001/022990),
 ODN-5890 (WO2006/080946),
 1018-ISS (WO2008/073661),
 EMD-1201081 (HYB-2055, IMO-2055) (WO2005/009355),
 D35-CpG, K3-CpG (GeneDesign, Inc.),

hoặc tương tự. Đối với sáng chế, oligonucleotit CpG thuộc lớp bất kỳ đều có thể được sử dụng. Oligonucleotit CpG thuộc lớp A (ví dụ, ODN2216, ODN2336 và D35-CpG), oligonucleotit CpG thuộc lớp B (ví dụ, ODN1826, ODN2006, CpG-28, 1018-ISS, IMO2055, K3-CpG, ODN684 và D-LS01) hoặc oligonucleotit CpG thuộc lớp C (ví dụ, D-LS03, ODN2395 và ODN M362) được ưu tiên. ODN1826 hoặc ODN2006 được đặc biệt ưu tiên.

Sợi thứ hai của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với oligonucleotit CpG mà là sợi thứ nhất, nhưng trừ oligonucleotit ARN.

Tốt hơn, nếu sợi thứ hai là oligonucleotit gồm từ 8 đến 60 nucleotit và bao gồm trình tự có khả năng lai với oligonucleotit CpG mà là sợi thứ nhất trong điều kiện nghiêm ngặt.

Oligonucleotit bất kỳ đều có thể được sử dụng làm sợi thứ hai miễn là nó có thể được lai với oligonucleotit CpG trong điều kiện nghiêm ngặt, và hợp chất bao gồm 1 hoặc vài cặp không hợp đôi trong phân lai có thể được lấy làm ví dụ.

Ví dụ, hợp chất này có thể là oligonucleotit mà phân lai của nó có độ tương đồng ít nhất là 70% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là 95% hoặc nhiều hơn so với trình tự bổ sung của oligonucleotit CpG của sợi thứ nhất.

Độ tương đồng thể hiện sự tương tự về điểm số ví dụ, theo phương pháp BLAST, chương trình tra cứu bằng cách sử dụng thuật toán được phát hiện bởi Altschul và các đồng tác giả. (The Journal of Molecular Biology, 215, 403-410 (1990).)

“Điều kiện nghiêm ngặt” dùng để chỉ các điều kiện mà theo đó, trình tự

bazơ tạo ra thể lai (được gọi là lai đặc hiệu) với trình tự đặc hiệu nhưng trình tự bazơ bất kỳ mà không có chức năng tương đương thì không tạo ra thể lai (được gọi là lai không đặc hiệu) với các trình tự đặc hiệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng lựa chọn các điều kiện bằng cách thay đổi nhiệt độ trong phản ứng lai hoặc rửa, nồng độ muối trong quá trình lai hoặc đệm rửa, hoặc điều kiện tương tự. Cụ thể, ví dụ về các điều kiện lai nghiêm ngặt theo sáng chế là, nhưng không chỉ giới hạn ở điều kiện mà theo đó, oligonucleotit được lai trong $6\times\text{SSC}$ (NaCl 0,9M, trinitrat 0,09M) hoặc $6\times\text{SSPE}$ (NaCl 3M, NaH_2PO_4 0,2M, $\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$ 20mM, độ pH 7,4) ở nhiệt độ 42°C và rửa bằng $0,5\times\text{SSC}$ ở 42°C . Về phương pháp lai, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, phương pháp lai thẩm tách phương Nam hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể thực hiện theo phương pháp được mô tả trong *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Current Protocols in Molecular Biology* (1994) (Wiley-Interscience), *DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition* (1995) (Oxford University Press) hoặc tài liệu tương tự.

“1 hoặc vài cặp không hợp đôi” dùng để chỉ từ 1 đến 5, tốt hơn là từ 1 đến 3, và tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 cặp không hợp đôi.

Sợi thứ hai của oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế có chiều dài gồm từ 8 đến 60 nucleotit. Ví dụ, chiều dài này nằm trong khoảng từ 8 đến 60 nucleotit, từ 8 đến 50 nucleotit, từ 8 đến 40 nucleotit, từ 8 đến 30 nucleotit, từ 10 đến 25 nucleotit hoặc từ 15 đến 25 nucleotit. Chiều dài của sợi thứ hai có thể là giống với chiều dài của oligonucleotit CpG mà là sợi thứ nhất, và ngắn hơn 1 hoặc vài nucleotit so với chiều dài của oligonucleotit CpG miễn là nó có thể được lai với oligonucleotit CpG. Ngoài ra, chiều dài của sợi thứ hai có thể là dài hơn so với chiều dài của oligonucleotit CpG bằng cách thêm 1 hoặc vài nucleotit ở một hoặc cả hai phía của phần lai với oligonucleotit CpG.

“1 hoặc vài nucleotit” dùng để chỉ từ 1 đến 10, 1 đến 5, 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2 nucleotit.

Chiều dài ưu tiên của sợi thứ hai tùy thuộc vào chiều dài của oligonucleotit CpG của sợi thứ nhất. Ví dụ, chiều dài này lớn hơn hoặc bằng

50%, lớn hơn hoặc bằng 60%, lớn hơn hoặc bằng 70%, nằm trong khoảng từ 50 đến 100%, 60 đến 100% hoặc 70 đến 100% chiều dài của sợi thứ nhất. Chiều dài bằng 50 đến 100% chiều dài của sợi thứ nhất được đặc biệt ưu tiên.

Oligonucleotit của sợi thứ hai của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế là oligonucleotit mà nucleosit được chọn từ nhóm gồm nucleosit ADN, nucleosit ARN và các dẫn xuất nucleosit liên kết với. Tất cả các nucleosit có thể là giống nhau, hoặc gồm hai hoặc nhiều loại nucleosit. Tuy nhiên, oligonucleotit ARN mà toàn bộ các nucleosit đều là nucleosit ARN sẽ bị loại trừ. Khi nucleosit được bao gồm trong sợi thứ hai, oligonucleotit mà nucleosit ADN và/hoặc các dẫn xuất nucleosit liên kết với là được ưu tiên. Toàn bộ các nucleosit có thể là nucleosit ADN, dẫn xuất nucleosit hoặc cả hai loại trong số chúng.

Khi oligonucleotit bao gồm nucleosit ADN và các dẫn xuất nucleosit, ví dụ có thể kể đến là oligonucleotit bao gồm vùng tâm và các vùng đầu ở cả hai phía của vùng tâm này và bao gồm ít nhất là một dẫn xuất nucleosit trong vùng đầu ở cả hai phía. Cụ thể, (các) vùng đầu 5' và/hoặc 3' bao gồm 1 hoặc nhiều, tốt hơn là 1 hoặc 5, và tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 dẫn xuất nucleosit. Kiểu, số lượng và vị trí của (các) dạng cải biến trong một vùng đầu có thể là giống hoặc khác với loại, số lượng và vị trí của (các) dạng cải biến trong vùng đầu kia. Theo phương án khác, oligonucleotit bao gồm các dẫn xuất nucleosit theo cách ngẫu nhiên.

Để làm dẫn xuất nucleosit trong sợi thứ hai của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế, (các) dạng cải biến bất kỳ mà đã biết trong lĩnh vực này như các ví dụ trên đây thì đều có thể được sử dụng.

Nucleosit có nhóm thế ở vị trí 2' của đường và/hoặc nucleosit có cấu trúc cầu giữa vị trí 4' và vị trí 2' của đường được ưu tiên.

Để làm nhóm thế ở vị trí 2' của đường, F, OCH₃ hoặc OCH₂CH₂OCH₃ được ưu tiên. OCH₃ được đặc biệt ưu tiên.

Để làm cấu trúc cầu giữa vị trí 4' và vị trí 2' của đường, 4'-(CH₂)_m-O-2', trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, hoặc 4'-C(=O)-NR³-2', trong đó R³ là nguyên tử hydro hoặc alkyl, được ưu tiên.

Để làm liên kết giữa các nucleosit trong oligonucleotit của sợi thứ hai

trong oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế, liên kết giữa các nucleosit đã biết bất kỳ như các ví dụ trên đây trong lĩnh vực này thì đều có thể được sử dụng. Tất cả các liên kết giữa các nucleosit có thể là giống nhau, hoặc gồm hai hoặc nhiều loại liên kết. D-oligo và/hoặc S-oligo là được ưu tiên.

Khi 2 hoặc nhiều loại liên kết giữa các nucleosit được bao gồm như D-oligo và S-oligo, ví dụ có thể kể đến là oligonucleotit bao gồm vùng tâm và các vùng đầu ở cả hai phía của vùng tâm này và bao gồm ít nhất là một liên kết giữa các nucleosit không có trong tự nhiên (ví dụ, S-oligo) trong vùng đầu ở cả hai phía và liên kết giữa các nucleosit tự nhiên (ví dụ, D-oligo) trong vùng tâm. Cụ thể, (các) vùng đầu 5' và/hoặc 3' bao gồm 1 hoặc nhiều, tốt hơn là 1 hoặc 5, và tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 liên kết giữa các nucleosit không có trong tự nhiên. Kiểu, số lượng và vị trí của (các) dạng cải biến trong một vùng đầu có thể là giống hoặc khác với loại, số lượng và vị trí của (các) dạng cải biến trong vùng đầu kia. Theo phương án khác, oligonucleotit bao gồm các liên kết giữa các nucleosit không có trong tự nhiên theo cách ngẫu nhiên.

Oligonucleotit CpG của sợi thứ nhất và oligonucleotit của sợi thứ hai trong oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế có thể được tổng hợp theo các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này. Ví dụ, chúng có thể được tổng hợp dễ dàng bởi các máy tổng hợp axit nucleic tự động mà có bán sẵn trên thị trường (ví dụ, máy tổng hợp của AppliedBiosystems, Dainippon Seiki). Phương pháp tổng hợp là phương pháp tổng hợp pha rắn bằng cách sử dụng phosphoramidit, phương pháp tổng hợp pha rắn bằng cách sử dụng hydro phosphonat hoặc hợp chất tương tự. Các ví dụ được mô tả trong Ví dụ 1 sau đây, Tetrahedron Letters 22, 1859-1862 (1981) và tài liệu tương tự.

Sợi thứ nhất và sợi thứ hai đã tổng hợp tạo ra oligonucleotit sợi kép bằng cách lai theo phương pháp đã biết rõ. Các ví dụ được mô tả trong Ví dụ 1 sau đây, Ví dụ 1 trong WO2013/089283 và tài liệu tương tự.

Trong oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế, lipit liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.

"Lipit" có nghĩa là hợp chất kỵ nước. Hợp chất này không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó là lipit đã biết, và có thể là ở dạng mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng. Các ví dụ có thể kể đến là axit béo với mạch béo chứa từ 8

đến 30 nguyên tử cacbon (ví dụ, farnesol), diaxyl lipid, cholesterol, dẫn xuất cholesterol, axit steroid (ví dụ, axit mật), lipid A, tocopherol và tổ hợp của chúng. Các ví dụ về axit béo với mạch béo là, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, axit béo no hoặc chưa no ở dạng mạch thẳng hoặc mạch nhánh, và các dẫn xuất axit béo (ví dụ, este của axit béo, amit của axit béo và thioeste của axit béo).

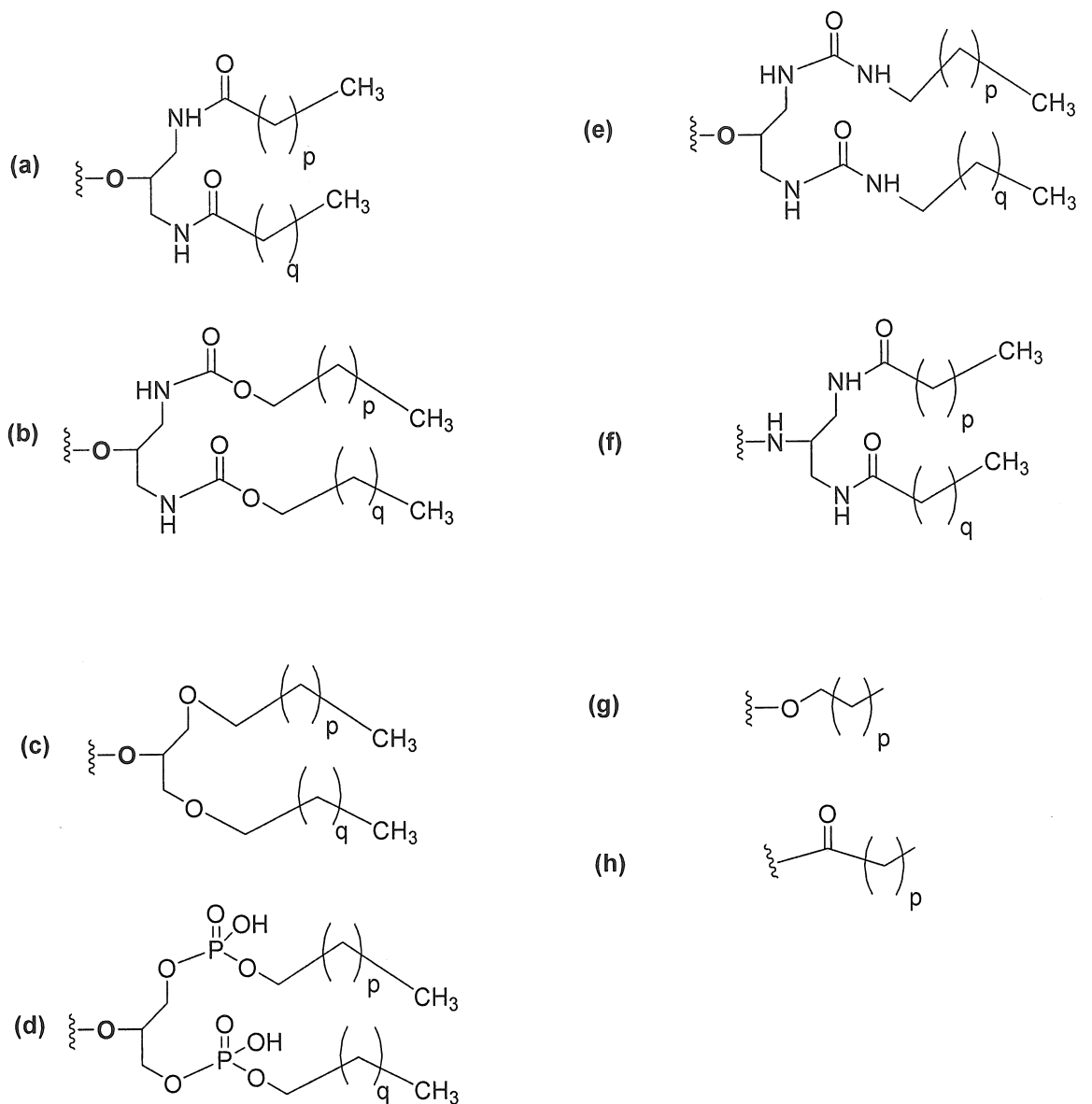
Khi lipid được dùng cho sáng chế, lipid bao gồm mạch hydrocacbon được ưu tiên. Tốt hơn, lipid này là lipid bao gồm 1 hoặc 2 mạch hydrocacbon hoặc hợp chất tương tự. Đặc biệt tốt hơn, nếu oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế có diaxyl lipid. Khi lipid liên kết ở hai hoặc nhiều vị trí và một lipid là diaxyl lipid, thì lipid kia có thể là lipid khác với diaxyl lipid.

“Diaxyl lipid” là phospholipid, glycolipid, sphingolipid hoặc tổ hợp của chúng, mà bao gồm hai mạch hydrocacbon. Tốt hơn, nếu nó là nhóm (a) hoặc (f) sau đây.

Các mạch hydrocacbon trong lipid độc lập bao gồm từ 8 đến 30 nguyên tử cacbon. Các mạch này có thể ở dạng no, chưa no hoặc tổ hợp của chúng, và có mạch nhánh. Khi lipid có một mạch, chiều dài của mạch tốt hơn là chứa từ 8 đến 30 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa là từ 8 đến 20 nguyên tử cacbon. Khi lipid có hai mạch, chiều dài của các mạch tốt hơn là chứa từ 10 đến 30 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa là từ 12 đến 30 nguyên tử cacbon, và tốt nhất là chứa từ 14 đến 24 nguyên tử cacbon. Khi lipid có hai mạch, chiều dài của hai mạch có thể là giống hoặc khác nhau. Các mạch trong lipid liên kết với một phần bao gồm axit phosphoric, đường hoặc hợp chất tương tự (vị trí liên kết với oligonucleotit) qua liên kết este, liên kết thioeste, tổ hợp của chúng hoặc liên kết tương tự.

Oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế có lipid bao gồm (các) mạch hydrocacbon chứa từ 12 đến 30 nguyên tử cacbon ở sợi thứ hai. Khi lipid liên kết ở 2 hoặc nhiều vị trí và một lipid là lipid bao gồm (các) mạch hydrocacbon chứa từ 12 đến 30 nguyên tử cacbon, thì số nguyên tử cacbon của (các) mạch hydrocacbon ở lipid kia có thể nhỏ hơn 12.

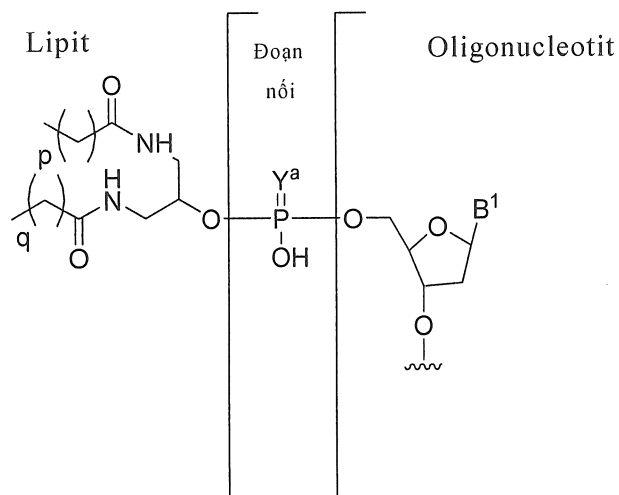
Các ví dụ về “lipid” là các hợp chất sau đây.



trong đó p và q độc lập là số nguyên từ 6 đến 28, tốt hơn là từ 8 đến 28, tốt hơn nữa là từ 10 đến 28 và tốt nhất là từ 10 đến 18.

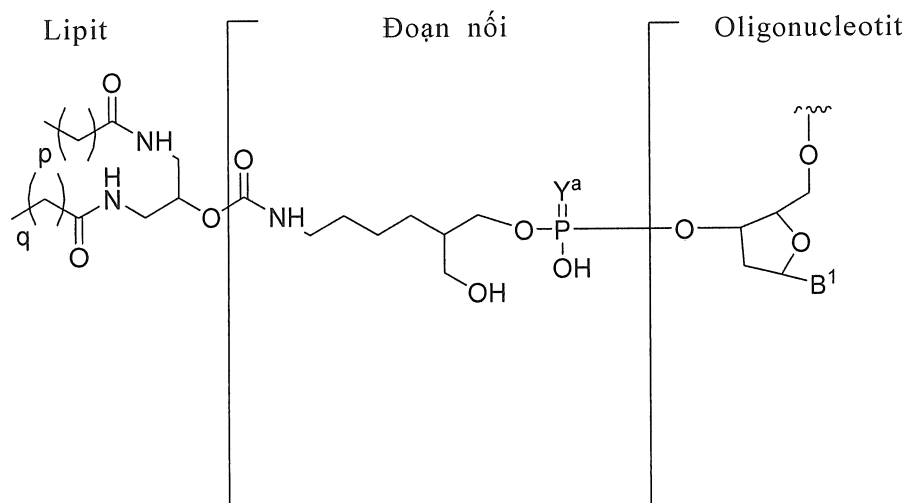
Trong oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế, lipid có thể liên kết ở vị trí bất kỳ của sợi thứ hai. Nó có thể liên kết ở đầu 3', đầu 5' hoặc trong sợi thứ hai.

Khi lipid liên kết ở đầu 5', ví dụ, nó có thể liên kết như dưới đây.



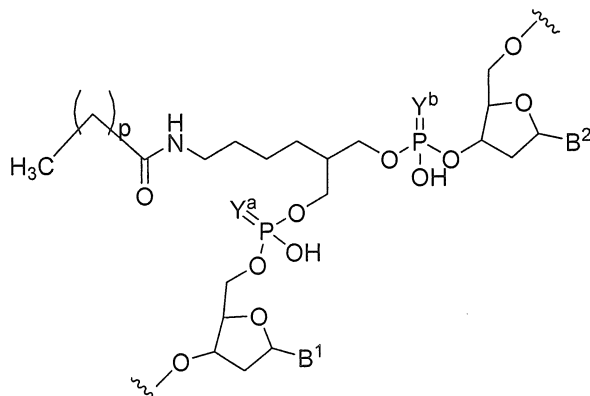
trong đó B^1 là bazơ ở đầu 3' của sợi thứ hai, Y^a là O hoặc S, và từng giá trị p hoặc q độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28, và tốt hơn là từ 10 đến 18.

Khi lipit liên kết ở đầu 3', ví dụ, nó có thể liên kết như dưới đây.

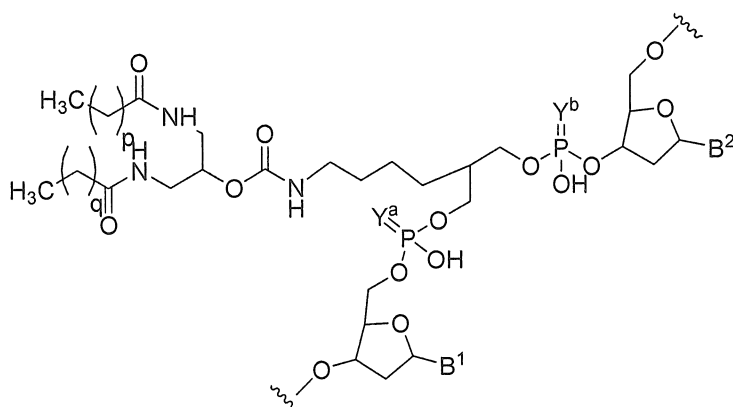


trong đó B^1 là bazơ ở đầu 5' của sợi thứ hai, Y^a là O hoặc S, và từng giá trị p hoặc q độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28, và tốt hơn là từ 10 đến 18.

Khi lipit liên kết ở sợi thứ hai, ví dụ, nó có thể liên kết như dưới đây.



hoặc

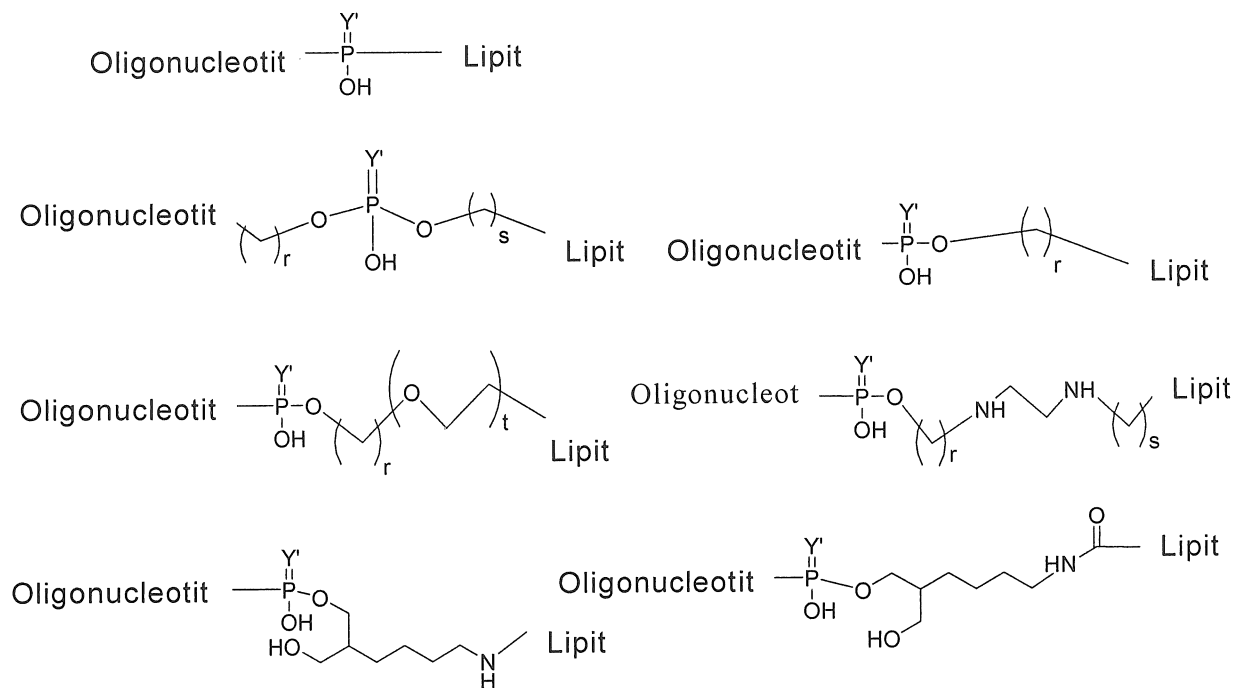


trong đó B¹ là bazơ ở đầu 5' của sợi thứ hai, Y^a là O hoặc S, và từng giá trị p hoặc q độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28, và tốt hơn là từ 10 đến 18.

Ngoài ra, tốt hơn nếu lipid liên kết ở một hoặc hai vị trí ở sợi thứ hai. Tốt hơn, nếu lipid liên kết ở đầu 3' và/hoặc đầu 5'. Tốt hơn nữa, nếu lipid liên kết ở đầu 5'.

Lipid có thể được tổng hợp theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các ví dụ về lipid hoặc các phương pháp điều chế được mô tả trong Ví dụ 1 sau đây, tài liệu sáng chế 1 và tương tự.

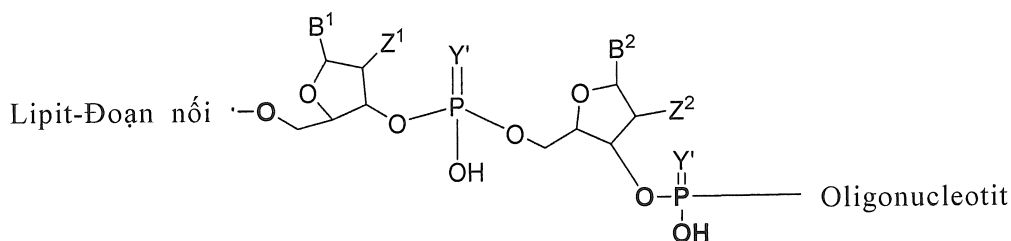
Trong oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế, lipid liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối. Để làm “đoạn nối”, đoạn nối bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này thì đều có thể được sử dụng. Các ví dụ có thể kể đến là đoạn nối phân cực, đoạn nối alkylen, đoạn nối etylen glycol và đoạn nối etylendiamin. Khi lipid là phospholipid, thì lipid này là đoạn nối có chiều dài nằm trong khoảng từ 4 đến 26 nguyên tử giữa nguyên tử oxy của sợi thứ hai và nguyên tử phospho của lipid. Các ví dụ có thể kể đến là đoạn nối oligonucleotit hoặc các đoạn nối sau đây.



trong đó Y' là O hoặc S, và từng giá trị r hoặc s độc lập là số nguyên từ 1 đến 10, tốt hơn là từ 1 đến 5, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 3. t là số nguyên từ 1 đến 4, tốt hơn là từ 1 đến 3, và tốt hơn nữa là bằng 2 hoặc 3.

Đoạn nối có thể được tổng hợp theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Đoạn nối oligonucleotit có thể được tổng hợp theo phương pháp tương tự với phương pháp để tổng hợp các oligonucleotit trong ví dụ trên đây.

Tốt hơn, nếu đoạn nối là đoạn nối oligonucleotit. Chiều dài của đoạn nối oligonucleotit nằm trong khoảng từ 2 đến 10, từ 2 đến 5, bằng 2, 3, 4, hoặc 5 nucleotit. Ví dụ có thể kể đến là đoạn nối đoạn nối sau đây.



trong đó B¹ hoặc B² là adenin (A), guanin (G), xytosin (C), 5-metylxytosin (5-Me-C), thymin (T) hoặc uraxil (U). từng nhóm Y' độc lập là O hoặc S. Z¹ hoặc Z² độc lập là H hoặc OH, và tốt hơn là H.

Ví dụ về đoạn nối oligonucleotit là đoạn nối ADN, nghĩa là, -(dX¹)u-, trong đó nhóm X¹ độc lập là A, G, C hoặc T, và u là số nguyên từ 1 đến 8. Cụ

thể, đoạn nối này là dG, dGdG, dGdGdGdG, dGdGdGdGdG, dT, dTdT, dTdTdTdT, dTdTdTdTdT hoặc đoạn nối tương tự. dGdG, dGdGdGdGdG hoặc dTdT được đặc biệt ưu tiên. Tốt hơn, nếu liên kết giữa các nucleosit trong đoạn nối ADN là liên kết phosphorothioat.

Đầu 3', đầu 5' hoặc đoạn nối không liên kết với lipit của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế có thể được cải biến thêm. Để có thể theo dõi oligonucleotit, để cải thiện được động học hoặc được lực học của oligonucleotit, hoặc để tăng cường độ ổn định hoặc ái lực liên kết của oligonucleotit, nhóm được cải biến và được biết rõ trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Các ví dụ có thể kể đến là nhóm bảo vệ của nhóm hydroxyl, phân tử thông báo, cholesterol, phospholipit, sắc tố, phân tử huỳnh quang và nhóm tương tự.

Hơn nữa, đầu 3' hoặc đầu 5' không liên kết với lipit của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế có thể bao gồm gốc phosphat este. "Gốc phosphat este" dùng để chỉ nhóm phosphat ở đầu kết thúc chứa phosphat este hoặc phosphat este cải biến. Mặc dù gốc phosphat este có thể ở cả hai đầu, tốt hơn nếu gốc này là nucleosit ở đầu 5'. Cụ thể, gốc này là nhóm có công thức: $-O-P(=O)(OH)OH$ hoặc nhóm cải biến. Nghĩa là, một hoặc nhiều O hoặc OH tùy ý được thế bằng H, O, OR' , S, $N(R')$, trong đó R' là H, nhóm bảo vệ amino, hoặc alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc alkyl. Từng đầu 5' hoặc đầu 3' có thể độc lập bao gồm từ 1 đến 3 gốc phosphat este được thế hoặc không được thế.

Sáng chế đề cập đến được phẩm (được phẩm theo sáng chế) hoặc chế phẩm vaccin (chế phẩm vaccin theo sáng chế) bao gồm oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế (vaccin hoặc tá dược theo sáng chế).

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến được phẩm hoặc chế phẩm vaccin bao gồm kháng nguyên và oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế (tá dược theo sáng chế).

"Kháng nguyên" là phân tử có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, tế bào, phần chiết tế bào, protein, protein tái tổ hợp, protein tinh chế, polypeptit, peptit, polysacarit, thể liên hợp polysacarit, chất mô phỏng peptit hoặc chất mô phỏng không phải là

peptit của polysacarit, các phân tử khác được mã hóa bởi ADN plasmit, hapten, các phân tử nhỏ, lipit, glycolipit, hydrat cacbon, tác nhân gây bệnh đã bất hoạt hoàn toàn, virut, phần chiết virut, virut sống được làm giảm độc lực, vector virut, vi khuẩn sống được làm giảm độc lực, vector vi khuẩn, sinh vật đa bào như ký sinh trùng và dị ứng nguyên.

Kháng nguyên có thể được tạo ra ở dạng kháng nguyên đơn hoặc tổ hợp gồm các kháng nguyên. Kháng nguyên có thể được tạo ra ở dạng hỗn hợp phức gồm polypeptit hoặc oligonucleotit.

Các kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, kháng nguyên vi sinh vật, kháng nguyên tự thân hoặc chất gây nghiện.

“Kháng nguyên vi sinh vật” dùng để chỉ kháng nguyên của vi sinh vật, và vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, vi khuẩn, virut, ký sinh trùng và nấm.

“Vi khuẩn” không bị giới hạn đặc biệt, miễn là nó là vi khuẩn gây bệnh ở người, vật nuôi, gia súc hoặc đối tượng tương tự. Cụ thể, vi khuẩn là *Streptococcus* (*Streptococcus pyogens*, *Streptococcus pneumoniae* hoặc loài tương tự), *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA hoặc loài tương tự), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, vi khuẩn thuộc giống *Listeria*, vi khuẩn gây bệnh viêm màng não, *Gonococcus*, *Escherichia coli* gây bệnh, *Friedländer bacilli*, *Proteus bacilli*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Mycoplasma*, *Clostridia*, *Tubercle bacilli*, *Cholera bacilli*, *Yersinia pestis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Dysentery bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Treponema pallidum*, *Tetanus bacillus*, *Mycobacterium leprae*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Francisella*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Burkholderia mallei*, *Helicobacter pylori* hoặc loài tương tự.

“Virut” không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó là virut gây bệnh ở người, vật nuôi, gia súc hoặc đối tượng tương tự. Các ví dụ có thể kể đến là virut cúm, virut hợp bào hô hấp (Respiratory Syncytial Virus: RSV), virut u nhú, virut viêm gan (typ A, B, C, D, E, F, G, TT hoặc loại tương tự), rinovirut, virut đậu mùa, virut sởi, virut rubeon, virut bại liệt, virut thủy đậu, norovirut, virut Norwalk, sapovirut, virut sapporo, virut quai bị, adenovirut, enterovirut, virut

rota, virus làm thiếu hụt miễn dịch ở người như HIV-1 và HIV-2, virus dại, virus hướng lympho T, virus sốt vàng da, virus cự bào, SARS-CoV, coronavirus như MERS-CoV, virus ebola, polyomavirus, virus JC, virus BK, virus ecpet như virus ecpet đơn dạng 1 (Herpes Simplex Virus 1: HSV1) và virus ecpet đơn dạng 2 (Herpes Simplex Virus 2: HSV2), lymphocryptovirus, roseolovirus, virus viêm não Nhật Bản, virus Cocksackie, virus dengue, virus Tây sông Nin, coronavirus, parvovirus, virus Epstein-Barr, virus Marburg, hantavirus, virus Lassa, virus Chikungunya, virus Hantaan, virus bệnh Louping, virus viêm màng não đám rối màng mạch lympho bào, bornavirus, virus bệnh sốt Thung lũng Rift, virus Thogoto, virus Dhori, virus bệnh chân và miệng, virus bệnh Newcastle, virus viêm miệng nổi mụn ở bò, virus dịch hạch ở gia súc, virus bệnh mụn nước ở lợn, calicivirus, torovirus, virus dịch tả ngựa châu Phi, arterivirus, virus bệnh đậu ở cừu, capripoxvirus, virus bệnh sốt cata ác tính liên quan đến cừu, virus nhiễm khuẩn huyết xuất huyết và virus viêm miệng mụn nước.

“Ký sinh trùng” không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó là ký sinh trùng gây bệnh ở người, vật nuôi, gia súc hoặc đối tượng tương tự. Các ví dụ có thể kể đến là trùng kiết lị, sốt rét, toxoplasma, leishmania, cryptosporidium, trypanosoma, sán kim, schistosoma japonicum, giun chỉ, giun tròn và sán cá.

“Nấm” không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó là nấm gây bệnh ở người, vật nuôi, gia súc hoặc đối tượng tương tự. Cụ thể, nấm này là aspergillus, candida, cryptococcus, trichophyton, histoplasma, pneumocystis hoặc loại tương tự.

“Kháng nguyên tự thân” dùng để chỉ kháng nguyên khối u, kháng nguyên liên quan đến bệnh Alzheimer, kháng nguyên đối với kháng thể người, kháng nguyên mà được biểu hiện từ các yếu tố retrovirus nội sinh của người hoặc loại tương tự.

Ví dụ về “kháng nguyên khối u” là kháng nguyên được biểu hiện đặc hiệu trong tế bào ung thư. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm protein, peptit và peptit dung hợp chứa chúng. Các ví dụ có thể kể đến là peptit được mô tả trong WO2006/090810, WO2007/145318, WO2008/047473, WO2008/102557, WO2009/025117, WO2009/025196, WO2009/153992, WO2010/013485,

WO2010/021112, WO2010/073551, WO2010/095428, WO2010/131452, WO2010/137295, WO2011/067920, WO2011/074236, WO2011/089921, WO2011/111392, WO2012/053200, WO2012/053206, WO2012/169200, WO2013/024582, WO2013/061594, WO2014/041784, WO2014/087626 và tài liệu tương tự.

Ví dụ về kháng nguyên liên quan đến bệnh Alzheimer là tau, β -amyloid hoặc chất tương tự.

Ví dụ về kháng nguyên đối với kháng thể người là IgE.

“Chất gây nghiện” dùng để chỉ nicotin, cocain hoặc chất tương tự. Ví dụ về kháng nguyên nicotin là hapten nicotin liên hợp với chất mang (ví dụ độc tố bạch hầu).

Dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể còn bao gồm (các) tá dược đã được biết rõ miễn là hiệu quả của oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế được duy trì. Ví dụ, tá dược này là độc tố tả, độc tố salmonella, phèn hoặc chất chủ vận đối với thụ thể giống Toll (TLR) mà không phải là TLR9. Ví dụ về chất chủ vận đối với TLR là chất chủ vận đối với TLR3 như poly(I:C) được làm ổn định; chất chủ vận đối với TLR4 như dẫn xuất của lipopolysaccharit (LPS) (ví dụ, MPL và GLA); chất chủ vận đối với TLR5 như flagelin; chất chủ vận đối với TLR7; và chất chủ vận đối với TLR8. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm muối nhôm như nhôm hydroxit, phức chất kích thích miễn dịch (ISCOM), nhũ tương dầu trong nước hoặc nước trong dầu, liposom và hệ phân phối như hạt nano và vi hạt.

Về các ví dụ sau đây, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm kháng nguyên khối u có bất kỳ hoặc toàn bộ trong số các đặc tính ưu việt sau đây:

- a) Mức độ cảm ứng CTL lớn hơn hoặc bằng 1%.
- b) Ưc chế đối với sự cấy ghép khối u.
- c) Hiệu quả làm thoái triển khối u.
- d) Dược động học tốt như sinh khả dụng cao, độ thanh thải vừa phải và đặc tính tương tự. Đặc biệt là, khả năng phân phối hiệu quả đến hạch bạch huyết.
- e) Độ ổn định trao đổi chất cao.

- f) Không gây hội chứng giải phóng xytokin.
- g) Mức độ gây kích ứng cục bộ yếu.
- h) Không có tính gây đột biến.
- i) Nguy cơ về bệnh tim mạch thấp.
- j) Nguy cơ về tính độc cấp tính thấp.

Phương pháp sử dụng và dạng bào chế bất kỳ đối với dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế đều có thể được sử dụng nếu là phương pháp sử dụng và dạng bào chế đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách tùy thuộc vào việc liệu sự điều trị khu trú hay điều trị toàn thân được mong muốn và vào vùng cần được điều trị. Các ví dụ về phương pháp sử dụng bao gồm phương pháp sử dụng khu trú (bao gồm sử dụng ở mắt, sử dụng trong âm đạo, sử dụng trong trực tràng, sử dụng trong mũi và sử dụng qua chân bì), sử dụng qua đường miệng và sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Các ví dụ về việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tiêm hoặc truyền nhỏ giọt trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, trong màng bụng hoặc trong cơ, sử dụng ở phổi bằng cách hút hoặc xông, sử dụng nội tủy mạc và sử dụng trong não thất. Phương pháp tiêm trong tĩnh mạch hoặc sử dụng dưới da được ưu tiên.

Khi dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế được sử dụng khu trú, dạng bào chế như miếng dán qua chân bì, thuốc bôi dể, thuốc xức, kem, gel, thuốc giọt, thuốc đạn, khí dung, thuốc dạng lỏng và thuốc bột có thể được sử dụng.

Các ví dụ về chế phẩm sử dụng qua đường miệng bao gồm thuốc bột, thuốc cốm, hỗn dịch hoặc dung dịch hòa tan trong nước hoặc chất dẫn không chứa nước, viên nang, thuốc bột và viên nén.

Các ví dụ về chế phẩm sử dụng ngoài đường tiêu hóa, sử dụng nội mạc tủy hoặc sử dụng trong não thất bao gồm các dung dịch nước vô khuẩn chứa chất đệm, chất pha loãng và các chất phụ gia thích hợp khác.

Có thể thu được dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế bằng cách trộn lượng hữu hiệu với các chất phụ gia dược dụng khác nhau mà thích hợp với dạng sử dụng, như tá dược, chất kết dính, chất làm ẩm, chất gây rã, chất làm trơn và chất pha loãng nếu cần. Khi chế phẩm là thuốc tiêm, nó cùng

với chất mang thích hợp có thể được làm vô khuẩn để thu được chế phẩm.

Các ví dụ về tá dược bao gồm lactoza, sacaroza, glucoza, tinh bột, canxi cacbonat và xenluloza vi tinh thể.

Các ví dụ về chất kết dính bao gồm metylxenluloza, carboxymetylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, gelatin và polyvinylpyrrolidon.

Các ví dụ về chất gây rã bao gồm carboxymetylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, tinh bột, natri alginat, aga và natri lauryl sulfat.

Các ví dụ về chất làm trơn bao gồm bột talc, magie stearat và macrogol. Dầu cacao, macrogol, metylxenluloza hoặc chất tương tự có thể được sử dụng làm nguyên liệu nền cho thuốc đạn.

Khi chế phẩm được bào chế ở dạng dung dịch, thuốc tiêm nhũ hóa hoặc thuốc tiêm được tạo hỗn dịch, chất hòa tan, chất tạo hỗn dịch, chất nhũ hóa, chất ổn định, chất bảo quản, chất tạo đẳng trương và chất tương tự mà thường được sử dụng có thể được thêm vào nếu cần. Để sử dụng qua đường miệng, chất tạo ngọt, hương liệu hoặc chất tương tự có thể được thêm vào.

Việc định liều phụ thuộc vào mức độ trầm trọng và sự đáp ứng với tình trạng bệnh cần điều trị, với quá trình điều trị kéo dài từ vài ngày đến vài tháng, hoặc cho đến khi sự chữa khỏi bệnh được thực hiện hoặc thu được sự giảm nhẹ tình trạng bệnh. Lịch biểu dùng thuốc tối ưu có thể được tính toán từ các giá trị đo mức tích tụ dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin trong cơ thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định liều lượng tối ưu, các phương pháp học trong việc định liều và chế độ lặp lại.

Tỷ lệ hàm lượng của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế trong dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin thường là, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, trong khoảng từ 0,01 đến 99,99% trọng lượng so với 100% trọng lượng của dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin.

Khi kháng nguyên được sử dụng, thì cần xét đến tỷ lệ hàm lượng của kháng nguyên và tá dược theo sáng chế, tá dược này thường nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 phần trọng lượng so với 1 phần trọng lượng của kháng nguyên.

Liều lượng của dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin được đa dạng hóa tùy thuộc vào mức độ kích thích miễn dịch mong muốn, độ tuổi của đối tượng sử

dụng, giới tính hoặc yếu tố tương tự, do đó liều lượng này có thể được thiết lập một cách phù hợp, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 10 mg/kg thể trọng/ngày, nhưng nó không bị giới hạn đặc biệt trong khoảng này.

Ngoài ra, theo mức độ hiệu quả của dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin mong muốn, độ tuổi của đối tượng sử dụng, giới tính hoặc yếu tố tương tự, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng cho cùng đối tượng vài lần, ví dụ, lên tới khoảng 2 đến 4 lần. Khi dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế được sử dụng cho cùng đối tượng vài lần, khoảng cách thời gian được thiết lập thích hợp, ví dụ, khoảng từ 14 đến 30 ngày.

Dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với 1 hoặc nhiều loại thuốc. Chất điều trị mà đã biết là chất điều trị cho bệnh đích trong lĩnh vực này thì có thể được sử dụng làm thuốc. Ví dụ, khi bệnh là bệnh ung thư, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được đồng sử dụng với (các) chất hóa trị liệu. Ví dụ, khi bệnh là bệnh nhiễm vi khuẩn, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được đồng sử dụng với (các) chất kháng sinh. Dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời hoặc riêng rẽ với (các) chất khác. Ngoài ra, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế và (các) chất điều trị có thể được sử dụng dưới các dạng bào chế khác nhau độc lập bao gồm mỗi loại hoặc dạng bào chế đơn bao gồm dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin và (các) chất điều trị. Hơn nữa, khi bệnh là bệnh ung thư, dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với việc điều trị bằng phẫu thuật đã được biết trong lĩnh vực này.

Hơn nữa, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế với lượng hữu hiệu. Ví dụ về “đáp ứng miễn dịch” là sự tăng tính cảm ứng của lympho bào T độc tế bào (CTL) đặc hiệu so với đối chứng. Phương pháp cụ thể để xác định mức độ cảm ứng CTL được mô tả chẳng hạn trong Ví dụ 3 sau đây và WO2013/024582.

Hơn nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế với lượng hữu hiệu để làm giảm một hoặc nhiều triệu

chúng của bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn so với đối chứng.

“Đối tượng” dùng để chỉ cá thể mà là đích cho việc điều trị bằng dược phẩm hoặc chế phẩm vaccin theo sáng chế. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm động vật có vú như người, động vật dùng cho phòng thí nghiệm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), vật nuôi (ví dụ, chó, mèo, chồn furo và chim) và gia súc (ví dụ, trâu bò, lợn, gà, dê, đà điểu, cừu và ngựa).

“Lượng hữu hiệu” dùng để chỉ liều lượng đủ để gây ra hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch, tạo ra hiệu quả dược lý và/hoặc sinh lý mong muốn, hoặc tạo ra sự điều trị cho rối loạn, bệnh hoặc tình trạng. Liều lượng chính xác có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như yếu tố biến đổi phụ thuộc vào đối tượng (ví dụ, độ tuổi và tình trạng sức khỏe của hệ miễn dịch), bệnh, giai đoạn của bệnh và quá trình điều trị đã cung cấp.

“Bệnh ung thư” không bị giới hạn đặc biệt, miễn là nó là bệnh ung thư mà người, vật nuôi, gia súc hoặc đối tượng tương tự có thể mắc. Các ví dụ có thể kể đến là bệnh ung thư bạch cầu dạng tủy mạn tính (Chronic Myeloid Leukemia: CML), bệnh ung thư bạch cầu dạng tủy cấp tính (Acute Myeloid Leukemia: AML), u lympho, bệnh Hodgkin, u lympho không Hodgkin, đa u tủy, u não, ung thư vú, caxinom màng trong tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư dạ dày như ung thư dạ dày lan tỏa, ung thư ruột thừa, ung thư kết-trực tràng, ung thư gan, caxinom tế bào gan, ung thư túi mật, caxinom đường mật, ung thư tụy, ung thư thượng thận, u mô đệm đường tiêu hóa, u trung biểu mô, caxinom đầu và cổ, ung thư thanh quản, ung thư miệng, ung thư nướu răng, ung thư lưỡi, ung thư niêm mạc miệng, ung thư tuyến nước bọt, ung thư xoang cạnh mũi, caxinom xoang hàm, caxinom xoang trán, ung thư xoang sàng, ung thư xoang bướm, ung thư tuyến giáp, ung thư thận, ung thư phổi như ung thư phổi tế bào không nhỏ (Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC) và ung thư phổi tế bào nhỏ (Small Cell Lung Cancer: SCLC), sacom xương, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư bàng quan, sacom cơ vân, ung thư da, caxinom hậu môn, sacom sụn, sacom bao hoạt dịch, bệnh lạc nội mạc tử cung, khối u mô mềm và u nguyên bào xương.

“Bệnh nhiễm khuẩn” dùng để chỉ bệnh nhiễm khuẩn cấp tính hoặc mạn tính, đặc biệt là bệnh nhiễm virus. Các ví dụ có thể kể đến bao gồm, nhưng

không chỉ bị giới hạn ở, bệnh thiếu hụt miễn dịch do HIV hoặc loại tương tự, u nhú do HPV hoặc loại tương tự, ecpet do HSV hoặc loại tương tự, viêm não, cúm do virus cúm A ở người hoặc loại tương tự và cảm lạnh do rinovirus ở người.

Trong phần mô tả này, ý nghĩa của mỗi phần viết tắt là như sau:

Ac: axetyl

CPG: Thủy tinh có độ xốp được kiểm soát (Controlled Pore Glass)

DIEA: N,N-diisopropyletylamin

DMAP: 4-dimetylaminopyridin

DMTr: dimetoxytrityl

DMT-MM: 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua

DMF: N,N'-dimetylformamit

Et: etyl

Fmoc: 9-florenylmetyloxycarbonyl

HBTU: O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametyluroni-hexaflo-phosphat

Me: metyl

MMTr: 4-metoxypenyldiphenylmetyl

MMTrCl: 4-metoxytrityl clorua

PBS: nước muối được đệm phosphat

TBS: tert-butyldimetylsilyl

TBAF: tetrabutylamoni florua

TFA: axit trifloaxetic

THF: tetrahydrofuran

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào, nhưng không chỉ bị giới hạn ở, các ví dụ, ví dụ tham khảo và ví dụ thử nghiệm sau đây.

Phân tích cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) của mỗi hợp chất thu được trong các ví dụ được thực hiện ở tần số 300 MHz hoặc 400 Mhz bằng cách sử dụng CD₃OD, CDCl₃ hoặc DMSO-d₆.

Phân tích sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao (Ultra Performance Liquid Chromatography: UPLC) được thực hiện trong các điều kiện sau đây.

Pha động: [A] là dung dịch formic 0,1% trong nước, [B] là dung dịch

axetonitril chứa axit formic 0,1% trong nước

Gradient: gradient tuyến tính của dung môi [B] 5% đến 100% trong 3,5 phút được thực hiện, và dung môi [B] 100% được duy trì trong 0,5 phút.

Cột: ACQUITY UPLC (nhãn hiệu đã đăng ký) BEH C18 (1,7 μm , đường kính trong 2,1 x 50 mm) (Waters)

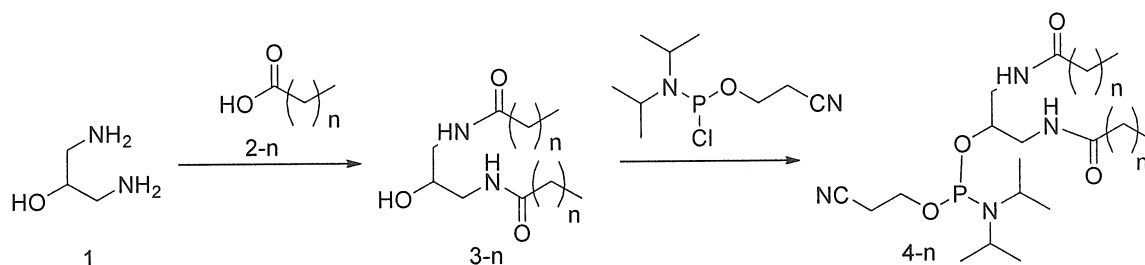
Tốc độ chảy: 0,8 ml/phút

Bước sóng phát hiện PDA: 254 nm (khoảng phát hiện 210-500 nm)

Ví dụ 1: Tổng hợp oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế

A) Tổng hợp lipit

1-1) Tổng hợp 4-n



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

1-1-1) Tổng hợp hợp chất 3-6

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-6 (3,20 g, 22,2 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong THF-DMF (5:1, 60 ml), và DIEA (4,84 ml, 27,7 mmol) và HBTU (8,84 g, 23,3 mmol) được thêm vào. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (2,2 g, 24,41 mmol) trong dung dịch DMF (5 ml) được thêm từng giọt trong 10 phút và khuấy trong 3 giờ. Lượng hỗn hợp phản ứng được cô đặc đến khi còn một nửa ở áp suất giảm, và lượng còn lại này được thêm từng giọt vào nước (100 ml). Hỗn hợp được khuấy trong 10 phút, và chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn này được rửa bằng nước (50 ml) và axetonitril (150 ml) để thu được hợp chất 3-6 (3,2 g, 9,34 mmol) dưới dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6,45 (2H, t, $J = 6,0$ Hz), 4,39 (1H, s), 3,78-3,73 (1H, m), 3,33 (4H, t, $J = 5,6$ Hz), 2,22 (4H, t, $J = 7,7$ Hz), 1,67 (4H, dt, $J = 31,0, 14,1$ Hz), 1,30-1,27 (16H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

1-1-2) Tổng hợp hợp chất 4-8

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-8 (7,65 g, 44,40 mmol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) trong DMF (50,0 ml) và diclometan (100,0 ml). DIEA (8,72 ml, 66,6 mmol) và HBTU (18,52 g, 48,8 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (2,0 g, 22,2 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (20 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (100 ml) và axetonitril (100 ml) và làm khô để thu được hợp chất 3-8 (6,6 g, 16,6 mmol) dưới dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,29 (brs, 2H), 4,12 (s, 1H), 3,76 (dd, 1H, $J = 4,5$, 4,5 Hz), 3,42-3,35 (m, 2H), 3,31-3,25 (m, 2H), 2,22 (t, 4H, $J = 7,5$ Hz), 1,65-1,60 (m, 4H), 1,29-1,26 (m, 24H), 0,88 (t, 6H, $J = 6,5$ Hz).

ESI-MS(m/z): 340 ($M+1$).

Bước 2

Hợp chất 3-8 (2,88 g, 7,22 mmol) được tạo huyền phù trong diclometan (60 ml), và DIEA (5,30 ml, 30,3 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (3,23 ml, 14,5 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tách bằng phễu tách, và lớp hữu cơ pha loãng bằng diclometan (80 ml) được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (20 ml), hai lần bằng nước (20 ml), và một lần bằng nước muối (20 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô đặc ở áp suất giảm. Thu được dầu màu nâu tạo ra, hợp chất 4-8 (2,88 g, 4,81 mmol) ở dạng sản phẩm thô. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 148,2 (s)

1-1-3) Tổng hợp hợp chất 4-10

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-10 (9,78 g, 48,8 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong DMF (150,0 ml) và diclometan (75 ml). DIEA (12,79 ml, 73,2 mmol) và HBTU (20,37 g, 53,7 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy

mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Hợp chất 1 (2,2 g, 24,41 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 80 °C, và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (200 ml) và nước (50 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (200 ml) và axetonitril (400 ml) để thu được hợp chất 3-10 (9,95 g, 21,88 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6,25 (2H, t, $J = 5,8$ Hz), 4,07 (1H, s), 3,75 (1H, s), 3,44-3,38 (2H, m), 3,29-3,23 (2H, m), 2,22 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,67-1,59 (4H, m), 1,30-1,25 (64H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 2

Tạo huyền phù hợp chất 3-10 (230 mg, 0,506 mmol) trong diclometan (11 ml), và DIEA (0,353 ml, 2,023 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (0,226 ml, 1,012 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tách bằng phễu tách, và lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), năm lần bằng nước (10 ml), và một lần bằng nước muối (10 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô đặc ở áp suất giảm. Thu được dầu màu nâu tạo ra, hợp chất 4-10 (365 mg) ở dạng sản phẩm thô. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ : 148,2 (s)

1-1-4) Tổng hợp hợp chất 4-12

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-12 (5,07 g, 22,19 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong DMF (51,8 ml) và diclometan (28,6 ml). DIEA (5,81 ml, 33,3 mmol) và HBTU (9,26 g, 24,4 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (1,0 g, 11,1 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 40°C, và được

khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (50 ml), axetonitril (50 ml) và diclometan (50 ml) để thu được hợp chất 3-12 (4,8 g, 9,4 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,20 (brs, 2H), 3,96 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,40 (dd, 2H, $J=4,0, 12,0$ Hz), 3,25 (dd, 2H, $J = 4,0, 12,0$ Hz), 2,22 (t, 4H, $J = 12,0$ Hz, 2H), 1,62 (d, 4H, $J = 8,0$ Hz), 1,29-1,25 (m, 40H), 0,90-0,86 (m, 6H)

ESI-MS(m/z): 512 ($M+1$).

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 3-12 (5,10 g, 9,98 mmol) trong diclometan (257 ml), và bổ sung DIEA (6,97 ml, 39,9 mmol). Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (4,46 ml, 20,0mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tách bằng phễu tách, và lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml), hai lần bằng nước (100 ml), và một lần bằng nước muối (100 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất 4-12 (4,80 g, 6,75 mmol) thu được ở dạng dầu màu nâu làm sản phẩm thô. Cấu trúc của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 148,2 (s)

1-1-5) Tổng hợp hợp chất 4-14

Hòa tan hợp chất 2-14 (12,52 g, 48,8 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong DMF (150,0 ml) và diclometan (75 ml). DIEA (12,79 ml, 73,2 mmol) và HBTU (20,37 g, 53,7 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ. Hợp chất 1 (2,2 g, 24,41 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 80°C , và được khuấy trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (800 ml) và nước (50 ml), chất rắn màu trắng thu được

được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (500 ml), axetonitril (300 ml) và diclometan (100 ml) để thu hợp chất 3-14 (10,9 g, 19,23 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6,21 (2H, s), 3,97 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 3,77-3,74 (1H, m), 3,45-3,38 (2H, m), 3,28-3,22 (2H, m), 2,22 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,65-1,61 (4H, m), 1,29-1,25 (48H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 3-14 (1,00 g, 1,76 mmol) trong diclometan (50 ml), và DIEA (0,924 ml, 5,29 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (0,870 ml, 3,53 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan (50 ml). Dung dịch được tách bằng phễu tách, và sau đó lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml), hai lần bằng nước (100 ml), và một lần bằng nước muối (100 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất 4-14 (1,00 g, 1,30 mmol) vô định hình màu trắng thu được làm sản phẩm thô. Sự hình thành hợp chất này được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ : 148,2 (s)

1-1-6) Tổng hợp hợp chất 4-16

Theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu phi sáng chế 3, hợp chất 3-16 được tổng hợp từ hợp chất 2-16, và sau đó hợp chất 4-16 được tổng hợp.

Hợp chất 3-16: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6,20 (brs, 2H), 3,95 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 3,25 (m, 2H), 2,24 (m, 4H), 1,68-1,20 (m, 60H), 0,88 (t, 6H, $J=8,0$ Hz).

Hợp chất 4-16: $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ :148,2 (s)

1-1-7) Tổng hợp hợp chất 4-18

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-18 (13,9 g, 44,4 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong DMF (207 ml) và diclometan (214 ml). DIEA (16,3 ml, 93

mmol) và HBTU (18,5 g, 48,8 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (2,0 g, 22,2 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 40°C, và được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (100 ml), axetonitril (300 ml) và diclometan (100 ml) để thu hợp chất 3-18 (10,0 g, 14,7 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,20 (brs, 2H), 3,96 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,42 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 2,22 (m, 4H), 1,68-1,20 (m, 68H), 0,88 (m, 6H)

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 3-18 (3,8 g, 5,60 mmol) trong diclometan (230 ml), DIEA (5,86 ml, 33,6 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (3,74 ml, 16,79mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tách bằng phễu tách, và lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml), một lần bằng nước (50 ml), và một lần bằng nước muối (50 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô đặc ở áp suất giảm. Sau khi thêm axetonitril vào phần cặn, chất rắn màu trắng được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, nước và axetonitril để thu được hợp chất 4-18 (4,13 g, 4,70 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng. Sự hình thành hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 148,2 (s)

1-1-8) Tổng hợp hợp chất 4-20

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-20 (10,2 g, 30,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong DMF (250 ml) và diclometan (250 ml). DIEA (7,86 ml, 45 mmol) và HBTU (12,52 g, 33,0 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (1,35 g, 15,0 mmol)

được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 40°C, và được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (50 ml), axetonitril (50 ml) và diclometan (50 ml) để thu được hợp chất 3-20 (7,20 g, 9,79 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,18 (brs, 2H), 3,75 (m, 1H), 3,41 (m, 2H), 3,27 (m, 2H), 2,22 (m, 4H), 1,58-1,25 (m, 76H), 0,89-0,86 (m, 6H)

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 3-20 (1,0 g, 1,36 mmol) trong clorofom (50 ml), và DIEA (0,713 ml, 4,08 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (0,607 ml, 2,72 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được thêm từng giọt vào axetonitril (300 ml) trong khi khuấy mạnh. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc, và chất rắn này được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (20 ml), hai lần bằng nước (20 ml), và hai lần bằng axetonitril (20 ml). Chất rắn thu được được làm khô ở áp suất giảm để thu hợp chất 4-20 (843 mg, 0,901 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng. Sự hình thành hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 148,2 (s)

1-1-9) Tổng hợp hợp chất 4-22

Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-22 (8,79 g, 23,8 mmol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) trong DMF (250,0 ml) và diclometan (250,0 ml). DIEA (6,25 ml, 35,8 mmol) và HBTU (9,95 g, 26,2 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hợp chất 1 (1,07 g, 11,9 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt đến 40°C, và được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml), chất rắn màu trắng thu được được thu

gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước (50 ml), axetonitril (50 ml) và diclometan (50 ml) để thu được hợp chất 3-22 (8,10 g, 8,17 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

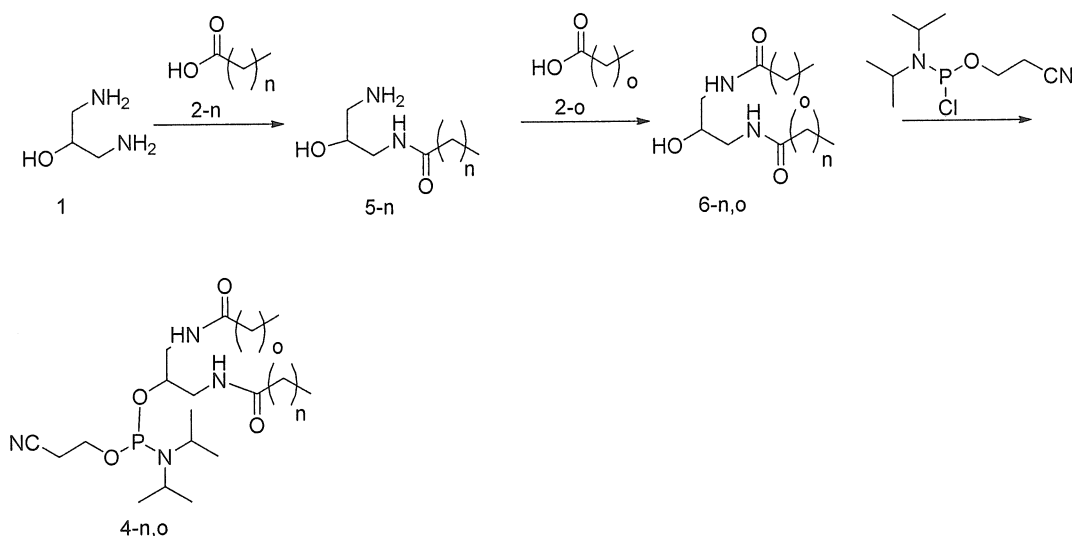
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,06 (brs, 2H), 3,73 (m, 1H), 3,36 (dd, 2H, $J = 6,0, 14,4$ Hz), 3,22 (dd, 2H, $J = 5,2, 14,4$ Hz), 2,17 (m, 4H), 1,61 (m, 4H), 1,59-1,24 (m, 80H), 0,87-0,84 (m, 6H)

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 3-22 (1,0 g, 1,36 mmol) trong clorofom (50 ml), và DIEA (0,713 ml, 4,08 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (0,607 ml, 2,72mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được thêm từng giọt vào axetonitril (300 ml) trong khi khuấy mạnh. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc, và chất rắn này được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (20 ml), hai lần bằng nước (20 ml), và hai lần bằng axetonitril (20 ml). Chất rắn thu được được làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 4-22 (814 mg, 0,821 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng. Sự hình thành hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng $^{31}\text{P-NMR}$.

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 148,2 (s)

1-2) Tổng hợp hợp chất 4-n,o



trong đó n hoặc o là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28.

1-2-1) Tổng hợp hợp chất 4-8,18

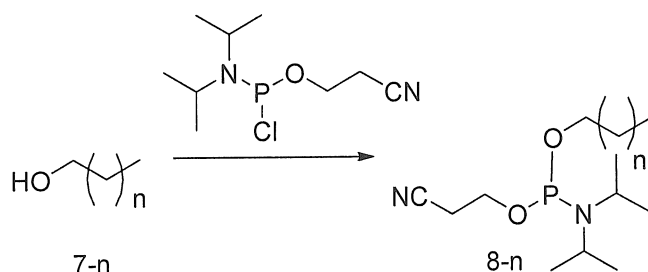
Bước 1

Hòa tan hợp chất 2-8 trong DMF và dung dịch. DIEA và HBTU được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Hợp chất 1 được thêm ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch huyền phù thu được, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Dung dịch hoạt hóa chứa hợp chất 2-18 mà đã được điều chế riêng rẽ [hợp chất 2-18 được hòa tan trong DMF và dung dịch. DIEA và HBTU được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng] được thêm vào bình phản ứng, và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được gia nhiệt đến 40°C, và sau đó được khuấy. Hỗn hợp phản ứng được thêm dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn thu được được rửa bằng nước, axetonitril và diclometan để thu được hợp chất 6-8,18.

Bước 2

Tạo huyền phù cho hợp chất 6-8,18 trong clorofom, và DIEA được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được thêm từng giọt vào axetonitril trong khi khuấy mạnh. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc, và chất rắn này được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, hai lần bằng nước, và hai lần bằng axetonitril. Chất rắn thu được được làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 4-8,18. Sự hình thành hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

2) Tổng hợp hợp chất 8-n



trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28.

2-1) Tổng hợp hợp chất 8-6

Hòa tan hợp chất 7-6 (1,00 g, 7,68 mmol, Tokyo Chemical Industry

Co., Ltd.) trong diclometan (15 ml), và trietylamin (2,13 ml, 15,4 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (1,71 ml, 7,68mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Phản ứng được dừng bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, và hỗn hợp được chiết hai lần bằng etyl axetat (50 ml). Lớp hữu cơ được rửa một lần bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), ba lần bằng nước (10 ml) và một lần bằng nước muối (10 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô đặc ở áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, hợp chất 8-6 (2,60 g) ở dạng sản phẩm thô. Sự hình thành hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

2-2) Tổng hợp hợp chất 8-10

Hòa tan hợp chất 7-10 (1,00 g, 5,37 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong diclometan (15 ml), và trietylamin (1,49 ml, 10,7 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (1,20 ml, 5,37 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Phản ứng được dừng bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, và hỗn hợp được chiết hai lần bằng etyl axetat (50 ml). Lớp hữu cơ được rửa một lần bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), ba lần bằng nước (10 ml) và một lần bằng nước muối (10 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô đặc ở áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, hợp chất 8-10 (2,09 g) ở dạng sản phẩm thô. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

2-3) Tổng hợp hợp chất 8-12

Hòa tan hợp chất 7-12 (4,29 g, 20,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong diclometan (52 ml), và DIEA (10,5 ml, 60,0 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (5,36 ml, 24,00 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Phản ứng được dừng bằng dịch natri bicacbonat bão

hòa trong nước (20 ml), và sau đó hỗn hợp được tách bằng phễu tách. Sau khi lớp hữu cơ được rửa một lần bằng nước (100 ml), lớp hữu cơ này được rửa một lần bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml) và hai lần bằng nước (100 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô đặc ở áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, hợp chất 8-12 (4,80 g, 11,6 mmol) ở dạng sản phẩm thô. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,3 (s)

2-4) Tổng hợp hợp chất 8-14

Hòa tan hợp chất 7-14 (1,00 g, 4,12 mmol, NACALAI TESQUE, INC.) trong diclometan (15 ml), và triethylamin (1,14 ml, 8,25 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (0,92 ml, 4,12 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Phản ứng được dừng bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, và hỗn hợp được chiết hai lần bằng etyl axetat (50 ml). Lớp hữu cơ được rửa một lần bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml), ba lần bằng nước (10 ml) và một lần bằng nước muối (10 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô đặc ở áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, hợp chất 8-14 (1,87 g). Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

2-5) Tổng hợp hợp chất 8-16

Hòa tan hợp chất 7-16 (5,41 g, 20,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong diclometan (52 ml), và DIEA (10,5 ml, 60,0 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (4,91 ml, 22,00mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Phản ứng được dừng bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (20 ml), và sau đó hỗn hợp được tách bằng phễu tách. Sau khi lớp hữu cơ được rửa bằng nước (100 ml), lớp hữu cơ này được rửa một lần bằng dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml) và hai lần bằng nước (100 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô đặc ở áp suất giảm để thu được dầu màu nâu, hợp chất 8-16 (4,60 g, 9,77 mmol) ở dạng

sản phẩm thô. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,3 (s)

2-6) Tổng hợp hợp chất 8-18

Hòa tan hợp chất 7-18 (2,99 g, 10,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong clorofom (81 ml), và DIEA (3,67 ml, 21,0 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (2,34 ml, 10,5 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc, và phần cặn được rửa bằng axetonitril (50 ml). Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng axetonitril (50 ml). Sau đó, chất rắn màu vàng được làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 8-18 (1,22 g, 2,45 mmol). Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

2-7) Tổng hợp hợp chất 8-20

Hòa tan hợp chất 7-20 (3,27 g, 10,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong clorofom (81 ml), và DIEA (3,67 ml, 21,0 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (2,34 ml, 10,5 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô, và phần cặn được rửa bằng axetonitril (50 ml). Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng axetonitril (50 ml). Sau đó, chất rắn màu vàng được làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 8-20 (3,19 g, 6,06 mmol). Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

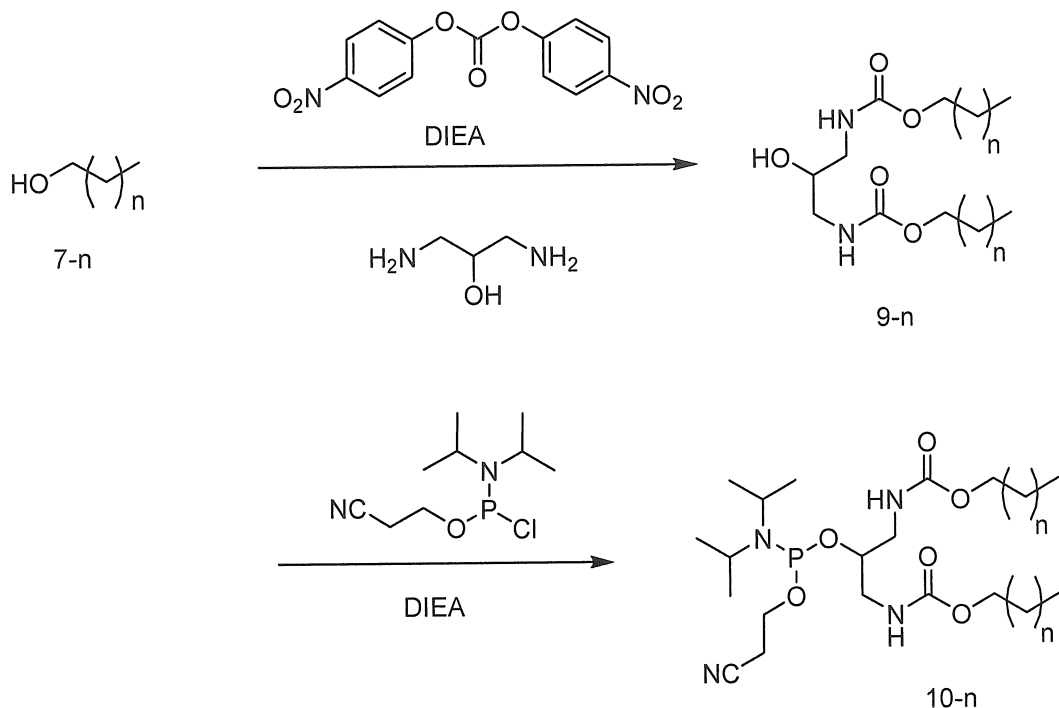
2-8) Tổng hợp hợp chất 8-22

Hòa tan hợp chất 7-22 (3,55 g, 10,0 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) trong clorofom (81 ml), và DIEA (3,67 ml, 21,0 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (2,34 ml, 10,5 mmol) được thêm ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô, và phần cặn được rửa bằng axetonitril (50 ml). Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc và rửa

bằng axetonitril (50 ml). Sau đó, chất rắn màu vàng được làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 8-22 (4,97 g, 8,96 mmol). Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 147,2 (s)

3) Tổng hợp hợp chất 10-n



trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28.

3-1) Tổng hợp hợp chất 10-16

Bước 1

Trong môi trường khí nitơ, thêm bis-(p-nitrophenyl) cacbonat (13,5 g, 44,4 mmol) và DIEA (11,6 ml, 66,6 mmol) vào hợp chất 7-16 (12,1 g, 44,4 mmol) trong dung dịch DMF (104 ml)-diclometan (57,1 ml), và sau đó hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Tiếp theo, hợp chất 1 (2,0 g, 22,2 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu ở 60°C trong 2 giờ. Chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng diclometan (100 ml), nước (100 ml) và axetonitril (100 ml) và sau đó làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 9-16 (15,44 g, 22,6 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

^1H -NMR(CDCl_3) δ : 5,20 (brs, 2H), 4,05 (m, 4H), 3,79 (m, 1H), 3,24 (m, 4H), 1,55-1,21 (m, 68H), 0,88 (m, 6H)

Bước 2

Trong môi trường khí nitơ, thêm DIEA (15,8 ml, 90,0 mmol) và 2-

xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (10,1 ml, 45,2 mmol) vào hợp chất 9-16 được tạo huyền phù trong diclometan (582 ml), và sau đó hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu ở 50°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (300 ml), một lần bằng nước (300 ml), và một lần bằng nước muối (300 ml). Lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat, và sau đó được cô ở áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong diclometan (50 ml) và được thêm từng giọt vào axetonitril (150 ml) để tạo bột. Chất rắn màu vàng tạo ra được làm khô ở áp suất giảm để thu hợp chất 10-16 (14,2 g, 16,1 mmol).

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 149,1 (s)

3-2) Tổng hợp hợp chất 10-18

Bước 1

Trong môi trường khí nitơ, thêm bis-(p-nitrophenyl) cacbonat (4,1 g, 13,4 mmol) và DIEA (3,5 ml, 20,1 mmol) vào hợp chất 7-18 (4 g, 13,4 mmol) trong dung dịch DMF (60 ml)-diclometan (40 ml), và sau đó hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Tiếp theo, hợp chất 1 (0,6 g, 6,7 mmol) trong dung dịch DMF (5 ml) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy qua đêm. Chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng diclometan, nước và axetonitril và sau đó làm khô ở áp suất giảm để thu hợp chất 9-18 (4,1 g, 5,55 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 5,20 (brs, 2H), 4,05 (t, 4H, $J = 8\text{Hz}$), 3,79 (s, 1H), 3,32 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 1,25 (s, 72H), 0,88 (t, 6H, $J = 8\text{Hz}$)

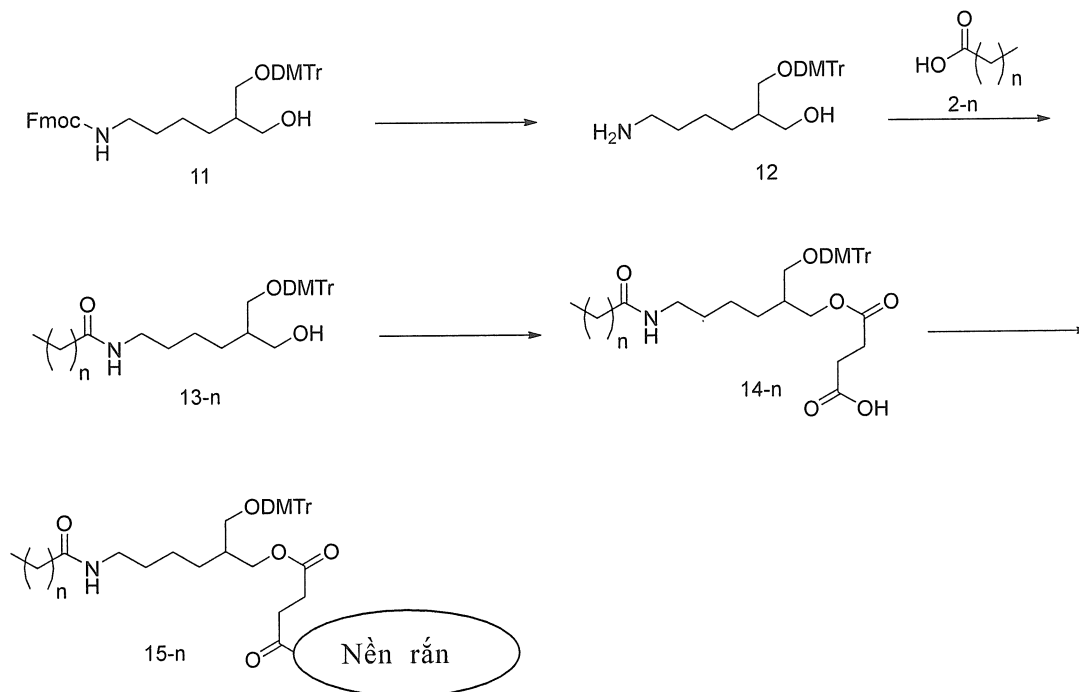
Bước 2

Trong môi trường khí nitơ, DIEA (1,2 ml, 6,8 mmol) và 2-xyanoethyl N,N-diisopropylcyclophosphoramidit (0,75 ml, 3,4 mmol) vào hợp chất 9-18 (1,0 g, 1,35 mmol) được tạo huyền phù trong diclometan (60 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 50°C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng diclometan (40 ml), và rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (40 ml x 2), nước (40 ml) và nước muối (40 ml). Lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat, và sau đó được cô ở áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong diclometan (15 ml) và được thêm từng giọt

vào axetonitril (150 ml) để tạo bột. Chất rắn thu được được làm khô ở áp suất giảm để thu hợp chất 10-18 (0,98 g, 1,04 mmol) ở dạng chất rắn màu trắng.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 149,1 (s)

4) Tổng hợp hợp chất 15-n



trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28.

4-1) Tổng hợp hợp chất 15-6

Các bước 1 và 2

Thêm diethylamin (1,4 ml, 13,40 mmol) vào hợp chất 11 (US2014/0142253) (722 mg, 1,075 mmol) trong diclometan (5,6 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 17 giờ. Sau khi etanol được thêm vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp được khuấy, dung môi được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được làm đồng bay hơi hai lần với etanol để thu được sản phẩm thô của hợp chất 12.

Thêm DMT-MM (476 mg, 1,720 mmol) vào hợp chất 2-6 (239 mg, 1,505 mmol) trong dung dịch etanol (5,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Hỗn hợp phản ứng thu được được thêm vào sản phẩm thô của hợp chất 12 trong dung dịch etanol (2,5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4,5 giờ. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước và nước được thêm vào phần cặn thu được, và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng

nước và nước muối, và sau đó làm khô bằng natri sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (n-hexan: ethyl axetat =70:30→20:80) để thu hợp chất 13-6 (320 mg, hiệu suất 52%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42-7,40 (2H, m), 7,32-7,26 (6H, m), 7,21 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,83 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 5,37 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,71-3,65 (1H, m), 3,63-3,57 (1H, m), 3,27 (1H, dd, $J = 9,2, 4,0$ Hz), 3,25-3,15 (2H, m), 3,07 (1H, dd, $J = 9,2, 7,2$ Hz), 2,45 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 2,12 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,78 (1H, s), 1,62-1,58 (2H, m), 1,47-1,40 (2H, m), 1,36-1,20 (12H, m), 0,87 (3H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 3

Thêm DMAP (6,6 mg, 0,054 mmol), DIEA (0,282 ml, 1,614 mmol) và anhydrit succinic (81 mg, 0,807 mmol) vào hợp chất 13-6 (310 mg, 0,538 mmol) trong diclometan (3,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sau đó sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom:metanol =100:0→90:10) để thu hợp chất 14-6 (360 mg, hiệu suất 99%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42-7,40 (2H, m), 7,31-7,25 (6H, m), 7,19 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,82 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 5,74 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 4,24 (1H, dd, $J = 10,8, 5,2$ Hz), 4,12 (1H, dd, $J = 10,8, 6,0$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,52-3,45 (1H, m), 3,24-2,98 (4H, m), 2,90 (1H, q, $J = 7,2$ Hz), 2,59-2,50 (3H, m), 2,14 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,90-1,85 (1H, m), 1,61-1,58 (2H, m), 1,48-1,18 (14H, m), 0,87 (3H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DIEA (0,186 ml, 1,065 mmol) và HBTU (89 mg, 0,234 mmol) vào hợp chất 14-6 (216 mg, 0,320 mmol) trong dung dịch axetonitril (42 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm Amino Ica CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (4,2 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 42 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn

hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi lọc hỗn hợp phản ứng, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 14-6 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 15-6 có lượng được mang là 53 $\mu\text{mol/g}$.

4-2) Tổng hợp hợp chất 15-10

Các bước 1 và 2

Theo phương pháp tương tự với bước 1 của mục 4-1), thu được sản phẩm thô của hợp chất 12 (392 mg).

Thêm DMT-MM (214 mg, 0,772 mmol) vào hợp chất 2-10 (155 mg, 0,772 mmol) trong dung dịch etanol (2,6 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng thu được được thêm vào sản phẩm thô của hợp chất 12 trong dung dịch etanol (2,5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Thêm DMT-MM (99 mg, 0,356 mmol) vào hợp chất 2-10 (71 mg, 0,356 mmol) trong dung dịch etanol (1,3 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Hỗn hợp được kết hợp với hỗn hợp phản ứng khác và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước và nước được thêm vào phần cặn thu được, và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, và làm khô bằng natri sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (n-hexan: etyl axetat = 80:20 $\rightarrow$ 30:70) để thu được hợp chất 13-10 (165 mg, 44%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,31-7,26 (6H, m), 7,21 (1H, t, $J = 6,6$ Hz), 6,83 (4H, d, $J = 8,4$ Hz), 5,35 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,70-3,57 (2H, m), 3,28-3,16 (3H, m), 3,07 (1H, t, $J = 8,0$ Hz), 2,43 (1H, s), 2,12 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,78 (1H, s), 1,61-1,58 (2H, m), 1,46-1,39 (2H, m), 1,25 (20H, s), 0,87 (3H, t, $J = 6,0$ Hz).

Bước 3

Thêm DMAP (4,3 mg, 0,035 mmol), DIEA (0,184 ml, 1,055 mmol) và anhydrit suxinic (53 mg, 0,528 mmol) vào hợp chất 13-10 (222 mg, 0,352 mmol) trong diclometan (2,2 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng

trong 2 ngày. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sau đó sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol =100:0→90:10) để thu được hợp chất 14-10 (243 mg, 94%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 6,0$ Hz), 7,31-7,26 (6H, m), 7,20 (1H, d, $J = 7,2$ Hz), 6,82 (4H, d, $J = 7,6$ Hz), 5,59 (1H, s), 4,29 (1H, d, $J = 10,4$ Hz), 4,17-4,13 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,23-2,98 (4H, m), 2,58 (4H, s), 2,16 (2H, t, $J = 8,0$ Hz), 1,90 (1H, s), 1,60 (2H, s), 1,42-1,19 (22H, m), 0,88 (3H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DIEA (0,166 ml, 0,950 mmol) và HBTU (79 mg, 0,209 mmol) vào hợp chất 14-10 (209 mg, 0,285 mmol) trong dung dịch axetonitril (38 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (3,8 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 23 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 38 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi lọc hỗn hợp phản ứng, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 14-10 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 15-10 có lượng được mang là 40 $\mu\text{mol/g}$.

4-3) Tổng hợp hợp chất 15-14

Các bước 1 và 2

Theo phương pháp tương tự với bước 1 của mục 4-1), thu được sản phẩm thô của hợp chất 12 (392 mg).

Thêm DMT-MM (372 mg, 1,346 mmol) vào hợp chất 2-14 (345 mg, 1,346 mmol) trong dung dịch etanol (4,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Hỗn hợp phản ứng thu được được thêm vào sản phẩm thô của hợp chất 12 trong dung dịch etanol (2,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 28 giờ. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước và nước được thêm vào

phần cặn thu được, và chiết bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, và làm khô bằng natri sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (n-hexan: ethyl axetat = 70:30 → 20:80) để thu được hợp chất 13-14 (228 mg, hiệu suất 37%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,40 (2H, d, $J = 6,8$ Hz), 7,31-7,21 (7H, m), 6,83 (4H, d, $J = 6,4$ Hz), 5,35 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,67 (1H, s), 3,61 (1H, s), 3,28-3,19 (3H, m), 3,07 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 2,43 (1H, s), 2,12 (2H, t, $J = 6,0$ Hz), 1,77 (1H, s), 1,59 (2H, s), 1,43 (2H, s), 1,25 (28H, s), 0,88 (3H, s).

Bước 3

Thêm DMAP (4,0 mg, 0,033 mmol), DIEA (0,171 ml, 0,977 mmol) và anhydrit succinic (49 mg, 0,488 mmol) vào hợp chất 13-14 (224 mg, 0,326 mmol) trong diclometan (2,2 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0 → 90:10) để thu được hợp chất 14-14 (163 mg, hiệu suất 64%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,40 (2H, d, $J = 6,4$ Hz), 7,30-7,26 (6H, m), 7,19 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 7,2$ Hz), 5,57 (1H, s), 4,29 (1H, d, $J = 10,8$ Hz), 4,17-4,13 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,23-2,98 (4H, m), 2,58 (4H, s), 2,15 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,90 (1H, s), 1,59 (4H, s), 1,46-1,25 (28H, m), 0,87 (3H, t, $J = 5,6$ Hz).

Bước 4

Thêm DIEA (0,122 ml, 0,700 mmol) và HBTU (58 mg, 0,154 mmol) vào hợp chất 14-14 (162 mg, 0,206 mmol) trong dung dịch axetonitril (28 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (2,8 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 28 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi lọc hỗn hợp phản ứng, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và

làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 14-14 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 15-14 có lượng được mang là 42 $\mu\text{mol/g}$.

4-4) Tổng hợp hợp chất 15-18

Các bước 1 và 2

Theo phương pháp tương tự với bước 1 của mục 4-1), thu được sản phẩm thô của hợp chất 12 (392 mg).

Thêm DMT-MM (471 mg, 1,702 mmol) vào hợp chất 2-18 (466 mg, 1,490 mmol) trong dung dịch etanol (5,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Hỗn hợp phản ứng thu được được thêm vào sản phẩm thô của hợp chất 12 trong dung dịch etanol (2,5 ml), hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4,5 giờ. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước và nước được thêm vào phần cặn thu được, và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, và làm khô bằng natri sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (n-hexan: etyl axetat = 70:30 $\rightarrow$ 20:80) để thu được hợp chất 13-18 (494 mg, hiệu suất 62%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 7,2$ Hz), 7,32-7,26 (6H, m), 7,21 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,83 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 5,36 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,70-3,65 (1H, m), 3,63-3,57 (1H, m), 3,27 (1H, dd, $J = 9,2, 4,0$ Hz), 3,24-3,13 (2H, m), 3,07 (1H, dd, $J = 9,2, 7,2$ Hz), 2,45 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 2,12 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,78 (1H, s), 1,63-1,25 (40H, m), 0,88 (3H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 3

Thêm DMAP (5,8 mg, 0,047 mmol), DIEA (0,248 ml, 1,419 mmol) và anhydrit succinic (71 mg, 0,709 mmol) vào hợp chất 13-18 (352 mg, 0,473 mmol) trong diclometan (3,5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và sau đó sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0 $\rightarrow$ 90:10) để thu được hợp chất 14-18 (225 mg, 56%) ở dạng dầu không màu.

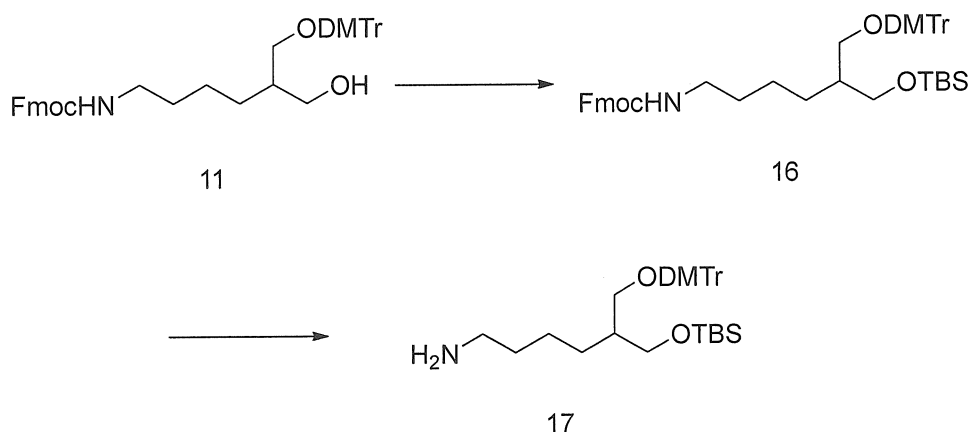
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 7,2$ Hz), 7,31-7,26 (6H, m), 7,20

(1H, t, $J = 6,4$ Hz), 6,82 (4H, d, $J = 7,6$ Hz), 5,57 (1H, s), 4,30 (1H, dd, $J = 10,4, 2,4$ Hz), 4,15 (1H, dd, $J = 10,4, 6,4$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,24-2,98 (4H, m), 2,59 (4H, s), 2,16 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,90 (1H, s), 1,59 (4H, s), 1,44-1,21 (36H, m), 0,88 (3H, t, $J = 5,6$ Hz).

Bước 4

Thêm DIEA (0,154 ml, 0,880 mmol) và HBTU (73 mg, 0,194 mmol) vào hợp chất 14-18 (223 mg, 0,264 mmol) trong dung dịch axetonitril (35 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Thêm Amino Ica CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (3,5 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 35 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi lọc hỗn hợp phản ứng, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 14-18 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 15-18 có lượng được mang là 56 $\mu\text{mol/g}$.

5) Tổng hợp hợp chất 17



Các bước 1 và 2

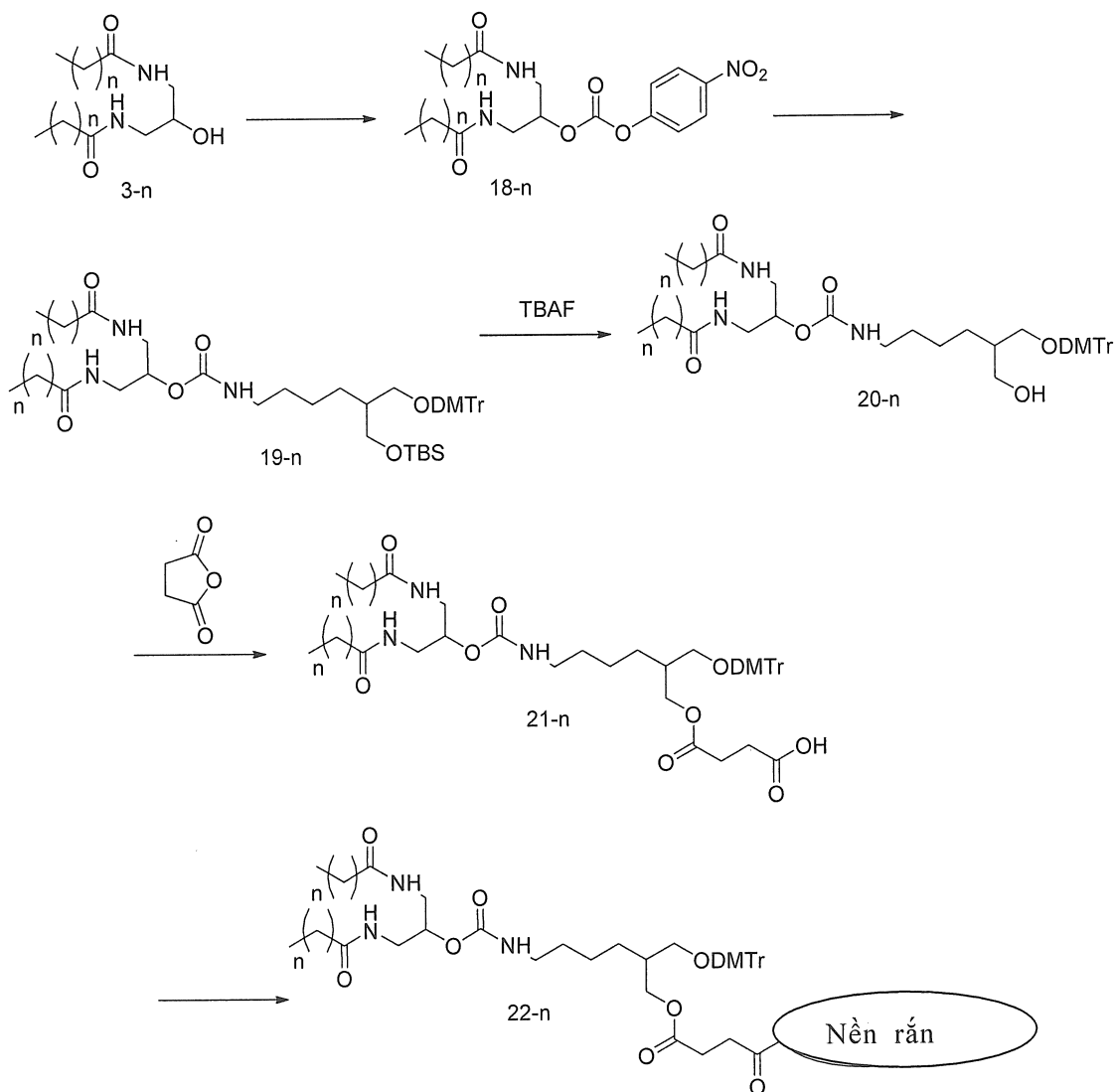
Thêm imidazol (71 mg, 1,044 mmol) và t-butylclodimetylsilan (79 mg, 0,522 mmol) vào hợp chất 11 (US2014/0142253, 292 mg, 0,435 mmol) trong dung dịch DMF (2,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và chiết bằng xyclopentyl metyl ete. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, và làm

khô bằng natri sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm để thu được sản phẩm thô của hợp chất 16 (352 mg).

Thêm diethylamin (0,6 ml, 5,74 mmol) vào sản phẩm thô của hợp chất 16 (352 mg) trong diclometan (2,4 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Sau khi etanol được thêm vào hỗn hợp phản ứng, dung môi được cô ở áp suất giảm. Phần cặn được làm đồng bay hơi hai lần với etanol, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom) để thu được hợp chất 17 (190 mg, 78%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,45-7,43 (2H, m), 7,32 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,29-7,25 (2H, m), 7,22-7,18 (1H, m), 6,81 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,68-3,61 (2H, m), 3,08-3,02 (2H, m), 2,63 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,75-1,69 (1H, m), 1,41-1,30 (6H, m), 1,27-1,15 (2H, m), 0,84 (9H, s), 0,01 (6H, s).

6) Tổng hợp hợp chất 22-n



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

6-1) Tổng hợp hợp chất 22-6

Bước 1

Thêm DIEA (1,53 ml, 8,76 mmol), bis(nitrophenyl) cacbonat (1,33 g, 4,38 mmol) và DMAP (178 mg, 1,46 mmol) vào hợp chất 3-6 (1,0 g, 2,92 mmol) trong dung dịch THF (20 ml)-clorofom (20 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc. Sau khi nước cái được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan: ethyl axetat =60:40→20:80) để thu được hợp chất 18-6 (982 mg, 66%) ở dạng chất rắn màu trắng.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8,32-8,26 (2H, m), 7,42 (2H, dt, J = 9,9, 2,5 Hz), 6,36 (2H, t, J = 6,4 Hz), 4,80 (1H, ddd, J = 10,7, 5,6, 3,3 Hz), 3,65-3,50 (4H, m), 2,26 (4H, t, J = 7,6 Hz), 1,69-1,62 (4H, m), 1,28 (16H, dt, J = 19,1, 4,7 Hz), 0,87 (6H, t, J = 6,8 Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-6 (450 mg, 0,89 mmol) vào hợp chất 17 (500 mg, 0,89 mmol) trong diclometan (10,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm và tinh chế bằng sắc ký cột amino silicagel (hexan: ethyl axetat =65:35→10:90) để thu hợp chất 19-6 (625 mg, 76%) ở dạng dầu không màu.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7,42 (2H, d, J = 7,4 Hz), 7,31 (4H, t, J = 6,2 Hz), 7,26 (3H, t, J = 3,9 Hz), 7,19 (1H, t, J = 7,2 Hz), 6,82 (4H, t, J = 6,0 Hz), 6,25 (2H, t, J = 5,8 Hz), 4,70 (2H, dd, J = 10,3, 5,3 Hz), 3,79 (6H, d, J = 4,4 Hz), 3,62 (2H, dd, J = 10,1, 5,1 Hz), 3,51 (2H, dd, J = 13,3, 6,4 Hz), 3,32-3,26 (2H, m), 3,08 (4H, dt, J = 20,2, 6,6 Hz), 2,19 (4H, t, J = 7,7 Hz), 1,70 (1H, t, J = 5,7 Hz), 1,61 (8H, t, J = 9,3 Hz), 1,42 (2H, t, J = 7,3 Hz), 1,26 (20H, tt, J = 26,0, 10,5 Hz), 0,88 (6H, dd, J = 12,0, 5,3 Hz), 0,83 (9H, s).

Bước 3

Thêm TBAF (trong THF 1M, 1,34 ml, 1,34 mmol) vào hợp chất 19-6 (625 mg, 0,67 mmol) trong THF (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, và sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột diol silicagel (hexan: ethyl axetat =50:50→10:90) để thu được hợp chất 20-6 (541 mg, 99%) ở dạng chất lỏng

không màu.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7,41 (2H, t, J = 4,3 Hz), 7,26 (9H, ddt, J = 31,6, 12,0, 4,9 Hz), 6,83 (4H, d, J = 8,8 Hz), 6,38 (2H, q, J = 6,1 Hz), 4,88 (1H, t, J = 5,6 Hz), 4,67 (1H, t, J = 5,0 Hz), 3,79 (6H, t, J = 7,5 Hz), 3,69-3,61 (2H, m), 3,50-3,44 (2H, m), 3,30 (3H, tt, J = 20,6, 6,5 Hz), 3,15-3,06 (3H, m), 2,63 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,78 (1H, s), 1,62 (4H, t, J = 6,9 Hz), 1,43 (2H, t, J = 5,4 Hz), 1,30 (20H, dt, J = 29,2, 11,0 Hz), 0,87 (6H, t, J = 6,9 Hz).

Bước 4

Thêm DIEA (0,35 ml, 1,98 mmol), DMAP (8,0 mg, 0,066 mmol), và anhydrit succinic (132 mg, 1,32 mmol) vào hợp chất 20-6 (541 mg, 0,66 mmol) trong diclometan (2,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, và sau đó sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol =40:1→10:1) để thu hợp chất 21-6 (591 mg, 97%) ở dạng chất lỏng không màu.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7,41 (2H, d, J = 7,5 Hz), 7,31-7,25 (8H, m), 7,20 (1H, t, J = 7,2 Hz), 6,82 (4H, d, J = 8,5 Hz), 6,62 (1H, t, J = 6,3 Hz), 6,48 (1H, t, J = 6,5 Hz), 5,91 (1H, t, J = 5,5 Hz), 4,71 (1H, t, J = 5,3 Hz), 4,42 (1H, dd, J = 11,0, 3,2 Hz), 4,14 (1H, dd, J = 10,9, 5,9 Hz), 3,79 (6H, s), 3,40 (4H, tt, J = 20,4, 7,0 Hz), 3,08 (4H, dq, J = 33,3, 8,0 Hz), 2,69-2,49 (4H, m), 2,20 (4H, dd, J = 15,6, 8,2 Hz), 1,95 (1H, s), 1,61 (4H, d, J = 7,0 Hz), 1,27 (22H, d, J = 5,0 Hz), 0,87 (6H, dd, J = 6,8, 5,1 Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,30 ml, 1,70 mmol) và HBTU (142 mg, 0,37 mmol) vào hợp chất 21-6 (312 mg, 0,34 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (4:1, 25 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm dạng HybridCPG amino 2000Å (Prime Synthesis, Inc.) (2,8 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa HybridCPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm THF/anhydrit axetic/pyridin (8:1:1, 30 ml) được thêm vào HybridCPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 3 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa HybridCPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần

bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-6 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-6 có lượng được mang là 114 $\mu\text{mol/g}$.

6-2) Tổng hợp hợp chất 22-8

Bước 1

Thêm bis(nitrophenyl) cacbonat (1,14 g, 3,76 mmol), DIEA (1,3 ml, 7,5 mmol) và DMAP (0,15 g, 1,25 mmol) vào hợp chất 3-8 (1 g, 2,5 mmol) trong THF (20 ml) và clorofom (20 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc. Sau khi nước cái được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan: etyl axetat =60:40→20:80) để thu được hợp chất 18-8 (1,17 g, 83%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,27 (2H, dt, $J = 9,9, 2,5$ Hz), 7,41 (2H, dt, $J = 9,9, 2,5$ Hz), 6,42 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), 4,81-4,78 (1H, m), 3,65-3,50 (4H, m), 2,26 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,68-1,62 (4H, m), 1,28 (24H, t, $J = 9,5$ Hz), 0,87 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-8 (500 mg, 0,89 mmol) và DIEA (0,23 ml, 1,33 mmol) vào hợp chất 17 (500 mg, 0,89 mmol) trong diclometan (10,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột amino silicagel (hexan: etyl axetat =50:50→10:90) để thu được hợp chất 19-8 (661 mg, 75%) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,31 (4H, t, $J = 6,3$ Hz), 7,26 (3H, t, $J = 3,9$ Hz), 7,19 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,25 (2H, t, $J = 6,0$ Hz), 4,70 (2H, q, $J = 5,4$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,63 (2H, t, $J = 5,3$ Hz), 3,51 (2H, dd, $J = 13,1, 6,5$ Hz), 3,29 (2H, dd, $J = 12,9, 7,0$ Hz), 3,08 (4H, dt, $J = 20,0, 6,5$ Hz), 2,18 (4H, t, $J = 7,7$ Hz), 1,70 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 1,62 (6H, d, $J = 11,2$ Hz), 1,42 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,27 (28H, dt, $J = 37,9, 14,6$ Hz), 0,87 (6H, t, $J = 6,8$ Hz), 0,83 (9H, s).

Bước 3

Thêm TBAF (trong THF M, 1,34 ml, 1,34 mmol) vào hợp chất 19-8 (661

mg, 0,669 mmol) trong THF (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 25 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột diol silicagel (hexan: ethyl axetat = 50:50→10:90) để thu hợp chất 20-8 (549 mg, 94%) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 4,4$ Hz), 7,32-7,19 (9H, m), 6,84 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,35 (2H, q, $J = 6,1$ Hz), 4,85 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 4,67 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,64 (2H, dd, $J = 14,3, 7,4$ Hz), 3,47 (2H, dt, $J = 14,1, 5,8$ Hz), 3,30 (3H, tt, $J = 19,5, 6,2$ Hz), 3,15-3,06 (3H, m), 2,60 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,78 (1H, s), 1,62 (4H, s), 1,44 (2H, d, $J = 5,1$ Hz), 1,27 (28H, dd, $J = 11,0, 3,7$ Hz), 0,87 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (7,7 mg, 0,063 mmol), anhydrit succinic (126 mg, 1,25 mmol) và DIEA (0,32 ml, 1,88 mmol) vào hợp chất 20-8 (549 mg, 0,63 mmol) trong diclometan (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 20:1→10:1) để thu hợp chất 21-8 (582 mg, 95%) ở dạng chất lỏng không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,31-7,25 (8H, m), 7,20 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,82 (4H, d, $J = 8,7$ Hz), 6,61 (1H, t, $J = 6,2$ Hz), 6,47 (1H, t, $J = 6,4$ Hz), 5,91 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 4,71 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 4,42 (1H, dd, $J = 11,0, 3,2$ Hz), 4,14 (1H, dd, $J = 10,9, 5,8$ Hz), 3,80 (6H, d, $J = 6,1$ Hz), 3,47-3,33 (4H, m), 3,08 (4H, ddd, $J = 33,6, 15,6, 8,5$ Hz), 2,69-2,49 (4H, m), 2,20 (4H, dd, $J = 15,6, 8,2$ Hz), 1,95 (1H, s), 1,55 (4H, dt, $J = 34,3, 6,5$ Hz), 1,27 (30H, t, $J = 7,2$ Hz), 0,87 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,27 ml, 1,54 mmol) và HBTU (128 mg, 0,34 mmol) vào hợp chất 21-8 (300 mg, 0,31 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (4:1, 25 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dạng HybridCPG amino 2000Å (Prime Synthesis, Inc.) (2,5g) được thêm vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa HybridCPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm THF/anhydrit

acetic/pyridin (8:1:1, 30 ml) được thêm vào HybridCPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 3 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa HybridCPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-8 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-8 có lượng được mang là 107 $\mu\text{mol/g}$.

6-3) Tổng hợp hợp chất 22-10

Bước 1

Thêm pyridin (0,379 ml, 4,70 mmol) và 4-nitrophenyl cloformat (947 mg, 4,70 mmol) vào hợp chất 3-10 (2,0 g, 3,92 mmol) trong THF (50 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc. Sau khi nước cái được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 18-10 (1,1 g, 42%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,28 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,42 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,91 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 4,80 (1H, s), 3,57 (4H, m), 2,26 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,66 (4H, t, $J = 6,9$ Hz), 1,27 (40H, d, $J = 20,2$ Hz), 0,88 (6H, t, $J = 6,7$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-10 (50 mg, 0,074 mmol) vào hợp chất 17 (41 mg, 0,074 mmol) trong diclometan (5,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 19-10 (80 mg, 98%) ở dạng chất lỏng màu vàng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,31 (7H, t, $J = 6,4$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,23 (2H, d, $J = 5,5$ Hz), 4,68 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,63 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 3,52 (2H, t, $J = 6,8$ Hz), 3,28 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 3,11-3,04 (4H, m), 2,18 (4H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,62 (6H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,25 (40H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz), 0,84 (9H, s), 0,01 (6H, s).

Bước 3

Thêm triethylamin (4,4 ml, 7,21 mmol) và TBAF (trong THF 1M, 0,4 ml, 0,40 mmol) vào hợp chất 19-10 (559,2 mg, 0,535 mmol) trong THF (5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng

được pha loãng bằng clorofom (10 ml), và sau đó được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được cô ở áp suất giảm, và sau đó sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu hợp chất 20-10 (384 mg, 77%) ở dạng chất lỏng không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 4,3$ Hz), 7,31 (7H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,84 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,32 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 4,83 (1H, t, $J = 6,0$ Hz), 4,67 (1H, s, $J = 5,2$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,68-3,63 (2H, m), 3,47 (2H, dd, $J = 12,9, 6,1$ Hz), 3,34-3,24 (3H, m), 3,10 (3H, dt, $J = 17,5, 5,6$ Hz), 2,59 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,71 (1H, m), 1,62 (4H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,25 (36H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (5,04 mg, 0,041 mmol) và anhydrit succinic (62,0 mg, 0,619 mmol) vào hợp chất 20-10 (384 mg, 0,431 mmol) trong diclometan (10,1 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 ngày. Sau khi hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột diol silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 21-10 (308 mg, 71%) ở dạng chất lỏng không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 4,3$ Hz), 7,31 (6H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,84 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,81 (1H, br s), 6,61 (1H, br s), 5,83 (1H, br s), 4,70 (1H, s), 4,38 (1H, m), 4,13 (1H, d, $J = 10,4$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,78-3,41 (6H, m), 3,05 (6H, m), 2,89 (6H, m), 2,62-2,55 (6H, m), 2,20 (4H, d, $J = 7,2$ Hz), 1,94 (1H, s), 1,62 (4H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,25 (36H, s), 0,88 (6H, t, $J = 7,2$ Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,168 ml, 0,982 mmol) và HBTU (100 mg, 0,264 mmol) vào hợp chất 21-10 (247 mg, 0,240 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (1:1, 20 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Thêm Amino leaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (2,0 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 12 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng diclometan và ba lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 20

ml) được thêm vào HybridCPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 30 phút. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa hai lần bằng diclometan và hai lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-10 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-10 có lượng được mang là 69 $\mu\text{mol/g}$.

6-4) Tổng hợp hợp chất 22-12

Bước 1

Thêm pyridin (0,379 ml, 4,70 mmol) và 4-nitrophenyl cloformat (947 mg, 4,70 mmol) vào hợp chất 3-12 (2,0 g, 3,92 mmol) trong THF (50 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc. Sau khi nước cái được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 18-12 (1,1 g, 42%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,28 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,42 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,91 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 4,80 (1H, s), 3,57 (4H, m), 2,26 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,66 (4H, t, $J = 6,9$ Hz), 1,27 (40H, d, $J = 20,2$ Hz), 0,88 (6H, t, $J = 6,7$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-12 (50 mg, 0,074 mmol) vào hợp chất 17 (41 mg, 0,074 mmol) trong diclometan (5,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 19-12 (80 mg, 98%) ở dạng chất lỏng màu vàng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,31 (6H, t, $J = 6,4$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,23 (2H, d, $J = 5,5$ Hz), 4,68 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,63 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 3,52 (2H, t, $J = 6,8$ Hz), 3,28 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 3,11-3,04 (4H, m), 2,18 (4H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,62 (6H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,25 (40H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz), 0,84 (6H, s), 0,01 (6H, s).

Bước 3

Thêm triethylamin (1,0 ml, 7,21 mmol) và TBAF (trong THF 1M, 0,4 ml, 0,40 mmol) vào hợp chất 19-12 (90 mg, 0,082 mmol) trong THF (5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng clorofom (10 ml), và sau đó được rửa bằng dung dịch

natri bicarbonat bão hòa trong nước (10 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→95:5) để thu được hợp chất 20-12 (84 mg, 100%) ở dạng chất lỏng không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 4,3$ Hz), 7,31 (6H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,84 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,34 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 4,83 (1H, s), 4,67 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,68-3,63 (2H, m), 3,47 (2H, dd, $J = 12,9, 6,1$ Hz), 3,34-3,24 (3H, m), 3,10 (3H, dt, $J = 17,5, 5,6$ Hz), 2,60 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,62 (4H, t, $J = 6,9$ Hz), 1,25 (40H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (0,7 mg, 0,006 mmol) và anhydrit succinic (7,3 mg, 0,073 mmol) vào hợp chất 20-12 (60 mg, 0,061 mmol) trong dung dịch pyridin (2 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Sau khi hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→95:5) để thu được hợp chất 21-12 (56 mg, 85%) ở dạng chất lỏng không màu.

ESI-MS(m/z): 1085 (M-H).

Bước 5

Thêm DIEA (0,043 ml, 0,248 mmol) và HBTU (31 mg, 0,083 mmol) vào hợp chất 21-12 (52 mg, 0,048 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/clorofom (1:1, 10 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm Amino Icaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (0,5 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 23 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 5 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và sau đó làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-12 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-12 có lượng được mang là 31 $\mu\text{mol/g}$.

6-5) Tổng hợp hợp chất 22-14

Bước 1

Thêm pyridin (0,320 ml, 3,97 mmol) và 4-nitrophenyl cloformat (800 mg, 3,97 mmol) vào hợp chất 3-14 (1,5 g, 3,92 mmol) trong THF (60 ml), và hỗn hợp được gia nhiệt hồi lưu trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc. Sau khi nước cái được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan: ethyl axetat = 66:34→45:55) để thu hợp chất 18-14 (1,56 g, 81%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,29 (2H, d, $J = 10,0$ Hz), 7,43 (2H, d, $J = 10,0$ Hz), 6,31 (2H, t, $J = 6,4$ Hz), 4,81-4,76 (1H, m), 3,65-3,58 (2H, m), 3,55-3,48 (2H, m), 2,25 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,67-1,61 (4H, m), 1,25 (48H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-14 (1,38 g, 1,88 mmol) vào hợp chất 17 (1,06 g, 1,88 mmol) trong diclometan (30 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan: ethyl axetat = 66:34→45:55) để thu được hợp chất 19-14 (1,47 g, 68%) ở dạng chất rắn màu trắng.

ESI-MS(m/z): 1155 (M-H).

Bước 3

Thêm TBAF (trong THF 1M, 3,81 ml, 3,81 mmol) vào hợp chất 19-14 (1,47 g, 1,27 mmol) trong THF (30 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng ethyl axetat, dung môi được cô ở áp suất giảm. Sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan: ethyl axetat = 50:50→5:95) để thu được hợp chất 20-14 (1,04 g, 79%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,32-7,27 (6H, m), 7,21 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,83 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,37-6,35 (2H, m), 4,86 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 4,69-4,64 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,69-3,61 (2H, m), 3,50-3,24 (6H, m), 3,15-3,06 (3H, m), 2,61 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,25 (58H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (12 mg, 0,10 mmol), DIEA (0,523 ml, 2,99 mmol) và anhydrit succinic (170 mg, 1,70 mmol) vào hợp chất 20-14 (1,04 g, 0,998 mmol) trong diclometan (20 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột diol silicagel (clorofom) để thu được hợp chất 21-14 (1,17 g) ở dạng chất rắn màu trắng.

ESI-MS(m/z): 1141 (M-H).

Bước 5

Thêm DIEA (0,447 ml, 2,56 mmol) và HBTU (214 mg, 0,563 mmol) vào hợp chất 21-14 (585 mg, 0,512 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (1:1, 40 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (4,0 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 21 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa bằng hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (1:1, 120 ml) và dietyl ete (60 ml), và sau đó làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 40 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa bằng pyridin (40 ml), isopropanol (60 ml) và dietyl ete (60 ml), và sau đó làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-14 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-14 có lượng được mang là 40 $\mu\text{mol/g}$.

6-6) Tổng hợp hợp chất 22-18

Bước 1

Thêm pyridin (0,143 ml, 1,76 mmol) và 4-nitrophenyl cloformat (356 mg, 1,77 mmol) vào hợp chất 3-18 (1,0 g, 1,47 mmol) trong THF (40 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 60°C trong 1 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nước cái được cô ở áp suất giảm. Sản phẩm thô của chất rắn tạo ra được rửa bằng etyl axetat để thu được hợp chất 18-18 (508 mg, 41%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,29 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,43 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 6,29 (2H, s), 3,60-3,50 (4H, m), 2,25 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,64 (4H, d, $J = 6,6$

Hz), 1,25 (64H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,4$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-18 (93 mg, 0,110 mmol) vào hợp chất 17 (62 mg, 0,110 mmol) trong diclometan (4,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→90:10) để thu được hợp chất 19-18 (113 mg, 81%) ở dạng chất lỏng màu vàng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 13,4$ Hz), 7,31 (7H, d, $J = 9,3$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,22 (2H, s), 4,69 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,62 (2H, t, $J = 5,6$ Hz), 3,51 (2H, dd, $J = 10,9, 6,1$ Hz), 3,32-3,27 (2H, m), 3,11-3,04 (4H, m), 2,17 (4H, t, $J = 3,7$ Hz), 1,62 (6H, dd, $J = 10,5, 4,7$ Hz), 1,25 (64H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz), 0,83 (9H, s), 0,01 (6H, s).

Bước 3

Thêm trietylamin (0,1 ml, 0,79 mmol) và TBAF (trong THF 1M, 0,32 ml, 0,32 mmol) vào hợp chất 19-18 (100 mg, 0,079 mmol) trong THF (4 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng clorofom (10 ml), và sau đó được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (10 ml). Sau khi lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng magie sulfat và cô đặc ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→95:5) để thu được hợp chất 20-18 (90 mg, 99%) ở dạng chất lỏng không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 8,6$ Hz), 7,31 (7H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,84 (4H, d, $J = 8,6$ Hz), 6,31 (2H, s), 4,81 (1H, s), 4,67 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,71-3,63 (2H, m), 3,49 (2H, dd, $J = 14,7, 11,1$ Hz), 3,30 (3H, tt, $J = 18,8, 7,4$ Hz), 3,13-3,07 (3H, m), 2,58 (1H, s), 2,18 (4H, d, $J = 7,6$ Hz), 1,60 (6H, dd, $J = 9,2, 4,4$ Hz), 1,25 (64H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,3$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (0,9 mg, 0,007 mmol) và anhydrit succinic (15,8 mg, 0,151 mmol) vào hợp chất 20-18 (87 mg, 0,075 mmol) trong dung dịch pyridin (2 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 7 ngày. Sau khi hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→95:5) để thu được hợp

chất 21-18 (85 mg, 90%) ở dạng chất lỏng không màu.

ESI-MS(m/z): 1253 (M-H).

Bước 5

Thêm DIEA (0,043 ml, 0,248 mmol) và HBTU (38 mg, 0,10 mmol) vào hợp chất 21-18 (85 mg, 0,068 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/clorofom (1:1, 10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (0,5 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 23 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 5 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa hai lần bằng pyridin, hai lần bằng isopropanol và hai lần bằng diethyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-18 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-18 có lượng được mang là 15 $\mu\text{mol/g}$.

6-7) Tổng hợp hợp chất 22-20

Bước 1

Thêm bis(4-nitrophenyl) cacbonat (1,241 ml, 4,08 mmol) và DMAP (498 mg, 4,08 mmol) vào hợp chất 3-20 (1,0 g, 1,36 mmol) trong THF (35 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 55°C trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Axetonitril (50 ml) được thêm vào phần cặn và hỗn hợp được khuấy cho đến khi chất rắn được làm kết tủa. Nước (20 ml) được thêm vào dung dịch huyền phù, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Chất rắn tạo ra được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng nước (50 ml) và axetonitril (50 ml) để thu được hợp chất 18-20 (1,1 g, 92%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,28 (2H, dd, $J = 2,0, 6,8$ Hz), 7,42 (2H, dd, $J = 2,4, 7,2$ Hz), 6,30 (2H, s), 4,79 (1H, s), 3,61 (2H, m), 3,52 (2H, m), 2,20 (4H, m), 1,66 (4H, m), 1,25 (72H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp chất 18-20 (350 mg, 0,388 mmol) và DMAP (47,5 mg, 0,388

mmol) vào hợp chất 17 (219 mg, 0,388 mmol) trong THF (6,5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 65°C trong 2 giờ. Dung dịch axetonitril ngâm nước 10% (70 ml) được thêm vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp được khuấy một lúc. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc để thu được hợp chất 19-20 (420 mg, 82%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,43 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,31 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 8,4$ Hz), 6,26 (2H, br s), 4,73 (1H, br s), 4,69 (1H, br s), 3,79 (6H, s), 3,79 (6H, s), 3,63 (2H, m), 3,49 (2H, m), 3,29 (2H, d, $J = 14,0$ Hz), 3,10-3,06 (4H, m), 2,18 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,68 (4H, m), 1,42-1,25 (m, 72H), 0,88 (6H, t, $J = 6,4$ Hz), 0,83 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Bước 3

Thêm TBAF (trong THF 1M, 0,506 ml, 0,506 mmol) vào hợp chất 19-20 (559 mg, 0,422 mmol) trong THF (5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 50°C trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được thêm từng giọt vào dung dịch axetonitril ngâm nước 10% (100 ml), và sau đó chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc để thu được hợp chất 20-20 (344 mg, 67%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 4,3$ Hz), 7,31 (7H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,84 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,35 (2H, br s), 4,85 (1H, s), 4,67 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,68 (2H, m), 3,47 (2H, dd, $J = 12,9, 6,1$ Hz), 3,34-3,24 (3H, m), 3,10 (3H, dt, $J = 17,5, 5,6$ Hz), 2,60 (1H, s), 2,21-2,17 (4H, m), 1,62 (4H, m), 1,60-1,45 (m, 4H), 1,25-1,01 (72H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (3,5 mg, 0,0284 mmol) và anhydrit succinic (42,6 mg, 0,426 mmol) vào hợp chất 20-20 (344 mg, 0,284 mmol) trong diclometan (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được thêm từng giọt vào dung dịch axetonitril ngâm nước 10% (100 ml), và chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc để thu được hợp chất 21-20 (361 mg, 97%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,31-7,26 (7H, m), 6,83 (4H, t, $J = 8,4$ Hz), 6,56 (1H, br s), 6,40 (1H, br s), 5,89 (1H, br s), 4,71 (1H, m), 4,41 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,14 (1H, dd, $J = 6,0, 11,2$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,65 (1H, m), 3,43-3,37 (4H, m), 3,05-3,02 (4H, m), 2,19-2,17 (4H, m), 1,61-1,25

(76H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,127 ml, 0,725 mmol) và HBTU (60,5 mg, 0,159 mmol) vào hợp chất 21-20 (190 mg, 0,145 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril/clorofom (1:3, 10 ml), và hỗn hợp được lắc ở 40°C trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (3,0 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 2 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng clorofom, một lần bằng etanol và ba lần bằng axetonitril, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 20 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng clorofom và ba lần bằng axetonitril, và sau đó làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-20 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-20 có lượng được mang là 48 $\mu\text{mol/g}$.

6-8) Tổng hợp hợp chất 22-22

Bước 1

Thêm bis(p-nitrophenyl) cacbonat (1,54 g, 5,05 mmol) và DMAP (618 mg, 5,05 mmol) vào hợp chất 3-22 (2,0 g, 2,53 mmol) trong THF (35 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 65°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Axetonitril (100 ml) được thêm vào phần cặn và hỗn hợp được khuấy cho đến khi chất rắn được làm kết tủa. Nước (20 ml) được thêm vào dung dịch huyền phù, và hỗn hợp được khuấy mạnh. Chất rắn tạo ra được thu gom bằng cách lọc và được rửa theo thứ tự bằng nước (100 ml) và axetonitril (100 ml) để thu được hợp chất 18-22 (2,27 g, 89%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,28 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,43 (2H, d, $J = 8,82$ Hz), 6,29 (2H, br t, $J = 6,4$ Hz), 4,79 (1H, br s), 3,61 (2H, m), 3,52 (2H, m), 2,25 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,64 (4H, m), 1,26 (84H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,0$ Hz).

Bước 2

Thêm hợp DMAP (144 mg, 1,81 mmol) và hợp chất 18-22 (1,13 g, 1,81 mmol) vào hợp chất 17 (666 mg, 1,81 mmol) trong THF (10,0 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 65°C trong 2 giờ. Axetonitril (150 ml) được thêm chậm vào hỗn

hợp phản ứng. Kết tủa tạo ra được thu gom bằng cách lọc và được rửa ba lần bằng axetonitril để thu được hợp chất 19-22 (1,5 g, 92%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 6,8$ Hz), 7,32-7,20 (7H, m), 6,81 (4H, d, $J = 6,8$ Hz), 6,26 (2H, br m), 4,70 (2H, s), 3,63 (2H, m), 3,49 (2H, m), 3,31 (2H, m), 3,09-3,04 (4H, m), 2,18 (4H, m), 1,60 (4H, m), 1,25 (84H, m), 0,86 (6H, t, $J = 6,8$ Hz), 0,84 (9H, s), 0,01 (6H, s).

Bước 3

Thêm TBAF (trong THF 1M, 1,64 ml, 1,69 mmol) vào hợp chất 19-22 (1,5 g, 1,07 mmol) trong THF (8,9 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 65°C trong 2 giờ. Axetonitril (150 ml) được thêm chậm vào hỗn hợp phản ứng. Kết tủa tạo ra được thu gom bằng cách lọc và được rửa ba lần bằng axetonitril để thu được hợp chất 20-22 (1,2 g, 87%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 7,31-7,21 (7H, m), 6,84 (4H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,34 (2H, m), 4,83 (1H, s), 4,67 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,67 (2H, m), 3,46 (2H, m), 3,33-3,24 (3H, m), 3,10 (3H, m), 2,17 (4H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,78 (4H, m), 1,44-1,25 (84H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,0$ Hz).

Bước 4

Thêm DMAP (1 mg, 0,008 mmol) và anhydrit succinic (11,9 mg, 0,118 mmol) vào hợp chất 20-22 (100 mg, 0,079 mmol) trong diclometan (3 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 45°C trong 4 giờ. Axetonitril được thêm từng giọt vào hỗn hợp phản ứng, và chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn tạo ra được rửa ba lần bằng axetonitril để thu được hợp chất 21-22 (361 mg, 97%) ở dạng chất rắn màu trắng.

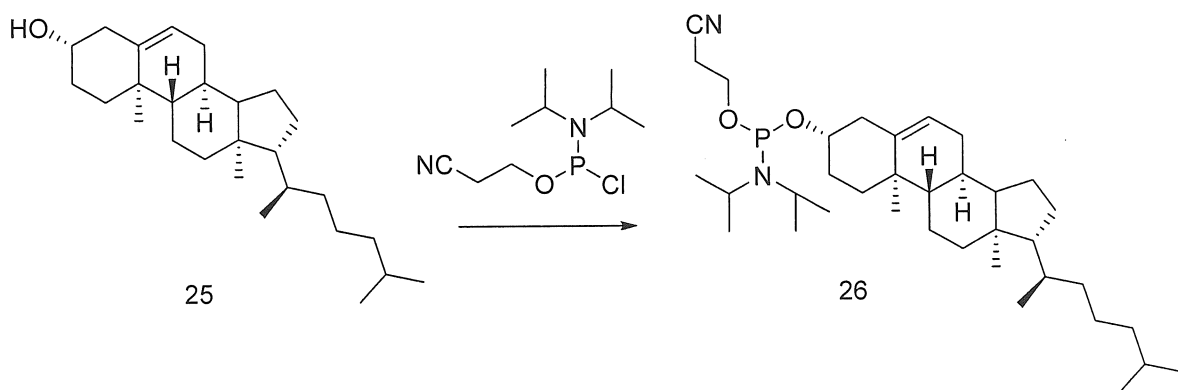
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,31-7,26 (7H, m), 6,81 (4H, t, $J = 8,8$ Hz), 6,58 (1H, br m), 6,43 (1H, br m), 5,88 (1H, br m), 4,71 (1H, m), 4,40 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,14 (1H, dd, $J = 6,0, 10,8$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,65 (1H, m), 3,43-3,37 (4H, m), 3,13-3,02 (4H, m), 2,63-2,53 (4H, m), 2,23-2,18 (4H, dd, $J = 7,2, 14,8$ Hz), 2,00-1,25 (4H, m), 1,25-1,11 (84H, m), 0,88 (6H, t, $J = 6,8$ Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,059 ml, 0,336 mmol) và HBTU (28 mg, 0,074 mmol)

vào hợp chất 21-22 (92 mg, 0,067 mmol) trong hỗn hợp gồm axetonitril diclometan/clorofom (1:1:2, 10 ml), và hỗn hợp được lắc ở 40°C trong 15 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (0,9 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc ở 40°C trong 3 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng clorofom, ba lần bằng axetonitril và ba lần bằng etanol, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 60 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 1,5 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa ba lần bằng axetonitril, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 21-22 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 22-22 có lượng được mang là 47 $\mu\text{mol/g}$.

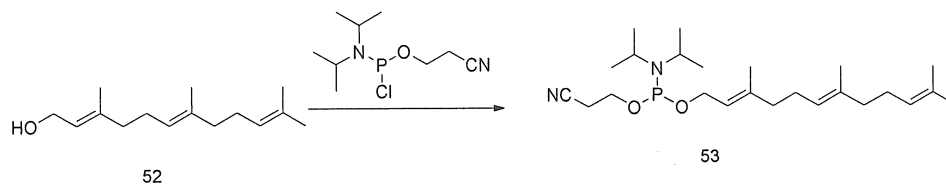
8-1) Tổng hợp hợp chất 26



Trong môi trường khí nitơ, thêm DIEA (0,9 ml, 5,17 mmol) vào cholesterol (hợp chất 25, 1,00 g, 2,59 mmol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) trong diclometan (10 ml), và hỗn hợp được làm lạnh bằng nước đá lạnh. Metyl N,N-diisopropylphosphoramidit (0,86 ml, 3,85 mmol) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong khi được làm lạnh bằng nước đá trong 40 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan và etyl axetat (100 ml), và sau đó được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml) và nước muối (100 ml). Lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat, lọc, và sau đó được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 : 20 g, n-hexan: etyl axetat = 50:50→0:100) để thu được hợp chất 26 (1,45 g, hiệu suất 95%) ở dạng bột không màu. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 145,46 (d)

8-2) Tổng hợp hợp chất 5

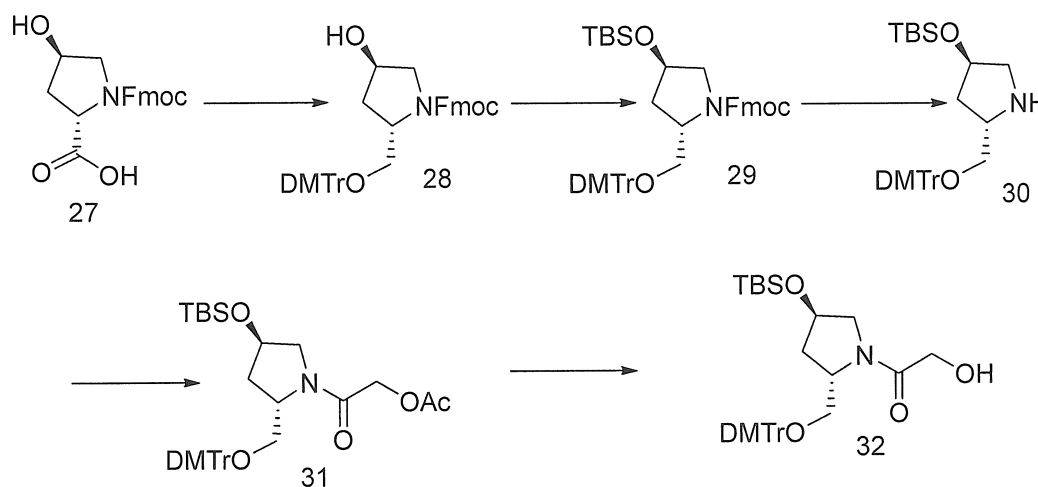


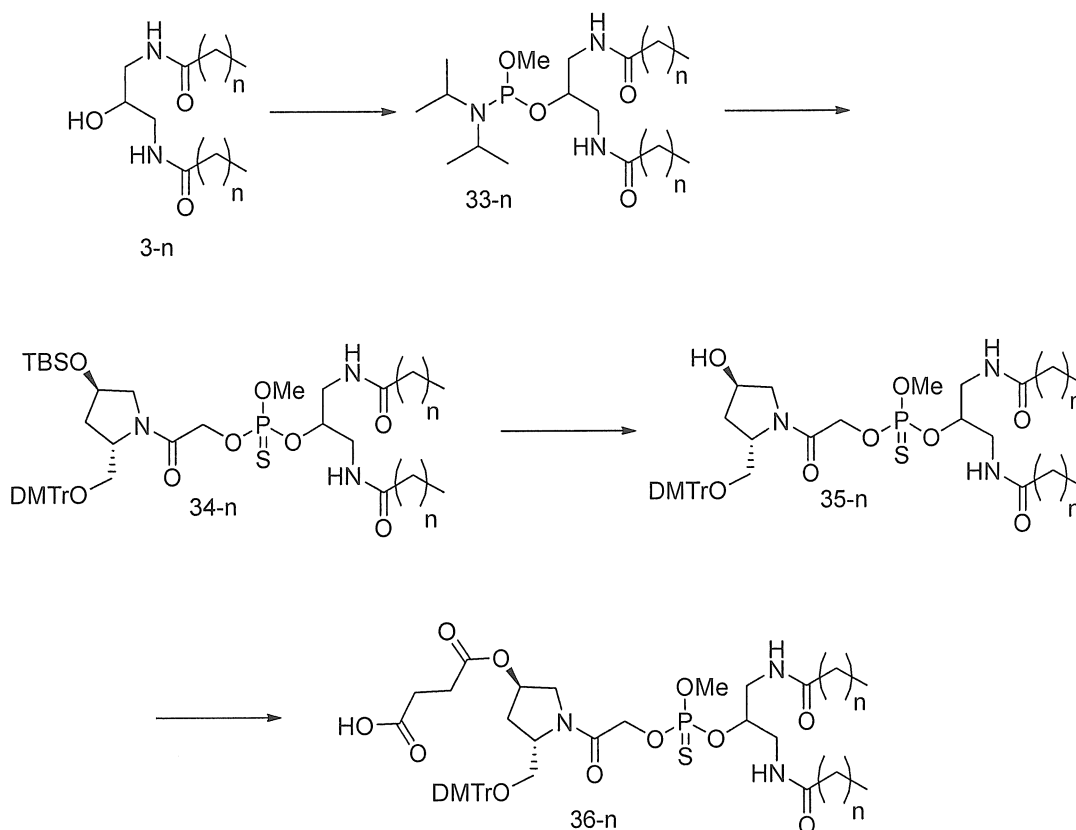
Hòa tan Farnesol (hợp chất 52, 1,0 ml, 3,99 mmol, Junsei Chemical Co., Ltd.) trong diclometan (8,9 ml), và DIEA (1,53 ml, 8,78 mmol) được thêm vào. Sau đó, 2-xyanoethyl N,N-diisopropylphosphoramidit (0,98 ml, 4,39 mmol) được thêm vào ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Diclometan (90 ml) và dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (100 ml) được thêm vào dung môi phản ứng để dừng phản ứng, và sau đó hỗn hợp được tách bằng phễu tách. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (100 ml), và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Lớp hữu cơ được cô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 53 (1,20 g, 2,84 mmol) ở dạng sản phẩm thô là dầu màu vàng nhạt. Cấu tạo của hợp chất được xác định dựa trên việc đưa vào phospho hóa trị ba bằng ^{31}P -NMR.

^1H -NMR (CDCl_3) δ : 5,37 (1H, t, $J = 6,6$ Hz), 5,10-5,08 (2H, m), 4,19-4,13 (2H, m), 3,90-3,77 (2H, m), 3,66-3,54 (2H, m), 2,64 (2H, t, $J = 6,6$ Hz), 2,08-1,99 (8H, m), 1,68-1,67 (6H, m), 1,61-1,60 (6H, m), 1,20-1,17 (12H, m).

^{31}P -NMR (CDCl_3) δ : 147,92 (1H, s).

9) Tổng hợp hợp chất 36-n





trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

9-1) Tổng hợp hợp chất 36-16

Bước 1

Theo các phương pháp được mô tả trong Nucleic Acids Research, 42, 8796-8807 (2014), hợp chất 28 được tổng hợp từ hợp chất 27 theo hai bước.

Bước 2

Thêm imidazol (690mg, 10,1mmol, 1,3 đương lượng) và tert-butyltrimethylsilyl clorua (1,29 g, 8,57 mmol, 1,1 đương lượng) vào hợp chất 28 (5,0 g, 7,79 mmol) trong dung dịch DMF (20 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng ethyl axetat, rửa bằng nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 : 120 g, n-hexan: ethyl axetat: triethylamin= 90:10:1→65:35:1) để thu hợp chất 29 (5,50 g, hiệu suất 93%) ở dạng bột không màu. Nhờ $^1\text{H-NMR}$, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 1:1.

ESI-MS(m/z): 778 ($M+H$).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,68 (d, $J=7,5\text{Hz}$, 1H), 7,62 (d, $J=7,5\text{Hz}$, 1H), 7,58-7,51 (m, 1H), 7,40-7,05 (m, 14H), 6,74-6,63 (m, 5H), 4,61-4,49 (m, 1H),

4,33-4,15 (2m, 1H), 4,12-4,03 (m, 1H), 3,93-3,85 (m, 1H), 3,62 (s, 6H), 3,56 (dd, $J=10,7$, 5,4Hz, 0,5H), 3,41-3,31 (m, 1H), 3,16 (dd, $J=9,0$, 4,3Hz, 0,5H), 3,00 (m, 0,5H), 2,90 (m, 0,5H), 2,13-2,02 (m, 1H), 1,97-1,82 (m, 1H), 0,82 (s, 1,5H), 0,81 (s, 3H), 0,779 (s, 3H), 0,787 (s, 1,5H), 0,007 (s, 1,5H), 0,000 (s, 1,5H), -0,015 (s, 1,5H), -0,026 (s, 1,5H).

Bước 3

Thêm piperidin (0,379 ml, 3,83 mmol, 1,1 đương lượng) vào hợp chất 29 (2,63 g, 3,48 mmol) trong dung dịch DMF (10 ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, và sau đó được cô ở áp suất giảm. Phần cặn được pha loãng bằng ethyl axetat, rửa bằng nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm. Metanol (10 ml) được thêm vào, và kết tủa thu được được lọc. Dịch lọc được cô ở áp suất giảm để thu được sản phẩm thô của hợp chất 30 (2,20 g).

ESI-MS(m/z): 524 (M+H). RT (thời gian lưu) đỉnh HPLC = 3,29 phút.

Bước 4

Thêm triethylamin (3,65 ml, 36,9 mmol) và axetoxaxetyl clorua (3,65 ml, 36,9 mmol) theo thứ tự ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 30 (2,20 g, sản phẩm thô) trong diclometan (15 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng ethyl axetat, rửa bằng nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm để thu được sản phẩm thô của hợp chất 31.

ESI-MS(m/z): 634 (M+H). RT đỉnh HPLC = 3,40 phút.

Bước 5

Sau khi hợp chất 31 thu được ở bước 4 được hòa tan trong metanol (10 ml), dung dịch natri metoxit 28% trong metanol (0,60 ml) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng ethyl axetat, rửa bằng nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 : 80 g, n-hexan: ethyl axetat: triethylamin = 80:20:1 $\rightarrow$ 65:35:1) để thu được hợp chất 32 (1,45 g, hiệu suất tính từ hợp chất 30: 71%) ở dạng bột không màu. Nhờ $^1\text{H-NMR}$, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 78:22.

ESI-MS(m/z): 592 (M+H). RT đỉnh HPLC = 3,36 phút.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : (Sản phẩm chính) 7,39-7,32 (m, 2H), 7,32-7,18 (m, 7H), 6,86-6,79 (m, 4H), 4,73 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,06 (dd, $J=15,1, 4,4\text{Hz}$, 1H), 3,98 (dd, $J=15,1, 4,4\text{Hz}$, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,57 (dd, $J=10,0, 4,0\text{Hz}$, 1H), 3,52 (dd, $J=10,0, 6,0\text{Hz}$, 1H), 3,47 (dd, $J=4,4, 4,4\text{Hz}$, 1H), 3,13 (dd, $J=10,0, 2,5\text{Hz}$, 1H), 3,08 (dd, $J=10,0, 5,0\text{Hz}$, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (ddd, $J=13,0, 8,8, 6,0\text{Hz}$, 1H), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H). (Sản phẩm phụ) 7,39-7,32 (m, 2H), 7,32-7,18 (m, 7H), 6,86-6,79 (m, 4H), 4,54 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,92 (dd, $J=14,6, 4,3\text{Hz}$, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,68 (dd, $J=12,0, 4,0\text{Hz}$, 1H), 3,62-3,42 (m, 2H), 3,16-3,02 (m, 2H), 2,11 (ddd, $J=13,0, 5,8, 4,0\text{Hz}$, 1H), 2,02 (m, 1H), 0,86 (s, 9H), 0,051 (s, 3H), 0,049 (s, 3H).

Bước 6

Thêm DIEA (3,36 ml, 19,3 mmol, 4,0 đương lượng) vào hợp chất 3-16 (2,00 g, 3,21 mmol), mà được tổng hợp theo phương pháp tương tự với mục 1-1-6), tạo huyền phù trong diclometan (60 ml), và dung dịch được thêm vào methyl N,N-diisopropylclophosphoramidit (2,54 g, 12,8 mmol, 2,0 đương lượng) trong diclometan (10 ml). Hỗn hợp được khuấy ở 45°C trong 10 phút.

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được rót vào dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước, chiết bằng clorofom, và sau đó được rửa bằng nước muối. Sau khi làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô ở áp suất giảm. Trong khi khuấy, axetonitril (20 ml) được thêm vào phần cặn thu được. Chất kết tủa được thu gom bằng cách lọc để thu được hợp chất 33-16 (2,36 g, hiệu suất 94%) ở dạng chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 6,39 (t, $J = 5,5\text{ Hz}$, 1H, -NH), 6,18 (t, $J = 5,5\text{ Hz}$, 1H, -NH), 3,95 (m, 0,5H), 3,67-3,51 (m, 4,5H), 3,42 (s, 1,5H), 3,39 (s, 1,5H), 3,19-3,11 (m, 1H), 3,05-2,97 (m, 1H), 2,30-2,15 (m, 4H), 1,70-1,57 (m, 4H), 1,36-1,23 (m, 56H), 1,23-1,14 (m, 12H), 0,88 (t, $J=6,5\text{Hz}$, 6H). $^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 149,06

Bước 7

Thêm 1H-tetrazol (124 mg, 1,77 mmol, 1,5 đương lượng) vào hợp chất 32 (700 mg, 1,18 mmol) và hợp chất 33-16 (1,87 g, 2,37 mmol, 2,0 đương lượng), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch

DDTT 0,5M ([dimethylamino-metyliden)amino]-3H-1,2,4-dithiazaolin-3-thion, 4,73 ml, hòa tan trong 3-picolin:axetonitril = 1:1) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat, rửa theo thứ tự bằng dung dịch axit xitric 10%, dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước và nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂:45 g, n-hexan: etyl axetat: triethylamin = 75:25:1 → 50:50:1) để thu được hợp chất 34-16 (1,19 g, hiệu suất 79%) ở dạng bột không màu.

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 7,40-7,11 (m, 9H), 6,87-6,78 (m, 4H), 4,94-4,84 (m, 1H), 4,82-4,72 (m, 1H), 4,58-4,43 (m, 2H), 4,38-4,31 (m, 1H), 3,86-3,53 (m, 4H), 3,80 (s, 3H), 3,79 (s, 6H), 3,33-2,99 (m, 4H), 2,30-1,88 (m, 6H), 1,65-1,55 (m, 4H), 1,35-1,20 (m, 56H), 0,91-0,84 (m, 15H), 0,08 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

Bước 8

Thêm TBAF nồng độ 1 mol/l trong THF (0,937 ml, 1,2 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 34-16 (1,02 g, 0,780 mmol) in THF (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂: 30 g, clorofom: metanol: triethylamin = 97,5:2,5:1 → 90:10:1) để thu được hợp chất 35-16 (608 mg, hiệu suất 65%).

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 7,40-7,17 (m, 9H), 6,91 (m, 1H, -NH), 6,88-6,78 (m, 5H), 5,00-4,35 (m, 5H), 3,85-3,44 (m, 4H), 3,79 (s, 3H), 3,78 (s, 6H), 3,35-3,06 (m, 4H), 2,31-2,09 (m, 5H), 2,06-1,94 (m, 1H), 1,68-1,52 (m, 4H), 1,36-1,18 (m, 56H), 0,88 (t, J=7,0Hz, 6H).

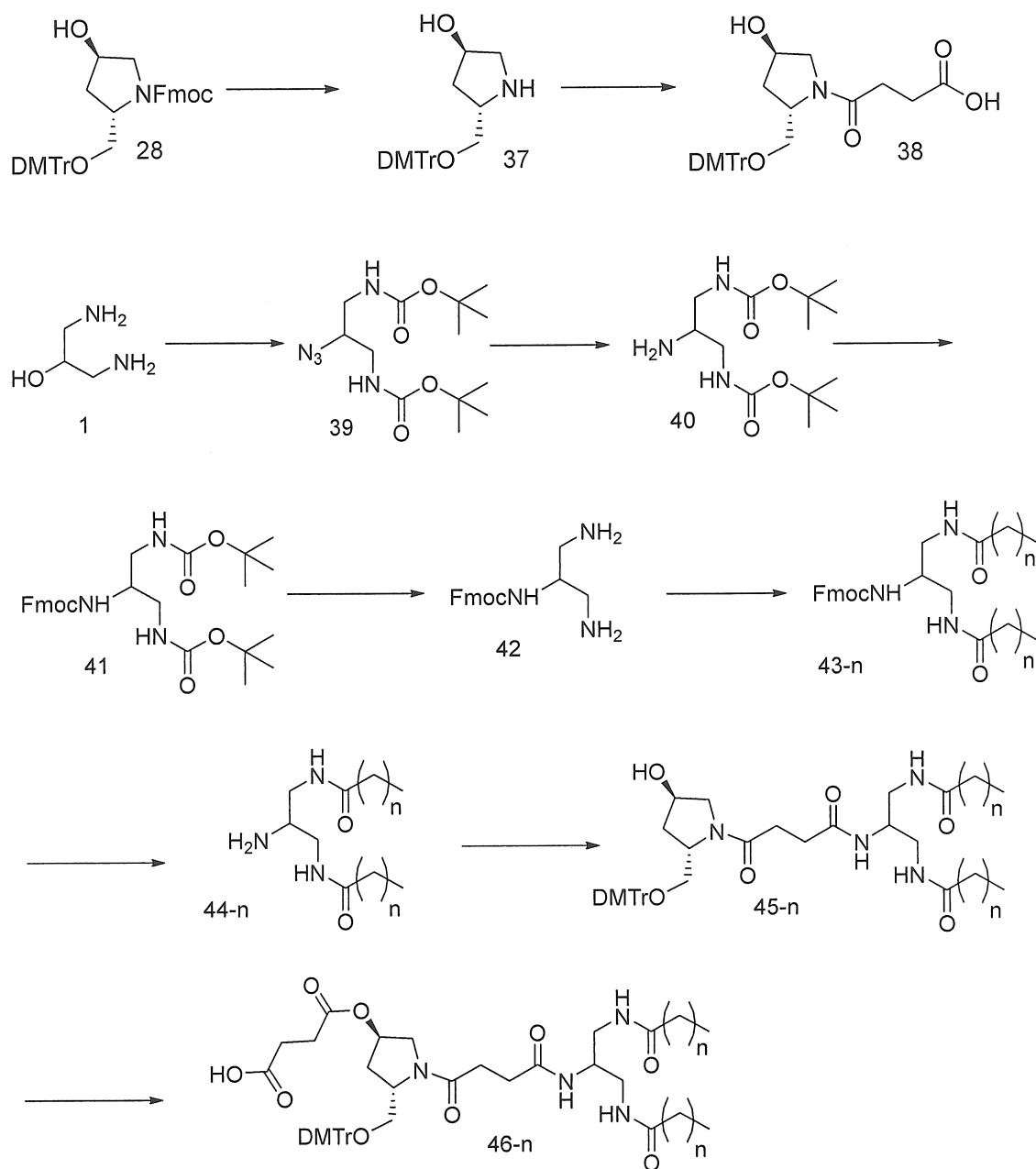
Bước 9

Thêm triethylamin (0,073ml, 0,528mmol, 3,0 đương lượng) và anhydrit succinic (35 mg, 0,352 mmol, 2,0 đương lượng) và DMAP (4 mg, 0,033 mmol) theo thứ tự ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 35 -16 (210 mg, 0,176 mmol) trong diclometan (3 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂:24 g, clorofom: metanol: triethylamin =

100:0:1→95:5:1) để thu được hợp chất 36-16 (172 mg, hiệu suất 76%) ở dạng chất rắn không màu.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 7,38-7,32 (m, 2H), 7,38-7,32 (m, 7H), 6,90-6,76 (m, 4H), 5,42 (br.s, 1H), 5,04-4,39 (m, 4H), 3,87-3,55 (m, 4H), 3,79 (s, 3H), 3,78 (s, 6H), 3,31-3,07 (m, 4H), 2,65-2,43 (m, 4H), 2,38-2,28 (m, 1H), 2,28-2,08 (m, 5H), 1,67-1,53 (m, 4H), 1,35-1,19 (m, 56H), 0,88 (t, $J=6,5\text{Hz}$, 6H).

10) Tổng hợp hợp chất 46-n



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

10-1) Tổng hợp hợp chất 46-16

Bước 1

Theo các phương pháp được mô tả trong Nucleic Acids Research, 42,

8796-8807 (2014), hợp chất 37 được tổng hợp từ hợp chất 28.

Bước 2

Thêm triethylamin (1,98 ml, 14,3 mmol, 2,0 đương lượng) và anhydrit succinic (751 mg, 7,51 mmol, 1,05 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 37 (3,00 g, 7,15 mmol) trong diclometan (15 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 :120g, clorofom: metanol: triethylamin = 95:5:1→75:25:1) để thu được hợp chất 38 (3,37 g, hiệu suất 91%) ở dạng bột không màu. Nhờ $^1\text{H-NMR}$, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 63:37.

ESI-MS(m/z): 530 ($M+H$). RT đỉnh HPLC = 1,86 phút.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: (Sản phẩm chính) 7,39-7,33 (m, 2H), 7,30-7,22 (m, 6H), 7,22-7,16 (m, 1H), 6,85-6,77 (m, 4H), 4,50 (br.s, 1H), 4,41 (m, 1H), 3,88 (d, $J=11,0\text{Hz}$, 1H), 3,775 (s, 6H), 3,65 (dd, $J=11,0, 4,0\text{Hz}$, 1H), 3,43 (dd, $J=9,2, 4,5\text{Hz}$, 1H), 3,14 (dd, $J=9,2, 2,7\text{Hz}$, 1H), 2,85-1,97 (m, 6H). (Sản phẩm phụ) 7,39-7,33 (m, 2H), 7,30-7,22 (m, 6H), 7,22-7,16 (m, 1H), 6,85-6,77 (m, 4H), 4,41 (m, 1H), 4,31 (br.s, 1H), 4,11 (d, $J=12,3\text{Hz}$, 1H), 3,783 (s, 6H), 3,25 (dd, $J=12,3, 3,5\text{Hz}$, 1H), 3,18 (dd, $J=9,5, 4,8\text{Hz}$, 1H), 3,10 (dd, $J=9,5, 4,8\text{Hz}$, 1H), 2,85-1,97 (m, 6H).

Bước 3

Theo các phương pháp được mô tả trong Journal of Medicinal Chemistry, 48, 7781 (2005), hợp chất 39 được tổng hợp từ hợp chất 1.

Bước 4

Thêm triphenylphosphin (1,98 ml, 14,3 mmol, 2,0 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 39 (3,00 g, 7,15 mmol) trong hỗn hợp gồm THF-nước (9:1) (30 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Nhiệt độ được nâng lên 70°C , và hỗn hợp được khuấy trong 4 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm thành sản phẩm thô để thu hợp chất 40 ở dạng dầu không màu.

Bước 5

Thêm triethylamin (2,10 ml, 15,1 mmol, 1,2 đương lượng) và Fmoc-Cl (3,59 g, 13,9 mmol, 1,1 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 40

(7,15 mmol) trong diclometan (30 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng clorofom, rửa bằng nước muối, và sau đó làm khô bằng magie sulfat. Dung môi được cô ở áp suất giảm. Chất rắn tạo ra được rửa bằng n-hexan và lượng nhỏ clorofom, và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂: 120g, n-hexan: etyl axetat= 75:25→0:100) để thu được hợp chất 41 (4,18 g, hiệu suất tính từ hợp chất 39: 65%) ở dạng bột không màu.

ESI-MS(m/z): 512 (M+H). RT đỉnh HPLC = 2,71 phút.

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 7,80 (d, J=7,5Hz, 2H), 7,60 (d, J=7,5Hz, 2H), 7,40 (dd, J=7,5, 7,5Hz, 2H), 7,30 (dd, J=7,5, 7,5Hz, 2H), 6,02 (br.s, 1H), 5,21 (br.s, 2H), 4,46-4,27 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 3,59 (m, 1H), 3,45-3,29 (m, 2H), 3,27-3,13 (m, 2H), 1,46 (s, 18H).

Bước 6

Thêm TFA (30 ml) vào hợp chất 41 (3,00 g, 7,15 mmol), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô ở áp suất giảm để thu được sản phẩm thô của hợp chất 42.

ESI-MS(m/z): 312 (M+H). RT đỉnh HPLC = 1,00 phút.

Bước 7

Thêm trietylamin (1,17 ml, 8,44 mmol, 6,0 đương lượng) và stearyl clorua (938 mg, 3,10 mmol, 2,2 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 42 trong diclometan (10 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Kết tủa màu trắng tạo ra được thu gom bằng cách lọc, rửa bằng một lượng nhỏ clorofom, nước và n-hexan, và sau đó làm khô ở áp suất giảm để thu được hợp chất 43-16 (888 mg, hiệu suất tính từ hợp chất 40: 75%) ở dạng chất rắn không màu.

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 7,76 (d, J=7,5Hz, 2H), 7,60 (d, J=7,5Hz, 2H), 7,34 (d, J=7,5, 7,5Hz, 2H), 7,31 (d, J=7,5, 7,5Hz, 2H), 6,51 (br.s, 2H), 6,39 (br.s, 1H), 4,39-4,26 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 3,68-3,54 (m, 2H), 3,26-3,07 (m, 2H), 2,29-2,18 (m, 4H), 1,70-1,58 (m, 4H), 1,37-1,17 (m, 56H), 0,88 (t, J=7,0Hz, 6H).

Bước 8

Thêm piperidin (0,111 ml, 1,12 mmol, 1,1 đương lượng) vào hợp chất

43-16 (860 mg, 1,02 mmol) trong dung dịch DMF (5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở 80°C trong 1,5 giờ. Sau khi để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, kết tủa tạo ra được thu gom bằng cách lọc, rửa bằng n-hexan, và làm khô ở áp suất giảm. Chất rắn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂: 24g, clorofom: metanol = 98:2→75:25) để thu được hợp chất 44-16 (198 mg, hiệu suất 31%) ở dạng chất rắn không màu.

¹H-NMR(CDCl₃)δ: 6,34 (br.s, 2H), 3,48-3,36 (m, 2H), 3,06-2,98 (m, 2H), 2,99 (s, 1H), 2,25-2,18 (m, 4H), 1,70-1,58 (m, 4H), 1,37-1,18 (m, 56H), 0,88 (t, J=7,0Hz, 6H).

Bước 9

Thêm DIEA (225 μl, 1,29 mmol) và HBTU (127 mg, 0,334 mmol) ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 38 (134 mg, 0,257 mmol) thu được từ bước 2 trong dung dịch DMF (2 ml), và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Hỗn hợp được thêm vào hợp chất 44-16 (218 mg, 17,1 mmol) trong diclometan (3 ml) ở 45°C, và sau đó hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở 45°C. Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng nước muối. Sau khi làm khô bằng magie sulfat, dung môi được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được hòa tan trong etyl axetat, và n-hexan được thêm vào ở 80°C. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc để thu được hợp chất 45-16 (244 mg, hiệu suất 85%) ở dạng chất rắn không màu. Nhờ ¹H-NMR, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 63:37.

¹H-NMR(CDCl₃)δ:(Sản phẩm chính) 7,35-7,32 (m, 2H), 7,31-7,16 (m, 7H), 6,85-6,77 (m, 4H), 6,46 (br.s, 1H, -NH), 4,38 (br.s, 1H), 3,781 (s, 6H), 3,72-3,58 (m, 2H), 3,51-3,36 (m, 2H), 3,28-3,08 (m, 3H), 2,78-2,60 (m, 2H), 2,48-1,98 (m, 7H), 1,64-1,56 (m, 4H), 1,35-1,19 (m, 56H), 0,88 (t, J=7,0Hz, 6H). (Sản phẩm phụ) 7,35-7,32 (m, 2H), 7,31-7,16 (m, 7H), 6,85-6,77 (m, 4H), 6,46 (br.s, 1H, -NH), 4,53 (br.s, 1H), 3,783 (s, 6H), 3,72-3,58 (m, 2H), 3,51-3,36 (m, 2H), 3,28-3,08 (m, 3H), 2,48-1,98 (m, 7H), 1,64-1,56 (m, 4H), 1,35-1,19 (m, 56H), 0,88 (t, J=7,0Hz, 6H).

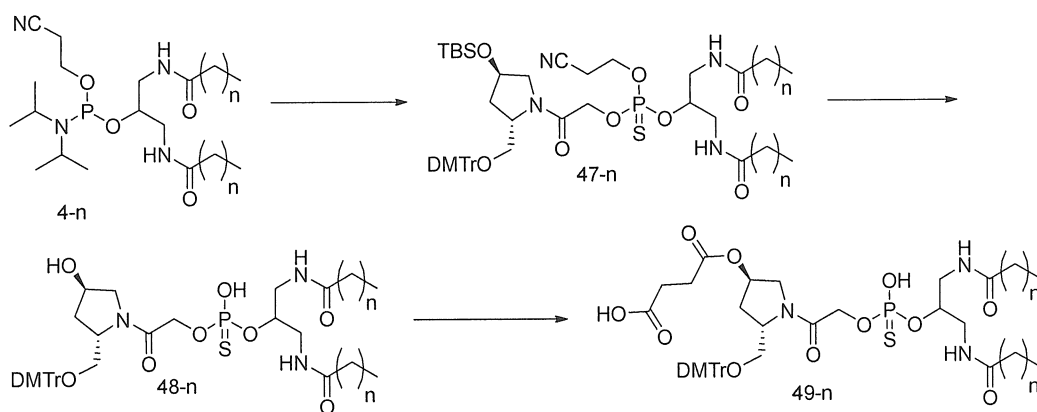
Bước 10

Thêm triethylamin (0,237 ml, 1,71 mmol, 5,6 đương lượng) và anhydrit succinic (85 mg, 0,844 mmol, 2,8 đương lượng) và DMAP (4 mg) theo thứ tự ở

nhệt độ trong phòng vào hợp chất 45-16 (340 mg, 0,303 mmol) trong diclometan (3 ml). Sau khi hỗn hợp được khuấy ở 45°C trong 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 :12 g, clorofom: metanol: trietylamin = 100:0:1→80:20:1), và sau đó rửa bằng n-hexan để thu được hợp chất 46-16 (246 mg, hiệu suất 66%) ở dạng chất rắn không màu. Nhờ $^1\text{H-NMR}$, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 77:23.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: (Sản phẩm chính) 7,38-7,31 (m, 2H), 7,31-7,12 (m, 6H), 7,17-7,11 (m, 1H), 7,00 (br.s, 1H), 6,85-6,77 (m, 4H), 6,74 (br.s, 1H, -NH), 5,33 (br.s, 1H), 4,34 (br.s, 1H), 3,90-3,74 (m, 2H), 3,788 (s, 6H), 3,64-3,37 (m, 2H), 3,35-3,11 (m, 2H), 3,11-2,92 (m, 2H), 2,68-2,07 (m, 11H), 1,68-1,51 (m, 4H), 1,37-1,16 (m, 56H), 0,88 (t, $J=6,6\text{Hz}$, 6H). (Sản phẩm phụ) 7,38-7,31 (m, 2H), 7,31-7,12 (m, 6H), 7,17-7,11 (m, 1H), 7,00 (br.s, 1H), 6,85-6,77 (m, 4H), 6,74 (br.s, 1H, -NH), 5,20 (br.s, 1H), 4,17 (br.s, 1H), 3,90-3,74 (m, 2H), 3,678 (s, 6H), 3,64-3,37 (m, 2H), 3,35-3,11 (m, 2H), 3,11-2,92 (m, 2H), 2,68-2,07 (m, 11H), 1,68-1,51 (m, 4H), 1,37-1,16 (m, 56H), 0,88 (t, $J=6,6\text{Hz}$, 6H).

11) Tổng hợp hợp chất 49-n



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

11-1) Tổng hợp hợp chất 49-16

Bước 1

Theo phương pháp tương tự để tổng hợp hợp chất 34-16 được mô tả ở mục 9-1), thu được hợp chất 47-16 ở dạng bột không màu (hiệu suất 78%).

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 7,34 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H), 7,31-7,21 (m, 6H), 7,18 (m,

1H), 6,87-6,79 (m, 4H), 3,78 (s, 6H), 2,25-2,02 (m, 5H), 1,94-1,84 (m, 1H), 1,64-1,49 (m, 4H), 1,33-1,16 (m, 56H), 0,88 (t, $J=7,0\text{Hz}$, 6H), 0,87 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

Bước 2

Theo phương pháp tương tự để tổng hợp hợp chất 35-16 được mô tả ở mục 9-1), thu được hợp chất 48-16 ở dạng bột không màu (hiệu suất 61%).

ESI-MS(m/z): 1177 (M^+). RT đỉnh HPLC = 3,64 phút.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 7,35 (d, $J=7,8\text{Hz}$, 2H), 7,31-7,16 (m, 7H), 6,87-6,78 (m, 4H), 4,98-4,49 (m, 3H), 4,48-4,31 (m, 2H), 3,91-3,44 (m, 5H), 3,78 (s, 6H), 3,37-3,08 (m, 4H), 2,27-2,11 (m, 5H), 2,08-1,94 (m, 1H), 1,66-1,52 (m, 4H), 1,34-1,21 (m, 56H), 0,88 (t, $J=6,7\text{Hz}$, 6H).

Bước 3

Thêm triethylamin (0,330 ml, 2,39 mmol, 4,5 đương lượng), anhydrit succinic (106 mg, 0,159 mmol, 3,0 đương lượng) và DMAP (13 mg, 10,6 μmol , 0,2 đương lượng) theo thứ tự ở nhiệt độ trong phòng vào hợp chất 48-16 (624 mg, 0,529 mmol) trong diclometan (5 ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ở áp suất giảm. Phần cặn tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 :24g, clorofom: metanol: triethylamin = 97,5:2,5:1 $\rightarrow$ 80:20:1) để thu được hợp chất 49-16 (482 mg, hiệu suất 71%) ở dạng chất rắn không màu.

Mặc dù hợp chất 49-16 là hỗn hợp gồm 2 loại chất đồng phân, một phần của hỗn hợp này được tách riêng bằng cách sắc ký cột silicagel và các dữ liệu thiết bị khác nhau được xác định.

Chất đồng phân 1 của hợp chất 49-16 (chất đồng phân có giá trị R_f cao hơn dựa trên TLC triển khai bằng dung môi gồm clorofom:metanol = 5: 1): Nhờ $^1\text{H-NMR}$, quan sát được hỗn hợp gồm các chất đồng phân hình học theo tỷ lệ 65:35.

ESI-MS(m/z): 1277 (M^+). RT đỉnh HPLC = 3,72 phút.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: (Sản phẩm chính) 7,34 (d, $J=7,5\text{Hz}$, 2H), 7,31-7,14 (m, 7H), 6,83 (d, $J=8,3\text{Hz}$, 4H), 5,45 (br.s, 1H), 4,75 (dd, $J=14,1$, 8,3Hz, 1H), 4,55-4,38 (m, 2H), 4,33 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,72-3,48 (m, 4H), 3,44-3,08 (m, 4H), 2,70-2,44 (m, 4H), 2,38-2,14 (m, 6H), 1,68-1,51 (m, 4H), 1,34-1,21

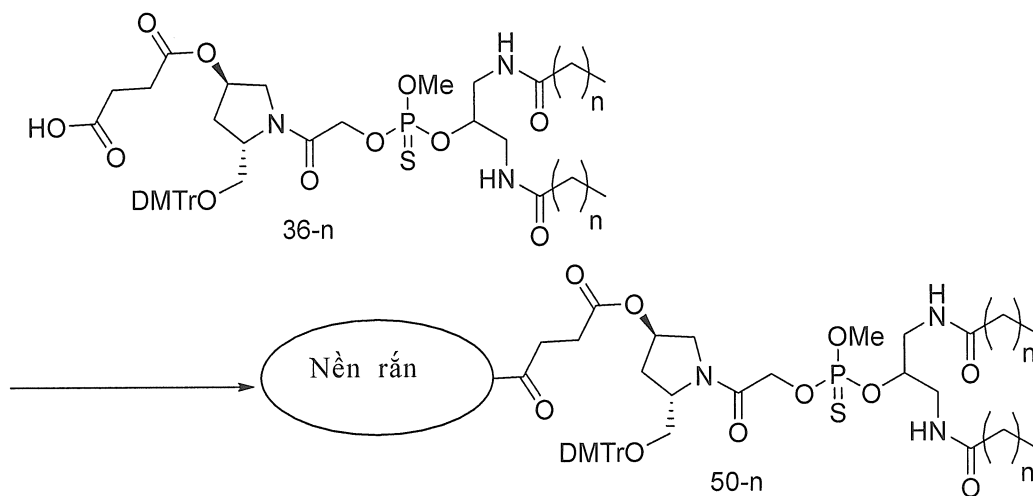
(m, 56H), 0,88 (t, $J=6,7\text{Hz}$, 6H). (Sản phẩm phụ) 7,34 (d, $J=7,5\text{Hz}$, 2H), 7,31-7,14 (m, 7H), 6,83 (d, $J=8,3\text{Hz}$, 4H), 5,20 (br.s, 1H), 4,84 (m, 1H), 4,55-4,38 (m, 2H), 4,33 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,72-3,48 (m, 4H), 3,44-3,08 (m, 4H), 2,70-2,44 (m, 4H), 2,38-2,14 (m, 6H), 1,68-1,51 (m, 4H), 1,34-1,21 (m, 56H), 0,88 (t, $J=6,7\text{Hz}$, 6H). ^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 58,1

Chất đồng phân 2 của hợp chất 49-16 (chất đồng phân có giá trị R_f thấp hơn dựa trên TLC triển khai với dung môi gồm clorofom:metanol = 5: 1)

ESI-MS(m/z): 1277 (M^+). RT đỉnh HPLC = 3,72 phút.

^1H -NMR(CDCl_3) δ : 7,83 (br.s, 1H), 7,37-7,10 (m, 9H), 6,74 (d, $J=8,6\text{Hz}$, 4H), 5,30 (br.s, 1H), 4,62 (dd, $J=14,0, 9,2\text{Hz}$, 1H), 4,42-4,33 (m, 2H), 4,30 (dd, $J=14,0, 9,2\text{Hz}$, 1H), 3,71 (s, 6H), 2,63-2,34 (m, 4H), 2,31-2,21 (m, 1H), 2,16-2,03 (m, 5H), 1,59-1,42 (m, 4H), 1,24-1,09 (m, 56H), 0,81 (t, $J=6,7\text{Hz}$, 6H). ^{31}P -NMR(CDCl_3) δ : 57,3

12) Tổng hợp hợp chất 50-n



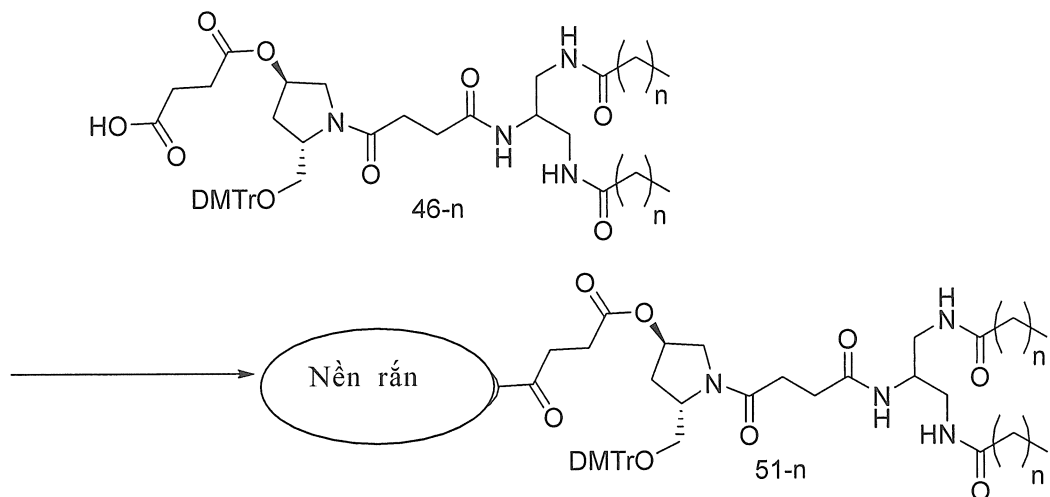
trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

12-1) Tổng hợp hợp chất 50-16

Thu hợp chất 50-16 bằng cách đưa hợp chất 36-16 thu được từ mục 9-1) vào điều kiện tương tự của phản ứng để mang trên nhựa rắn ở mục 4). Lượng được mang của hợp chất 36-16 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 50-16 có lượng được mang là $32 \mu\text{mol/g}$.

Theo phương pháp tương tự, hợp chất 49-n có thể được mang trên nhựa rắn.

13) Tổng hợp hợp chất 51-n

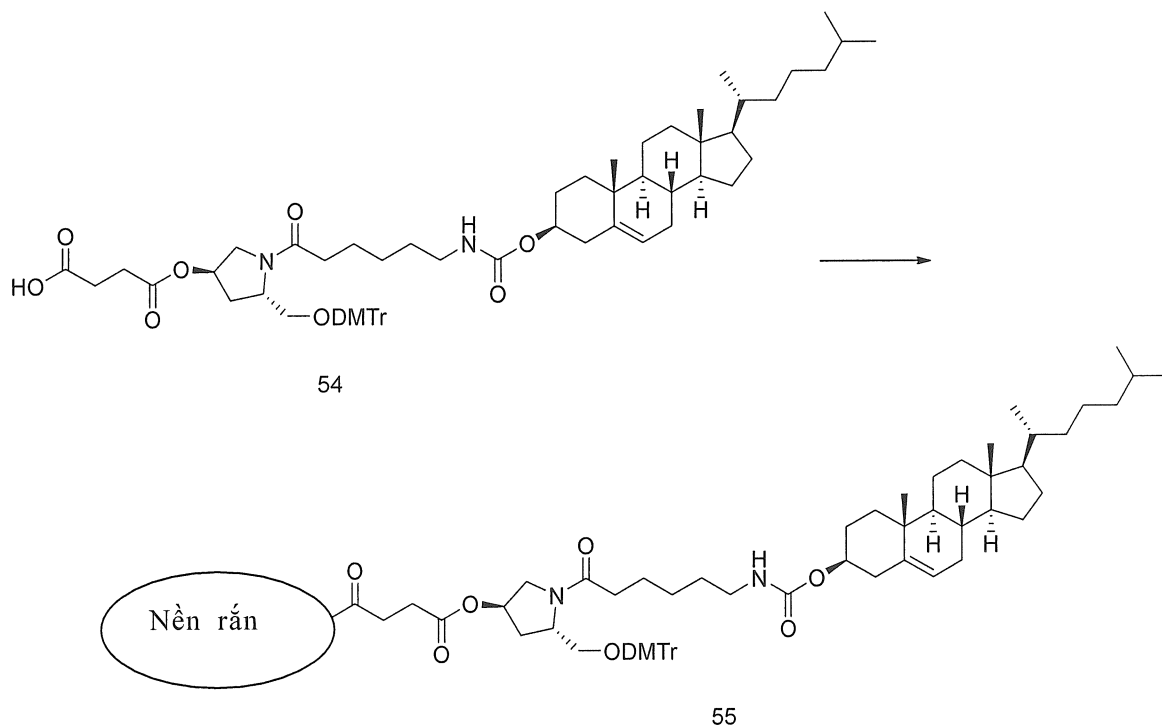


trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

13-1) Tổng hợp hợp chất 51-16

Thu hợp chất 51-16 bằng cách đưa hợp chất 46-16 thu được từ mục 10-1) vào điều kiện tương tự của phản ứng để mang trên nhựa rắn ở mục 4). Lượng được mang của hợp chất 46-16 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 51-16 có lượng được mang là 33 $\mu\text{mol/g}$.

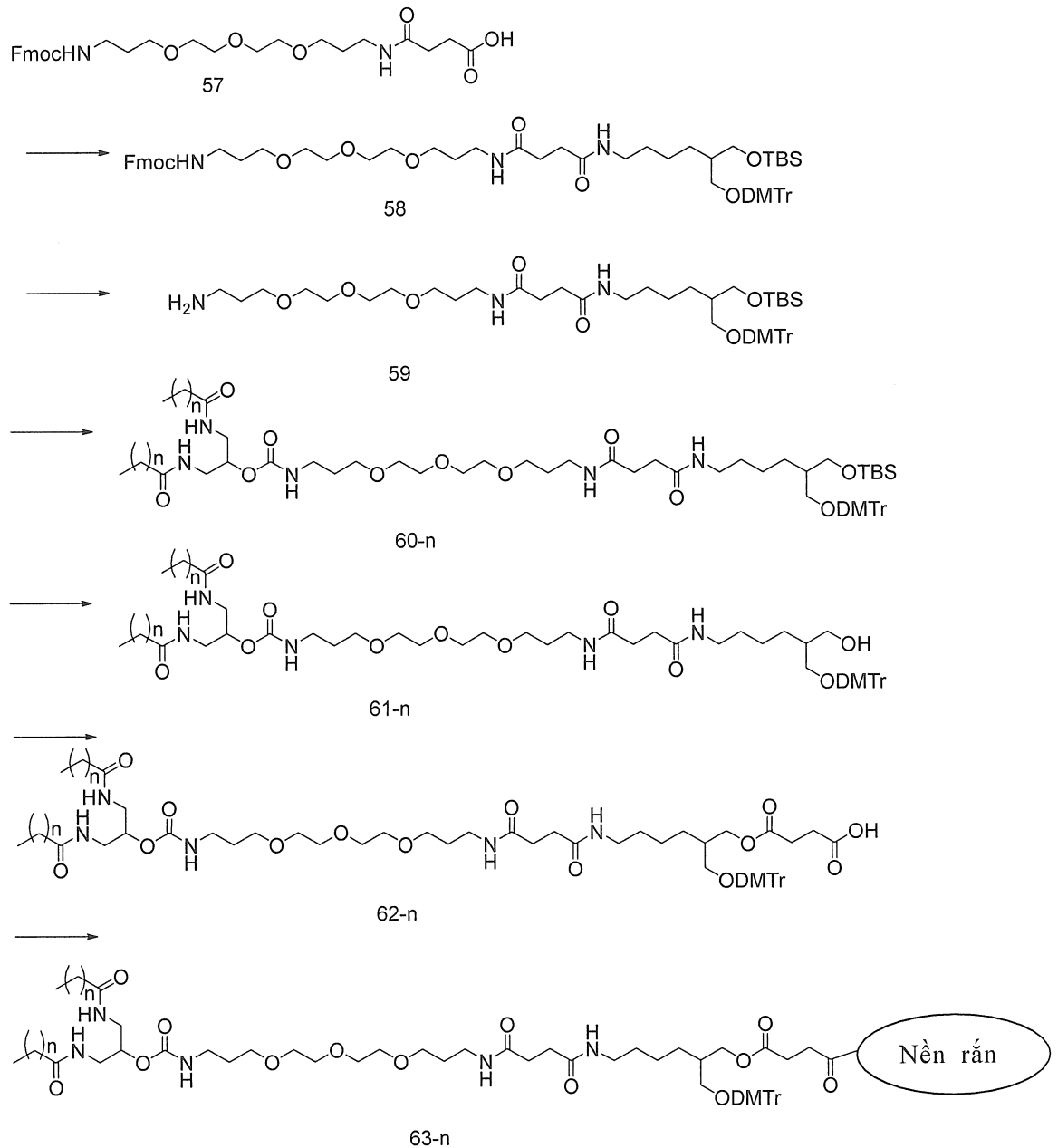
14) Tổng hợp hợp chất 55



Thu hợp chất 55 bằng cách đưa hợp chất 54 được mô tả trong US2008/0085869 vào điều kiện tương tự của phản ứng để mang trên nhựa rắn ở

mục 4). Lượng được mang của hợp chất 54 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 55 có lượng được mang là 90 $\mu\text{mol/g}$.

15) Tổng hợp hợp chất 63-n



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

15-1) Tổng hợp hợp chất 63-18

Bước 1

Thêm DIEA (0,447 ml, 3,46 mmol) và HBTU (349 mg, 1,04 mmol) vào hợp chất 57 (Sigma-Aldrich, 0,517 g, 0,952 mmol) trong dung dịch DMF (4,9

ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau đó, hợp chất 17 (0,488 g, 0,865 mmol) trong dung dịch DMF được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy qua đêm. Sau khi tách và chiết bằng hexan/ethyl axetat = 1:1 (2x50 ml) và dịch natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml), các lớp hữu cơ được kết hợp, rửa bằng nước muối (50 ml), và làm khô bằng magie sulfat. Sau khi lọc, hỗn hợp được cô bằng cách làm bay hơi quay ở áp suất giảm, tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (clorofom: metanol = 100:0→70:30) để thu được hợp chất 58 (0,837 g, 85%) ở dạng chất rắn không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,75 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,60 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,42-7,38 (4H, m), 7,32-7,28 (7H, m), 7,24 (1H, s), 7,18 (1H, t, $J = 7,3$ Hz), 6,81 (4H, d, $J = 8,9$ Hz), 6,49 (1H, s), 6,08 (1H, s), 5,56 (1H, s), 4,39 (2H, d, $J = 6,9$ Hz), 4,21 (1H, t, $J = 6,7$ Hz), 3,79 (6H, s), 3,63-3,52 (15H, m), 3,34-3,28 (4H, m), 3,14 (2H, dd, $J = 13,9, 6,4$ Hz), 3,03 (2H, d, $J = 5,6$ Hz), 1,80-1,65 (5H, m), 1,63 (4H, s), 1,43-1,36 (2H, m), 1,31-1,26 (2H, m), 1,18-1,12 (2H, m), 0,84 (9H, s), 0,01 (6H, s).

Bước 2

Thêm piperidin (80 μl) vào hợp chất 58 (800 mg, 0,735 mmol) trong dung dịch DMF (8ml), và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi tách và chiết bằng hexan/ethyl axetat = 1:4 và nước, hỗn hợp được làm khô bằng natri sulfat khan qua đêm. Sau khi lọc, hỗn hợp được cô bằng cách làm bay hơi quay ở áp suất giảm, và tinh chế bằng sắc ký cột amino silicagel (clorofom: metanol = 100:0→97:3) để tạo ra hợp chất 59 (0,178 g, 0,205 mmol) ở dạng dầu không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,37 (8H, dt, $J = 50,4, 5,2$ Hz), 7,26-7,18 (2H, m), 6,89 (1H, s), 6,82 (4H, t, $J = 5,9$ Hz), 6,25 (1H, t, $J = 5,1$ Hz), 3,81 (6H, s), 3,66-3,53 (15H, m), 3,35 (2H, q, $J = 6,0$ Hz), 3,16 (2H, dd, $J = 13,9, 6,5$ Hz), 3,04 (2H, d, $J = 5,5$ Hz), 2,80 (2H, t, $J = 6,7$ Hz), 1,80-1,17 (17H, m), 0,85 (9H, s), 0,03-0,01 (6H, m).

Bước 3

Sau khi hợp chất 3-18 (140 mg, 0,205 mmol) và DMAP (63 mg, 0,514 mmol) được phá vỡ thành các mảnh nhỏ trong bình, hỗn hợp được hòa tan trong THF (1,8 ml). bis(4-nitrophenyl) cacbonat (156 mg, 0,514 mmol) được

thêm vào, hỗn hợp được khuấy ở 55°C trong 30 phút. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, THF được cô ở áp suất giảm, và phần cặn được tạo huyền phù trong axetonitril (10 ml) lần nữa. Sau khi gia nhiệt để gần như trở thành dung dịch, hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, và chất rắn được làm kết tủa. Sau đó, quá trình kết tủa được thúc đẩy bằng cách phá vỡ bằng siêu âm. Chất rắn kết tủa được thu gom bằng cách lọc và rửa lần lượt bằng axetonitril (10 ml), nước (10 ml) và axetonitril (10 ml) và sau đó làm khô trong chân không để thu được hợp chất 18-18 (196 mg, 0,232 mmol) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt. Hợp chất 18-18 (196 mg) được hòa tan trong THF (1,8 ml). Hợp chất 59 (178 mg, 0,205 mmol) và DMAP (25 mg, 0,205 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy ở 55°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, chất rắn được làm kết tủa, và axetonitril (18 ml) được thêm vào. Sau khi gia nhiệt và phá vỡ bằng siêu âm, nước (1,8 ml) được thêm vào, và sau đó thu được đối tượng, hợp chất 60-18 (251 mg, 0,160 mmol) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt bằng cách lọc qua phễu Kyriyama.

Bước 4

Sau khi hợp chất 60-18 (246 mg, 0,157 mmol) trong THF (4,9 ml) được làm lạnh trong bể nước đá, dung dịch TBAF (trong THF 1M, 495 μ l, 0,495 mmol) được thêm vào, và hỗn hợp được khuấy và làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi dung môi được cô ở áp suất giảm, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột amino silicagel (chỉ sử dụng clorofom) để tạo ra hợp chất 61-18 (192 mg, 0,132 mmol) ở dạng chất rắn không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,41 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,30 (5H, dd, $J = 8,9, 2,1$ Hz), 7,21 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,83 (5H, d, $J = 8,7$ Hz), 6,76 (1H, t, $J = 6,2$ Hz), 6,44 (1H, t, $J = 6,6$ Hz), 5,63 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 4,72-4,66 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,76-3,74 (1H, m), 3,64-3,48 (17H, m), 3,39-3,14 (6H, m), 3,06 (2H, dd, $J = 9,0, 7,6$ Hz), 2,76 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 2,50-2,46 (6H, m), 2,19 (6H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,79-1,73 (7H, m), 1,49-1,42 (6H, m), 1,24 (68H, d, $J = 11,8$ Hz), 0,89-0,87 (6H, t, $J = 6,3$ Hz).

Bước 5

Thêm DIEA (0,069 ml, 0,393 mmol), DMAP (1,6 mg, 0,013 mmol), và anhydrit succinic (20 mg, 0,197 mmol) vào hợp chất 61-18 (191 mg, 0,131

mmol) trong diclometan (1,9 ml), và hỗn hợp được khuấy hồi lưu trong phòng trong 3 giờ. Dung môi được cô ở áp suất giảm, và phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột diol silicagel (chỉ sử dụng clorofom) để tạo ra hợp chất 62-18 (201 mg, 0,129 mmol) ở dạng chất rắn không màu.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,42 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,30 (5H, d, $J = 8,7$ Hz), 7,19 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,81 (5H, d, $J = 8,7$ Hz), 6,74 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 6,26 (1H, t, $J = 5,9$ Hz), 5,55 (1H, t, $J = 5,9$ Hz), 4,72-4,67 (1H, m), 3,79 (6H, s), 3,58-3,49 (17H, m), 3,32-3,27 (6H, m), 3,14 (2H, q, $J = 6,5$ Hz), 3,04 (2H, d, $J = 5,4$ Hz), 2,49-2,46 (4H, m), 2,20 (5H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,76-1,72 (4H, m), 1,65-1,62 (10H, m), 1,42-1,41 (3H, m), 1,25 (68H, s), 0,88 (6H, t, $J = 6,6$ Hz).

Bước 6

Sau khi hợp chất 62-18 (153 mg, 0,098 mmol) được hòa tan trong hỗn hợp gồm axetonitril/diclometan (1:1, 10 ml), DIEA (0,067 ml, 0,392 mmol) và HBTU (41 mg, 0,108 mmol) được thêm, và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Thêm Amino lcaa CPG 1000Å tự nhiên (ChemGenes Corporation) (1,0 g) vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp này được lắc trong 24 giờ. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa hai lần bằng axetonitril, hai lần bằng diclometan và hai lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Hỗn hợp gồm CapA (PROLIGO, L840045-06) và CapB (PROLIGO, L850045-06) (1:1, 20 ml) được thêm vào CPG đã làm khô, và hỗn hợp này được lắc trong 30 phút. Sau khi hỗn hợp phản ứng được lọc, nhựa CPG được rửa hai lần bằng axetonitril, hai lần bằng diclometan và hai lần bằng dietyl ete, và làm khô ở áp suất giảm. Lượng được mang của hợp chất 62-18 được tính toán bằng thử nghiệm so màu của cation DMTr, và thu được hợp chất 63-18 có lượng được mang là 56 $\mu\text{mol/g}$.

B) Tổng hợp oligonucleotit

Oligonucleotit sử dụng trong các ví dụ của phần mô tả này được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp phosphoramidit dùng AKTA Oligopilot10 (GE Healthcare), NS-8-I (Dainippon Seiki co., ltd.) hoặc NS-8-II (Dainippon Seiki co., ltd.). Monome được điều chế trong dung dịch axetonitril bằng cách sử dụng amidit được tạo dẫn xuất từ quá trình tổng hợp amidit trên đây. Thời gian liên kết nằm trong khoảng từ 32 giây đến 10 phút, và từ 8 đến 10 đương

lượng đơn vị amidit được sử dụng để ngưng tụ với một monome. Chất oxy hóa 0,02M (Sigma-Aldrich) và iot/pyridin/nước = 12,7/9/1 (trọng lượng/thể tích/thể tích) được sử dụng để oxy hóa PO. DDTT ((dimethylamino-methylidyn) amino-3H-1,2,4-dithiazolin-3-thion) 50 mM trong axetonitril/3-picolin với tỷ lệ 1/1 theo thể tích hoặc 1/4 theo thể tích và dung dịch axetonitril/pyridin theo tỷ lệ 1/4 theo thể tích được sử dụng để oxy hóa PS. Chất hoạt hóa ETT (5-ethylthio)-1H-tetrazol) (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm chất hoạt hóa, CapA và CapB (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm chất phản ứng che phủ. Deb (dung dịch TCA CH_2Cl_2 3% trọng lượng/thể tích) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) hoặc Deb (dung dịch axit dicloaxetin, toluen 3% trọng lượng/thể tích) được sử dụng làm chất phản ứng tách nhóm trityl.

SEQ-321, SEQ-323, SEQ-340, SEQ-343, SEQ-346, SEQ-349, SEQ-352, SEQ-355 và SEQ-358 được tạo ra bằng cách cung cấp hợp chất 22-18 cho GeneDesign Inc. để yêu cầu tổng hợp nucleic và tinh chế oligonucleotit. DMT-butandiol phosphoramidit dùng để tổng hợp SEQ-316 được mua từ ChemGenes Corporation.

C) Tổng hợp oligonucleotit liên kết lipid

1) Tổng hợp từ đơn vị amidit tổng hợp

Thanh khuấy, sàng phân tử 4A 1/16 và amidit được tổng hợp ở mục A) trên đây (ví dụ, hợp chất 4-n, hợp chất 4-n,o, hợp chất 8-n và hợp chất 10-n, 10 đến 100 đương lượng oligonucleotit) được cho vào ống vi sóng (2-5 ml, 10-20 ml) được chế tạo bởi Biotage, và dung dịch được điều chỉnh đến nồng độ 0,2M bằng clorofom (được bổ sung 2-metyl-2-butan làm chất ổn định). Sau khi làm khô trong 5 giờ, oligonucleotit được mang bởi pha rắn (nhựa CPG hoặc nhựa polystyren) và chất hoạt hóa ETT 0,25M mà là ((5-ethylthio)-1H-tetrazol) diclometan (lượng giống như clorofom) được thêm, đóng kín và gia nhiệt ở 40°C trong thời gian từ 10 phút đến 1 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được pha loãng hai lần bằng clorofom, và nhựa được thu gom bằng cách lọc. Nhựa thu được được sử dụng trong quá trình oxy hóa PS trong NS-8-I (Dainippon Seiki co., Ltd.) hoặc NS-8-II (Dainippon Seiki co., Ltd.). Sau đó, nhựa đã làm khô được đưa vào điều kiện khử bảo vệ I hoặc II sau đây để tổng hợp oligonucleotit liên kết lipid đích.

2) Tổng hợp từ nhựa mang lipit

Sử dụng lipit được mang bởi nhựa được tổng hợp ở mục A trên đây (ví dụ, hợp chất 15-n, hợp chất 22-n, hợp chất 50-n, hợp chất 51-n, hợp chất 55 và hợp chất 63-n), oligonucleotit liên kết lipit đích được tổng hợp theo phương pháp tương tự với mục B) trên đây.

D) Loại nhóm bảo vệ

1) Phân giải từ nhựa, và khử bảo vệ phosphat và loại nhóm bảo vệ bazơ

Để ngắt mạch oligonucleotit ADN, dung dịch amoniac 28% (SEQ-1, 3 hoặc 49) hoặc dung dịch amoniac 28%/EtOH với tỷ lệ 4/1 theo thể tích (oligonucleotit sợi đơn được mô tả trong các ví dụ ngoại trừ SEQ-1, 3 và 49) được sử dụng và dung dịch được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và ở 55°C trong 5 giờ. Dung dịch amoniac với lượng 1 ml, 5 ml hoặc 10 ml được sử dụng để lần lượt tổng hợp 1 μmol , 5 μmol hoặc 10 μmol cho phản ứng ngắt mạch. Sau khi nhựa được rửa bằng dung dịch etanol 50%, dịch lọc được cô ở áp suất giảm đến thể tích nằm trong khoảng từ 1 đến 5 ml.

Khi trình tự chứa ARN, dung dịch tạo ra được làm đông khô nhanh để thu được bột màu trắng, và sau đó phản ứng khử bảo vệ sau đây đối với nhóm 2'-TBS được thực hiện.

2) Loại nhóm bảo vệ đối với nhóm 2'-TBS

Thêm N-metylpyrrolidon/triethylamin/triethylamin trihydroflorua với tỷ lệ = 6/1/2 theo thể tích vào bột màu trắng thu được, và dung dịch được khuấy ở 65°C trong 1,5 giờ. Etoxytrimetylsilan với cùng lượng được thêm vào hỗn hợp phản ứng, và dung dịch được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để thu được kết tủa. Sau khi ly tâm ở 2500 x g (2 phút), lớp dung môi hữu cơ được loại bỏ một cách cẩn thận. Diethyl ete được thêm vào kết tủa thu được, và dung dịch được khuấy mạnh. Sau đó, theo cách tương tự, quá trình ly tâm được thực hiện và loại bỏ dung môi hữu cơ để thu được đơn vị ARN thô (chất rắn màu trắng).

E) Tinh chế

Oligonucleotit không có phối tử lipit như SEQ-1, 3 và 49 được tinh chế bằng HPLC đảo pha trong điều kiện 1.

Điều kiện đối với HPLC đảo pha

Điều kiện 1

Pha động:

Đệm A: Dung dịch TEAA (triethylamonixetat, độ pH 7,0) 100 mM trong nước hoặc dung dịch AcONa 100 mM trong nước (độ pH 5,4).

Đệm B: axetonitril

Gradient nồng độ B: 10-30%

(Điều kiện 1-1)

Cột: Hydrosphere C18 (YMC co., ltd.) 100x20mm I.D., S-5 μ m, 12 nm

Tốc độ chảy: 10 ml/phút

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

Bước sóng UV phát hiện: 260 nm

(Điều kiện 1-2)

Cột: Hydrosphere C18 (YMC co., ltd.) 150x10mm I.D., S-5 μ m, 12 nm

Tốc độ chảy: 4 ml/phút

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

Bước sóng UV phát hiện: 260 nm

Oligonucleotit sợi đơn với (các) phối tử lipid (oligonucleotit sợi đơn được mô tả trong các ví dụ ngoại trừ SEQ-1, 3 và 49) được tinh chế bằng HPLC pha ngược trong điều kiện 2.

Điều kiện 2

Điều kiện đối với HPLC đảo pha

Theo độ tan trong lipid của hợp chất, nồng độ B lúc đầu được điều chỉnh trong khoảng từ 20% đến 50%.

Pha động:

Đệm A: Dung dịch TEAA (triethylamoni axetat độ pH 7,0) 100 mM trong nước hoặc dung dịch AcONa 100 mM trong nước (độ pH 5,4).

Đệm B: axetonitril

Gradient nồng độ B: 20-80% (hợp chất có L₄₋₈ hoặc L₄₋₁₀),

30-60% (hợp chất có L_{Toc} hoặc L_{chol}),

30-80% (hợp chất có L₄₋₁₂, L₄₋₁₄, L₄₋₁₆, L₄₋₁₈, M₂₂₋₁₂ hoặc M₅₁₋₁₆),

40-80% (hợp chất có L₄₋₂₀ hoặc L₄₋₂₂),

50-80% (hợp chất có M₂₂₋₁₈)

(Điều kiện 2-1)

Cột: YMC-Pack C4 (YMC co., ltd.) 100x20mm I.D., S-5 μ m, 12 nm

Tốc độ chảy: 10 ml/phút

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

Bước sóng UV phát hiện: 260 nm

(Điều kiện 2-2)

Cột: YMC-Pack C4 (YMC co., ltd.) 150x10mm I.D., S-5 μ m, 12 nm

Tốc độ chảy: 4 ml/phút

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

Bước sóng UV phát hiện: 260 nm

F) Loại muối và làm khô ở nhiệt độ thấp cho oligonucleotit đã tinh chế

Sử dụng dụng cụ ly tâm VivaSpin20 (MWCO 3000) (Sartorius) và Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units-3K, quá trình siêu lọc được lặp lại đối với oligonucleotit thu được để loại bỏ hợp phần muối ra khỏi phân đoạn. Sau đó, thực hiện làm đông khô nhanh để thu được oligonucleotit đích ở dạng bột. Đối với oligonucleotit được tinh chế bằng cách sử dụng dung môi TEAA, phương pháp loại muối được thực hiện sau khi biến đổi dạng muối bằng dung dịch natri axetat 100 mM (20 ml).

G) Phân tích độ tinh khiết của oligonucleotit

Oligonucleotit thu được được xác nhận về trình tự đích bằng cách so khớp các trọng lượng phân tử tìm thấy được xác định bởi phép đo UPLC/MS và các trọng lượng phân tử tính toán được.

Điều kiện 1 (SEQ-1, 3 hoặc 49)

Xevo G2 Tof System (Waters)

Cột: Aquity OST C18 (2,1x50 mm) (Waters)

Pha động:

Đệm A: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol 200 mM/dung dịch triethylamin 8mM trong nước

Đệm B: metanol

Gradient nồng độ B: 10-30% (10 phút)

Nhiệt độ: 50°C

Tốc độ chảy: 0,2 ml/phút

Điều kiện 2 (oligonucleotit sợi đơn được mô tả trong các ví dụ ngoại trừ SEQ-1, 3 và 49)

Xevo G2 Tof System (Waters)

Cột: Cột ACQUITY UPLC Protein BEH C4, 300Å, 1,7µm,
2,1mm×100mm, 1/pkg (Waters)

Pha động:

Đệm A: 1,1,1,3,3,3-hexafluo-2-propanol 200 mM/dung dịch trietylamin
8mM trong nước

Đệm B: metanol

Gradient nồng độ B: 10-95% (10 phút)

Nhiệt độ: 50°C

Tốc độ chảy: 0,2 ml/phút

Các kết quả được thể hiện trong các bảng từ 1 đến 3.

Bảng 1

Số	Mw lý thuyết [M-H]-	Mw tìm được [M]	Số	Mw lý thuyết [M-H]-	Mw tìm được [M]
SEQ-1	6363	6365	SEQ-76	5117	5116
SEQ-2	7064	7065	SEQ-78	5554	5554
SEQ-3	6254	6256	SEQ-80	5610	5610
SEQ-5	6955	6955	SEQ-82	5666	5666
SEQ-7	3842	3842	SEQ-84	6798	6799
SEQ-9	5367	5367	SEQ-86	6854	6855
SEQ-11	6731	6731	SEQ-88	6910	6911
SEQ-13	6843	6843	SEQ-90	8451	8452
SEQ-15	7012	7011	SEQ-92	8451	8452
SEQ-17	6698	6699	SEQ-94	8451	8452
SEQ-19	6369	6370	SEQ-96	8563	8564
SEQ-21	6040	6040	SEQ-98	8731	8733
SEQ-23	5736	5736	SEQ-100	8675	8677
SEQ-25	5423	5423	SEQ-102	8731	8733
SEQ-27	5133	5134	SEQ-104	8395	8396
SEQ-29	4829	4829	SEQ-106	8507	8508
SEQ-31	4500	4500	SEQ-108	8563	8564
SEQ-33	4211	4211	SEQ-110	6042	6042
SEQ-35	3898	3898	SEQ-112	6362	6363
SEQ-37	7570	7570	SEQ-114	7323	7323
SEQ-39	7291	7291	SEQ-116	6067	6067
SEQ-41	7330	7331	SEQ-118	6412	6413
SEQ-43	5844	5845	SEQ-120	7448	7447
SEQ-45	7363	7363	SEQ-122	7287	7287
SEQ-47	7419	7419	SEQ-124	7607	7607
SEQ-49	7697	7698	SEQ-126	8568	8569
SEQ-50	8211	8212	SEQ-128	7312	7312
SEQ-52	7569	7568	SEQ-130	7657	7658
SEQ-54	6967	6966	SEQ-132	8693	8693
SEQ-56	6348	6348	SEQ-134	8385	8386
SEQ-58	5722	5722	SEQ-136	5598	5599
SEQ-60	5409	5409	SEQ-138	8216	8218
SEQ-62	6049	6050	SEQ-140	5430	5431
SEQ-64	6099	6099	SEQ-142	8399	8398
SEQ-66	8932	8933	SEQ-143	9089	9090
SEQ-68	5859	5860	SEQ-144	8652	8651
SEQ-70	5816	5817	SEQ-145	5426	5427
SEQ-72	8451	8452	SEQ-147	5410	5410
SEQ-74	5161	5160	SEQ-149	5470	5470

Bảng 2

Số	Mw lý thuyết [M-H]-	Mw tìm được [M]	Số	Mw lý thuyết [M-H]-	Mw tìm được [M]
SEQ-151	6758	6758	SEQ-229	5992	5992
SEQ-153	7102	7102	SEQ-231	6048	6049
SEQ-155	7793	7793	SEQ-233	5987	5987
SEQ-157	8139	8139	SEQ-235	8370	8370
SEQ-159	8484	8484	SEQ-237	6700	6701
SEQ-161	7761	7761	SEQ-239	7390	7392
SEQ-163	8074	8075	SEQ-241	6756	6757
SEQ-165	5912	5912	SEQ-243	7446	7448
SEQ-167	6602	6603	SEQ-245	6644	6645
SEQ-169	7638	7638	SEQ-247	7334	7336
SEQ-171	6380	6380	SEQ-249	6700	6701
SEQ-173	7368	7368	SEQ-251	7390	7391
SEQ-175	5782	5785	SEQ-253	6348	6349
SEQ-177	6408	6408	SEQ-254	5793	5792
SEQ-179	7509	7508	SEQ-256	6326	6328
SEQ-181	8481	8482	SEQ-257	5615	5615
SEQ-183	5694	5695	SEQ-259	5687	5687
SEQ-185	6073	6075	SEQ-261	5743	5743
SEQ-187	6764	6765	SEQ-263	5967	5968
SEQ-189	7800	7801	SEQ-265	6023	6024
SEQ-191	6129	6130	SEQ-267	5951	5952
SEQ-193	6820	6819	SEQ-269	6007	6010
SEQ-195	7856	7856	SEQ-271	6063	6064
SEQ-197	6017	6018	SEQ-273	6642	6642
SEQ-199	6707	6709	SEQ-275	6698	6699
SEQ-201	6073	6074	SEQ-277	6754	6754
SEQ-203	6764	6766	SEQ-279	6468	6469
SEQ-205	6007	6008	SEQ-281	6524	6525
SEQ-207	6063	6063	SEQ-283	6552	6553
SEQ-209	6119	6120	SEQ-285	7609	7608
SEQ-211	6698	6698	SEQ-287	7196	7196
SEQ-213	6754	6754	SEQ-289	8441	8442
SEQ-215	6810	6812	SEQ-291	7252	7252
SEQ-217	6119	6119	SEQ-293	8498	8499
SEQ-219	6175	6177	SEQ-295	7180	7184
SEQ-221	6810	6811	SEQ-297	7236	7240
SEQ-223	6867	6869	SEQ-299	7292	7296
SEQ-225	6192	6192	SEQ-301	7870	7873
SEQ-227	6028	6027	SEQ-303	7926	7929

Bảng 3

Số	Mw lý thuyết [M-H] ⁻	Mw tìm được [M]	Số	Mw lý thuyết [M-H] ⁻	Mw tìm được [M]
SEQ-305	7983	7986	SEQ-346	5944	5942
SEQ-307	8425	8426	SEQ-348	9346	9345
SEQ-309	8537	8541	SEQ-349	5919	5916
SEQ-311	9115	9118	SEQ-351	7048	7046
SEQ-313	9171	9175	SEQ-352	5921	5920
SEQ-315	9227	9230	SEQ-354	8050	8049
SEQ-317	6247	6248	SEQ-355	5927	5926
SEQ-319	6213	6214	SEQ-357	6778	6777
SEQ-321	6109	6107	SEQ-358	5775	5771
SEQ-323	4248	4249	SEQ-360	5574	5575
SEQ-325	7236	7238	SEQ-362	5839	5840
SEQ-327	7292	7293	SEQ-364	5895	5897
SEQ-329	7348	7350	SEQ-366	5631	5631
SEQ-331	7926	7929	SEQ-368	5895	5896
SEQ-333	7983	7985	SEQ-370	5951	5953
SEQ-335	8039	8041	SEQ-372	8481	8483
SEQ-337	5619	5619	SEQ-374	8537	8539
SEQ-339	6433	6434	SEQ-376	8593	8595
SEQ-340	5775	5773	SEQ-378	9171	9173
SEQ-342	7342	7341	SEQ-380	7151	7154
SEQ-343	5936	5934	SEQ-381	5860	5861
SEQ-345	8341	8339	SEQ-383	8833	8835

I) Điều chế oligonucleotit sợi kép

Oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế được điều chế như sau. Sau khi trộn lượng đẳng phân tử của dung dịch nồng độ 100 μM của mỗi oligonucleotit, dung dịch được gia nhiệt ở 75°C trong 5 phút, và để nguội tự nhiên đến nhiệt độ trong phòng để thu được axit nucleic sợi kép. Cấu hình riêng của tổ chức sợi kép được xác định bằng cách sắc ký loại trừ kích thước.

Cột: YMC-PAC Diol-120 (4,6 x 300 mm) (YMC co., ltd.)

Pha động: Axetonitril 40% trong 1 x dung dịch PBS

Tốc độ chảy: 0,5 ml/phút

Nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng

Oligonucleotit tổng hợp được thể hiện trong các bảng từ bảng 4 đến bảng 27.

Bảng 4

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3') , Sợi bổ trợ(3'⇒5')
SEQ-1	ODN1826 (1)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
SEQ-2	Amph1826 (1)	5'-L ₄₋₁₆ [^] t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
SEQ-3	S-1 (2)	3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] -5'
SEQ-4	ODN1826 (1) S-1 (2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] -5'
SEQ-5	S-2 (2)	3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-6	ODN1826 (1) S-2 (2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-7	S-3 (3)	3'-a [^] g [^] gactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-8	ODN1826 (1) S-3 (3)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-9	S-4 (4)	3'-c [^] t [^] gcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-10	ODN1826 (1) S-4 (4)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-c [^] t [^] gcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-11	S-5 (2)	3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₈ -5'
SEQ-12	ODN1826 (1) S-5 (2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₈ -5'
SEQ-13	S-6 (2)	3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-14	ODN1826(1) S-6 (2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-15	S-7 (2)	3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-16	ODN1826 (1) S-7 (2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-17	S-8 (5)	3'-g [^] g [^] tactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-18	ODN1826 (1) S-8 (5)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-g [^] g [^] tactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-19	S-9 (6)	3'-g [^] t [^] actgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-20	ODN1826 (1) S-9 (6)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-g [^] t [^] actgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-21	S-10 (7)	3'-t [^] a [^] ctgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-22	ODN1826 (1) S-10 (7)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-t [^] a [^] ctgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-23	S-11 (8)	3'-a [^] c [^] tgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-24	ODN1826 (1) S-11 (8)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-a [^] c [^] tgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-25	S-12 (4)	3'-c [^] t [^] gcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-26	ODN1826 (1) S-12 (4)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-c [^] t [^] gcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-27	S-13 (9)	3'-t [^] g [^] caaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-28	ODN1826 (1) S-13 (9)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3' 3'-t [^] g [^] caaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'

Bảng 5

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3') (Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-29	S-14(10)	3'-g [^] c [^] aaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-30	ODN1826(1) S-14(10)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-g [^] c [^] aaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-31	S-15(11)	3'-c [^] a [^] aggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-32	ODN1826(1) S-15(11)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-c [^] a [^] aggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-33	S-16(12)	3'-a [^] a [^] ggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-34	ODN1826(1) S-16(12)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] ggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-35	S-17(3)	3'-a [^] g [^] gactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-36	ODN1826(1) S-17(3)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] g [^] gactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-37	S-18(2)	3'-aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] uOMe [^] uOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-38	ODN1826(1) S-18(2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] uOMe [^] uOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-39	S-19(2)	3'-A [^] G [^] GTACTGCAAGGACTG [^] C [^] A [^] A [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-40	ODN1826(1) S-19(2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-A [^] G [^] GTACTGCAAGGACTG [^] C [^] A [^] A [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-41	S-20(2)	3'-A _F [^] G _F [^] G _F [^] U _F A _F [^] C _F [^] U _F G _F [^] C _F [^] A _F [^] A _F [^] G _F [^] G _F [^] A _F [^] C _F [^] U _F G _F [^] C _F [^] A _F [^] A _F [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-42	ODN1826(1) S-20(2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-A _F [^] G _F [^] G _F [^] U _F A _F [^] C _F [^] U _F G _F [^] C _F [^] A _F [^] A _F [^] G _F [^] G _F [^] A _F [^] C _F [^] U _F G _F [^] C _F [^] A _F [^] A _F [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-43	S-21(4)	3'-cOMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] cOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-44	ODN1826(1) S-21(4)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-cOMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] gOMe [^] gOMe [^] aOMe [^] COMe [^] uOMe [^] uOMe [^] gOMe [^] cOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-45	S-22(2)	3'-M ₁₅₋₆ [^] a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-46	ODN1826(1) S-22(2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-M ₁₅₋₆ [^] a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-47	S-23(2)	3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-48	ODN1826(1) S-23(2)	5'-t [^] c [^] c [^] a [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] c [^] t [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] g [^] gtactgcaaggactg [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-49	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3'

Bảng 6

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3') (Sợi bổ trợ(3'⇒5')
SEQ-50	S-24(14)	3'-a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-51	ODN2006(13) S-24(14)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-52	S-25(15)	3'-c [^] a [^] gcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-53	ODN2006(13) S-25(15)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-c [^] a [^] gcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-54	S-26(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-55	ODN2006(13) S-26(16)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-56	S-27(17)	3'-a [^] a [^] aacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-57	ODN2006(13) S-27(17)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] aacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-58	S-28(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-59	ODN2006(13) S-28(18)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-60	S-29(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-61	ODN2006(13) S-29(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{4-18-5'}
SEQ-62	S-30(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L _{4-18-5'}
SEQ-63	ODN2006(13) S-30(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L _{4-18-5'}
SEQ-64	S-31(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L _{4-18-5'}
SEQ-65	ODN2006(13) S-31(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L _{4-18-5'}
SEQ-66	S-32(14)	3'-aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L _{4-18-5'}
SEQ-67	ODN2006(13) S-32(14)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] COMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L _{4-18-5'}

Bảng 7

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3') (Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-68	S-33(19)	3'-aOMe [^] cOMe [^] aOMeGOMeCOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] cOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-69	ODN2006(13) S-33(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-aOMe [^] cOMe [^] aOMeGOMeCOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] COMe [^] aOMe [^] gOMe [^] cOMe [^] aOMe [^] aOMe [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-70	S-34(19)	3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-71	ODN2006(13) S-34(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-72	S-35(14)	3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-73	ODN2006(13) S-35(14)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-74	S-36(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{Toc} -5'
SEQ-75	ODN2006(13) S-36(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{Toc} -5'
SEQ-76	S-37(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{Chol} -5'
SEQ-77	ODN2006(13) S-37(19)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L _{Chol} -5'
SEQ-78	S-38(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-79	ODN2006(13) S-38(18)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-80	S-39(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₄ -5'
SEQ-81	ODN2006(13) S-39(18)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₄ -5'
SEQ-82	S-40(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-83	ODN2006(13) S-40(18)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t-3' 3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₆ -5'

Bảng 8

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-84	S-41(16)	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'	
SEQ-85	ODN2006(13) S-41(16)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-86	S-42(16)	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₄ -5'	
SEQ-87	ODN2006(13) S-42(16)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₄ -5'
SEQ-88	S-43(16)	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-89	ODN2006(13) S-43(16)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-g ⁺ c ⁺ aaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-90	S-44(14)	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₄ -5'	
SEQ-91	ODN2006(13) S-44(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₄ -5'
SEQ-92	S-45(14)	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₀ -5'	
SEQ-93	ODN2006(13) S-45(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₀ -5'
SEQ-94	S-46(14)	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₈ -5'	
SEQ-95	ODN2006(13) S-46(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₈ -5'
SEQ-96	S-47(14)	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-97	ODN2006(13) S-47(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'

Bảng 9

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-98	S-48(14)	3'-M ₁₅₋₁₀ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-99	ODN2006(13) S-48(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₀ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-100	S-49(14)	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-101	ODN2006(13) S-49(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-102	S-50(14)	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-103	ODN2006(13) S-50(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-104	S-51(14)	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'	
SEQ-105	ODN2006(13) S-51(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₆ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-106	S-52(14)	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'	
SEQ-107	ODN2006(13) S-52(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₄ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-108	S-53(14)	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'	
SEQ-109	ODN2006(13) S-53(14)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-M ₁₅₋₁₈ ⁺ a ⁺ g ⁺ cagcaaaacagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ L ₄₋₁₂ -5'
SEQ-110	S-54(18)	3'-a ⁺ a ⁺ cagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ t ⁺ L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-111	ODN2006(13) S-54(18)	5'-t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ t ⁺ t ⁺ g ⁺ t ⁺ c ⁺ g ⁺ t ⁺ -3'	3'-a ⁺ a ⁺ cagcaaaacag ⁺ c ⁺ a ⁺ a ⁺ t ⁺ L ₄₋₁₈ -5'

Bảng 10

Số	ID (SEQ ID)	† Trình tự: CpG(5'⇒3') Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-112	S-55(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-113	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-55(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-114	S-56(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-115	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-56(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-116	S-57(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-117	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-57(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-118	S-58(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-119	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-58(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-120	S-59(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-121	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-59(18)	3'-a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-122	S-60(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-123	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-60(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-124	S-61(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-125	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-61(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-126	S-62(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-127	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-62(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] t [^] t [^] t [^] t [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-128	S-63(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-129	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-63(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'

Bảng 11

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-130	S-64(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-131	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-64(16)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-132	S-65(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-133	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	
	S-65(16)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-134	S-66(14)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a-5'	
SEQ-135	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-66(14)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a-5'
SEQ-136	S-67(20)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a-5'	
SEQ-137	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-67(20)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a-5'
SEQ-138	S-68(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a-5'	
SEQ-139	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-68(14)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-M ₂₂₋₁₂ [^] a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a-5'
SEQ-140	S-69(20)	3'-M ₂₂₋₁₂ [^] a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a-5'	
SEQ-141	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-69(20)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-M ₂₂₋₁₂ [^] a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a-5'
SEQ-142	Amph2006(13)	5'-L ₄₋₁₆ [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^]	
SEQ-143	Amph2006GG (13)	^t [^] t [^] -3'	5'-L ₄₋₁₆ [^] g [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]
SEQ-144	3'-Amph2006 (13)	^c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]
		c [^] g [^] t [^] t [^] M ₅₁₋₁₆ -3'	

Bảng 12

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-145	S-70(20)	3'-a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-146	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-70(20)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-a [^] g [^] cagcaaaaca [^] g [^] c [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-147	S-71(21)	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaa [^] a [^] c [^] L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-148	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-71(21)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-g [^] c [^] aaaacagcaaa [^] a [^] c [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-149	S-72(19)	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'	
SEQ-150	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^]	
	S-72(19)	c [^] g [^] t [^] t [^] -3'	3'-a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'

Bảng 13

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-151	S-73(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-152	ODN2006(13) S-73(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-153	S-74(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-154	ODN2006(13) S-74(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-155	S-75(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-156	ODN2006(13) S-75(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-157	S-76(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-158	ODN2006(13) S-76(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	

Bảng 14

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-159	S-77(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-160	ODN2006(13) S-77(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-161	S-78(24)	3'-a^a^acagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-162	ODN2006(13) S-78(24)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^acagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-163	S-79(17)	3'-a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-164	ODN2006(13) S-79(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^g^g^L4-18-5'	
SEQ-165	S-80(25)	3'-M22-18^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-166	ODN2006(13) S-80(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M22-18^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-167	S-81(25)	3'-M22-18^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-168	ODN2006(13) S-81(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M22-18^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-169	S-82(25)	3'-M22-18^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-170	ODN2006(13) S-82(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M22-18^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-171	S-83(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^a^a^L4-18-5'	
SEQ-172	ODN2006(13) S-83(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^a^a^L4-18-5'	
SEQ-173	S-84(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^a^a^a^a^L4-18-5'	
SEQ-174	ODN2006(13) S-84(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^a^a^a^a^a^a^L4-18-5'	

Bảng 15

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3') Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-175	S-85(25)	3'-a [^] g [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-176	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-85(25)	3'-a [^] g [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-177	S-86(17)	3'-a [^] a [^] aacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-178	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-86(17)	3'-a [^] a [^] aacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-179	S-87(25)	3'-a [^] g [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-180	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-87(25)	3'-a [^] g [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₁₀₋₁₈ -5'
SEQ-181	S-88(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ -a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-182	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-88(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ -a [^] g [^] cagcaaaacagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-183	S-89(19)	3'-M ₂₂₋₁₂ -a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-184	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-89(19)	3'-M ₂₂₋₁₂ -a [^] c [^] agcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-185	S-90(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-186	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-90(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-187	S-91(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-188	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-91(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-189	S-92(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-190	ODN2006(13)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] -3'
	S-92(18)	3'-M ₁₅₋₆ -a [^] a [^] cagcaaaacag [^] c [^] a [^] a [^] g [^] g [^] g [^] g [^] L ₄₋₁₈ -5'

Bảng 16

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-191	S-93(18)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-192	ODN2006(13) S-93(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-193	S-94(18)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-194	ODN2006(13) S-94(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-195	S-95(18)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-196	ODN2006(13) S-95(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-197	S-96(18)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-198	ODN2006(13) S-96(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-199	S-97(18)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-200	ODN2006(13) S-97(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-201	S-98(18)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-202	ODN2006(13) S-98(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-203	S-99(18)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-204	ODN2006(13) S-99(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-205	S-100(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-206	ODN2006(13) S-100(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-207	S-101(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-208	ODN2006(13) S-101(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	

Bảng 17

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3') Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-209	S-102(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'
SEQ-210	ODN2006(13) S-102(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'
SEQ-211	S-103(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-212	ODN2006(13) S-103(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-213	S-104(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-214	ODN2006(13) S-104(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-215	S-105(25)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'
SEQ-216	ODN2006(13) S-105(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'
SEQ-217	S-106(25)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-218	ODN2006(13) S-106(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-219	S-107(25)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-220	ODN2006(13) S-107(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-221	S-108(25)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-222	ODN2006(13) S-108(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'
SEQ-223	S-109(25)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-224	ODN2006(13) S-109(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'
SEQ-225	S-110(18)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{chol} -5'
SEQ-226	ODN2006(13) S-110(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{chol} -5'
SEQ-227	S-111(18)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{farl} -5'
SEQ-228	ODN2006(13) S-111(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{farl} -5'

Bảng 18

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-229	S-112(18)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-230	ODN2006(13) S-112(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-231	S-113(18)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-232	ODN2006(13) S-113(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-233	S-114(18)	3'-M _{chol} ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{farl} -5'	
SEQ-234	ODN2006(13) S-114(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M _{chol} ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a^L _{farl} -5'	
SEQ-235	S-115(14)	3'-a^g^cagcaaaacaK ₂₂₋₁₈ gcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-236	ODN2006(13) S-115(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^g^cagcaaaacaK ₂₂₋₁₈ gcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-237	S-116(17)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-238	ODN2006(13) S-116(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-239	S-117(17)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-240	ODN2006(13) S-117(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-241	S-118(17)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-242	ODN2006(13) S-118(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-243	S-119(17)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-244	ODN2006(13) S-119(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-245	S-120(17)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	
SEQ-246	ODN2006(13) S-120(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'	

Bảng 19

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3') Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-247	S-121(17)	3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-248	ODN2006(13) S-121(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₆ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-249	S-122(17)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-250	ODN2006(13) S-122(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-251	S-123(17)	3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-252	ODN2006(13) S-123(17)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₁₅₋₁₀ ^a^a^aacagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₄₋₁₆ -5'
SEQ-253	K3-CpG(26)	5'-a^t^c^g^a^c^t^c^t^c^g^a^g^c^g^t^t^c^t^c-3'
SEQ-254	S-124(27)	3'-t^g^agagctcgcaa^g^a^g^L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-255	K3-CpG(26) S-124(27)	5'-a^t^c^g^a^c^t^c^t^c^g^a^g^c^g^t^t^c^t^c-3' 3'-t^g^agagctcgcaa^g^a^g^L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-256	D35-CpG(28)	5'-g^gtgcatcgatgcagggg^g^g-3'
SEQ-257	S-125(29)	3'-g^t^agctacgtccc^c^c^c^L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-258	D35-CpG(28) S-125(29)	5'-g^gtgcatcgatgcagggg^g^g-3' 3'-g^t^agctacgtccc^c^c^c^L ₄₋₁₈ -5'
SEQ-259	S-126(25)	3'-M ₂₂₋₁₀ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-260	ODN2006(13) S-126(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₀ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-261	S-127(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-262	ODN2006(13) S-127(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-261	S-127(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-262	ODN2006(13) S-127(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'

Bảng 20

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-263	S-128(25)	3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-264	ODN2006(13) S-128(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-265	S-129(25)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-266	ODN2006(13) S-129(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-267	S-130(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-268	ODN2006(13) S-130(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-269	S-131(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-270	ODN2006(13) S-131(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-271	S-132(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-272	ODN2006(13) S-132(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-273	S-133(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-274	ODN2006(13) S-133(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-275	S-134(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^g^g^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-276	ODN2006(13) S-134(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-277	S-135(25)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-278	ODN2006(13) S-135(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-279	S-136(18)	3'-a^a^cagcaaaacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-280	ODN2006(13) S-136(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaaaacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L ₄₋₁₈ -5'	

Bảng 21

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3') Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-281	S-137(18)	3'-a^a^cagcaALNAALNAacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L4-18-5'
SEQ-282	ODN2006(13) S-137(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^cagcaALNAALNAacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L4-18-5'
SEQ-283	S-138(18)	3'-a^ALNA^cagcaALNAALNAacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L4-18-5'
SEQ-284	ODN2006(13) S-138(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^ALNA^cagcaALNAALNAacag^c^ALNA^ALNA^g^g^L4-18-5'
SEQ-285	S-139(18)	3'-a^a^c^a^g^c^a^a^a^a^c^a^g^c^a^a^g^g^g^g^g^L4-18-5'
SEQ-286	ODN2006(13) S-139(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^a^c^a^g^c^a^a^a^a^c^a^g^c^a^a^g^g^g^g^g^L4-18-5'
SEQ-287	S-140(30)	3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a-5'
SEQ-288	ODN2006(13) S-140(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a-5'
SEQ-289	S-141(14)	3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-290	ODN2006(13) S-141(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₀ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-291	S-142(30)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a-5'
SEQ-292	ODN2006(13) S-142(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a-5'
SEQ-293	S-143(14)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-294	ODN2006(13) S-143(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'
SEQ-295	S-144(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L8-6-5'
SEQ-296	ODN2006(13) S-144(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L8-6-5'

Bảng 22

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-297	S-145(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-298	ODN2006(13) S-145(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-299	S-146(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-300	ODN2006(13) S-146(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-301	S-147(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-302	ODN2006(13) S-147(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-303	S-148(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-304	ODN2006(13) S-148(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-305	S-149(30)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-306	ODN2006(13) S-149(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-307	S-150(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-308	ODN2006(13) S-150(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-309	S-151(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-310	ODN2006(13) S-151(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	

Bảng 23

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-311	S-152(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-312	ODN2006(13) S-152(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-313	S-153(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-314	ODN2006(13) S-153(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-315	S-154(14)	3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-316	ODN2006(13) S-154(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₂ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-317	S-155(18)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^Bu^Bu^a^a^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-318	ODN2006(13) S-155(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^Bu^Bu^a^a^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-319	S-156(18)	3'-M _{TEG-18} ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-320	ODN2006(13) S-156(18)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M _{TEG-18} ^a^a^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-321	S-157(25)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^ALNA^GLNA^5mCLNAagcaaaacag^5mCLNA^ALNA^ALNA-5'	
SEQ-322	ODN2006(13) S-157(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^ALNA^GLNA^5mCLNAagcaaaacag^5mCLNA^ALNA^ALNA-5'	
SEQ-323	S-158(31)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^ALNA^GLNA^5mCLNAagca^ALNA^ALNA^ALNA-5'	
SEQ-324	ODN2006(13) S-158(31)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^ALNA^GLNA^5mCLNAagca^ALNA^ALNA^ALNA-5'	

Bảng 24

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-325	S-159(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-326	ODN2006(13) S-159(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-327	S-160(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-328	ODN2006(13) S-160(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-329	S-161(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-330	ODN2006(13) S-161(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-331	S-162(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-332	ODN2006(13) S-162(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-333	S-163(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-334	ODN2006(13) S-163(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-335	S-164(30)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-336	ODN2006(13) S-164(30)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaa^a^c^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-337	S-165(25)	3'-a^cOMe^agOMeCaOMeaaOMeacOMeagOMe^c^aOMe^a^L ₄₋₁₈ -5'	
SEQ-338	ODN2006(13) S-165(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-a^cOMe^agOMeCaOMeaaOMeacOMeagOMe^c^aOMe^a^L ₄₋₁₈ -5'	

Bảng 25

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-339	ODN2216(32)	5'-g [^] g [^] gggacgatcgtcg [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] -3'	
SEQ-340	S-166(33)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] c [^] c [^] ccctgctagca [^] g [^] c [^] c-5'	
SEQ-341	ODN2216(32) S-166(33)	5'-g [^] g [^] gggacgatcgtcg [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] c [^] c [^] ccctgctagca [^] g [^] c [^] c-5'	
SEQ-342	ODN684(34)	5'-t [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] -3'	
SEQ-343	S-167(35)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] ctgcaagcagc [^] a [^] a [^] g [^] -5'	
SEQ-344	ODN684(34) S-167(35)	5'-t [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] ctgcaagcagc [^] a [^] a [^] g [^] -5'	
SEQ-345	D-LS01(36)	5'-t [^] c [^] g [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] c [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] g [^] t [^] a [^] -3'	
SEQ-346	S-168(37)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cgctgcaagcg [^] g [^] g [^] c-5'	
SEQ-347	D-LS01(36) S-168(37)	5'-t [^] c [^] g [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] c [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] g [^] t [^] a [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cgctgcaagcg [^] g [^] g [^] c-5'	
SEQ-348	D-LS03(38)	5'-t [^] c [^] g [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] c [^] c [^] g [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] c [^] g [^] g [^] -3'	
SEQ-349	S-169(39)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cgcttgcaagc [^] g [^] g [^] c-5'	
SEQ-350	D-LS03(38) S-169(39)	5'-t [^] c [^] g [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] c [^] c [^] g [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] c [^] g [^] g [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cgcttgcaagc [^] g [^] g [^] c-5'	
SEQ-351	ODN2395(40)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] t [^] c [^] g [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] -3'	
SEQ-352	S-170(41)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaagcc [^] g [^] c [^] g-5'	
SEQ-353	ODN2395(40) S-170(41)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] t [^] t [^] c [^] g [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] c [^] g [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcaaaagcc [^] g [^] c [^] g-5'	
SEQ-354	ODNM362(42)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] g [^] a [^] t [^] -3'	
SEQ-355	S-171(43)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcagcaagc [^] t [^] t [^] g-5'	
SEQ-356	ODNM362(42) S-171(43)	5'-t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] c [^] g [^] t [^] t [^] c [^] g [^] a [^] a [^] c [^] g [^] a [^] c [^] g [^] t [^] t [^] g [^] a [^] t [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] a [^] g [^] cagcagcaagc [^] t [^] t [^] g-5'	
SEQ-357	ODN2336(44)	5'-g [^] g [^] ggacgacgtcgtgg [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] -3'	
SEQ-358	S-172(45)	3'-M ₂₂₋₁₈ [^] c [^] c [^] cctgctgcagc [^] a [^] c [^] c-5'	
SEQ-359	ODN2336(44) S-172(45)	5'-g [^] g [^] ggacgacgtcgtgg [^] g [^] g [^] g [^] g [^] g [^] -3' 3'-M ₂₂₋₁₈ [^] c [^] c [^] cctgctgcagc [^] a [^] c [^] c-5'	

Bảng 26

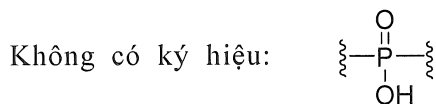
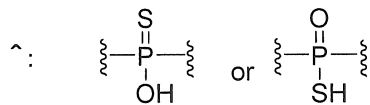
Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-360	S-173(25)	3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-361	ODN2006(13) S-173(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-362	S-174(25)	3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-363	ODN2006(13) S-174(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-364	S-175(25)	3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-365	ODN2006(13) S-175(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₆ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-366	S-176(25)	3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-367	ODN2006(13) S-176(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-368	S-177(25)	3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-369	ODN2006(13) S-177(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-370	S-178(25)	3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-371	ODN2006(13) S-178(25)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₈ ^a^g^cagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-372	S-179(14)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-373	ODN2006(13) S-179(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-374	S-180(14)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	
SEQ-375	ODN2006(13) S-180(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₀ -5'	

Bảng 27

Số	ID (SEQ ID)	Trình tự: CpG(5'⇒3')	Sợi bổ trợ (3'⇒5')
SEQ-376	S-181(14)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-377	ODN2006(13) S-181(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₁₄ -5'	
SEQ-378	S-182(14)	3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-379	ODN2006(13) S-182(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₁₄ ^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a^L ₈₋₆ -5'	
SEQ-380	1018ISS(46)	5'-t^g^a^c^t^g^t^g^a^a^c^g^t^t^c^g^a^g^a^t^g^a-3'	
SEQ-381	S-183(47)	3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^c^tgacacttgca^a^g^c-5'	
SEQ-382	1018ISS(46) S-183(47)	5'-t^g^a^c^t^g^t^g^a^a^c^g^t^t^c^g^a^g^a^t^g^a-3' 3'-M ₂₂₋₁₈ ^a^c^tgacacttgca^a^g^c-5'	
SEQ-383	S-184(14)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^Bu^Bu^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-384	ODN2006(13) S-184(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^Bu^Bu^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-385	S-185(14)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-386	ODN2006(13) S-185(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-387	S-186(14)	3'-M ₂₂₋₂₂ ^Bu^Bu^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	
SEQ-388	ODN2006(13) S-186(14)	5'-t^c^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^t^g^t^c^g^t^t-3' 3'-M ₂₂₋₂₂ ^Bu^Bu^g^g^g^g^g^a^g^cagcaaaacagcaaaacag^c^a^a-5'	

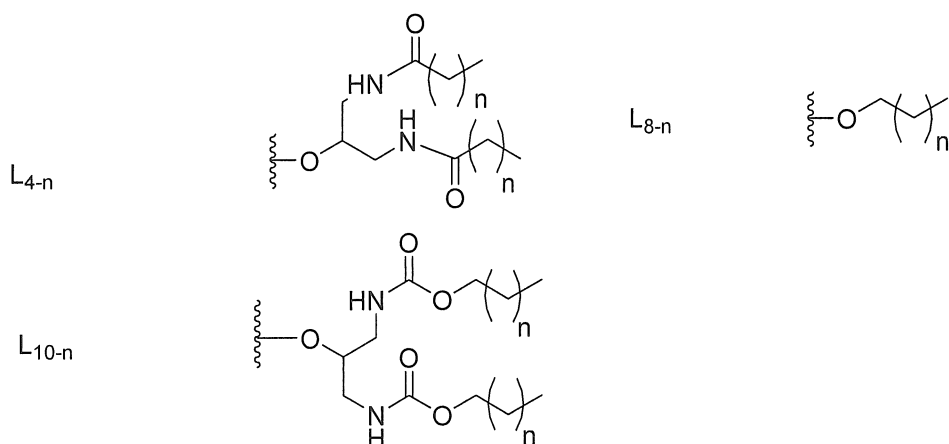
Trong các bảng từ bảng 4 đến bảng 27, n (chữ thường) là ADN, n_{OMe} là 2'-OMe-ARN, N (chữ hoa) là ARN, N_F là 2'-deoxy-2'-F-ARN, N_{LNA} là LNA

và 5mC là 5-methylxytosin. $\wedge$ là $-P(S)OH-$, và liên kết mà không có ký hiệu gì thì là $-P(O)OH-$.



L là hợp chất được đưa vào ở đầu 5' của oligonucleotit có thể bao gồm đoạn nối oligonucleotit, và liên kết đồng hóa trị với nhóm hydroxyl ở đầu 5' của oligonucleotit thông qua liên kết được mô tả. M là hợp chất được đưa vào ở đầu 3' của oligonucleotit có thể bao gồm đoạn nối oligonucleotit, và liên kết đồng hóa trị với nhóm hydroxyl ở đầu 3' của oligonucleotit thông qua liên kết được mô tả. Trong L_{x-n} , x là chữ số tương ứng với cấu trúc của hợp chất 4-n hoặc hợp chất 10-n ở dạng sợi kép hoặc hợp chất 8-n ở dạng sợi đơn, và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28 tương ứng với mạch cacbon. Trong M_{x-n} , x là chữ số tương ứng với cấu trúc của hợp chất 22-n, hợp chất 49-n hoặc hợp chất 51-n ở dạng sợi kép hoặc hợp chất 15-n ở dạng sợi đơn, và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 6 đến 28 tương ứng với mạch cacbon.

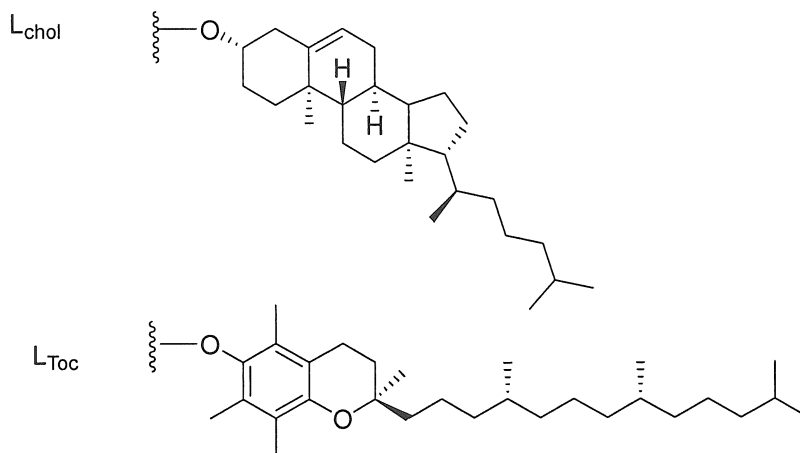
Cụ thể, L_{x-n} là nhóm được mô tả dưới đây.



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

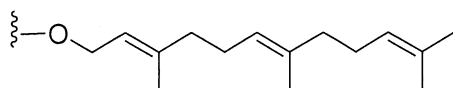
L_{4-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 4-n được tổng hợp ở mục 1-1) của mục A) trên đây. L_{8-n} là nhóm được tạo dẫn xuất từ hợp chất 8-n được tổng hợp ở mục 2) của mục A) trên đây. L_{10-n} là nhóm được tạo dẫn xuất từ hợp chất 10-n được tổng hợp ở mục 3) của mục A) trên đây.

L_{chol} hoặc L_{TOC} trong bảng là nhóm được mô tả dưới đây.



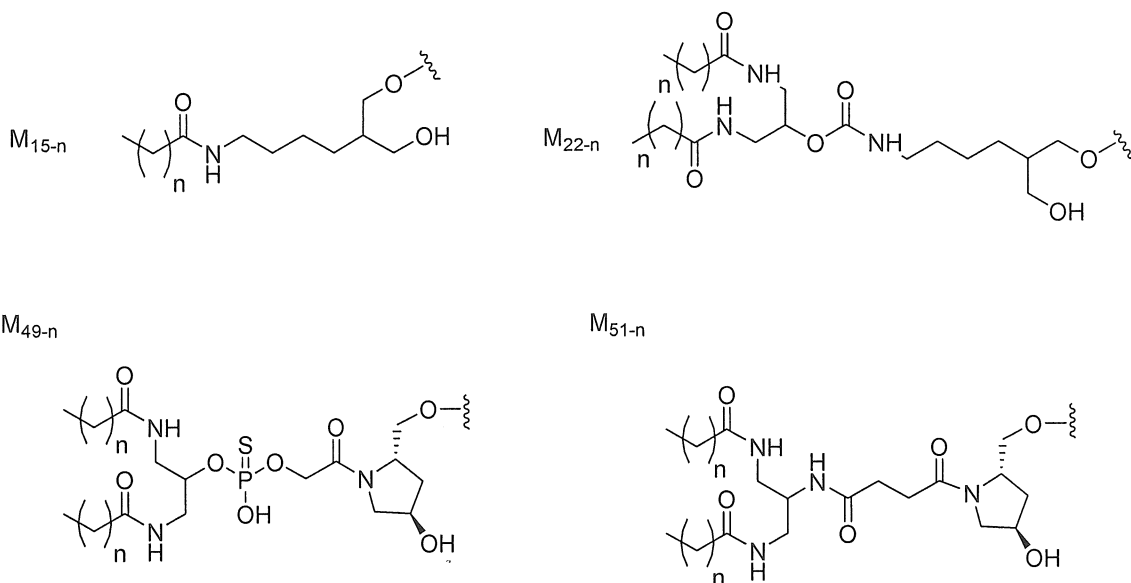
L_{chol} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 26 được tổng hợp ở mục 8-1) của mục A) trên đây. L_{Toc} là nhóm thu được từ hợp chất 5'-tocopherol-CE-phosphoramidit mua được từ Link Technologies Ltd.

L_{farl} trong bảng là nhóm được mô tả dưới đây.



L_{farl} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 53 được tổng hợp ở mục 8-2) của mục A) trên đây.

M_{x-n} là nhóm được mô tả dưới đây.

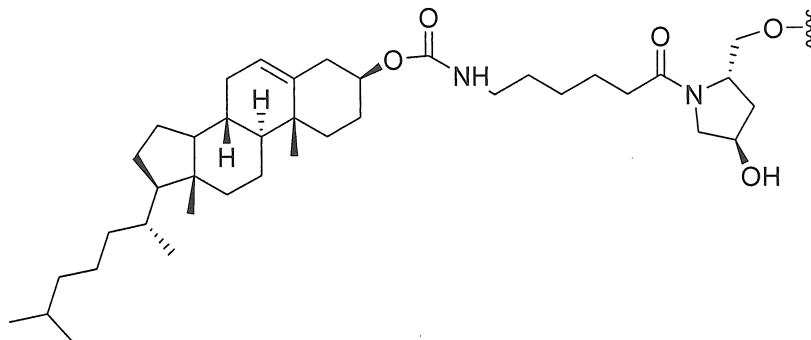


trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

M_{15-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 15-n được tổng hợp ở mục 4) của mục A) trên đây, M_{22-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 22-n được tổng hợp ở mục 6) của mục A) trên đây, M_{49-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 49-n được tổng hợp ở mục 11) của mục A) trên đây, và M_{51-n} là nhóm có nguồn

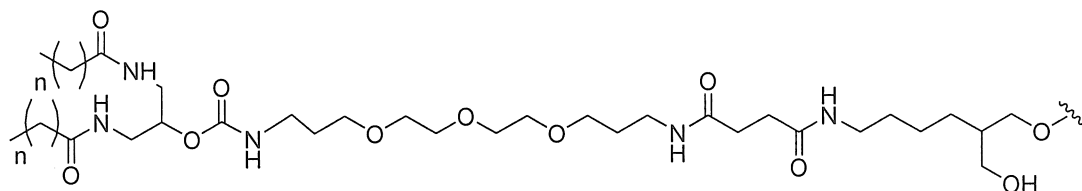
gốc từ hợp chất 51-n được tổng hợp ở mục 13) của mục A) trên đây.

M_{chol} trong bảng là nhóm được mô tả dưới đây.



M_{chol} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 55 được tổng hợp ở mục 14) của mục A) trên đây.

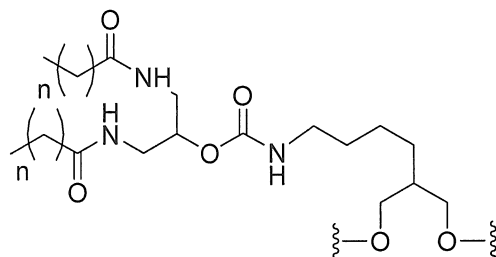
M_{TEG-n} trong bảng là nhóm được mô tả dưới đây.



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

M_{TEG-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 63-n được tổng hợp ở mục 15) của mục A) trên đây.

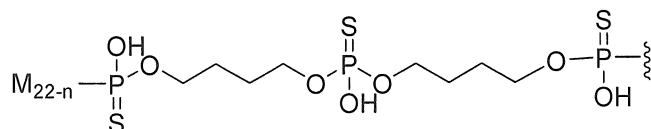
K_{22-n} trong bảng là nhóm được mô tả dưới đây.



trong đó n là số nguyên từ 6 đến 28.

K_{22-n} là nhóm có nguồn gốc từ hợp chất 22-n được tổng hợp ở mục 6) của mục A) trên đây.

Đoạn nối sau đây (^Bu^Bu^ trong bảng) được sử dụng cho S-155, S-184 hoặc S-186.



Ví dụ 2: Đánh giá hoạt tính của oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng

chế bằng cách sử dụng thử nghiệm gen thông báo

Nguyên liệu và phương pháp

Các tế bào HEK-Blue™ hTLR9 (Invivogen) dùng cho thử nghiệm gen thông báo được tạo ra bằng cách đưa vào gen TLR9 của người và gen thông báo mà là gen mã hóa phosphatase kiềm tiết ra gắn kết với trình tự vùng gắn kết NF- κ B•AP-1 trong tế bào HEK293, và là các tế bào biểu hiện ổn định cả hai gen này. $3,6 \times 10^4$ tế bào được tạo hỗn dịch trong môi trường HEK-Blue™ Detection (Invitrogen) bao gồm các cơ chất cho phosphatase kiềm được cấy lên các đĩa 96 lỗ, và 3 nM đến 30 μ M oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế, oligonucleotit CpG đã biết (ODN2006, SEQ-49), hoặc tá dược dựa trên thiết kế trong tài liệu sáng chế 1, nghĩa là ssCpG ODN mang phối tử lipid (SEQ-142, 143 hoặc 144) được thêm vào. Sau khi nuôi cấy trong tủ áp 37°C, 5% CO₂ trong 16 giờ, độ hấp thụ ở 620 nm được xác định bằng cách sử dụng dịch nổi bề mặt nuôi cấy được làm hiện màu. Giá trị kết quả được phân tích bằng phần mềm TIBCO Spotfire và được dùng để tính nồng độ hiệu lực 50% (EC₅₀) của mỗi oligonucleotit.

Kết quả

Như đã mô tả trước đây, đã biết rằng đặc tính của tá dược bị biến mất khi ssCpG ODN được sử dụng làm ADN sợi kép (dsCpG ODN) bằng cách ủ sợi thứ nhất và sợi thứ hai (tài liệu phi sáng chế 4). Để kiểm tra việc thiết kế tá dược của axit nucleic sợi kép thể hiện hoạt tính của chất chủ vận TLR9, sự đánh giá hoạt tính của oligonucleotit sợi kép được thực hiện bằng thử nghiệm gen thông báo.

Như được thể hiện ở bảng 28 và bảng 29, ODN2006 (SEQ-49) mà là ssCpG ODN thể hiện hoạt tính của chất chủ vận TLR9, và giá trị EC₅₀ là khoảng 467 nM (thử nghiệm 1, bảng 28) và khoảng 245 nM (thử nghiệm 2, bảng 29). Mặt khác, oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế bao gồm ODN2006 ở dạng oligonucleotit CpG thể hiện hoạt tính chủ vận TLR9 nằm trong khoảng từ vài chục đến một nghìn vài trăm nM. Phần lớn các tá dược theo sáng chế được mô tả trong bảng 28 và bảng 29 có khuynh hướng làm tăng hoạt tính so với ODN2006. Ngoài ra, 16 trình tự gồm SEQ-57, SEQ-59, SEQ-61, SEQ-63, SEQ-65, SEQ-111, SEQ-117, SEQ-135, SEQ-146, SEQ-226,

SEQ-282, SEQ-284, SEQ-294, SEQ-324, SEQ-361 và SEQ-363 có khuynh hướng làm giảm một ít hoạt tính so với ODN2006, nhưng mức chênh lệch là khoảng 3 lần. Do đó, rõ ràng là toàn bộ các oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế đều có hoạt tính của chất chủ vận TLR9.

Hơn nữa, để kiểm tra việc dạng cải biến của SEQ-2 được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 1 áp dụng cho ODN2006 mà là trình tự oligonucleotit CpG của người thể hiện hoạt tính của chất chủ vận TLR9, sự đánh giá hoạt tính được thực hiện theo cùng cách (SEQ-141, 142 hoặc 143). SEQ-142, 143 hoặc 144 không thể gây ra sự hoạt hóa TLR9 trong khoảng nồng độ đo được, nên không thể tính toán các giá trị EC₅₀ (ký hiệu là “n.d.” (not determined: không xác định được) trong bảng 28). Nghĩa là, điều này gợi ý rằng thiết kế (ssCpG ODN mang phối tử lipid) được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 1 không thể hữu ích để làm tá dược cho vacxin và/hoặc chính vacxin vì tuy nó thể hiện hoạt tính đối với ODN1826 (của chuột nhắt) nhưng không thể hiện hoạt tính đối với ODN2006 (của người) như được mô tả trong ví dụ.

Ngược lại, được gợi ý là oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế có thể hữu ích để làm tá dược cho vacxin và/hoặc chính vacxin bất kể trình tự của oligonucleotit CpG vì nó thể hiện hoạt tính đối với ODN2006 cũng như đối với ODN1826.

Thử nghiệm 1

Bảng 28

Số	EC50 (nM)	Số	EC50 (nM)	Số	EC50 (nM)
SEQ-49	466,8	SEQ-89	300,9	SEQ-125	305,6
SEQ-51	405,9	SEQ-91	68,4	SEQ-127	299,9
SEQ-55	377,9	SEQ-93	106,4	SEQ-129	459,0
SEQ-57	976,8	SEQ-95	33,4	SEQ-131	312,2
SEQ-59	542,5	SEQ-97	308,9	SEQ-133	169,7
SEQ-61	608,1	SEQ-99	311,3	SEQ-135	509,8
SEQ-63	598,9	SEQ-101	33,5	SEQ-137	254,7
SEQ-65	500,9	SEQ-105	96,9	SEQ-139	58,4
SEQ-75	300,6	SEQ-111	490,1	SEQ-141	31,0
SEQ-77	296,8	SEQ-113	449,5	SEQ-146	1128,2
SEQ-79	162,9	SEQ-115	303,2	SEQ-148	376,6
SEQ-81	225,9	SEQ-117	616,5	SEQ-150	309,9
SEQ-83	324,9	SEQ-119	436,7	SEQ-142	n.d.
SEQ-85	72,7	SEQ-121	282,3	SEQ-143	n.d.
SEQ-87	102,8	SEQ-123	326,0	SEQ-144	n.d.

Thử nghiệm 2

Bảng 29

Số	EC50 (nM)	Số	EC50 (nM)	Số	EC50 (nM)
SEQ-49	245,3	SEQ-218	59,8	SEQ-292	58,9
SEQ-152	86,4	SEQ-220	57,2	SEQ-294	262,4
SEQ-154	94,5	SEQ-222	31,9	SEQ-296	10,1
SEQ-156	90,0	SEQ-224	12,4	SEQ-298	10,2
SEQ-158	56,6	SEQ-226	362,0	SEQ-300	11,4
SEQ-160	65,1	SEQ-228	21,0	SEQ-302	10,2
SEQ-162	89,7	SEQ-230	39,8	SEQ-304	11,6
SEQ-164	64,2	SEQ-232	72,7	SEQ-306	11,3
SEQ-166	90,4	SEQ-234	27,0	SEQ-308	8,4
SEQ-168	62,8	SEQ-236	203,1	SEQ-310	10,7
SEQ-170	46,0	SEQ-238	131,9	SEQ-312	19,1
SEQ-172	161,9	SEQ-240	62,0	SEQ-314	20,8
SEQ-174	101,0	SEQ-242	102,4	SEQ-316	10,9
SEQ-176	241,2	SEQ-244	101,8	SEQ-318	81,3
SEQ-178	210,1	SEQ-246	102,6	SEQ-320	68,4
SEQ-180	46,9	SEQ-248	108,3	SEQ-322	50,4
SEQ-182	11,2	SEQ-250	92,4	SEQ-324	261,1
SEQ-184	34,2	SEQ-252	87,4	SEQ-326	24,6
SEQ-186	127,7	SEQ-260	39,9	SEQ-328	24,1
SEQ-188	67,7	SEQ-262	25,7	SEQ-330	33,7
SEQ-190	46,9	SEQ-264	86,3	SEQ-332	24,8
SEQ-192	123,9	SEQ-266	56,1	SEQ-334	25,3
SEQ-194	99,8	SEQ-268	11,5	SEQ-336	31,4
SEQ-196	33,2	SEQ-270	16,3	SEQ-338	188,1
SEQ-198	114,9	SEQ-272	33,3	SEQ-361	771,8
SEQ-200	96,3	SEQ-274	29,7	SEQ-363	290,2
SEQ-202	89,5	SEQ-276	30,9	SEQ-365	177,4
SEQ-204	83,4	SEQ-278	33,3	SEQ-367	178,2
SEQ-206	40,7	SEQ-280	168,3	SEQ-369	135,9
SEQ-208	31,3	SEQ-282	275,1	SEQ-371	170,0
SEQ-210	56,7	SEQ-284	25,8	SEQ-373	21,5
SEQ-212	46,9	SEQ-286	45,0	SEQ-375	21,9
SEQ-214	47,4	SEQ-288	65,4	SEQ-377	29,8
SEQ-216	99,0	SEQ-290	151,7	SEQ-379	20,3

Như được thể hiện trong bảng 30, ngay cả khi các oligonucleotit CpG ngoại trừ ODN2006 được sử dụng, phần lớn tá dược theo sáng chế đều thể hiện khuynh hướng làm tăng hoạt tính so với ssCpG ODN. Rõ ràng là từng oligonucleotit sợi kép liên kết lipid theo sáng chế đều có hoạt tính của chất chủ vận TLR9.

Bảng 30

Số	EC50 (nM)
SEQ-253 (K3-CpG)	2870,2
SEQ-255	173,4
SEQ-256 (D35-CpG)	3421046,2
SEQ-258	16328,8
SEQ-339 (ODN2216)	7244,7
SEQ-341	7915,8
SEQ-342 (ODN684)	2339,9
SEQ-344	111,4
SEQ-345 (D-LS01)	6280,7
SEQ-347	10,7
SEQ-351 (ODN2395)	11569,8
SEQ-353	1982,2
SEQ-354 (ODN M362)	16893838,1
SEQ-356	292,6

Ví dụ 3: Đánh giá in vivo các tá dược theo sáng chế

(A) Đánh giá mức độ cảm ứng CTL

Động vật

Chuột nhắt C57BL/6JJcl (6 đến 8 tuần tuổi) mua từ CLEA Japan, Inc.

Các hợp phần của vaccin 1

•Peptit OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEDKL, SEQ ID NO: 22) được tổng hợp và tinh chế bằng HPLC đảo pha và mua từ Sigma-Aldrich.

tá dược theo sáng chế hoặc CpG ODN đã biết rõ

Các hợp phần của vaccin 2

•Peptit TRP₂₁₈₀₋₁₈₈ (SIINFEDKL, SEQ ID NO: 23) được tổng hợp và tinh chế bằng HPLC đảo pha và mua từ Sigma-Aldrich.

•tá dược theo sáng chế hoặc CpG ODN đã biết rõ

Các hợp phần của vaccin 3

•Peptit OVA₂₅₇₋₂₆₄ hoặc peptit TRP₂₁₈₀₋₁₈₈

•Montanide ISA51 (SEPPIC)

Điều chế vaccin 1

Tính miễn dịch đặc hiệu được tạo ra bằng cách tiêm chủng chuột nhắt hai lần ở các khoảng cách thời gian 7 ngày. Mỗi vaccin mà là 100µg peptit OVA, và 1,57 hoặc 4,71 nmol tá dược theo sáng chế hoặc CpG ODN đã biết rõ, được hòa tan trong 1xPBS. 100 µl vaccin được cho sử dụng bằng cách tiêm dưới da trên sườn của chuột nhắt.

Điều chế vaccin 2

Tính miễn dịch đặc hiệu được tạo ra bằng cách tiêm chủng chuột nhắt hai lần ở các khoảng cách thời gian 7 ngày. Mỗi vaccin mà là 100µg peptit TRP2, và 1,57 hoặc 4,71 nmol tá dược theo sáng chế hoặc CpG ODN đã biết rõ, được hòa tan trong 1xPBS. 100 µl vaccin được cho sử dụng bằng cách tiêm dưới da trên sườn của chuột nhắt.

Điều chế vaccin 3

Dung dịch peptit TRP2 trong PBS với nồng độ 2mg/ml và Montanide (hợp phần vaccin 3 trên đây) với tỷ lệ 1:1 được trộn bằng cách sử dụng xy lanh và bộ nối bơm để tạo ra nhũ tương. 100 µl vaccin dạng nhũ tương được cho sử dụng bằng cách tiêm dưới da trên sườn của chuột nhắt hai lần ở các khoảng cách thời gian 7 ngày.

Nhuộm màu tetrame

7 ngày sau lần tiêm chủng thứ hai, máu được thu gom, tế bào hồng cầu được loại bỏ bằng dung dịch BD Pharm Lyse (BD pharmingen), và các tế bào được tạo hỗn dịch trong đệm FACS (1% huyết thanh bào thai bò, 2mM PBS với EDTA). Kháng thể đơn dòng CD16/32 kháng chuột nhắt (BioXcell) được thêm vào, và việc phong bế thụ thể Fc được thực hiện ở 4°C trong 30 phút. Tiếp theo, tetrame H-2Kb được đánh dấu bằng PE tương ứng với kháng nguyên vaccin (Tetrame T-Select H-2Kb OVA -SIINFELK hoặc Tetrame T-Select H-2Kb TRP-2 -SVYDFFVWL; cả hai loại mua được từ Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) và kháng thể kháng CD8 được đánh dấu Alexa 647 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) được thêm vào, và việc nhuộm màu được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau đó, việc nhuộm màu được thực hiện bằng DAPI (Invitrogen) và các tế bào được rửa hai lần bằng đệm FACS. Tế bào được tái tạo hỗn dịch trong đệm FACS và được phân

tích bằng máy đếm tế bào theo dòng FACSverse (BD bioscience) và phần mềm FACSsuite (BD bioscience). Để phân tích, sau khi phân đoạn âm tính với DAPI được khoanh vùng, phân đoạn tế bào bạch cầu được cung cấp bằng cách sử dụng sự tán xạ góc thẳng và sự tán xạ góc bên làm yếu tố chỉ báo. Trong phân đoạn tế bào bạch cầu, cả hai loại tế bào dương tính của Alexa 647-CD8 và Tetrame PE-H-2Kb được xác định là các CTL. Tỷ lệ CTL trong các tế bào bạch cầu được sử dụng để đánh giá.

Phương pháp tính toán yếu tố chỉ thị của mức độ cảm ứng CTL

Sau khi tính toán mức độ cảm ứng CTL trung bình của mỗi nhóm cho mỗi thử nghiệm, tỷ số đối với giá trị trung bình của mức độ cảm ứng CTL của ssCpG ODN, ODN1826 (SEQ-1) hoặc ODN2006 (SEQ-49) ở dạng đối chứng được tính toán.

Trong trường hợp tá được bao gồm ODN1826

(Giá trị trung bình của mức độ cảm ứng CTL của nhóm tá được)/ (Giá trị trung bình của mức độ cảm ứng CTL của nhóm ODN1826) = tỷ số đối với giá trị trung bình

Trong trường hợp tá được bao gồm ODN2006

(Giá trị trung bình của mức độ cảm ứng CTL của nhóm tá được)/ (Giá trị trung bình của mức độ cảm ứng CTL của nhóm ODN2006) = tỷ số đối với giá trị trung bình

Mức độ cảm ứng CTL của mỗi tá được được thể hiện khi mức độ cảm ứng CTL của ssCpG ODN được coi là 1, nếu giá trị càng lớn thì mức độ cảm ứng CTL càng cao.

B) Đánh giá tác dụng chống khối u của vacxin peptit TRP2 sử dụng tá được theo sáng chế

Sau khi gây miễn dịch bằng vacxin peptit TRP2, các tế bào B16F10 (ATTC) mà là u melanin ở chuột nhắt biểu hiện protein TRP2 được cấy ghép dưới da để đánh giá tác dụng chống khối u. Theo phương pháp tương tự với Ví dụ 3A), vào ngày tiếp theo ngày quan sát được tỷ lệ dương tính với tetrame trong máu ngoại vi của chuột nhắt được tiêm chủng hai lần với khoảng cách thời gian 7 ngày, các tế bào B16F10 (1×10^5 tế bào/chuột nhắt) được cấy ghép dưới da ở vai phải. Cứ 2 đến 3 ngày, trực lớn và trực nhỏ của khối u cấy ghép

được đo và thể tích khối u được tính toán theo công thức:

$$(\text{Trục lớn} \times \text{trục nhỏ}^2)/2$$

Phương pháp tính toán đối với các yếu tố chỉ thị tác dụng chống khối u

Đối với tá dược bao gồm ODN1826

$100 - (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm tá dược}) / (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm ODN1826})$

Đối với tá dược bao gồm ODN2006

$100 - (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm tá dược}) / (\text{thể tích khối u trung bình của nhóm ODN2006})$

Hợp chất có giá trị càng lớn thì có hoạt tính chống khối u càng mạnh.

Kết quả sử dụng ODN1826 làm oligonucleotit CpG

Kết quả 1-A: So sánh mức độ cảm ứng CTL giữa tá dược theo sáng chế và các tá dược đã biết.

Khi chuột nhắt được tạo miễn dịch bằng peptit TRP2 và ODN1826 (SEQ-1), CTL đặc hiệu với TRP2 được cảm ứng. Khi dsCpG ODN (SEQ-4) được sử dụng, mức độ cảm ứng CTL đặc hiệu với TRP2 bị giảm 0,46 lần so với ODN1826. Nghĩa là, các sợi kép dẫn đến việc làm giảm mức độ cảm ứng CTL so với tá dược sợi đơn. Điều này gợi ý rằng khi oligonucleotit CpG chỉ được tạo ra ở dạng sợi kép, thì hoạt tính kích thích miễn dịch bị giảm như được bộc lộ trong tài liệu phi sáng chế 4 và tài liệu tương tự. Mặt khác, khi tá dược theo sáng chế, nghĩa là tá dược oligonucleotit sợi kép liên kết lipit (SEQ-16) được sử dụng để gây miễn dịch, mức độ cảm ứng CTL được làm tăng 1,46 lần so với ODN1826. Do đó, điều này gợi ý rằng tá dược theo sáng chế đã làm tăng hoạt tính một cách bất ngờ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 31.

Bảng 31

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00
TRP2	SEQ-4	1,57	0,46
TRP2	SEQ-16	1,57	1,46

Kết quả 1-B: So sánh tác dụng chống khối u giữa tá dược theo sáng chế và các tá dược đã biết.

Khi chuột nhắt được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và ODN1826

(SEQ-1), chúng có ít tác dụng ức chế sự tiến triển khối u ở các tế bào B16F10. Hơn nữa, dsCpG ODN (SEQ-4) có ít tác dụng ức chế sự tiến triển khối u ở các tế bào B16F10. Mặt khác, tá dược theo sáng chế (SEQ-16) thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với sự tiến triển khối u ở các tế bào B16F10, ở mức 43% so với ODN1826 ở ngày 14 sau khi cấy ghép. Các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Kết quả 2-A, B: Mức độ cảm ứng CTL và tác dụng chống khối u của tá dược theo sáng chế bao gồm phối tử lipid có số nguyên tử cacbon khác nhau

Hoạt tính của tá dược theo sáng chế có lipid bao gồm hai mạch axyl chứa từ 10 đến 20 nguyên tử cacbon làm phối tử được kiểm tra với peptit OVA. Mức độ cảm ứng CTL và mức độ ức chế khối u của SEQ-12 (10 nguyên tử cacbon) bị giảm so với ODN1826 (SEQ-1). Mặt khác, mức độ cảm ứng CTL có khuynh hướng gia tăng khi chiều dài mạch dài hơn như SEQ-14 (14 nguyên tử cacbon), SEQ-6 (18 nguyên tử cacbon) và SEQ-16 (20 nguyên tử cacbon). Ngoài ra, mức độ ức chế khối u của SEQ-14 thể hiện mức độ ức chế khối u bằng khoảng 94% so với ODN1826 ở ngày 14 sau khi cấy ghép, còn SEQ-6 và SEQ-16 ức chế hoàn toàn sự phát triển khối u ở ngày 14 sau khi cấy ghép. Các kết quả được thể hiện trong bảng 32.

Bảng 32

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
OVA	SEQ-1	1,57	1,00	0,00
OVA	SEQ-12	1,57	0,42	-62,88
OVA	SEQ-14	1,57	0,85	93,94
OVA	SEQ-6	1,57	0,77	100,00
OVA	SEQ-16	1,57	2,32	100,00

Kết quả 3-A: Mức độ cảm ứng CTL của tá dược theo sáng chế mang lipid ở cả hai đầu

Hoạt tính của tá dược theo sáng chế với lipid bao gồm hai mạch axyl chứa 20 nguyên tử cacbon làm phối tử và còn bao gồm lipid sợi đơn chứa 8 hoặc 12 nguyên tử cacbon ở đầu 3' của oligonucleotit CpG (SEQ-46 hoặc SEQ-48) được kiểm tra với peptit TRP2. Cả hai mức độ cảm ứng CTL đều được làm tăng khoảng 2,8 lần so với ODN1826 (SEQ-1). Các kết quả được thể hiện trong bảng 33.

Bảng 33

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00
TRP2	SEQ-46	1,57	2,81
TRP2	SEQ-48	1,57	2,84

Kết quả 3-B: Tác dụng chống ung thư của tá dược theo sáng chế mang lipit ở cả hai đầu

Khi chuột nhắt được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và tá dược theo sáng chế, SEQ-46 hoặc SEQ-48, nó thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10, lần lượt ở mức 52% hoặc 43% ở ngày 13 sau khi cấy ghép so với ODN1826 (SEQ-1). Các kết quả được thể hiện trên Fig.2.

Kết quả 4-A: Mức độ cảm ứng CTL của các tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ có chiều dài khác nhau

Ở thiết kế tá dược oligonucleotit sợi kép, cần giải phóng oligonucleotit sợi kép, mà là thành phần hoạt tính, ở hạch bạch huyết. Tốc độ phân tách sợi kép tỷ lệ thuận với độ ổn định nhiệt, và càng có nhiều vị trí hỗ trợ trong cấu trúc sợi kép thì sợi kép này tồn tại càng ổn định. Sau đó, hoạt tính của các tá dược theo sáng chế có sợi hỗ trợ với chiều dài mạch khác nhau được kiểm tra với peptit TRP2.

Tá dược có sợi hỗ trợ chứa 10 nucleotit đối với ODN1826 (20 nucleotit), nghĩa là chiều dài của sợi hỗ trợ đối với oligonucleotit CpG bằng 50% (SEQ-8) và tá dược có sợi hỗ trợ chứa 15 nucleotit, nghĩa là chiều dài bằng 75% (SEQ-10) được sử dụng. Cả SEQ-8 và SEQ-10 đều làm tăng đáng kể mức độ cảm ứng CTL so với ODN1826 (SEQ-1) lần lượt ở mức 1,2 và 2,5 lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 34.

Bảng 34

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00
TRP2	SEQ-2	1,57	1,68
TRP2	SEQ-8	1,57	1,15
TRP2	SEQ-10	1,57	2,50

Kết quả 4-B: Tác dụng chống ung thư của các tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ có chiều dài khác nhau

Khi chuột nhắt được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và ssCpG ODN mang phối tử lipit ở tài liệu sáng chế 1 (SEQ-2), mức độ ức chế khối u là khoảng 3,5% ở ngày 12 sau khi cấy ghép so với ODN1826 (SEQ-1). Mặt khác, SEQ-8 mà là tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ chứa 10 nucleotit thể hiện mức độ ức chế khối u bằng khoảng 50% so với ODN1826 ở ngày 12 sau khi cấy ghép. Hơn nữa, SEQ-10 với sợi hỗ trợ chứa 15 nucleotit thể hiện tác dụng ức chế mạnh đối với sự tiến triển khối u ở các tế bào B16F10, bằng khoảng 76% so với ODN1826 ở ngày 12 sau khi cấy ghép. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Kết quả 5-A: Mức độ cảm ứng CTL của các tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ có chiều dài mạch khác nhau

Hoạt tính của tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ có chiều dài mạch nằm trong khoảng từ 10 đến 20 nucleotit so với ODN1826 (20 nucleotit), nghĩa là sợi hỗ trợ có chiều dài mạch bằng 50 đến 100% so với oligonucleotit CpG được kiểm tra với peptit TRP2. Tá dược có sợi hỗ trợ chứa 14 nucleotit (SEQ-28), 15 nucleotit (SEQ-26), 17 nucleotit (SEQ-22), 19 nucleotit (SEQ-18) và 20 nucleotit (SEQ-16) thể hiện sự tăng mức độ cảm ứng CTL so với ODN1826 (SEQ-1). Đặc biệt, tá dược với 19 nucleotit (SEQ-18), 17 nucleotit (SEQ-22) và 15 nucleotit (SEQ-26) thể hiện mức độ cảm ứng CTL bằng khoảng 3 lần so với ODN1826 (SEQ-1). Các kết quả được thể hiện trong bảng 35.

Bảng 35

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00
TRP2	SEQ-16	1,57	1,63
TRP2	SEQ-18	1,57	3,40
TRP2	SEQ-22	1,57	2,69
TRP2	SEQ-26	1,57	2,82
TRP2	SEQ-28	1,57	2,21
TRP2	SEQ-32	1,57	1,10
TRP2	SEQ-36	1,57	1,07

Kết quả 6-A: So sánh mức độ cảm ứng CTL với Montanide

Các hoạt tính của ODN1826 (SEQ-1), ssCpG ODN mang phối tử lipid (SEQ-2), tá dược theo sáng chế (SEQ-26) và Montanide mà là tá dược được sử dụng rất nhiều trong các thử nghiệm lâm sàng làm tá dược cho vacxin peptit được so sánh với peptit TRP2 dùng làm kháng nguyên. SEQ-2 và SEQ-26 thể hiện mức độ cảm ứng CTL cao hơn so với ODN1826. Mặt khác, mức độ cảm ứng CTL của Montanide bị giảm còn một phần bảy so với ODN1826. Các kết quả được thể hiện trong bảng 36.

Bảng 36

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00
TRP2	SEQ-2	1,57	3,23
TRP2	SEQ-26	1,57	2,82
TRP2	Montanide	100 μ l	0,13

Kết quả 6-B: So sánh tác dụng chống khối u đối với ssCpG ODN mang phối tử lipid

Khi chuột nhất được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và tá dược theo sáng chế, SEQ-26, nó thể hiện tác dụng ức chế rất mạnh đối với sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10, ở mức bằng 76,8% ở ngày 12 sau khi cấy ghép so với ODN1826 (SEQ-1). Mức độ ức chế khối u của ssCpG ODN mang phối tử lipid (SEQ-2) bằng 64,3% ở ngày 12 sau khi cấy ghép so với ODN1826. Nghĩa là, tá dược theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 mạnh hơn so với tá dược SEQ-2. Mặt khác, Montanide khi được sử dụng làm tá dược thì không có tác dụng chống khối u. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4.

Kết quả 7-A: Mức độ cảm ứng CTL của các tá dược theo sáng chế có các loại monome axit nucleic khác nhau trong sợi hỗ trợ

Hoạt tính của tá dược theo sáng chế có các monome axit nucleic trong sợi hỗ trợ là ARN, 2'-OMe-ARN hoặc 2'-F-ARN được kiểm tra với peptit TRP2. Tá dược mà toàn bộ các monome axit nucleic là ARN (SEQ-40) hoặc 2'-F-ARN (SEQ-42) không thể hiện sự tăng đáng kể mức độ cảm ứng CTL so với ODN1826 (SEQ-1). Mặt khác, tá dược có monome axit nucleic là 2'-OMe-ARN (SEQ-38 và SEQ-44) thể hiện sự tăng mức độ cảm ứng CTL lần lượt ở

mức 2,9 hoặc 2,4 lần so với ODN1826. Các kết quả gợi ý rằng 2'-OMe-ARN hữu ích để làm monome axit nucleic của tá dược theo sáng chế cũng như ADN. Các kết quả được thể hiện trong bảng 37.

Bảng 37

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
TRP2	SEQ-1	1,57	1,00	0,00
TRP2	SEQ-38	1,57	2,85	86,19
TRP2	SEQ-40	1,57	1,24	3,73
TRP2	SEQ-42	1,57	0,99	57,33
TRP2	SEQ-44	1,57	2,39	57,51
TRP2	SEQ-2	1,57	3,11	72,64

Kết quả 7-B: Tác dụng chống khối u của các tá dược theo sáng chế có các loại monome axit nucleic khác nhau trong sợi hỗ trợ

Khi chuột nhắt được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và tá dược theo sáng chế có monome axit nucleic là 2'-OMe-ARN (SEQ-38), nó thể hiện tác dụng ức chế rất mạnh đối với sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10, ở mức bằng 86,2% ở ngày 14 sau khi cấy ghép so với ODN1826 (SEQ-1). Mức độ ức chế khối u của ssCpG ODN mang phối tử lipid (SEQ-2) bằng 72,6% ở ngày 14 sau khi cấy ghép so với ODN1826. Nghĩa là, tá dược theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 mạnh hơn so với tá dược SEQ-2. Ngoài ra, tá dược có chiều dài mạch của SEQ-38 ngắn hơn (SEQ-44) và tá dược có monome axit nucleic là 2'-F-ARN (SEQ-42) thể hiện tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u ở các tế bào B16F10. Mặt khác, tá dược có monome axit nucleic là ARN (SEQ-40) không thể hiện tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10. Các kết quả được thể hiện trong bảng 37 và trên Fig.5.

Kết quả sử dụng ODN2006 làm oligonucleotit CpG

Kết quả 8-A: Mức độ cảm ứng CTL của các tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ hoặc đoạn nối có chiều dài mạch khác nhau

Hoạt tính của ODN2006 (SEQ-49, 24 nucleotit) và các tá dược theo sáng chế được so sánh với peptit TRP2 dùng làm kháng nguyên. Tá dược có chiều dài mạch của sợi hỗ trợ là 24 nucleotit, nghĩa là chiều dài của sợi hỗ trợ

so với oligonucleotit CpG là 100% (SEQ-51) và tá dược có chiều dài mạch của sợi hỗ trợ là 15 nucleotit, nghĩa là, chiều dài của sợi hỗ trợ so với oligonucleotit CpG là 62,5% (SEQ-61) được sử dụng. Cả SEQ-51 và SEQ-61 đều thể hiện mức độ cảm ứng CTL cao, ở mức hơn 5 lần so với ODN2006. Hơn nữa, tá dược có dTdT dùng làm đoạn nối (SEQ-63) hoặc dGdG (SEQ-65) được sử dụng. Cả SEQ-63 và SEQ-65 đều thể hiện mức độ cảm ứng CTL rất cao, ở mức khoảng 10 lần so với ODN2006. Các kết quả được thể hiện trong bảng 38.

Bảng 38

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-49	4,71	1,00
TRP2	SEQ-51	4,71	5,82
TRP2	SEQ-61	4,71	5,73
TRP2	SEQ-63	4,71	11,73
TRP2	SEQ-65	4,71	9,21

Kết quả 8-B: Tác dụng chống khối u của tá dược theo sáng chế với sợi hỗ trợ hoặc đoạn nối có chiều dài mạch khác nhau

Khi chuột nhất được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và ODN2006 (SEQ-49), chúng thể hiện ít tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10. Mặt khác, tá dược theo sáng chế có chiều dài của sợi hỗ trợ bằng 100% so với oligonucleotit CpG (SEQ-51) thể hiện 20% tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 ở ngày 10 sau khi cấy ghép so với ODN2006. Ngoài ra, mỗi tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ bằng 62,5% so với oligonucleotit CpG (SEQ-61), và tá dược có dTdT dùng làm đoạn nối (SEQ-63) hoặc dGdG (SEQ-65) thể hiện khoảng 50% tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 ở ngày 10 sau khi cấy ghép so với ODN2006. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6.

Kết quả 9-A: Mức độ cảm ứng CTL của các tá dược theo sáng chế có monome axit nucleic trong sợi hỗ trợ là 2'-OMe-ARN

Hoạt tính của tá dược theo sáng chế có monome axit nucleic trong sợi hỗ trợ là 2'-OMe-ARN được kiểm tra với TRP2. Chiều dài mạch của sợi hỗ trợ là 24 nucleotit, nghĩa là tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ so với các oligonucleotit CpG là 100% (SEQ-67) và, tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ là 15 nucleotit, nghĩa là, tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ so với oligonucleotit

CpG là 62,5% (SEQ-69) được sử dụng. SEQ-67 và SEQ-69 thể hiện mức độ cảm ứng CTL lần lượt bằng 1,4 hoặc 1,2 lần so với ODN2006 (SEQ-49). Các kết quả được thể hiện trong bảng 39.

Bảng 39

Peptit	Tá dược	Liều/con nmol	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
TRP2	SEQ-49	4,71	1,00
TRP2	SEQ-67	4,71	1,39
TRP2	SEQ-69	4,71	1,21

Kết quả 9-B: Tác dụng chống khối u của các tá dược theo sáng chế có monome axit nucleic trong sợi hỗ trợ là 2'-OMe-ARN

Khi chuột nhắt được gây miễn dịch bằng peptit TRP2 và tá dược theo sáng chế có monome axit nucleic là 2'-OMe-ARN, tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ so với oligonucleotit CpG là 100% (SEQ-67) thể hiện tác dụng ức chế rất mạnh đối với sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10, ở mức bằng 75% ở ngày 10 sau khi cấy ghép so với ODN2006 (SEQ-49). Tá dược có chiều dài của sợi hỗ trợ so với oligonucleotit CpG bằng 62,5% (SEQ-69) thể hiện 20% tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 ở ngày 10 sau khi cấy ghép so với ODN2006. Các kết quả được thể hiện trên Fig.7.

Các kết quả này gợi ý rằng 2'-OMe-ARN cũng hữu ích đối với ODN2006 để làm monome axit nucleic của tá dược theo sáng chế cũng như ADN.

Theo các phương pháp tương tự, mức độ cảm ứng CTL hoặc tác dụng chống khối u của các tá dược theo sáng chế được xác định. Các kết quả thể hiện trong các bảng từ bảng 40 đến bảng 68 và trên các hình vẽ từ Fig.8 đến Fig.13 thu được nhờ các thử nghiệm riêng rẽ. Đối với các thử nghiệm này, peptit TRP2 được sử dụng và liều lượng của tá dược theo sáng chế là 4,71 nmol. NT trong các bảng dùng để chỉ “không được thử nghiệm” (“not tested”).

Bảng 40

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-59	5,34
SEQ-57	4,28
SEQ-55	3,02
SEQ-53	2,86

Bảng 41

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 12 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-119	2,05	55,1
SEQ-192	1,74	41,5

Bảng 42

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 12 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-121	3,99	56,8

Bảng 43

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-152	1,17	80,45
SEQ-154	2,47	NT
SEQ-158	3,06	100

Bảng 44

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-182	2,24
SEQ-184	2,38

Bảng 45

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-186	2,37	NT
SEQ-188	1,49	51,3
SEQ-190	1,95	NT
SEQ-192	3,61	46,16
SEQ-194	2,48	55,02
SEQ-196	3,26	NT

Bảng 46

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-156	1,70	NT
SEQ-160	3,65	NT
SEQ-162	3,44	NT
SEQ-164	4,88	53,69

Bảng 47

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-166	2,57
SEQ-168	1,96

Bảng 48

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 14 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	1,00	0,00
SEQ-170	3,10	79,09
SEQ-172	1,24	NT
SEQ-174	1,78	NT

Bảng 49

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-176	1,97
SEQ-178	5,54
SEQ-180	3,59
SEQ-206	1,07
SEQ-208	1,28
SEQ-214	1,38
SEQ-216	1,95

Bảng 50

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-198	3,12
SEQ-200	3,24
SEQ-204	3,98

Bảng 51

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-226	1,84
SEQ-228	2,10
SEQ-230	3,10
SEQ-232	1,28
SEQ-234	1,96

Bảng 52

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-218	2,87
SEQ-220	1,68
SEQ-222	3,11
SEQ-224	2,25

Bảng 53

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-236	2,66

Bảng 54

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-238	1,09
SEQ-240	1,45
SEQ-242	1,62
SEQ-244	3,24

Bảng 55

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-246	2,51
SEQ-248	1,67
SEQ-250	1,86
SEQ-252	1,14

Bảng 56

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-256 (D35-CpG)	1,00
SEQ-258	2,46

Bảng 57

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-260	1,89
SEQ-262	1,45
SEQ-264	3,44
SEQ-266	2,51

Bảng 58

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-268	2,09
SEQ-270	2,31
SEQ-272	1,77
SEQ-274	4,03
SEQ-276	3,77
SEQ-278	2,58

Bảng 59

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-280	5,27
SEQ-282	2,82
SEQ-284	5,57
SEQ-286	2,40

Bảng 60

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-288	4,22
SEQ-290	2,80
SEQ-292	4,63
SEQ-294	5,30

Bảng 61

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-296	2,43
SEQ-298	2,08
SEQ-300	3,48
SEQ-302	2,58
SEQ-304	2,42
SEQ-306	3,04

Bảng 62

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-308	2,52
SEQ-310	4,91
SEQ-312	1,75
SEQ-314	2,58
SEQ-316	1,30

Bảng 63

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-318	4,19
SEQ-320	3,81
SEQ-322	2,15
SEQ-324	1,92

Bảng 64

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-326	4,27
SEQ-328	2,93
SEQ-330	2,53
SEQ-332	2,98
SEQ-334	1,66
SEQ-336	3,62
SEQ-338	1,72

Bảng 65

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-339 (ODN2216)	1,00
SEQ-341	1,25
SEQ-342 (ODN684)	1,00
SEQ-344	1,20
SEQ-345 (D-LS01)	1,00
SEQ-347	2,73

Bảng 66

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-354 (ODN M362)	1,00
SEQ-356	1,91

Bảng 67

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-373	2,21
SEQ-375	2,58
SEQ-377	1,57

Bảng 68

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên
SEQ-49	1,00
SEQ-361	1,09
SEQ-365	2,04
SEQ-369	1,70
SEQ-371	1,11

Ví dụ 4

Mức độ cảm ứng CTL đặc hiệu kháng nguyên của ODN2006 (SEQ-49) và SEQ-121 với sự vắng mặt của peptit kháng nguyên của khối u được đánh giá. Theo các phương pháp tương tự ở mục A) và B) của ví dụ 3, tác dụng của vacxin không chứa peptit kháng nguyên của khối u được kiểm tra. Cả hai giá trị CTL đặc hiệu kháng nguyên của SEQ-49 và SEQ-121 đều không thể phát hiện được. Mặt khác, SEQ-121 thể hiện 85,3% tác dụng ức chế sự tiến triển thành khối u của các tế bào B16F10 ở ngày 12 sau khi cấy ghép so với ODN2006. Từ các kết quả này, SEQ-121 được dự định áp dụng cho vacxin điều trị có tác dụng chống khối u ngay cả khi nó là đơn tác nhân (bảng 69, Fig.14).

Bảng 69

Tá dược	Tỷ lệ của giá trị trung bình của CTL đặc hiệu kháng nguyên	Mức độ ức chế khối u (ngày 12 sau khi cấy ghép)
SEQ-49	Không phát hiện được	0,00
SEQ-121	Không phát hiện được	85,3

Ví dụ 5: Thử nghiệm kích ứng ở liều đơn của các tá dược theo sáng chế

A) Thử nghiệm kích ứng dưới da ở liều đơn

Sự kích ứng dưới da của hợp chất theo sáng chế được đánh giá bằng xét nghiệm tổng thể và xét nghiệm mô bệnh học về da khi mổ xác ở thời điểm một ngày và một hoặc bốn tuần sau khi sử dụng dưới da theo liều đơn.

Hợp chất theo sáng chế được cho sử dụng dưới da vào phần giữa lưng ở giữa các xương vai của chuột cống. Khi mổ xác ở thời điểm một ngày, một hoặc bốn tuần sau khi dùng thuốc (gây mê bằng isofluran, làm chết êm ái bằng cách trích máu), da ở vị trí dùng thuốc được thu gom, quan sát tổng thể và cố định trong dung dịch formalin được đệm trung tính nồng độ 10%. Da cố định được cắt ra, nhúng và cắt lát mỏng theo các phương pháp thông thường, và các phần được nhuộm bằng Hematoxylin-eosin (HE) được chuẩn bị. Các mẫu quan sát bệnh học được quan sát đối với các phần nhuộm HE bằng kính hiển vi quang học và ghi lại các phát hiện mô bệnh học. Sự thay đổi về các phát hiện bệnh học được đánh giá theo bốn cấp độ gồm Tối thiểu; $\pm$, Nhẹ; +, Trung bình; 2+ và Đáng kể; 3+. Khi cấp độ bất kỳ không phù hợp với phát hiện, nó được ghi là dương tính.

Kết quả

Để kiểm chứng độ an toàn của các tá dược theo sáng chế để dùng làm thuốc, mức độ kích ứng dưới da được so sánh với Montanide được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng làm tá dược, Amph1826 (SEQ-2) hoặc ODN2006 (SEQ-49) mà là tá dược đã được biết rõ.

Montanide là tá dược gồm dầu khoáng và chất hoạt động bề mặt, và được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng làm tá dược cho vacxin peptit bằng cách pha chế nhũ tương với chế phẩm chứa nước. Mặc dù nó là tá dược có profin an toàn rất cao đối với các mối quan tâm về tính an toàn toàn thân, nhưng lại có vấn đề về việc xảy ra chứng xơ cứng da do nhũ tương còn lại ở vị trí sử dụng gây ra. Trong thí nghiệm này, phản ứng tại vị trí sử dụng của oligonucleotit sợi kép được so sánh với Montanide, và oligonucleotit này được kiểm tra về việc liệu nó có thể là tá dược có mức độ kích ứng cục bộ yếu hay không.

Các thử nghiệm kích ứng dưới da ở chuột cống với liều đơn được thực hiện đối với Montanide, SEQ-2, SEQ-49 hoặc tá dược theo sáng chế (SEQ-61, SEQ-119, SEQ-121, SEQ-170, SEQ-192 hoặc SEQ-216). Montanide được sử dụng với lượng 1 ml/vị trí ở dạng nhũ tương của Montanide: nước muối (1:1). SEQ-2, SEQ-49 hoặc tá dược theo sáng chế được hòa tan trong nước muối được đệm phosphat và được cho sử dụng với lượng lần lượt là 4,71, 15,7 hoặc 47,1 nmol/1ml/vị trí.

Kết quả là, thấy rõ rằng Montanide không bị hấp thụ/phân hủy/thải trừ vì phần tích tụ màu trắng hoặc các hạch màu trắng được quan sát thấy nhiều ở bên dưới da và các cấu trúc giống u nang này được xác nhận về mặt mô học ở thời điểm một ngày, một và bốn tuần sau khi sử dụng. Montanide vẫn còn bên dưới da tiếp tục gây viêm từ ngày một đến bốn tuần sau khi sử dụng. Một ngày sau khi sử dụng, chứng thâm nhiễm bạch cầu trung tính và chứng phù được quan sát thấy. Một tuần sau khi sử dụng, sự thâm nhiễm bạch cầu trung tính và chứng phù vẫn tiếp tục, nhưng tình trạng viêm trở nên có tính chất mạn tính nhẹ khi quan sát thấy sự viêm tạo mô hạt. Bốn tuần sau khi sử dụng, Montanide được bao bằng bao xơ dày được tạo ra. Chứng viêm được làm giảm nhẹ so với thời điểm một tuần sau khi sử dụng, nhưng thậm chí bốn tuần sau

khi sử dụng, thì vẫn quan sát thấy các con chuột với chứng thâm nhiễm bạch cầu trung tính hoặc chứng phù tiếp diễn.

Trong trường hợp SEQ-2, tình trạng thâm nhiễm tế bào viêm, chứng phù và đóng vảy được quan sát thấy ở thời điểm một ngày và một tuần sau khi sử dụng. Thậm chí bốn tuần sau khi sử dụng, tình trạng viêm da vẫn không khỏi, và tình trạng viêm tạo mô hạt do sự hoạt hóa liên tục hệ bạch cầu đơn nhân/đại thực bào được quan sát thấy.

Trong trường hợp SEQ-49, và SEQ-61, SEQ-119, SEQ-121, SEQ-170, SEQ-192 và SEQ-216, mà là tá dược theo sáng chế, chứng viêm cấp tính, chủ yếu là thâm nhiễm bạch cầu trung tính, được quan sát thấy bên dưới da ở thời điểm một ngày sau khi sử dụng. Một tuần sau khi sử dụng, chứng viêm, chủ yếu là lympho bào và đại thực bào, được quan sát từ dưới da đến mô chân bì, và bốn tuần sau khi sử dụng, chứng viêm gần như khỏi. Liên quan đến SEQ-119, SEQ-121 và SEQ-170, việc đánh giá sự kích ứng dưới da ở thời điểm bốn tuần sau khi sử dụng không được thực hiện, nhưng khi mức độ kích ứng dưới da của chúng ở thời điểm một ngày và một tuần sau khi sử dụng được so sánh với mức độ kích ứng của SEQ-119, SEQ-121, SEQ-170 và SEQ-61, mức độ kích ứng là bằng hoặc yếu hơn so với SEQ-61. Các kết quả này gợi ý rằng liên quan đến SEQ-119, SEQ-121 và SEQ-170, chứng viêm gần như khỏi hoàn toàn sau bốn tuần sử dụng.

Các bảng từ 70 đến 72 thể hiện các kết quả ở thời điểm sau một ngày sử dụng, các bảng từ 73 đến 75 thể hiện các kết quả ở thời điểm một tuần sau khi sử dụng, và bảng 76 và 77 thể hiện các kết quả ở thời điểm sau bốn tuần sử dụng. Các ký hiệu chú thích ở các bảng là như sau.

- 1) Các giá trị sau các phát hiện là số lượng con vật được quan sát.
- 2) Các giá trị sau các phát hiện là điểm số. Các điểm số được tính toán theo giá trị tổng, với điều kiện là cấp độ của mỗi cá thể được quy định là Tối thiểu; 1, Nhẹ; 2, và Trung bình; 3.

Phần trên đây cho thấy rằng khi được so sánh giữa các tá dược theo sáng chế và Montanide, thì các tá dược theo sáng chế không gây ra sự tích tụ các hợp chất bên dưới da (nguy cơ thấp về việc làm xơ cứng), hoại tử hoặc thâm nhiễm bạch cầu trung tính không xuất hiện ở thời điểm thậm chí là một

tuần sau khi sử dụng, và chứng viêm gần như khỏi hoàn toàn ở thời điểm bốn tuần sau khi điều trị. Do đó, kết luận là mức độ kích ứng dưới da của các tá dược theo sáng chế là yếu hơn so với mức độ kích ứng dưới da của Montanide. Ngoài ra, khi được so sánh giữa các tá dược theo sáng chế và Amph1826 (SEQ-2), chứng viêm do các tá dược theo sáng chế gây ra gần như khỏi hoàn toàn ở thời điểm bốn tuần sau khi sử dụng, nhưng mặt khác chứng viêm da do SEQ-2 gây ra vẫn không khỏi, và chứng viêm tạo mô hạt do sự hoạt hóa liên tục hệ bạch cầu đơn nhân/đại thực bào được quan sát thấy thậm chí ở thời điểm bốn tuần sau khi sử dụng. Do đó, kết luận là mức độ kích ứng dưới da của các tá dược theo sáng chế là yếu hơn so với mức độ kích ứng dưới da của SEQ-2. Mức độ kích ứng dưới da của các tá dược theo sáng chế không khác biệt đáng kể so với ODN2006 (SEQ-49).

Bảng 70

Tên hợp chất		Montanide	SEQ-49			SEQ-61		
Liều (nmol/vị trí)		-	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3
Số lượng chuột chết/sáp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Bệnh học	Tổng thể ¹⁾	Dưới da: Phần tích tụ màu trắng	3	0	0	0	0	0
		Dưới da: Nốt đỏ. Ban đỏ	0	0	0	1	0	0
	Mô bệnh học	Dưới da: Thâm nhiễm bạch cầu trung tính ²⁾	3	6	6	6	5	6
		Dưới da: Phù ²⁾	3	4	5	5	2	3
		Dưới da: Chảy máu ²⁾	2	2	1	2	1	0
		Dưới da: Cấu trúc giống u nang ¹⁾	3	0	0	0	0	0
		Lớp cơ: Thâm nhiễm bạch cầu trung tính ²⁾	0	4	6	5	4	5
Lớp cơ: Phù ²⁾	0	2	1	0	3	2	3	

Bảng 71

Tên hợp chất			SEQ-192				SEQ-216				SEQ-2				
Liều (nmol/vị trí)			4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	
Số lượng chuột			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Số lượng chuột chết/sấp giải phẫu			0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
Bệnh học	Vị trí sử dụng	Mô dưới da	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾		6	5	5	6	6	5	7	6	6	6	
			Phù ²⁾		7	6	4	5	7	4	3	5	6	6	
			Chảy máu ²⁾		2	1	1	3	1	1	0	3	3	3	
			Hoại tử ²⁾		1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
		Chân bì	Cấu trúc giống u nang ¹⁾		2	1	2	2	3	0	1	2	1	1	
			Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾		6	6	6	7	7	6	5	9	6	6	
			Lớp cơ	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾		2	3	4	3	6	2	4	7	6	6
				Phù ²⁾		1	2	3	2	2	1	1	3	4	4
Hoại tử ²⁾			0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		

Bảng 72

Tên hợp chất		SEQ-121				SEQ-170				SEQ-119			
Liều (nmol/vị trí)		4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Số lượng chuột chết/sáp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Bệnh học	Tổng thể ¹⁾	Độ đục	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	2
		Ban đỏ	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0
	Vị trí sử dụng	Mô bệnh học ²⁾	Mô	5	5	6	3	6	8	3	4	6	6
			dưới da	9	8	5	6	5	7	5	5	6	6
		Chân bì	1	4	6	1	0	5	1	2	6	6	6
		Lớp cơ	2	5	6	3	5	6	1	2	4	4	4

Bảng 73

Tên hợp chất		Montanide	SEQ-49			SEQ-61					
Liều (nmol/vị trí)		-	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1			
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3			
Số lượng chuột chết/sắp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0			
Bệnh học	Vị trí sử dụng	Tổng thể ¹⁾	Dưới da: Các hạch màu trắng			3	0	0	0	0	
			Biểu bì: Vảy			0	1	0	1	0	0
		Dưới da: Hoại tử ²⁾			2	0	0	0	0	0	
		Dưới da: Thâm nhiễm bạch cầu trung tính ²⁾			6	0	0	0	0	0	
		Dưới da: Thâm nhiễm bạch cầu đơn nhân ²⁾			0	3	6	8	2	3	7
		Dưới da: Viêm tạo mô hạt ²⁾			7	0	0	0	0	0	0
		Dưới da: Phù ²⁾			5	4	6	5	4	5	6
Dưới da: Cấu trúc giống u nang ¹⁾		3	0	0	0	0	0	0	0		

Bảng 74

Tên hợp chất		SEQ-192			SEQ-216			SEQ-2				
Liều (nmol/vị trí)		4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1		
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3	3	3		
Số lượng chuột chết/sắp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		
Bệnh học	Tổng thể ¹⁾	Phân tích tự chất màu trắng										
		Các nốt màu đỏ đậm										
		Phù										
		Vảy										
	Vị trí sử dụng	Mô bệnh học ²⁾	Dưới da	Viêm tạo mô hạt ²⁾								
			Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾									
			Phù ²⁾									
			Hoại tử ²⁾									
		Chân bì	Cấu trúc giống u nang ¹⁾									
			Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾									
			Lớp cơ	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾								

Bảng 75

Tên hợp chất		SEQ-121			SEQ-170			SEQ-119		
Liều (nmol/vị trí)		4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1	4,71	15,7	47,1
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3	3	3
Số lượng chuột chết/sắp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Bệnh học	Vị trí sử dụng	Tổng thể ¹⁾	Độ đục		0	0	0	1	1	0
			Ban đỏ		0	0	0	1	2	0
		Mô bệnh học ²⁾	Dưới da	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾	5	5	6	3	6	4
			Chân bì	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾	1	4	6	1	5	2
			Lớp cơ	Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾	2	5	6	3	5	6
								1	2	4

Bảng 76

Tên hợp chất		Montanide	SEQ-49				SEQ-61			
Liều (nmol/vị trí)		-	4,71	15,7	47,1	47,1	4,71	15,7	47,1	47,1
Số lượng chuột		3	3	3	3	3	3	3	3	3
Số lượng chuột chết/sáp giải phẫu		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Bệnh học	Vị trí sử dụng	Tổng thể ¹⁾	Dưới da: Các hạch màu trắng		3	0	0	0	0	0
			Lớp cơ: Thâm nhiễm bạch cầu đơn nhân ²⁾		0	0	0	0	0	1
		Mô bệnh học	Dưới da: Thâm nhiễm bạch cầu trung tính ²⁾		3	0	0	0	0	0
			Dưới da: Viêm tạo mô hạt ²⁾		6	0	0	0	0	0
			Dưới da: Phù ²⁾		1	0	0	0	0	0
			Dưới da: Cấu trúc giống u nang đi kèm với sự hình thành bao xơ ¹⁾		3	0	0	0	0	0

Bảng 77

Tên hợp chất			SEQ-192				SEQ-216				SEQ-2			
Liều (nmol/vị trí)			4,71	15,7	47,1	47,1	4,71	15,7	47,1	47,1	4,71	15,7	47,1	47,1
Số lượng chuột			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Số lượng chuột chết/sắp giải phẫu			0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Bệnh học	Vị trí sử dụng	Tổng thể ¹⁾ Mô bệnh học ²⁾	Phân tích tự chất màu trắng			0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Vảy			0	0	0	0	1	0	0	0	0
			Dưới da	Viêm tạo mô hạt ²⁾			0	0	0	0	4	5	7	7
				Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾			0	0	0	0	0	0	0	0
				Phù ²⁾			0	0	0	0	0	0	0	0
				Xơ hóa ²⁾			0	0	0	1	0	0	0	0
			Chân bì	Cấu trúc giống u nang ¹⁾			0	0	0	0	0	0	0	0
				Thâm nhiễm tế bào viêm ²⁾			0	1	0	0	0	4	7	7

B) Thử nghiệm kích ứng trong chân bì ở liều đơn

Sự kích ứng dưới da của các tá dược theo sáng chế được đánh giá bằng xét nghiệm tổng thể và xét nghiệm mô bệnh học về da khi mổ xác ở thời điểm một ngày và một hoặc bốn tuần sau khi sử dụng dưới da theo liều đơn.

Tá dược theo sáng chế được cho sử dụng dưới da ở da vùng lưng của các con chuột cống. Phương pháp sau đây được thực hiện theo cách tương tự với mục A) của ví dụ 5.

Ví dụ 6: Đánh giá khả năng gây cảm ứng sản xuất kháng thể của tá dược theo sáng chế khi gây miễn dịch bằng vaccin kháng nguyên PCRV *Pseudomonas aeruginosa*

Khi kháng nguyên và tá dược được sử dụng làm vaccin đối với bệnh nhiễm khuẩn và gây ra sự sản xuất kháng thể từ lympho bào B ở động vật được gây miễn dịch, thì tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh nhiễm khuẩn đó được dự kiến. Do đó, với kỳ vọng áp dụng tá dược này cho vaccin cho bệnh nhiễm khuẩn, thì sự sản xuất kháng thể từ lympho bào B được đánh giá. Kháng nguyên PCRV mà là *Pseudomonas aeruginosa* được sử dụng làm kháng nguyên cho việc đánh giá. Đã có báo cáo là kháng nguyên PCRV *Pseudomonas aeruginosa* có tác dụng vaccin (Moriyama et al., Infect. Immun., Sep. 2001, vol. 69, no. 9, 5908-5910), và do đó tác dụng gây cảm ứng sản xuất kháng thể bởi tá dược được đánh giá so với nhóm sử dụng kháng nguyên PCRV. Tá dược Freund được sử dụng cho nhóm đối chứng. Tá dược Freund là tá dược mà tubercle bacillus đã bị bất hoạt bằng cách gia nhiệt được trộn với dầu gồm dầu parafin, dianhydromanitol monooleat (mannide monooleate), và được biết đến là tá dược gây cảm ứng mạnh đến sự sản xuất kháng thể ở các nghiên cứu phi lâm sàng. Tá dược Freund thể hiện tác dụng mạnh trong các nghiên cứu phi lâm sàng, nhưng việc sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đã bị cấm do mối lo ngại về các tác dụng phụ (The European Agency for the Evaluation of Medical Products Evaluation of Medicines for Human Use, 25 March 2004, Internet (URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/11/WC500015469.pdf)).

Trình tự nucleotit Pcrv (SEQ ID NO: 48) thu được từ chủng *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 được tách dòng ở vị trí NdeI-XhoI trong vector

pET21a, và chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3) được biến nạp bằng plasmit đã chuẩn bị. Chủng pcrV-BL21 (DE3) được nuôi cấy trong 500 ml môi trường lỏng LB/Ampixilin ở 37°C, và 200 µl IPTG 0,1M được thêm vào khi OD600 bằng 0,5 để gây ra sự biểu hiện của protein PCRv tái tổ hợp. Sau khi nuôi cấy ở 16°C trong 18 giờ, vi khuẩn được tách ra bằng thiết bị ly tâm, và 15 ml đệm A (50 mM Tris-HCl (độ pH 8,0), 0,2M NaCl) chứa 0,5% lysozym (SIGMA Corporation) được thêm vào. Sau khi để ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, xử lý bằng siêu âm được thực hiện. Sau khi siêu âm ở tốc độ 12000 vòng/phút (rounds per minute: rpm) trong 10 phút, thu được phân đoạn tan. 1 ml gel agaroza Ni-NTA (QIAGEN) được thêm vào cột Polyprep (BIO-RAD Laboratories, Inc) và được làm cân bằng bằng 10ml đệm A. Phân đoạn tan được thêm vào cột và cho đi qua. Cột được rửa bằng 20 ml đệm A + 20 mM imidazol và được giải hấp bằng 1 ml đệm A + 250 mM imidazol. Cột Superdex 200 16/60 GL được nối với thiết bị AKTA Explorer (GE Healthcare), và được làm cân bằng bằng đệm A với lượng 1,5 thể tích cột (Column Volume: CV). Phân đoạn đã giải hấp bằng imidazol được tinh chế bằng cách lọc gel và protein PCRv tái tổ hợp HIS đầu C (SEQ ID NO: 49) được tinh chế. Protein PCRv tái tổ hợp thu được được xác định nồng độ bằng kit thử nghiệm BCA (PIERCE) và giữ ở nhiệt độ -80°C.

70 µg protein PCRv tái tổ hợp và 33 nmol tá dược theo sáng chế được trộn với nước muối đến thể tích 0,7 ml. Mỗi trong số 5 con chuột nhắt mà là chuột nhắt cái A/J 5 tuần tuổi (Japan SLC, Inc.) được tiêm trong chân bì chất sinh miễn dịch với lượng 0,1 ml vào ngày 0, 7 và 27. Để làm đối chứng, chỉ cho sử dụng protein PCRv tái tổ hợp để gây miễn dịch theo phương pháp tương tự. Liên quan đến tá dược Freund, 100 µg protein PCRv tái tổ hợp được trộn với nước muối đến thể tích 0,5 ml, và nhũ tương được pha chế với cùng lượng tá dược Freund hoàn chỉnh (Difco Laboratories). 0,1 ml được tiêm trong chân bì vào ngày 7 để gây miễn dịch ban đầu. Vào ngày 27, tá dược Freund không hoàn chỉnh (Difco Laboratories) được sử dụng để gây miễn dịch theo phương pháp tương tự. Vào ngày 33, máu được thu gom bằng cách sử dụng heparin từ tĩnh mạch đuôi của chuột nhắt, và ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi bề mặt được thu gom ở dạng kháng huyết thanh và giữ

ở nhiệt độ -40°C .

Độ chuẩn kháng thể được xác định như sau. Protein PCR_V tái tổ hợp được trộn với PBS (độ pH 7,4) (Invitrogen) đến nồng độ $1\text{ }\mu\text{g/ml}$, và dung dịch với lượng $20\text{ }\mu\text{l/lỗ}$ được thêm vào đĩa Nunc Maxisorp 384 lỗ (Thermo). Đĩa được làm kín bằng cơ cấu làm kín đĩa và quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa hai lần bằng đệm rửa (9 g/l NaCl , $0,5\text{ g/l Proclin 150}$, $0,1\text{ g/l Tween-20}$) với lượng $90\text{ }\mu\text{l/lỗ}$, đệm thử nghiệm 1x (Invitrogen) được thêm vào với lượng $60\text{ }\mu\text{l/lỗ}$. Đĩa được làm kín bằng cơ cấu làm kín đĩa và quá trình phong bế được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi loại bỏ chất lỏng bằng cách rút ra, kháng huyết thanh được pha loãng bằng đệm thử nghiệm 1x ở mức 10^3 đến 10^7 lần và dung dịch được thêm vào với lượng $20\text{ }\mu\text{l/lỗ}$. Đĩa được làm kín bằng cơ cấu làm kín đĩa và quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa ba lần bằng đệm rửa, IgG chuột kháng dê Fc-HRP (JacksonImmunoResearch) được pha loãng 20000 lần bằng đệm thử nghiệm 1x và dung dịch được thêm vào với lượng $20\text{ }\mu\text{l/lỗ}$. Đĩa được làm kín bằng cơ cấu làm kín đĩa và quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng đệm rửa, cơ chất TMB (Dako) với lượng $20\text{ }\mu\text{l/lỗ}$ được thêm vào và quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Axit sulfuric 0,5N (Nacalai) với lượng $20\text{ }\mu\text{l/lỗ}$ được thêm vào, và độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được xác định bằng bộ đọc đĩa. Tỷ lệ pha loãng khi độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm là 1,0 được tính toán và thiết lập làm độ chuẩn kháng thể. Các kết quả được thể hiện trên Fig.15.

Các độ chuẩn kháng thể lần lượt là $3,0 \times 10^6$ đối với SEQ-121 là giá trị cao nhất, $2,5 \times 10^6$ đối với tá dược Freund, $7,1 \times 10^5$ đối với SEQ-61 và $5,3 \times 10^5$ đối với ODN2006 (SEQ-49). Độ chuẩn kháng thể đối với riêng protein PCR_V là $1,3 \times 10^5$. Các kết quả này gợi ý rằng các tá dược theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch mạnh đối với tế bào B. Đặc biệt, độ chuẩn kháng thể đối với SEQ-121 thể hiện khả năng gây cảm ứng sản xuất kháng thể cao hơn ODN2006 và gần như bằng với độ chuẩn kháng thể đối với tá dược Freund. Do vậy, được gợi ý rằng các tá dược theo sáng chế rất hữu ích để làm tá dược cho vacxin chống lại các bệnh nhiễm khuẩn. Từ các kết quả này, các tá dược theo sáng chế được dự định áp dụng cho vacxin chống lại các bệnh nhiễm khuẩn.

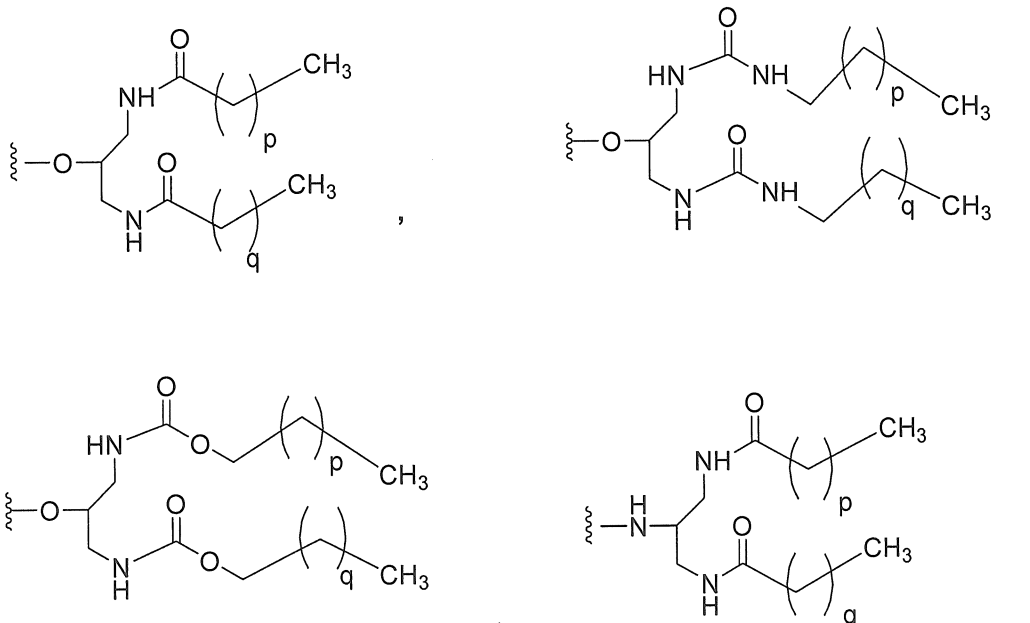
Khả năng ứng dụng công nghiệp

Như được thấy rõ từ các ví dụ trên đây, oligonucleotit sợi kép liên kết lipit theo sáng chế thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch rất tốt. Do đó, chúng đặc biệt hữu ích để làm tá dược nâng cao tác dụng cho vacxin.

Danh mục trình tự

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép, trong đó sợi thứ nhất chỉ gồm có oligonucleotit CpG bao gồm 8 đến 50 nucleotit, sợi thứ hai là oligonucleotit bao gồm 8 đến 60 nucleotit và chứa trình tự có khả năng lai với sợi thứ nhất, nhưng loại trừ ARN oligonucleotit, độ dài của sợi thứ hai là bằng hoặc lớn hơn 50% độ dài của sợi thứ nhất, và lipit chứa (các) mạch hydrocacbon có 12 đến 30 nguyên tử cacbon liên kết với sợi thứ hai qua đoạn nối.
2. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm 1, trong đó oligonucleotit của sợi thứ hai là oligonucleotit bao gồm các ADN nucleosit và/hoặc các dẫn xuất nucleosit.
3. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm 2, trong đó dẫn xuất nucleosit là nucleosit có nhóm thế ở vị trí 2' của đường và/hoặc nucleosit có cấu trúc cầu nối giữa các vị trí 4' và 2' của đường.
4. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm 3, trong đó cấu trúc cầu nối giữa các vị trí 4' và 2' của đường là 4'-(CH₂)_m-O-2', trong đó m là số nguyên từ 1 đến 4.
5. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó lipit là diaxyl lipit.
6. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm 5, trong đó diaxyl lipit là:



, hoặc

trong đó mỗi p và q độc lập là số nguyên từ 10 đến 28.

7. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó lipit này liên kết ở đầu 3' và/hoặc đầu 5' của sợi thứ hai.

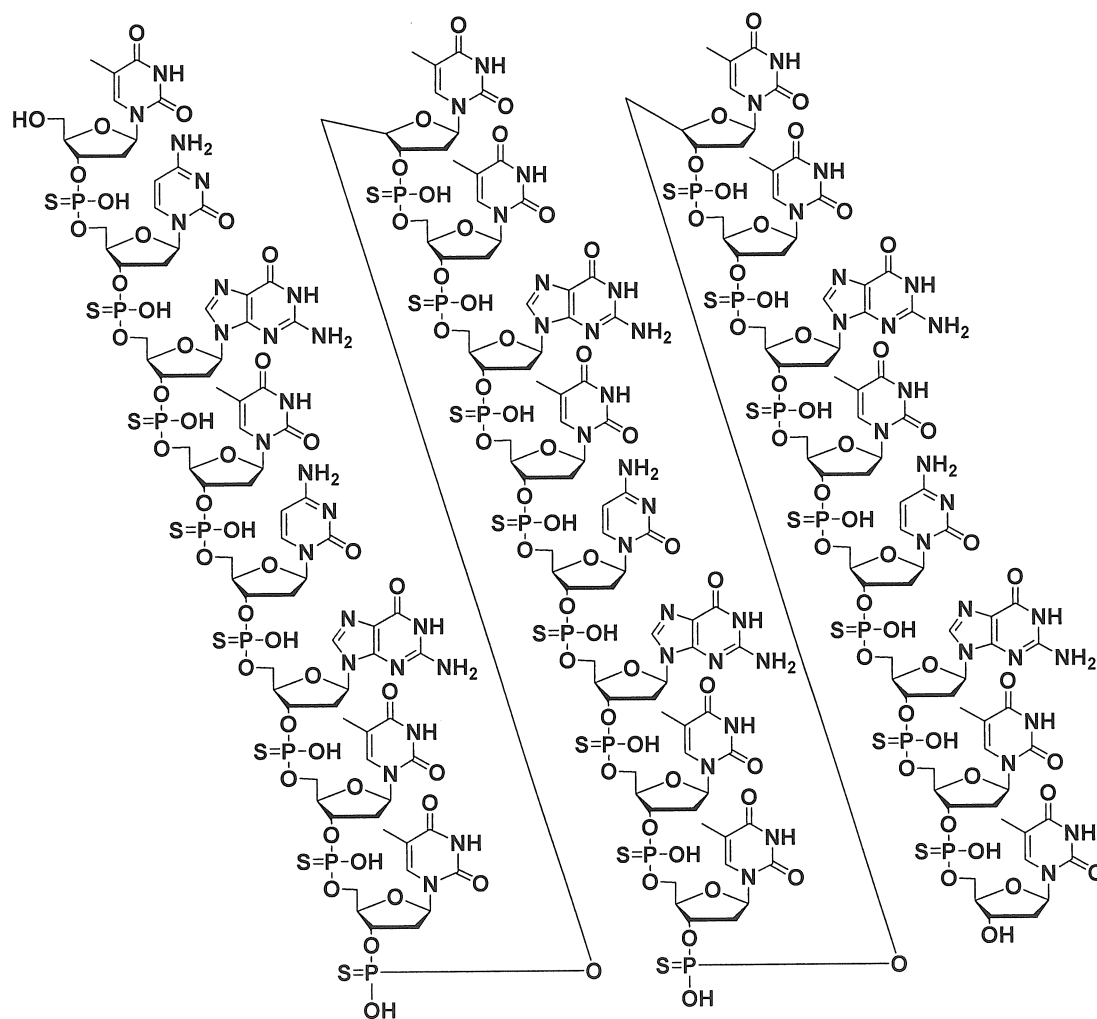
8. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó đoạn nối là đoạn nối oligonucleotit.

9. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm 8, trong đó đoạn nối là - (dX¹)u-, trong đó X¹ độc lập là A, G, C hoặc T, và u là số nguyên từ 1 đến 8.

10. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó oligonucleotit CpG là oligonucleotit bao gồm trình tự SEQ ID NO: 13.

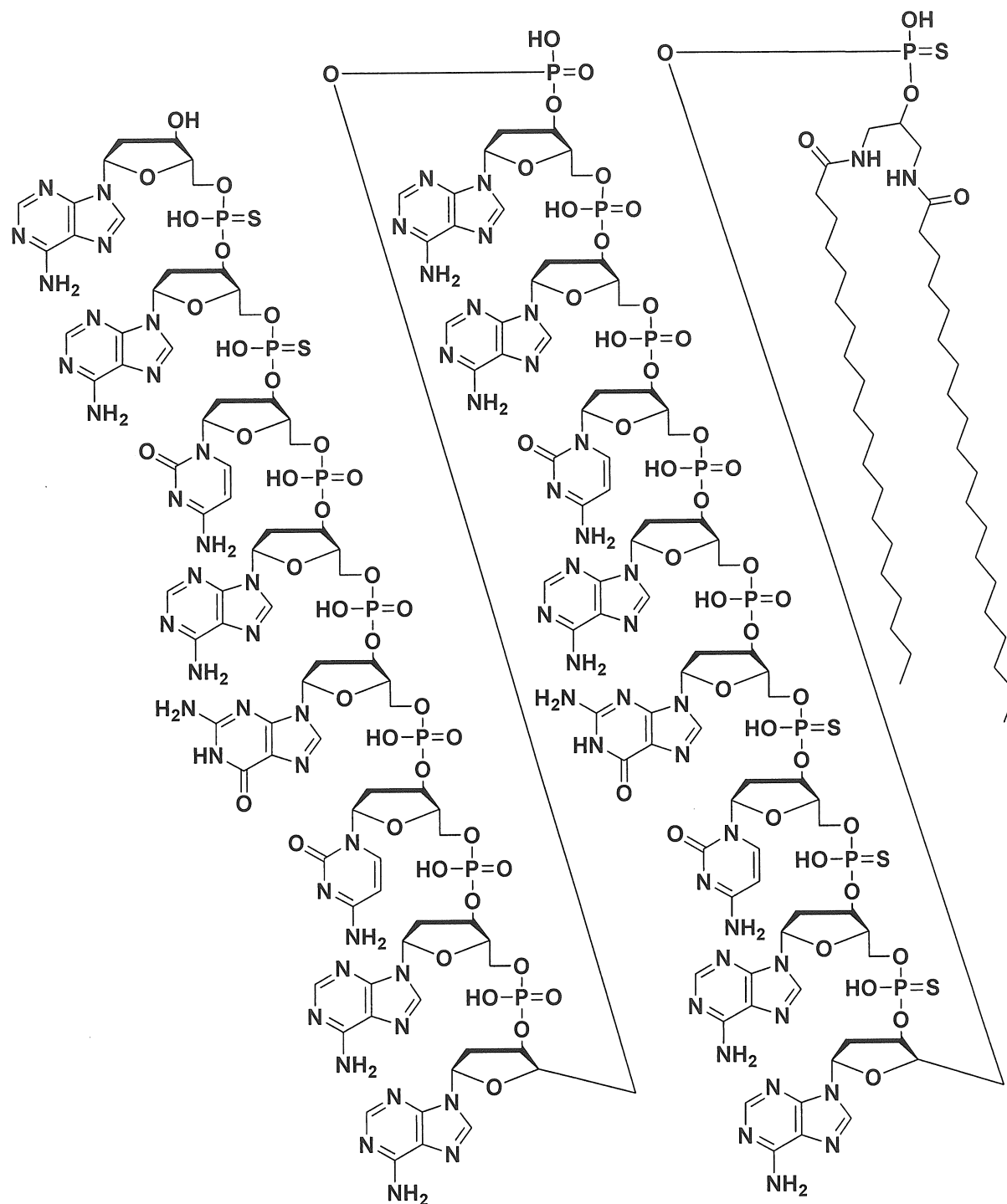
11. Dược phẩm chứa oligonucleotit sợi kép bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó:

sợi thứ nhất là sợi có công thức sau đây:



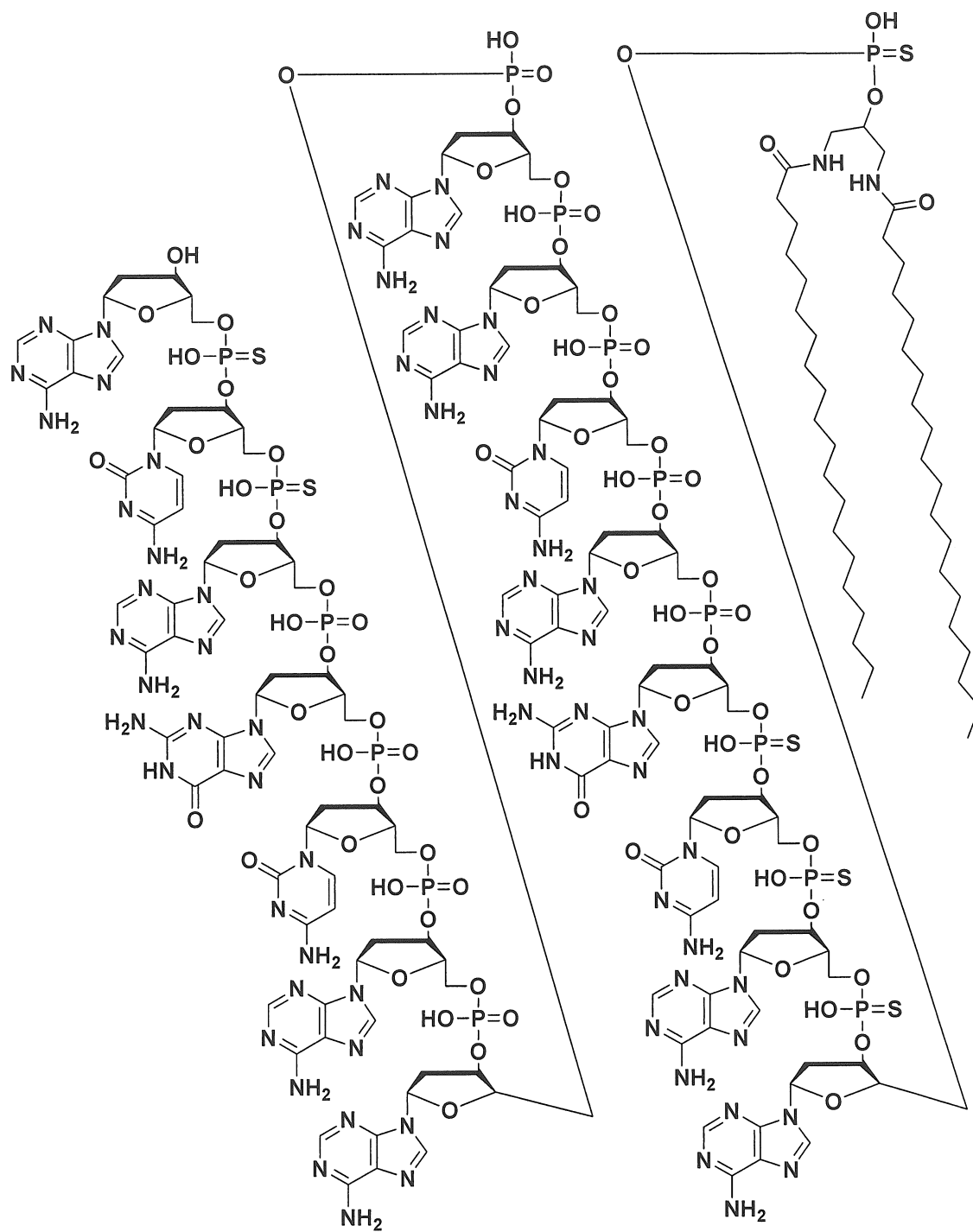
(ODN2006)

và sợi thứ hai là sợi có công thức được chọn từ các công thức sau đây,
công thức:



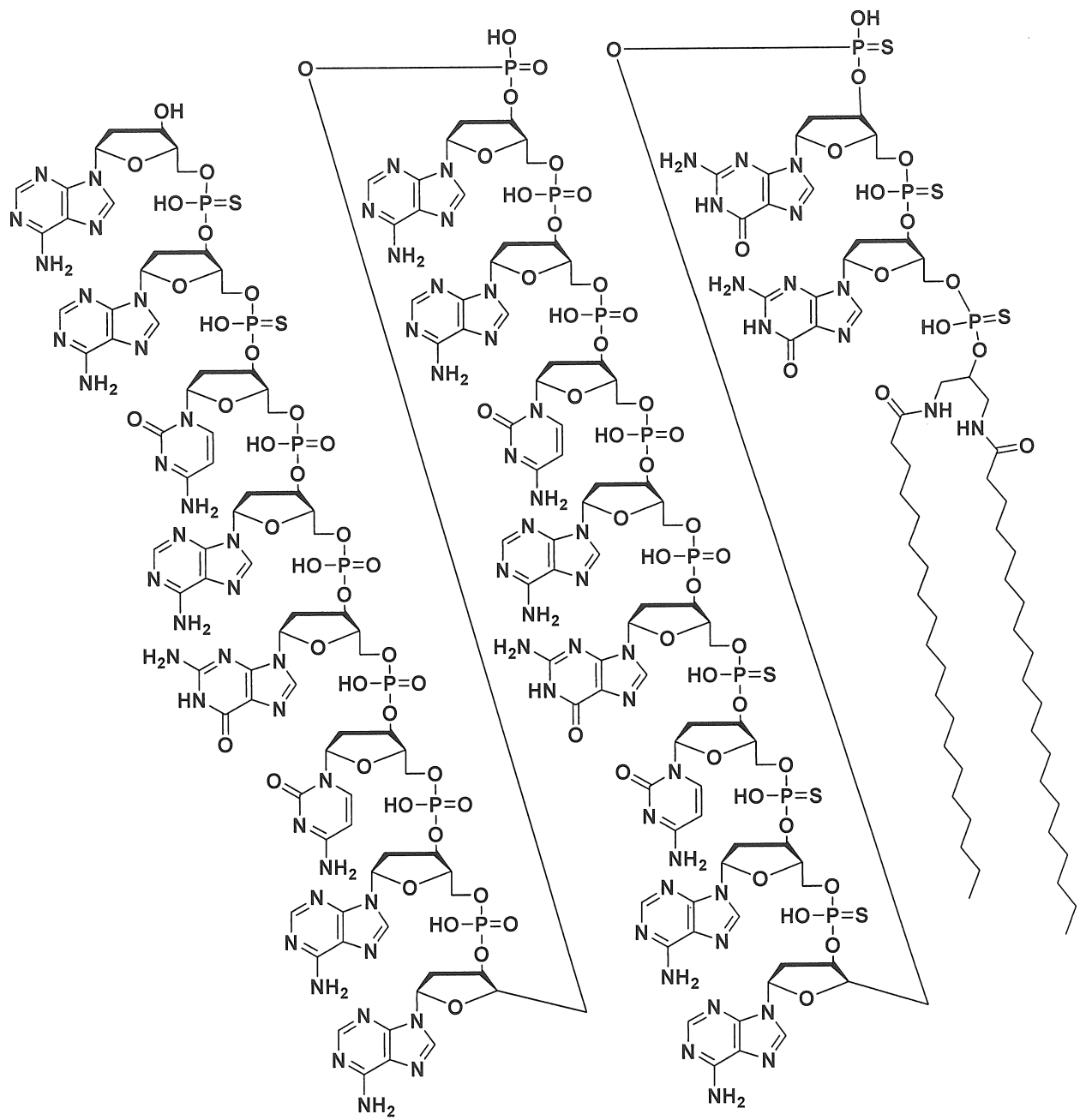
(S-28)

công thức:



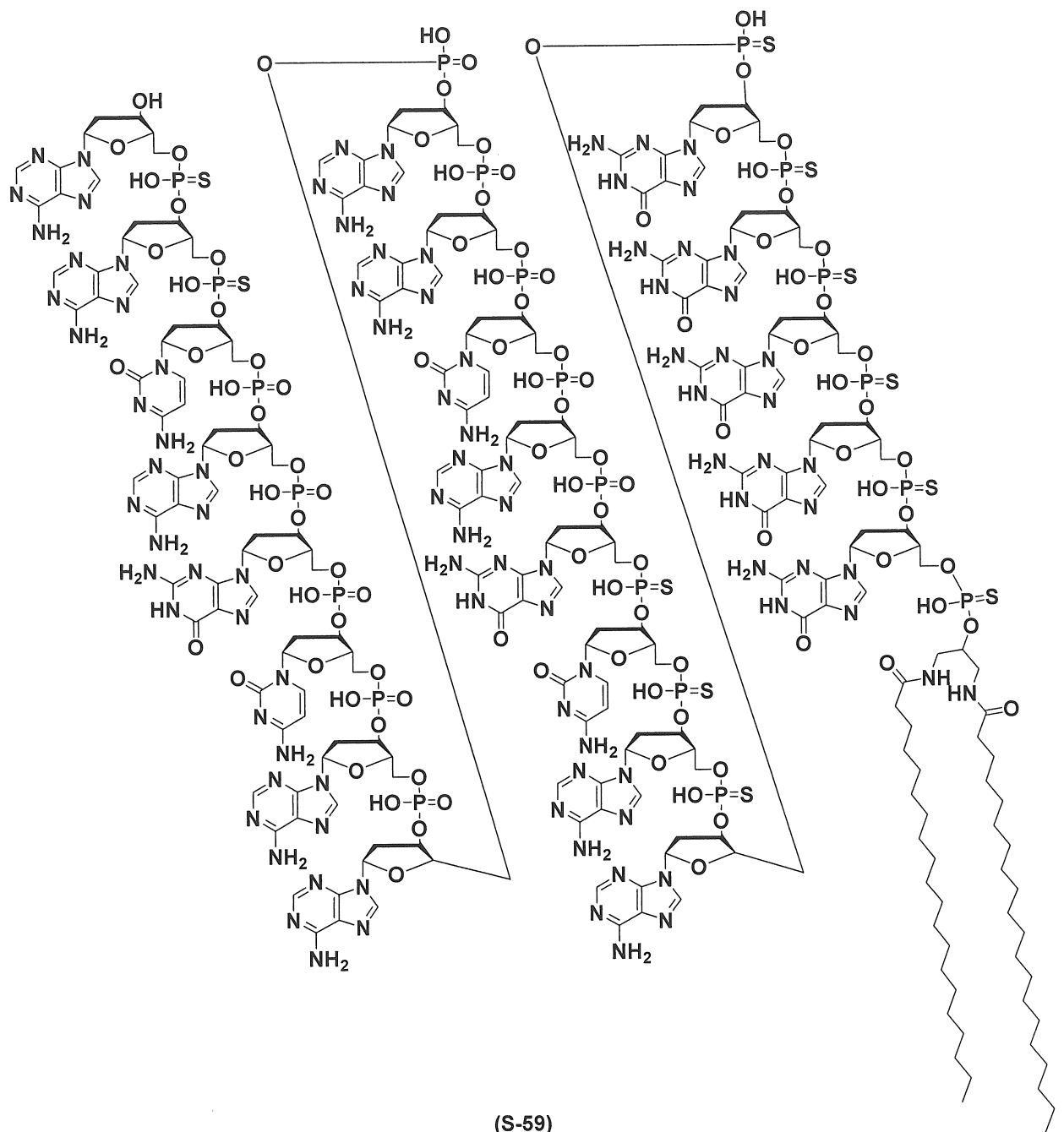
(S-29)

công thức:

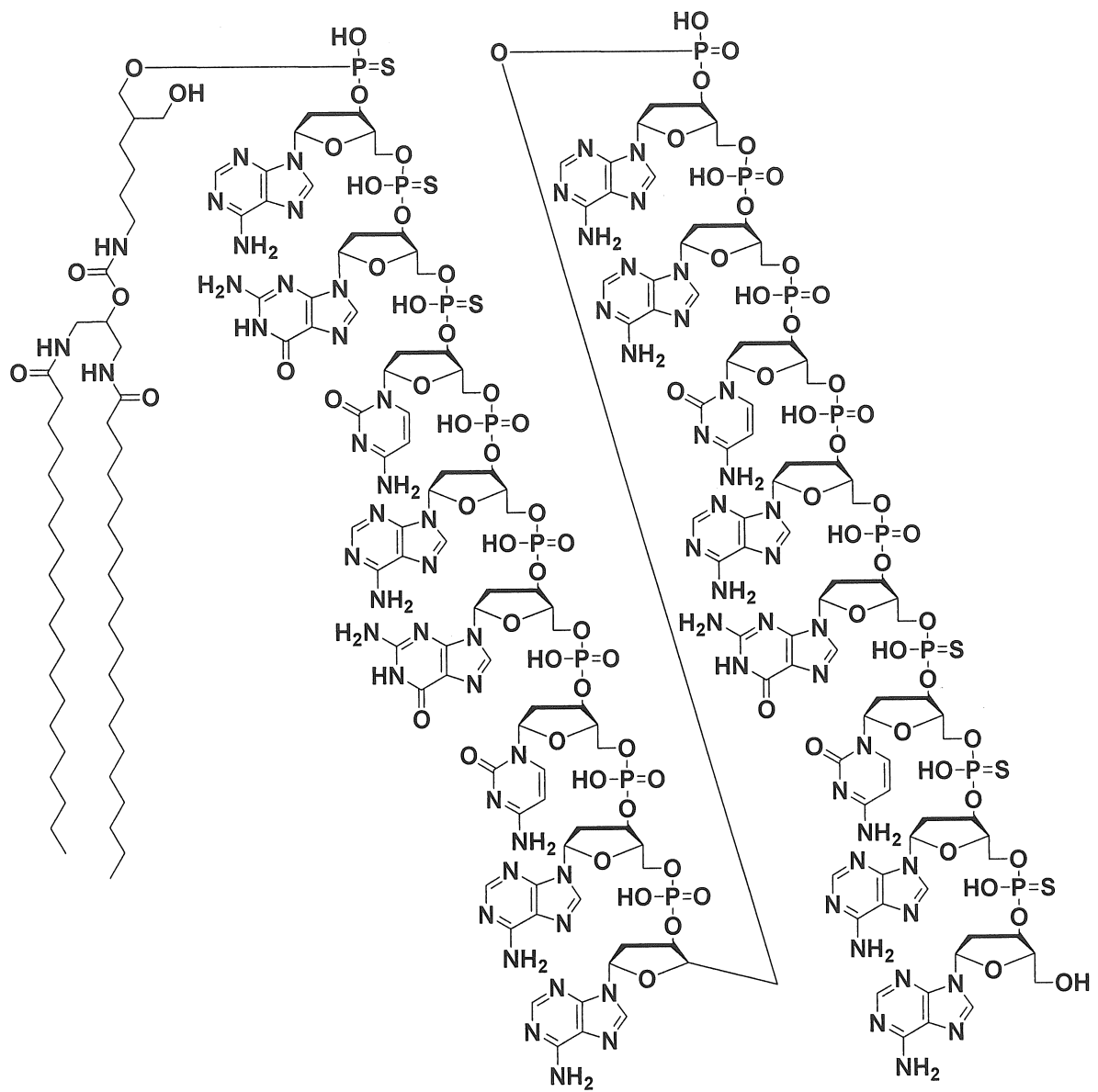


(S-58)

công thức:

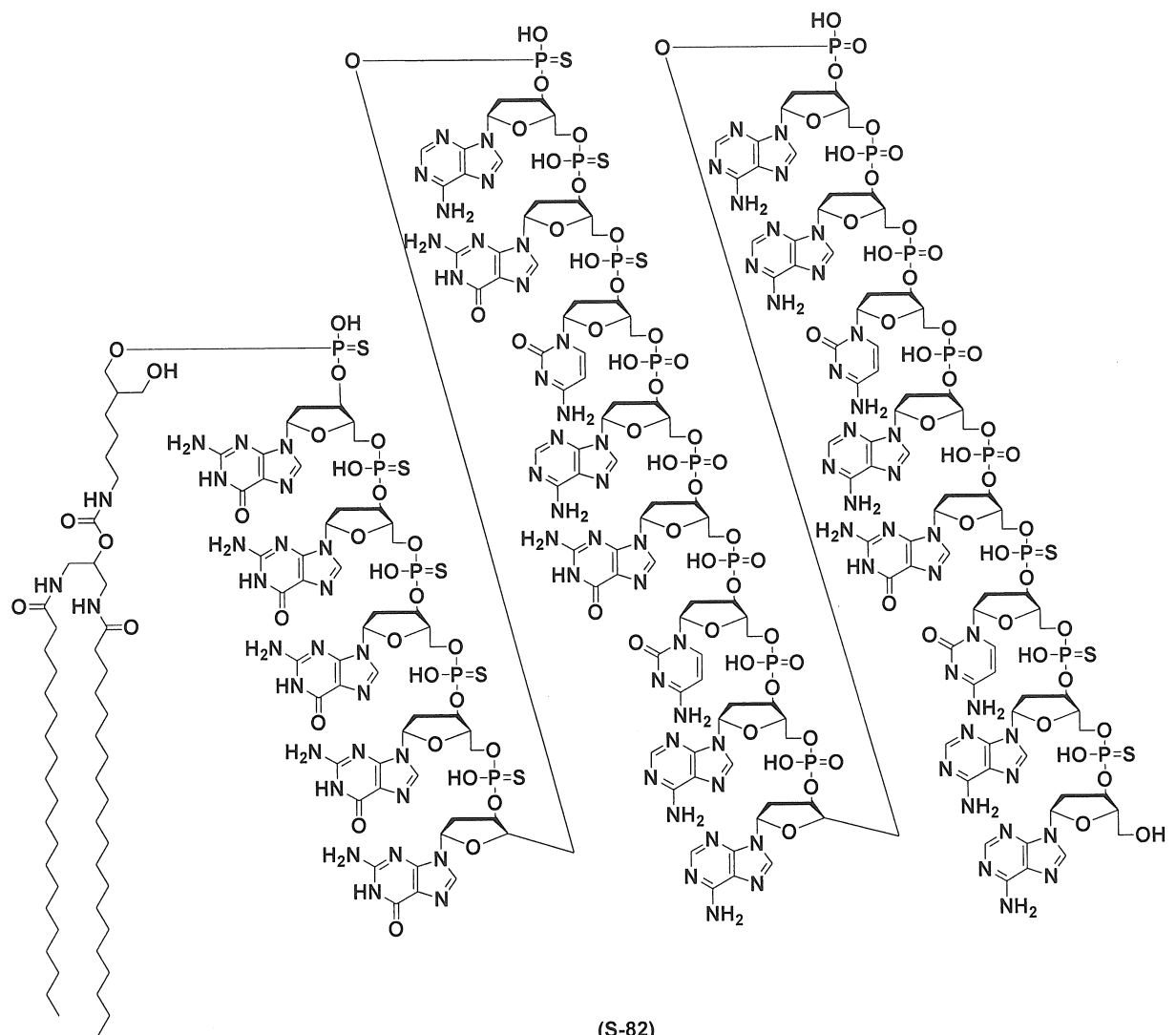


công thức:



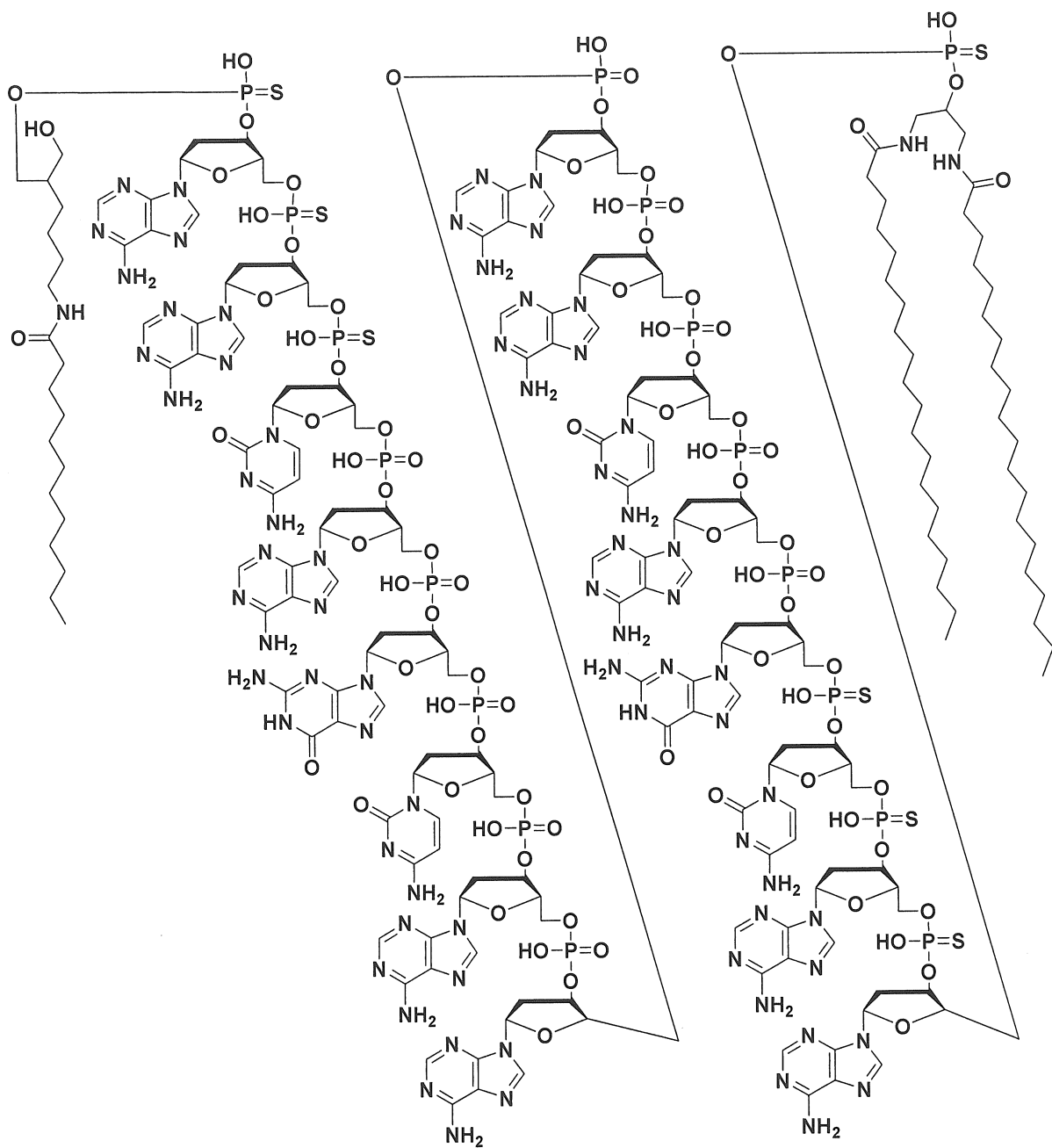
(S-80)

công thức:



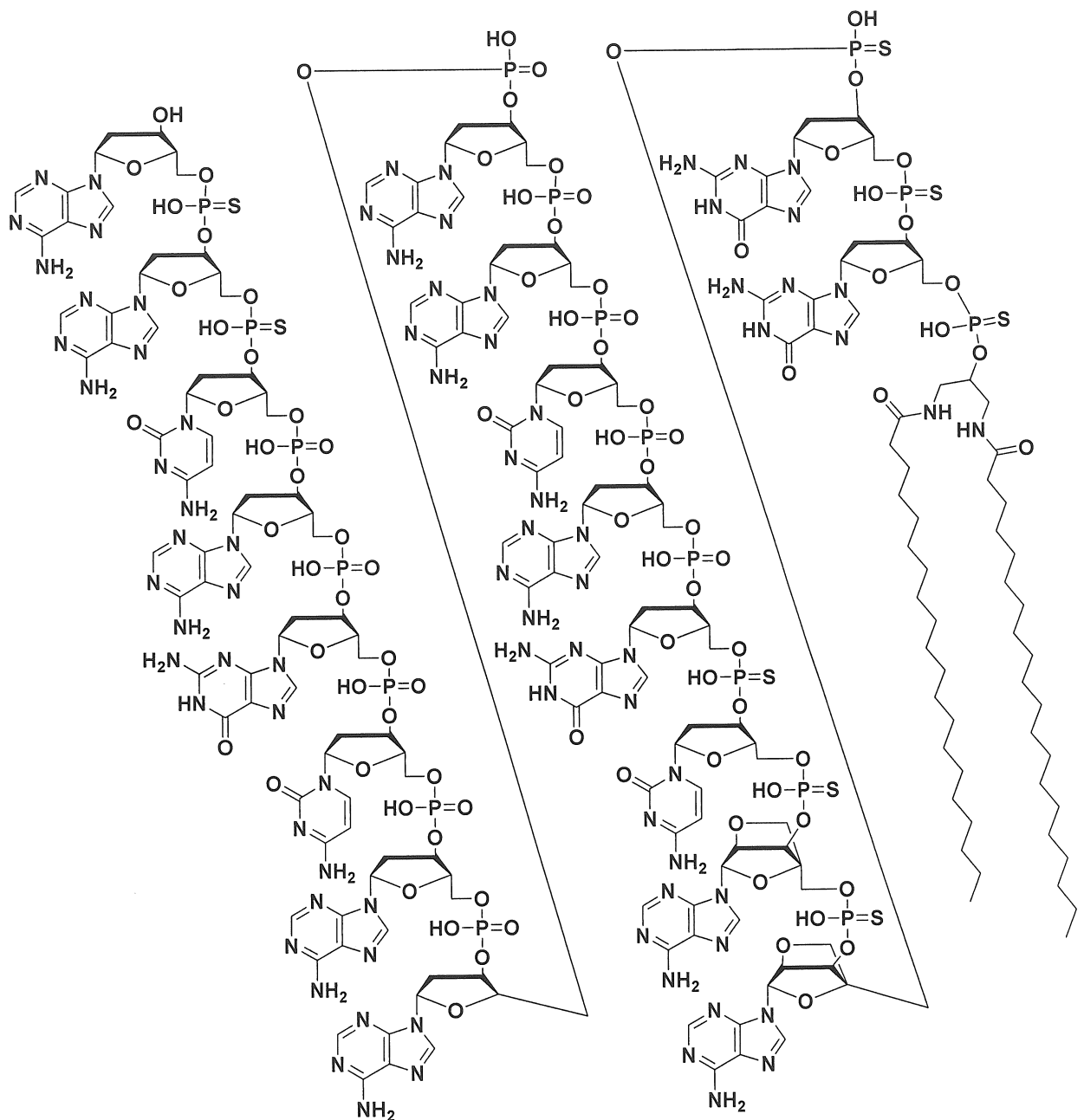
(S-82)

công thức:



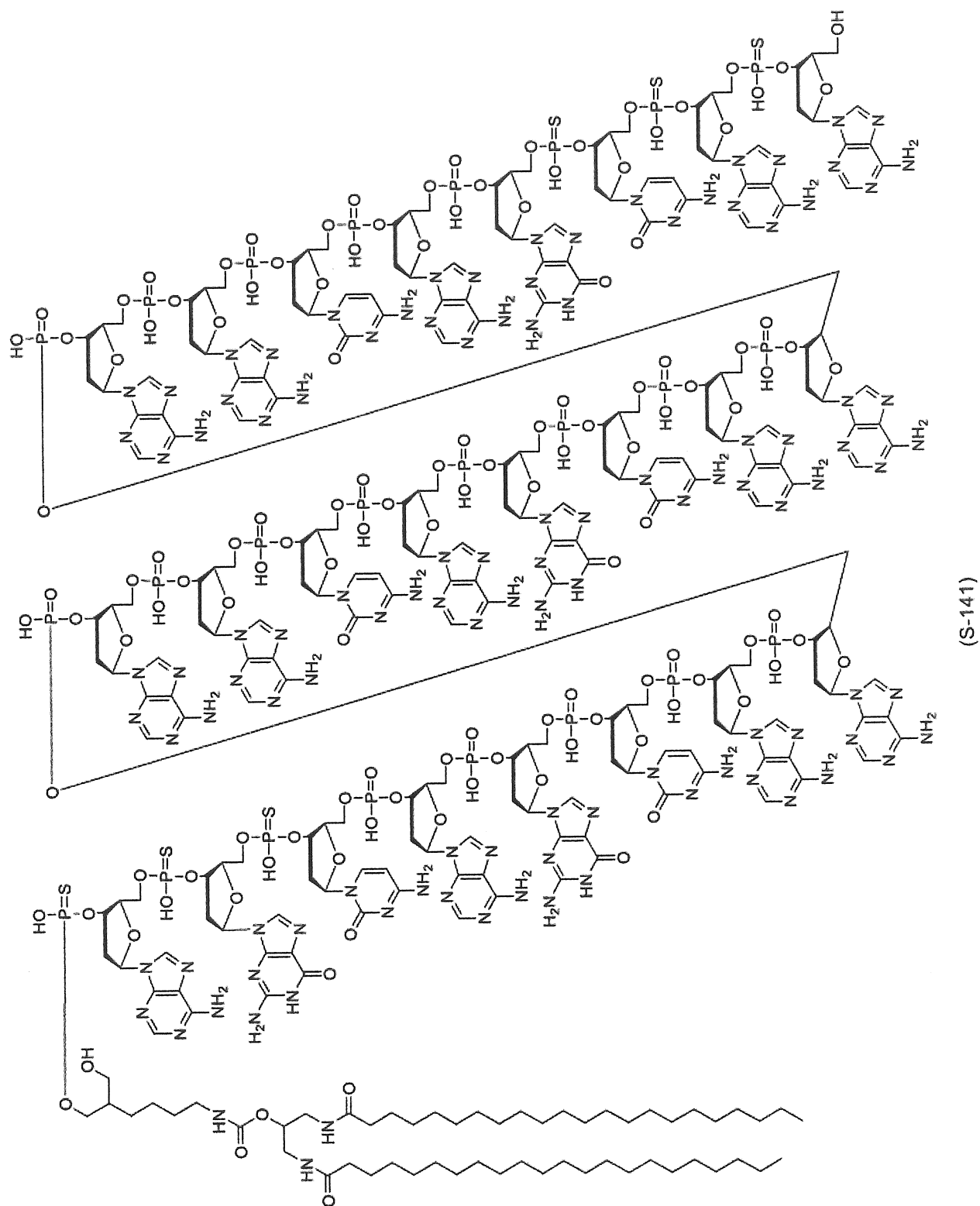
(S-93)

công thức:

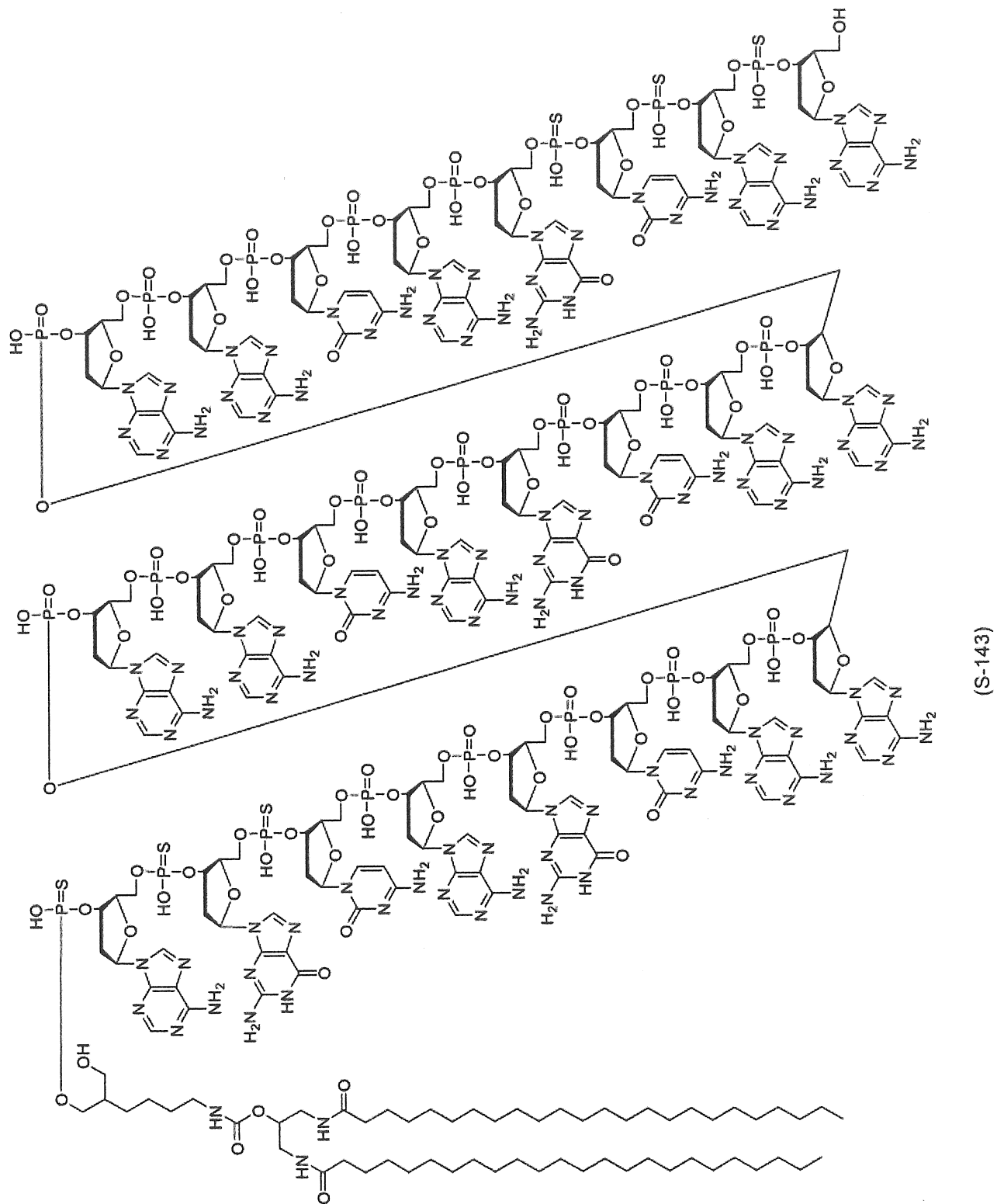


(S-136)

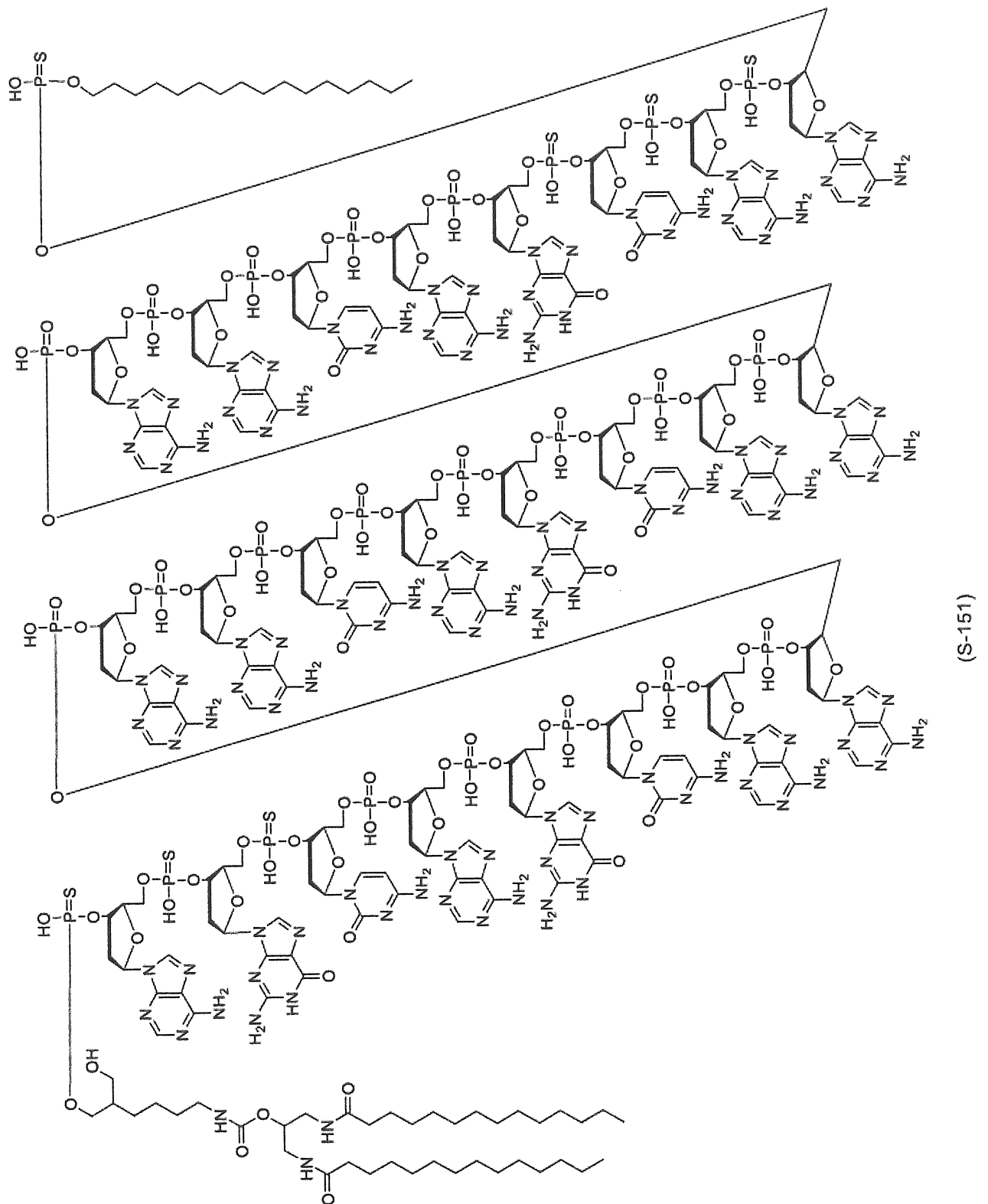
công thức:



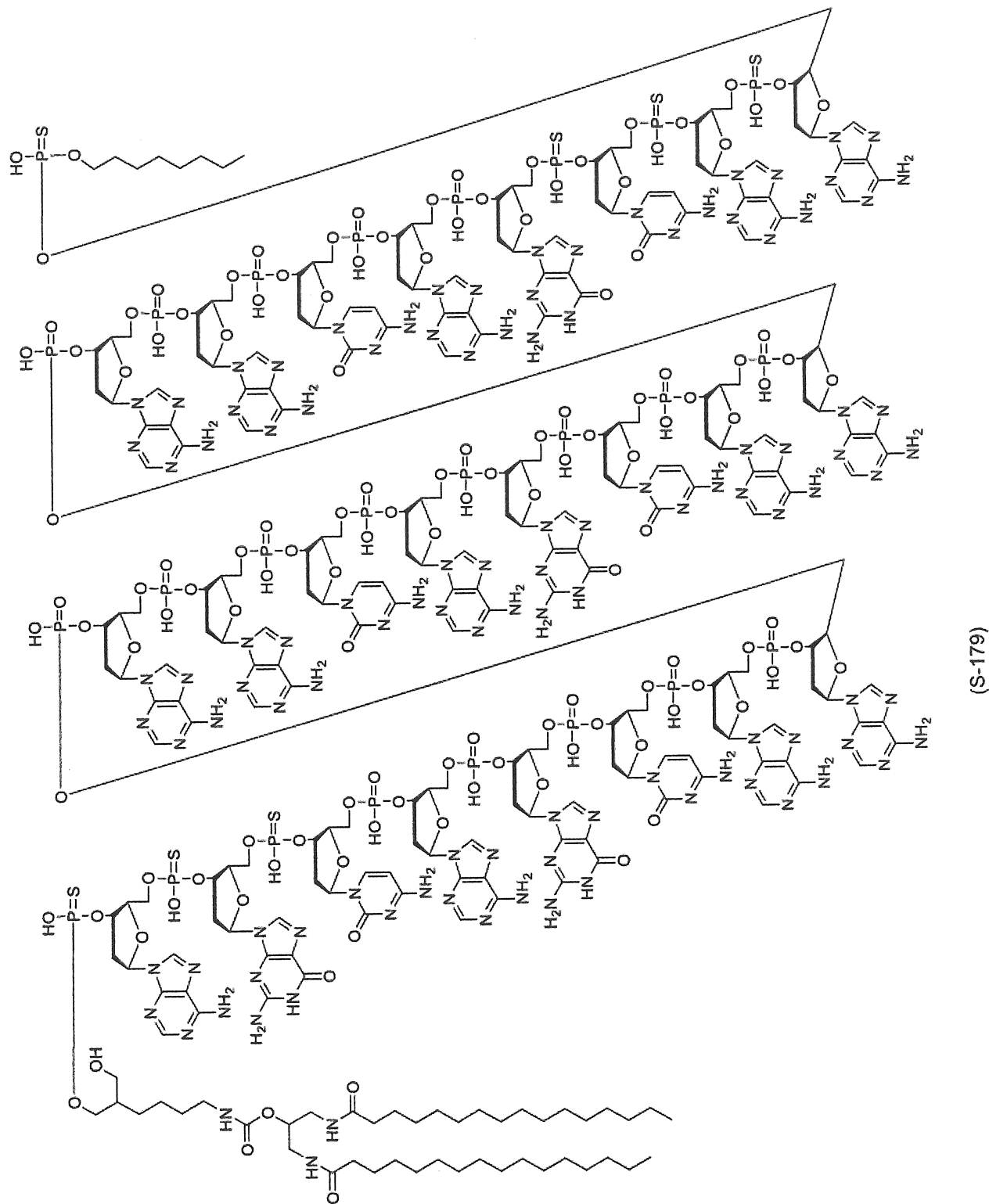
công thức:



công thức:



và công thức:



12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó dược phẩm này còn chứa kháng nguyên.

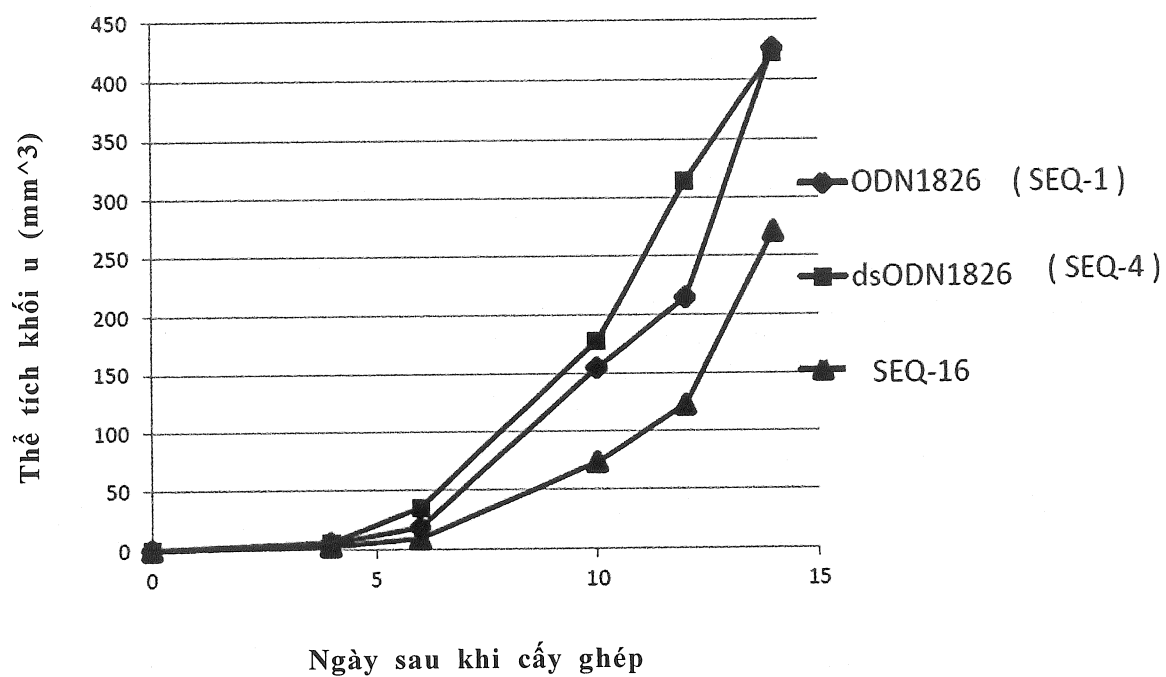
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó kháng nguyên là kháng nguyên vi sinh vật, kháng nguyên tự thân hoặc chất gây nghiện.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó kháng nguyên là kháng nguyên vi sinh vật, và kháng nguyên vi sinh vật là kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên vi rút hoặc kháng nguyên kí sinh trùng.

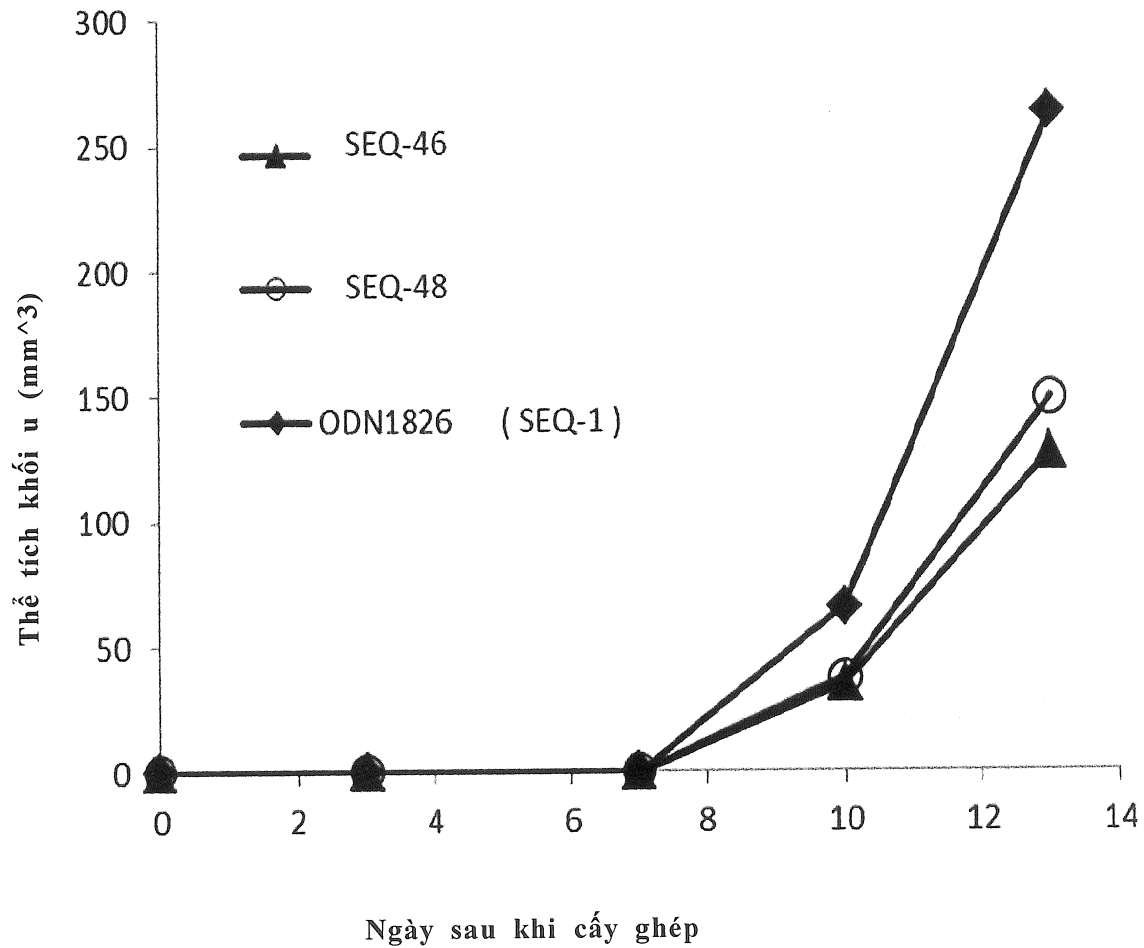
15. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó kháng nguyên là kháng nguyên tự thân, và kháng nguyên tự thân là kháng nguyên khối u, kháng nguyên liên quan đến bệnh Alzheimer, kháng nguyên kháng kháng thể người, hoặc kháng nguyên mà được biểu hiện từ các thành phần retrovirut nội sinh của người.

16. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó kháng nguyên là chất gây nghiện, và chất gây nghiện này là nicotin hoặc cocain.

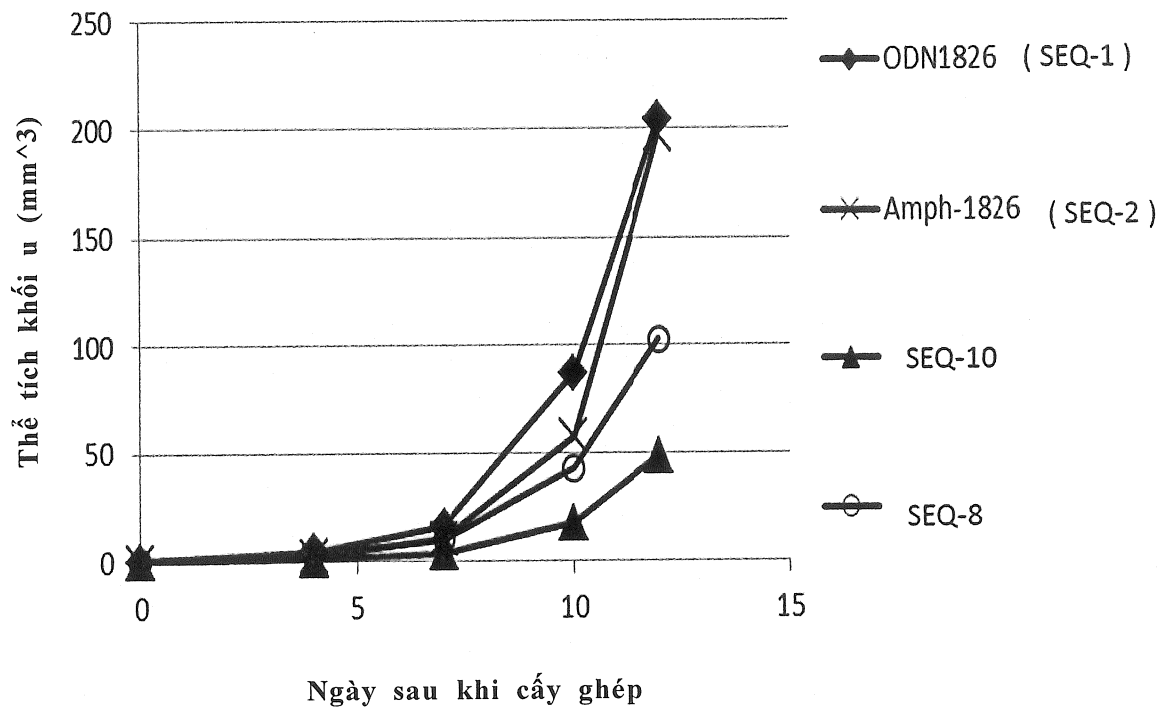
[Fig.1]



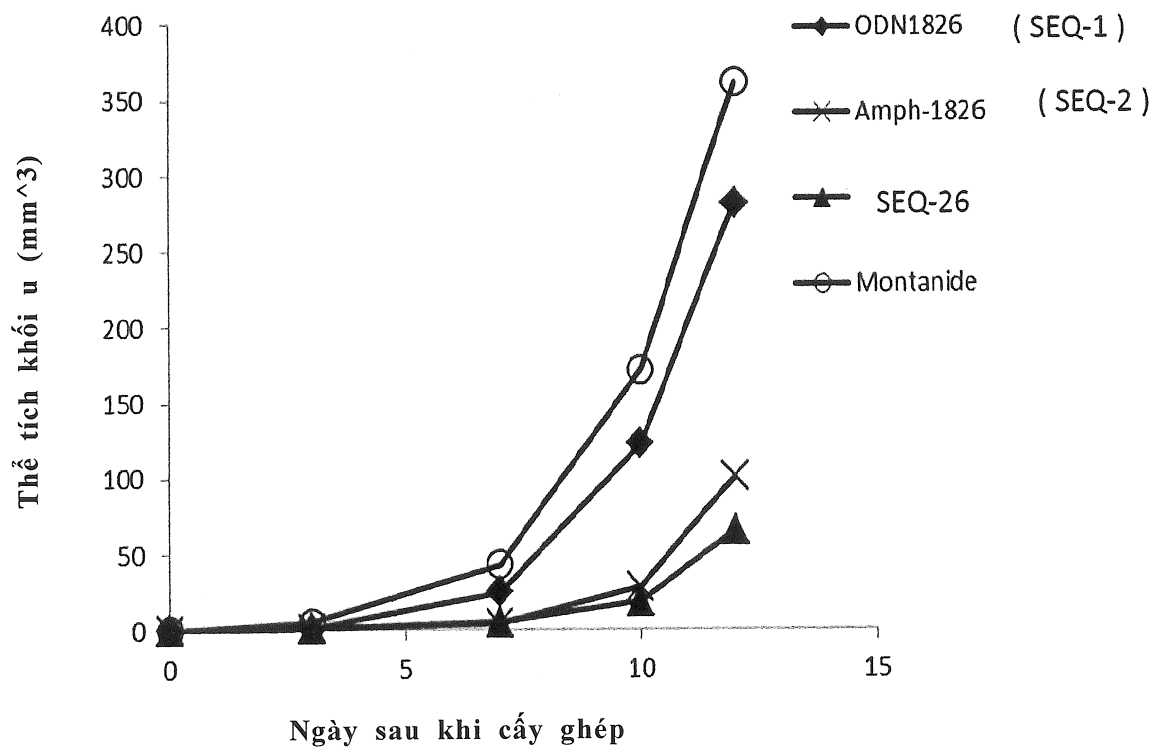
[Fig.2]



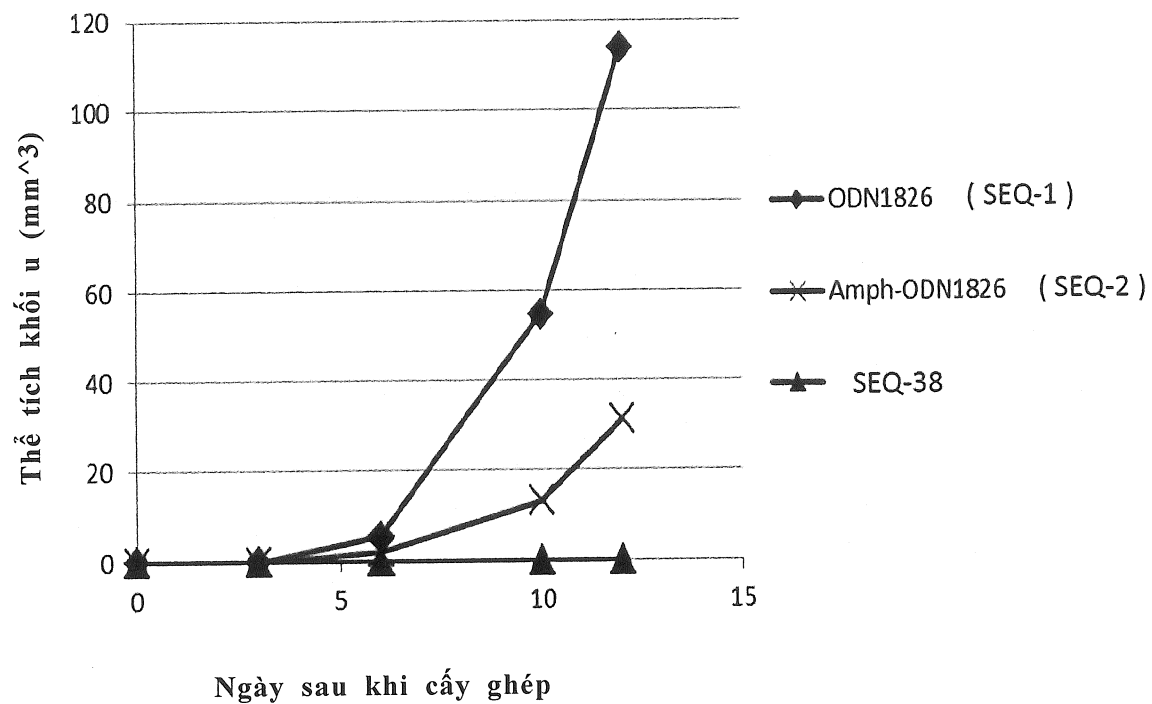
[Fig.3]



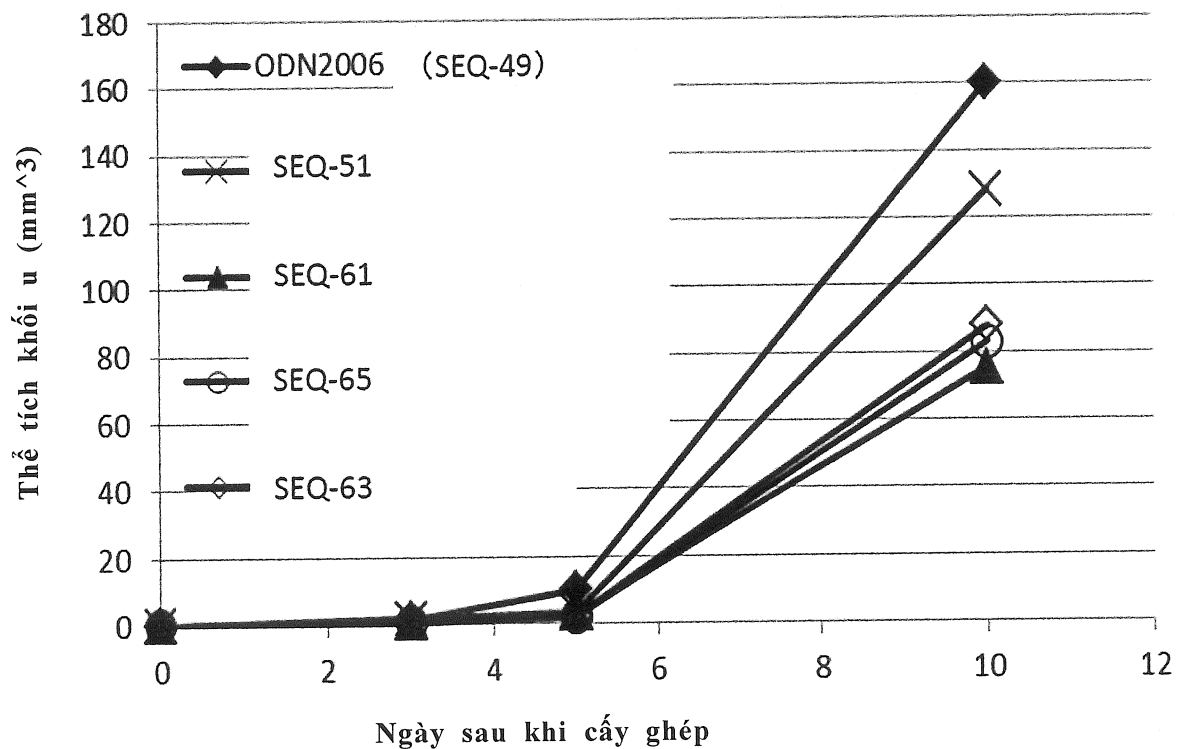
[Fig.4]



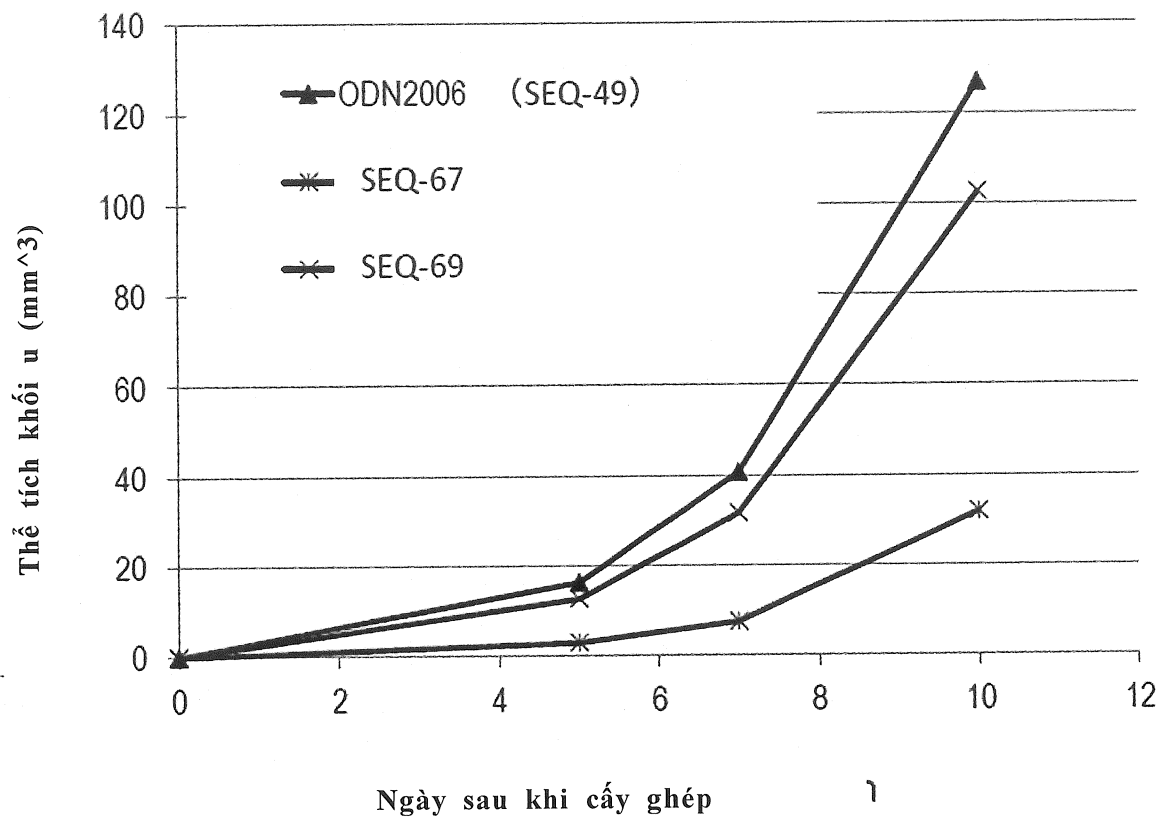
[Fig.5]



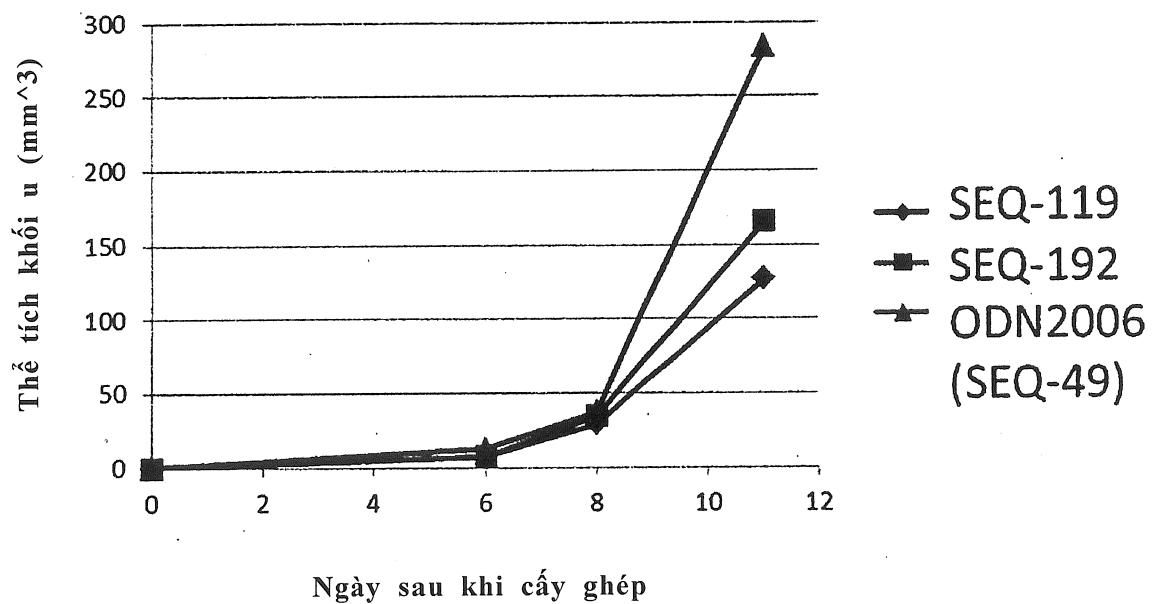
[Fig. 6]



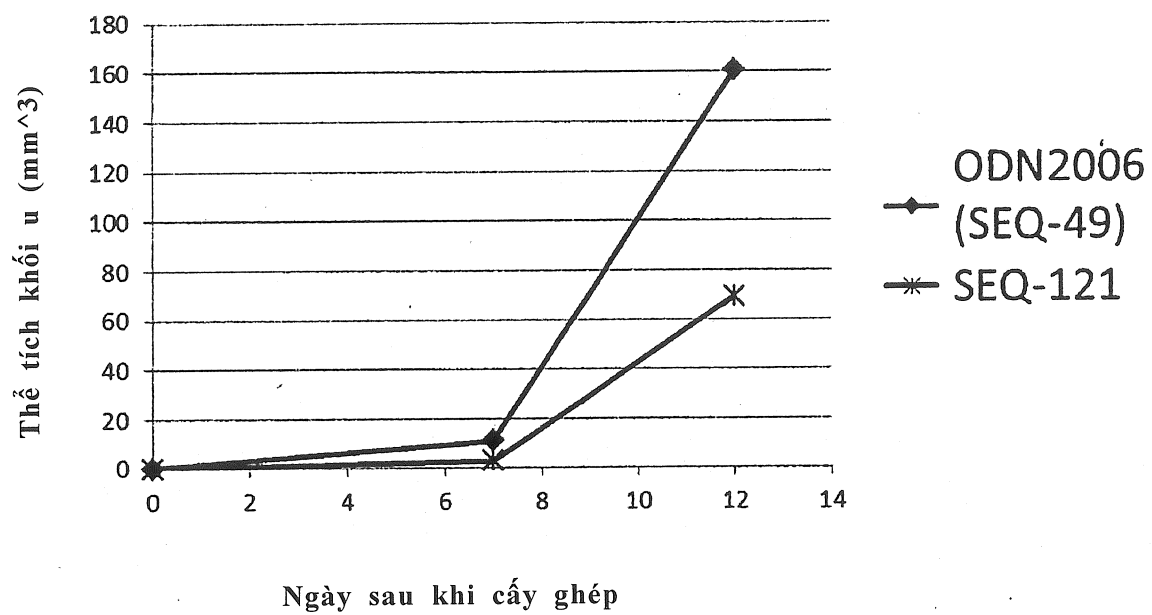
[Fig. 7]



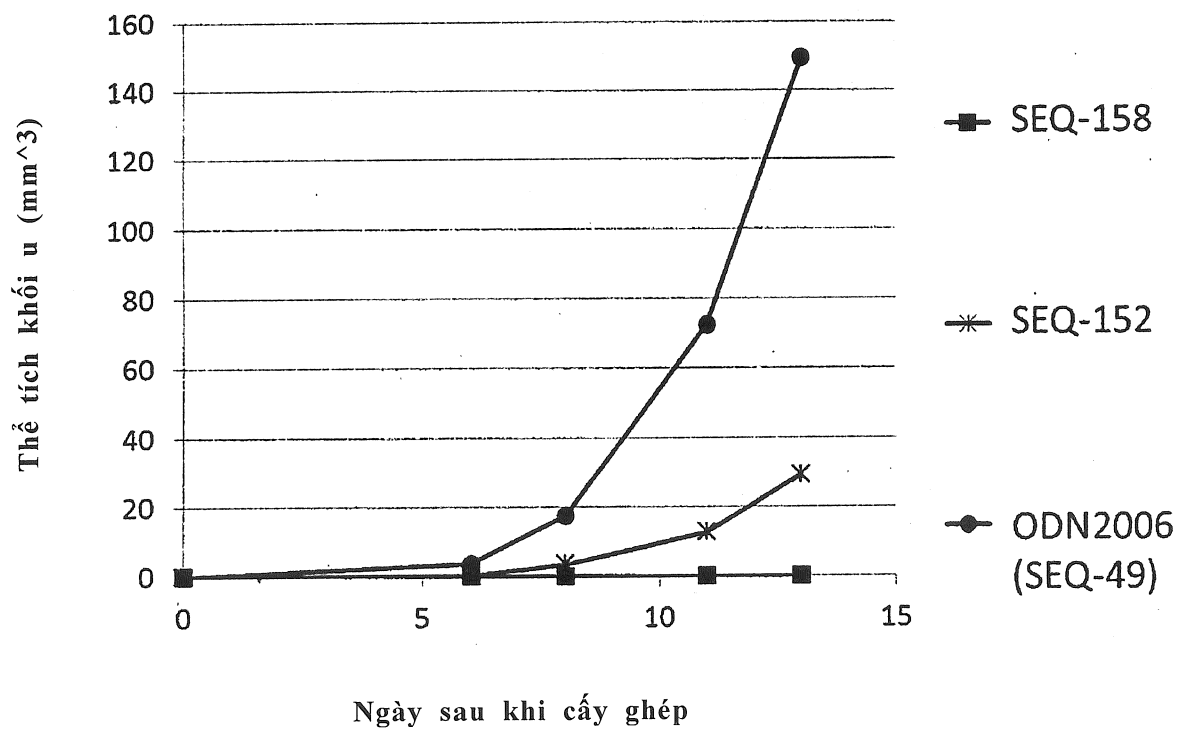
[Fig. 8]



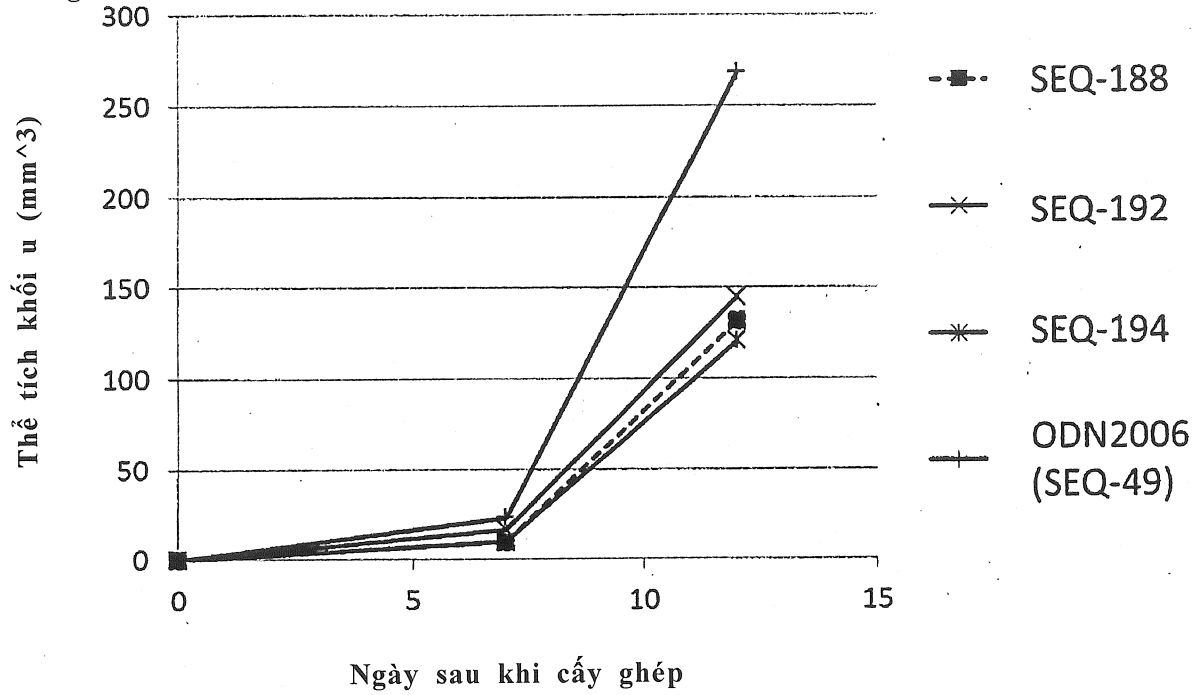
[Fig.9]



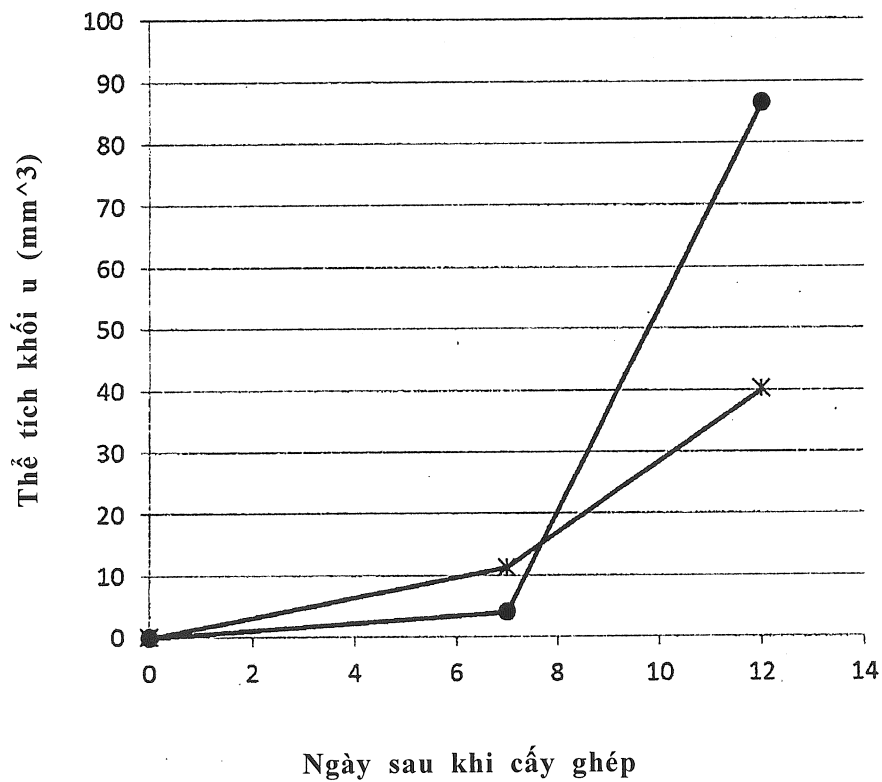
[Fig. 10]



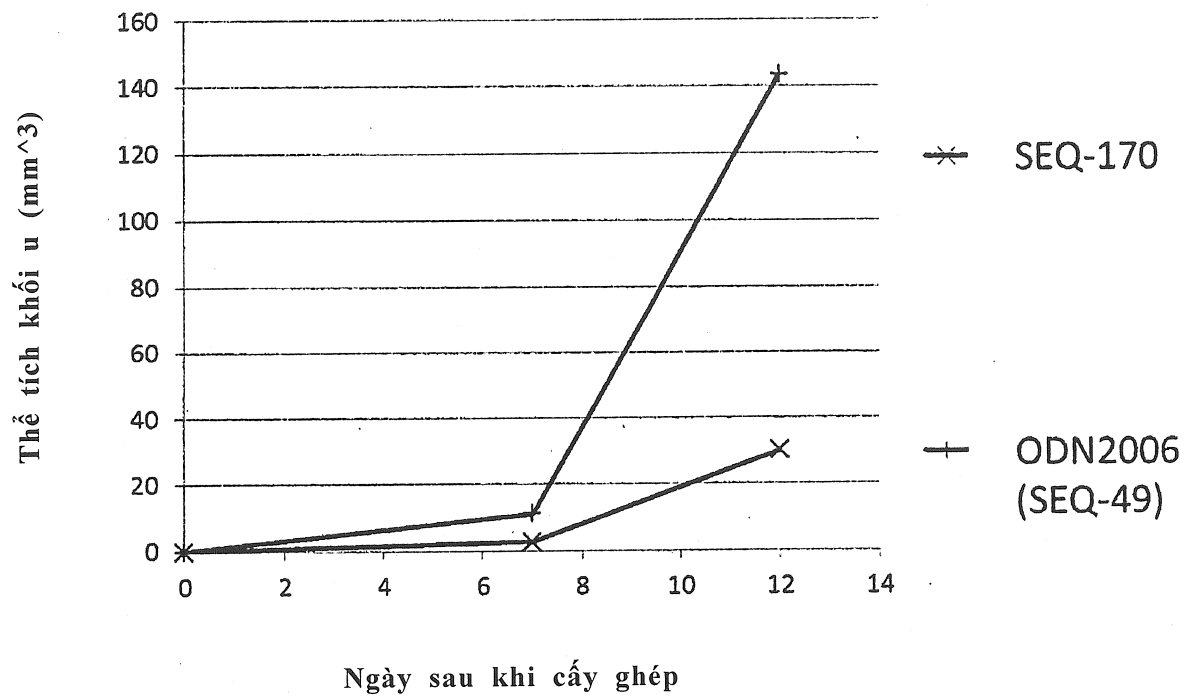
[Fig.11]



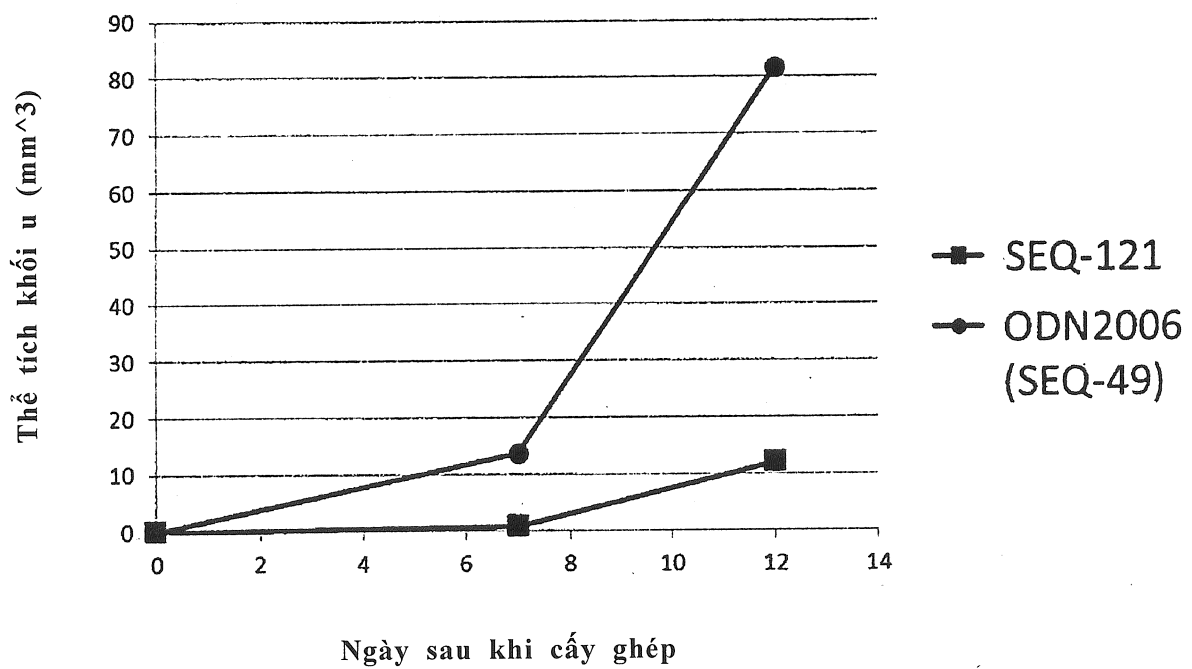
[Fig.12]



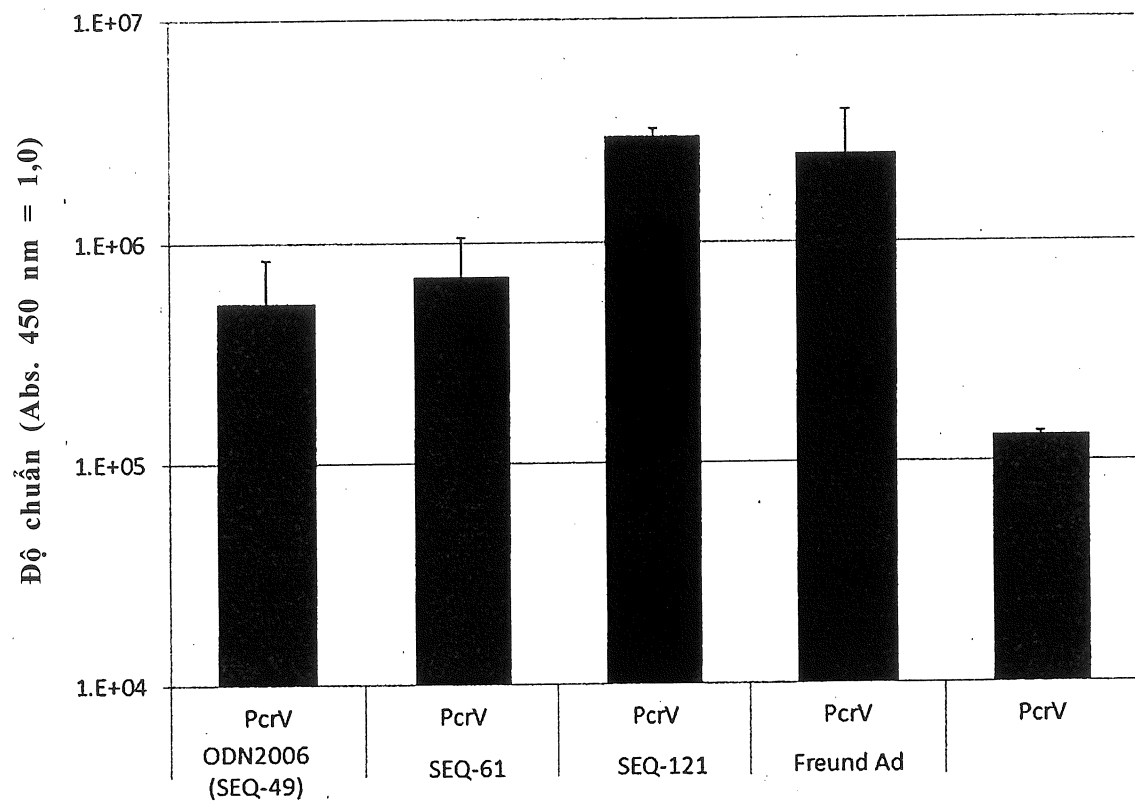
[Fig.13]



[Fig.14]



[Fig.15]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Shionogi & Co., Ltd.
 <120> DƯỢC PHẨM CHỨA OLIGONUCLEOTIT SỢI KÉP
 <130> 17P00022WO
 <160> 49
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit CpG
 <400> 1
 tccatgacgt tcctgacgtt
 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 2
 aacgtcagga acgtcatgga
 20
 <210> 3
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> oligonucleotit
 <400> 3
 aacgtcagga
 10
 <210> 4

<211> 15
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 4
aacgtcagga acgtc
15

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 5
aacgtcagga acgtcatgg
19

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 6
aacgtcagga acgtcatg
18

<210> 7
<211> 17
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> oligonucleotit

<400> 7
aacgtcagga acgtcat
17

<210> 8

<211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 8
 aacgtcagga acgtca
 16

<210> 9
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 9
 aacgtcagga acgt
 14

<210> 10
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 10
 aacgtcagga acg
 13

<210> 11
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 11
 aacgtcagga ac
 12

<210> 12

<211> 11
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 12
 aacgtcagga a
 11

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 13
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt
 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 14
 aacgacaaaa cgacaaaacg acga
 24

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 15
 aacgacaaaa cgacaaaacg ac
 22

<210> 16

<211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 16
 aacgacaaaa cgacaaaacg
 20

<210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 17
 aacgacaaaa cgacaaaa
 18

<210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 18
 aacgacaaaa cgacaa
 16

<210> 19
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 19
 aacgacaaaa cgaca
 15

<210> 20

<211> 15
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 20
 acgacaaaac gacga
 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 21
 caaaacgaca aaacg
 15

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit OVA

<400> 22

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5

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

<220>
 <223> peptit TRP2

<400> 23

Cys Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 24
 aacgacaaaa cgacaaa
 17

<210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 25
 aacgacaaaa cgacga
 16

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 26
 atcgactctc gagcggttctc
 20

<210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 27
 gagaacgctc gagagt
 16

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 28
 ggtgcatcga tgcagggggg
 20

<210> 29
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 29
 cccccctgca tcgatg
 16

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 30
 acaaaacgac aaaacgacga
 20

<210> 31
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 31
 aaaacgacga
 10

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit CpG

 <400> 32
 gggggacgat cgtcgggggg
 20

<210> 33
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 33
 ccgacgatcg tcccc
 16

<210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit CpG

 <400> 34
 tcgacgttcg tcgttcgctcg ttc
 23

<210> 35
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> oligonucleotit

 <400> 35
 gaacgacgaa cgtcga
 16

<210> 36
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 36
 tcgcgacggtt cgcccgacgt tcggta
 26

<210> 37
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 37
 cgggcgaacg tcgcga
 16

<210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 38
 tcgcgaacgt tcgccgcgtt cgaacgcgg
 29

<210> 39
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 39
 cggcgaacgt tcgcga
 16

<210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 40
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg
 22

<210> 41
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 41
 gcgccgaaaa cgacga
 16

<210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 42
 tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat
 25

<210> 43
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 43
 gttcgaacga cgacga
 16

<210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 44
 ggggacgacg tcgtgggggg g
 21

<210> 45
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 45
 ccacgacgtc gtcccc
 16

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit CpG

<400> 46
 tgactgtgaa cggtcgagat ga
 22

<210> 47
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 47
 cgaacgttca cagtca
 16

<210> 48
<211> 882
<212> ADN
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 48
atggaagtca gaaaccttaa tgccgctcgc gagctgttcc tggacgagct cctggccgcg
60
tcggcggcgc ctgccagtgc cgagcaggag gaactgctgg ccctgttgcg cagcgagcgg
120
atcgtgctgg cccacgccgg ccagccgctg agcgaggcgc aagtgtcaa ggcgctcgcc
180
tggttgctcg cggccaatcc gtccgcgcct ccggggcagg gcctcgaggt actccgcgaa
240
gtcctgcagg cacgtcggca gcccggtgcg cagtgggatc tgcgcgagtt cctggtgtcg
300
gcctatttca gcctgcacgg gcgtctcgac gaggatgtca tcggtgtcta caaggatgtc
360
ctgcagaccc aggacggcaa gcgcaaggcg ctgctcgacg agctcaaggc gctgaccgcg
420
gagttgaagg tctacagcgt gatccagtcg cagatcaacg ccgcgctgtc ggccaagcag
480
ggcatcagga tcgacgctgg cggtatcgat ctggtcgacc ccacgctata tggctatgcc
540
gtcggcgatc ccaggtggaa ggacagcccc gagtatgcgc tgctgagcaa tctggatacc
600
ttcagcggca agctgtcgat caaggatttt ctcagcggct cgccgaagca gagcggggag
660
ctcaagggcc tcagcgatga gtaccccttc gagaaggaca acaaccgggt cggcaatttc
720
gccaccacgg tgagcgaccg ctcgcgctccg ctgaacgaca aggtcaacga gaagaccacc
780
ctgctcaacg acaccagctc ccgctacaac tcggcgggtcg aggcgctcaa ccgcttcato
840
cagaaatacg acagcgtcct gcgcgacatt ctcagcgcga tc
882

<210> 49
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein PcrV tái tổ hợp (đuôi C-His)

<400> 49

Met Glu Val Arg Asn Leu Asn Ala Ala Arg Glu Leu Phe Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Glu Gln Glu Glu Leu
 20 25 30

Leu Ala Leu Leu Arg Ser Glu Arg Ile Val Leu Ala His Ala Gly Gln
 35 40 45

Pro Leu Ser Glu Ala Gln Val Leu Lys Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ala
 50 55 60

Ala Asn Pro Ser Ala Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Val Leu Arg Glu
 65 70 75 80

Val Leu Gln Ala Arg Arg Gln Pro Gly Ala Gln Trp Asp Leu Arg Glu
 85 90 95

Phe Leu Val Ser Ala Tyr Phe Ser Leu His Gly Arg Leu Asp Glu Asp
 100 105 110

Val Ile Gly Val Tyr Lys Asp Val Leu Gln Thr Gln Asp Gly Lys Arg
 115 120 125

Lys Ala Leu Leu Asp Glu Leu Lys Ala Leu Thr Ala Glu Leu Lys Val
 130 135 140

Tyr Ser Val Ile Gln Ser Gln Ile Asn Ala Ala Leu Ser Ala Lys Gln
 145 150 155 160

Gly Ile Arg Ile Asp Ala Gly Gly Ile Asp Leu Val Asp Pro Thr Leu

28880

				165					170					175		
Tyr	Gly	Tyr	Ala 180	Val	Gly	Asp	Pro	Arg 185	Trp	Lys	Asp	Ser	Pro 190	Glu	Tyr	
Ala	Leu 195	Leu	Ser	Asn	Leu	Asp	Thr 200	Phe	Ser	Gly	Lys	Leu 205	Ser	Ile	Lys	
Asp	Phe 210	Leu	Ser	Gly	Ser	Pro 215	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu 220	Leu	Lys	Gly	Leu	
Ser 225	Asp	Glu	Tyr	Pro	Phe 230	Glu	Lys	Asp	Asn	Asn 235	Pro	Val	Gly	Asn	Phe 240	
Ala	Thr	Thr	Val	Ser 245	Asp	Arg	Ser	Arg	Pro 250	Leu	Asn	Asp	Lys	Val 255	Asn	
Glu	Lys	Thr	Thr 260	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr 265	Ser	Ser	Arg	Tyr	Asn 270	Ser	Ala	
Val	Glu	Ala 275	Leu	Asn	Arg	Phe	Ile 280	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser 285	Val	Leu	Arg	
Asp	Ile 290	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Glu 295	His	His	His	His 300	His	His			