



(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)



1-0031268

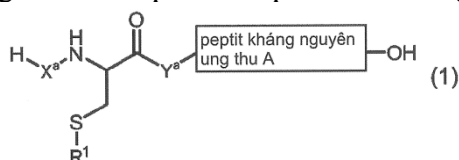
(51)⁷ C07K 7/06; A61P 35/00; C07K 7/08;
A61K 39/00; C07K 14/00

(13) B

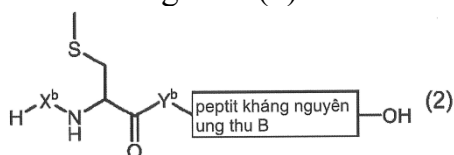
- (21) 1-2015-04130 (22) 28/03/2014
(86) PCT/JP2014/059336 28/03/2014 (87) WO 2014/157692 A1 02/10/2014
(30) 2013-072173 29/03/2013 JP; 2013-158383 31/07/2013 JP
(45) 25/03/2022 408 (43) 25/01/2016 334A
(73) 1. Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. (JP)
6-8, Dosho-machi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8524 Japan
2. INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. (JP)
13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 564-0053 Japan
(72) LI, Chiang Jia (CN); BAN, Hitoshi (JP); NISHIO, Yukihiro (JP); GOTO, Masashi (JP); NISHIHARA, Toshio (JP); TAKANASHI, Yosuke (JP).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) HỢP CHẤT LIÊN HỢP KHÁNG NGUYÊN PEPTIT WT1 VÀ DƯỢC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

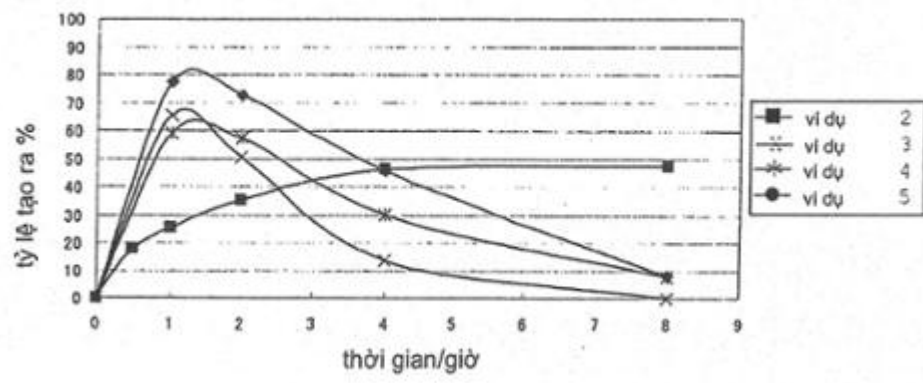
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (1):



trong đó, mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn và tương tự, peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, R^1 là nguyên tử hydro, nhóm có công thức (2):



trong đó, mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn và tương tự, peptit kháng nguyên ung thư B có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, và là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, hoặc peptit kháng nguyên ung thư C, và peptit kháng nguyên ung thư C có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, và là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II, có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, hoặc muối của nó, và tương tự. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và chế phẩm chứa hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực miễn dịch trị liệu bệnh ung thư và đề cập đến hợp chất liên hợp kháng nguyên peptit WT1, cụ thể là vắc xin liên hợp mà có thể được cắt bởi peptidaza ERAP1, thu được bằng cách liên hợp các tiền chất peptit có nguồn gốc từ protein kháng nguyên WT1 thông qua liên kết cộng hóa trị lưu huỳnh - lưu huỳnh và cảm ứng các tế bào T gây độc một cách hiệu quả. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và chế phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để tiêu diệt các tế bào ung thư trong cơ thể, sự miễn dịch tế bào, cụ thể là tế bào T gây độc (tế bào lympho T gây độc, tế bào T gây độc, sau đây được gọi là CTL) chủ yếu đóng vai trò quan trọng. CTL được tạo ra bởi sự biệt hóa và tăng sinh tế bào T tiền chất mà nhận biết phức hệ được tạo ra bởi kháng nguyên peptit có nguồn gốc từ protein kháng nguyên ung thư (peptit kháng nguyên ung thư) và phân tử MHC lớp I và tấn công các tế bào ung thư.

Gen ức chế bệnh ung thư của khối u Wilms, WT1 (gen WT1) được xem là protein kháng nguyên ung thư mới đối với bệnh bạch cầu và khối u thể bươu (xem tài liệu phi sáng chế 1).

Ví dụ, đối với protein WT1, các peptit kháng nguyên ung thư sau đây mà được liên kết với và được trình diện bởi MHC lớp I đã được báo cáo (xem các tài liệu sáng chế 1 và 2).

Peptit WT1₁₂₆₋₁₃₄: RMFPNAPYL (Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu) (SEQ ID NO: 2),

Peptit WT1₂₃₅₋₂₄₃: CMTWNQMNL (Cys-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu) (SEQ ID NO: 3), 7

Peptit WT1₁₀₋₁₈: ALLPAVPSL (Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Pro-Ser-Leu) (SEQ ID NO: 5),

Peptit WT1₁₈₇₋₁₉₅: SLGEQQYSV (Ser-Leu-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val) (SEQ ID NO: 6),

Peptit WT1₃₀₂₋₃₁₀: RVPGVAPTL (Arg-Val-Pro-Gly-Val-Ala-Pro-Thr-Leu) (SEQ ID NO: 7) và tương tự.

Trong miễn dịch trị liệu bệnh ung thư, sự kích hoạt các tế bào T hỗ trợ cũng là quan trọng để kích hoạt các tế bào T khác kể cả CTL. Nói chung, protein kháng nguyên bị suy biến bởi tiêu thể nội bào, một phần của các mảnh peptit được cấu thành bởi peptit chứa khoảng từ 13 đến 17 gốc axit amin liên kết với phân tử MHC lớp II dưới dạng kháng nguyên peptit và được trình diện đến phức hệ tế bào T hỗ trợ -TCR·CD3 để kích hoạt các tế bào T hỗ trợ. Ví dụ, đối với protein WT1, các peptit kháng nguyên ung thư sau đây mà được trình diện bằng cách liên kết với MHC lớp II đã được báo cáo (xem các tài liệu từ 3 đến 5).

Peptit WT1₃₃₂₋₃₄₇: KRYFKLSHLQMHSRKH (Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His) (SEQ ID NO: 8),

Peptit WT1₃₂₈₋₃₄₉: PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (Pro-Gly-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His-Thr-Gly) (SEQ ID NO: 10),

Peptit WT1₁₂₂₋₁₄₀: SGQARMFPNAPYLPSCLES (Ser-Gly-Gln-Ala-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-Pro-Ser-Cys-Leu-Glu-Ser) (SEQ ID NO: 11) và tương tự.

Tự bản thân protein kháng nguyên hoặc kháng nguyên peptit có nguồn gốc từ protein kháng nguyên nêu trên chủ yếu được sử dụng làm vắc xin kháng nguyên của WT1 (xem tài liệu phi sáng chế 2). Do vắc xin ung thư sử dụng protein thường chứa nhiều peptit kháng nguyên ung thư, nên nó có thể cảm ứng đồng thời nhiều CTL và các tế bào T hỗ trợ. Mặt khác, do vắc xin protein ung thư có các vấn đề về việc kiểm soát nguồn cung và chất lượng ổn định, nên các peptit mà thuận tiện trong việc kiểm soát sản xuất và chất lượng được sử dụng một cách rộng rãi làm kháng nguyên ung thư của WT1. Tuy nhiên, nói chung do các vắc xin peptit đã biết chủ yếu được cấu thành bởi kháng nguyên peptit được trình diện MHC lớp I riêng rẽ, nên cần thiết tăng cường hiệu quả cảm ứng về CTL là điều được đề cập đến trong những năm gần đây (xem tài liệu phi sáng chế 3).

Một trong những cách thức giải quyết cho vấn đề này là kháng nguyên

peptit đa hóa trị trình diện vắc xin ung thư peptit WT1. Hỗn hợp vắc xin chứa hỗn hợp của các kháng nguyên peptit được trình diện bởi MHC lớp I và lớp II (xem tài liệu phi sáng chế 4), vắc xin peptit mạch dài chứa các kháng nguyên peptit được trình diện bởi MHC lớp I và lớp II, mà được liên kết bởi liên kết amit, và tương tự đã được báo cáo làm vắc xin ung thư peptit (xem tài liệu phi sáng chế 5). Tuy nhiên, đối với trường hợp hỗn hợp vắc xin, do mỗi kháng nguyên peptit bao gồm các axit amin thể hiện các đặc tính khác nhau, nên việc phát triển chế phẩm tối ưu có khả năng cảm ứng CTL một cách hiệu quả tương ứng với nó thường là vấn đề nan giải. Đối với trường hợp vắc xin peptit mạch dài, đôi khi việc sản xuất vắc xin này đặt ra các vấn đề như với tương tự protein. Ngoài ra, do các kháng nguyên peptit được trình diện bởi lớp I và lớp II được liên kết qua đệm peptit bất kỳ trong vắc xin peptit mạch dài, nên khó kiểm soát và dự báo về các vị trí phân cắt bởi enzym nội bào. Trong khi đó, chất nhũ trùng peptit trong đó hai đơn phân peptit được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua đã được báo cáo (xem tài liệu sáng chế 6). Khác với hỗn hợp vắc xin, hai peptit đơn được liên kết và do đó, chúng có đặc tính vật lý riêng biệt và có thể được sản xuất theo cách thông thường. Mặt khác, để tạo ra thể liên hợp, đòi hỏi các peptit kháng nguyên ung thư WT1 chứa xystein trong trình tự axit amin của nó, và do đó làm hạn chế khả năng ứng dụng của các peptit này. Ngoài ra, hợp chất được biến đổi thu được bằng cách ngưng tụ xystein đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư bằng xystein, glutation hoặc axit thioglycolic bởi liên kết disulfua cũng đã được báo cáo (xem tài liệu sáng chế 7).

Quá trình trình diện peptit kháng nguyên ung thư trên MHC lớp I đòi hỏi các peptidaza. Trong số các peptidaza này, aminopeptidaza mô lưới nội chất 1 (sau đây được gọi là ERAP1) là một trong số các enzym cắt trong mô lưới nội chất (sau đây được gọi là ER), và đã được báo cáo để nhận biết trình tự kháng nguyên peptit đặc hiệu và độ dài peptit và phân cắt tiền chất peptit kháng nguyên ung thư khỏi đầu chặn mạch N để kiểm soát độ dài tối ưu cho việc liên kết với MHC lớp I (xem các tài liệu phi sáng chế 6-8). Tuy nhiên, cho đến nay không có bất kỳ báo cáo nào về tiền chất kháng nguyên ung thư peptit WT1 chứa xystein, mà được kiểm soát về độ dài của nó từ đầu chặn mạch N, bằng chức năng cắt của ERAP1.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 00/06602

Tài liệu sáng chế 2: WO 00/18795

Tài liệu sáng chế 3: WO 2005/045027

Tài liệu sáng chế 4: WO 2007/047764

Tài liệu sáng chế 5: WO 2007/120673

Tài liệu sáng chế 6: WO 2004/063217

Tài liệu sáng chế 7: WO 2007/063903

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: The Journal of Immunology, 2000; 164(4); 1873-1880

Tài liệu phi sáng chế 2: The Oncologist, 2012; 17(2); 250-259

Tài liệu phi sáng chế 3: Cancer Journal, 2011; 17(5); 343-350

Tài liệu phi sáng chế 4: Blood, 2010; 166(2); 171-179

Tài liệu phi sáng chế 5: Cancers, 2011; 3; 3991-4009

Tài liệu phi sáng chế 6: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005; 102(47); 17107-17112

Tài liệu phi sáng chế 7: The Journal of Immunology, 2009; 183; 5526-5536

Tài liệu phi sáng chế 8: The Journal of Immunology, 2010; 184; 4725-4732

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Sáng chế đề xuất hợp chất liên hợp kháng nguyên peptit WT1, cụ thể là vắc xin liên hợp WT1 mà cảm ứng CTL một cách hiệu quả.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu kỹ lưỡng với những nỗ lực để giải quyết vấn đề nêu trên, và đã hình thành nên ý tưởng bổ sung xystein vào peptit kháng nguyên ung thư WT1 khi xem xét đến việc chấp nhận vắc xin liên hợp, và đã xác nhận thêm rằng các kết quả thử nghiệm được lý và tương tự sử dụng mẫu thử động vật in vivo đã gợi dẫn rõ ràng rằng ERAP1 phân cắt xystein khỏi đầu chặn

mạch N của tiền chất peptit kháng nguyên ung thư WT1 mà được tạo ra bởi sự phân cắt tiêu giảm nội bào của liên kết disulfua, để chuyển hóa một cách hiệu quả tiền chất này thành peptit kháng nguyên ung thư, mà đến lượt mình lại dẫn đến việc phát hiện ra kháng nguyên peptit đa hóa trị trình diện vắc xin liên hợp có khả năng cảm ứng CTL trong cơ thể, và hoàn thành sáng chế.

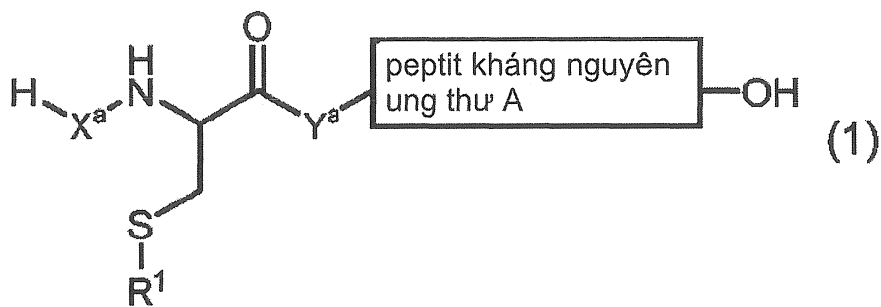
Cụ thể là, trong quá trình nghiên cứu để giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã đạt được ý tưởng về phương pháp đưa xystein, mà là cần thiết để tạo ra thể liên hợp của hai peptit kháng nguyên ung thư WT1 khác nhau, vào vị trí bất kỳ trong số đầu chặn mạch N hoặc đầu chặn mạch C, mà không làm ảnh hưởng đến sự trình diện kháng nguyên bởi MHC lớp I. Kết quả của việc nghiên cứu bổ sung là, các tác giả sáng chế đã tạo ra peptit bằng cách đưa từ 0 đến 5 axit amin chứa xystein vào đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư WT1, và thể liên hợp của các peptit này chứa liên kết disulfua thông qua xystein. Ngoài ra, lần đầu tiên các tác giả sáng chế đã xác nhận được rằng peptit và thể liên hợp nêu trên là dễ bị cắt bởi ERAP1 in vitro và/hoặc in vivo, mà đến lượt mình lại dẫn đến sự hình thành của peptit kháng nguyên ung thư và nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Trong khi việc phát triển kháng nguyên peptit WT1 đa hóa trị mới trình diện trong vắc xin ung thư peptit, mà có thể dễ dàng được sản xuất, có thể ứng dụng cho nhiều vắc xin ung thư peptit, và cảm ứng CTL với hiệu quả cao, là điều được mong muốn, thì thể liên hợp được phát hiện bởi các tác giả sáng chế cho phép việc phát triển vắc xin liên hợp WT1 mà cảm ứng CTL một cách hiệu quả, là ưu việt về các đặc tính lý hóa, có thể dễ dàng được sản xuất, đơn giản hóa việc quản lý sản xuất, và có thể ứng dụng cho nhiều vắc xin.

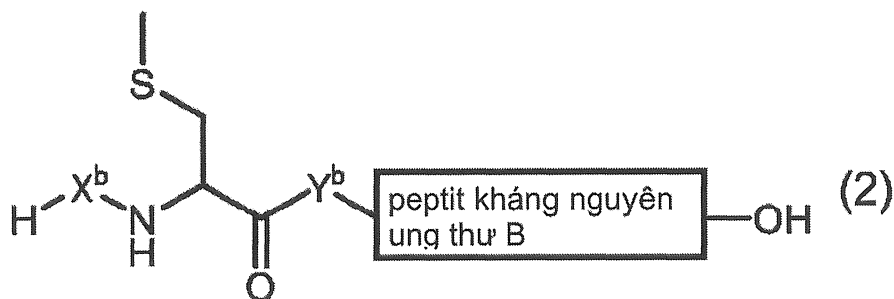
Do đó, sáng chế đề xuất các giải pháp sau:

I. Phương án thứ nhất:

1. Hợp chất có công thức (1):



trong đó mỗi trong số X^{a} và Y^{a} độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^{a} và tổng số gốc axit amin đối với Y^{a} là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A này liên kết với Y^{a} trong công thức (1), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư A này liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (1), R^1 là nguyên tử hydro, nhóm có công thức (2):



trong đó mỗi trong số X^{b} và Y^{b} độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^{b} và tổng số gốc axit amin đối với Y^{b} là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư B có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, và là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư B liên kết với Y^{b} trong công thức (2), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư B liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (2), và nhóm thioete trong công thức (2) liên kết với nhóm thioete trong công thức (1), hoặc peptit kháng nguyên ung thư C, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, và là peptit WT1 được giới hạn bởi

MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, và nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C liên kết với nhóm thioete trong công thức (1), miễn là khi R^1 là nguyên tử hydro, thì trình tự của hợp chất có công thức (1) là không giống với một phần trình tự của protein WT1, hoặc muối được dụng của nó;

2. Hợp chất theo mục 1, trong đó X^a là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^a và Y^a độc lập là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^a là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, hoặc X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

3. Hợp chất theo mục 1 hoặc 2, trong đó X^a là liên kết đơn, và Y^a là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

4. Hợp chất theo mục 1 hoặc 2, trong đó X^a là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, và Y^a là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

5. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

6. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

7. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 6, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được

chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

8. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 7, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

hoặc muối được dụng của nó;

9. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R^1 là nguyên tử hydro, hoặc muối được dụng của nó;

10. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 9, trong đó hợp chất có công thức (1) là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),

CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),

CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),

CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),

CSLGEQQYSV (SEQ ID NO: 17) và

CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18),

hoặc muối được dụng của nó;

11. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R^1 là nhóm có công thức (2), hoặc muối được dụng của nó;

12. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11, trong đó X^b là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^b và Y^b độc lập là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc X^b là liên kết

đơn và Y^b là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^b là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, hoặc X^b là liên kết đơn và Y^b là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

13. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 12, trong đó X^b là liên kết đơn, và Y^b là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

14. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 12, trong đó X^b là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

15. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11 đến 14, trong đó mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

16. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11 đến 15, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

17. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 16, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

18. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11 đến 17, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
 CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),
 ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
 SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và
 RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

hoặc muối được dụng của nó;

19. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 18, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (3):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

20. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R¹ là peptit kháng nguyên ung thư C, hoặc muối được dụng của nó;

21. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 20, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

22. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 20 đến 21, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3), hoặc peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

23. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 20 đến 22, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

hoặc muối được dụng của nó;

24. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 20 đến 23, trong đó

hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (4):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

25. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 20, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 14 đến 30 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

26. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 20 và 25, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),

SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 10 - 11 và 19 - 24 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ, hoặc muối được dụng của nó;

27. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 20 và từ 25 đến 26, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),

SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

hoặc muối được dụng của nó;

28. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 20 và từ 25 đến 27, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (6):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (7):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (8):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc hợp chất có công thức (9):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

29. Dược phẩm chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 28, hoặc muối được dụng của nó và chất mang được dụng;

30. Dược phẩm theo mục 29, mà được sử dụng làm vắc xin ung thư;

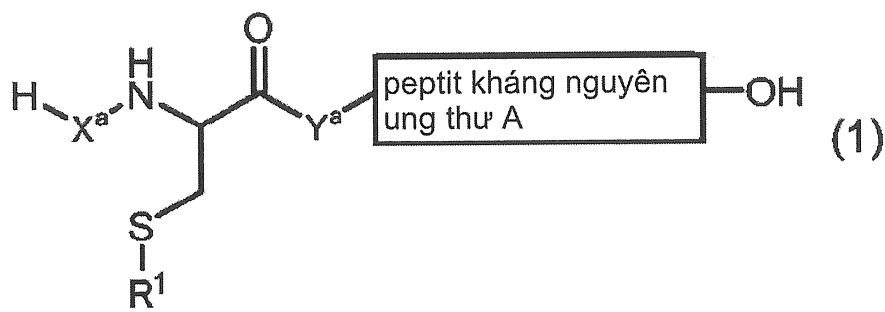
31. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 28 hoặc muối được dụng của nó được sử dụng để sản xuất vắc xin ung thư;

32. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 28 hoặc muối được dùng của nó được sử dụng cho bệnh nhân dương tính với WT1 với lượng có tác dụng chữa bệnh hoặc phòng bệnh để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư; và

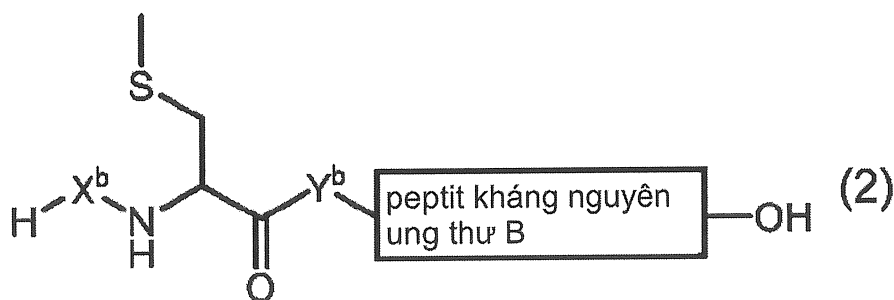
33. Phương pháp thu hai epitop (vị trí quyết định kháng nguyên) được giới hạn bởi MHC lớp I khác nhau, hoặc epitop được giới hạn bởi MHC lớp I và epitop được giới hạn bởi MHC lớp II, bao gồm việc cho hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 28 hoặc muối được dùng của nó phản ứng với ERAP1.

II. Phương án thứ hai:

1. Hợp chất có công thức (1):



trong đó mỗi trong số X^a và Y^a độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^a và tổng số gốc axit amin đối với Y^a là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với Y^a trong công thức (1), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (1), R^1 là nguyên tử hydro, nhóm có công thức (2):



trong đó mỗi trong số X^b và Y^b độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai

có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^b và gốc axit amin đối với Y^b là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư B có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A trong trình tự này và là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư B liên kết với Y^b trong công thức (2), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư B liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (2), và nhóm thioete trong công thức (2) liên kết với nhóm thioete trong công thức (1), hoặc peptit kháng nguyên ung thư C, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I khác với peptit kháng nguyên ung thư A trong trình tự này và có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, và nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C liên kết với nhóm thioete trong công thức (1), miễn là khi R^1 là nguyên tử hydro, thì trình tự của hợp chất có công thức (1) là không giống với một phần trình tự của protein WT1, hoặc muối được dụng của nó;

2. Hợp chất theo mục 1, trong đó X^a là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^a và Y^a độc lập là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^a là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, hoặc X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc X^a và Y^a là mỗi liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

3. Hợp chất theo mục 1 hoặc 2, trong đó X^a là liên kết đơn, và Y^a là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

4. Hợp chất theo mục 1 hoặc 2, trong đó X^a là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, và Y^a là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

5. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

6. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

7. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 6, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

8. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 7, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

hoặc muối được dụng của nó;

9. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R^1 là nguyên tử hydro, hoặc muối được dụng của nó;

10. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 9, trong đó hợp chất có công thức (1) là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),

CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),

CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),

CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),

CSLGEEQQYSV (SEQ ID NO: 17) và

CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18),

hoặc muối được dụng của nó;

11. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R^1 là nhóm có công thức (2), hoặc muối được dụng của nó;

12. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11, trong đó X^b là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^b và Y^b độc lập là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc X^b là liên kết đơn và Y^b là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^b là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, hoặc X^b là liên kết đơn và Y^b là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

13. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 12, trong đó X^b là liên kết đơn, và Y^b là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

14. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11 đến 12, trong đó X^b là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

15. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 11 đến 14, trong đó mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

16. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 15, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

17. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 16, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7 nhưng bao gồm sự biến đổi của (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

18. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 17, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

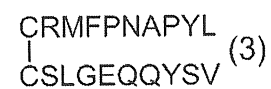
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

hoặc muối được dụng của nó;

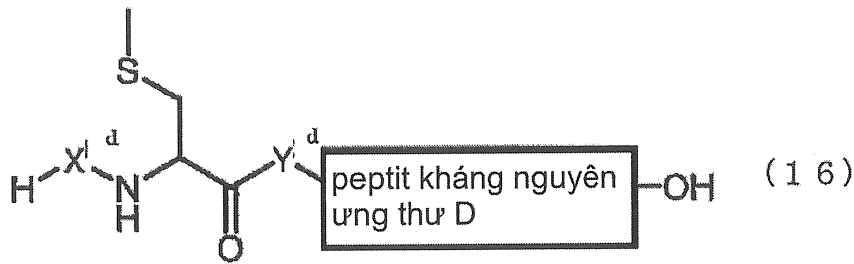
19. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 18, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (3):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

20. Hợp chất theo mục 13, trong đó Y^b là gốc alanin, hoặc muối được dụng của nó;

21. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 11 đến 13 và 20, trong đó, khi peptit kháng nguyên ung thư B là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có một gốc xystein, thì nhóm thioete trong peptit kháng nguyên ung thư B được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16):



trong đó mỗi trong số X^d và Y^d độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^d và tổng số gốc axit amin đối với Y^d là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư D là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư D liên kết với Y^d trong công thức (16), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư D liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (16), hoặc liên kết với nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư E, mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, hoặc muối được dụng của nó;

22. Hợp chất theo mục 21, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

23. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 22, trong đó peptit kháng nguyên ung thư B là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

hoặc muối được dụng của nó;

24. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 23, trong đó X^d là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^d và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai độc lập có 1 gốc axit amin, hoặc X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^d là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn, hoặc X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc mỗi trong số X^d và Y^d là liên kết đơn,

hoặc muối được dụng của nó;

25. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 24, trong đó X^d là liên kết đơn, Y^d là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

26. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 24, trong đó X^d là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai gồm có một gốc axit amin, và Y^d là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

27. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 26, trong đó mỗi trong số X^d và Y^d là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

28. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 27, trong đó peptit kháng nguyên ung thư D là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 14 đến 30 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

29. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 28, trong đó peptit kháng nguyên ung thư D là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),

SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),

SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

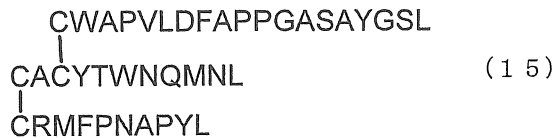
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) và

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),

hoặc muối được dụng của nó;

30. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, từ 11 đến 13 và từ 20 đến 29, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (15):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

31. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 23, trong đó peptit kháng nguyên ung thư E là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 14 đến 30 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

32. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 21 đến 23 và 31, trong đó peptit kháng nguyên ung thư E là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

hoặc muối được dụng của nó;

33. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó R¹ là peptit kháng nguyên ung thư C, hoặc muối được dụng của nó;

34. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 33, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

35. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 33 đến 34, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, hoặc muối được dụng của nó;

36. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 33 đến 35, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

hoặc muối được dụng của nó;

37. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và từ 33 đến 36, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (4):

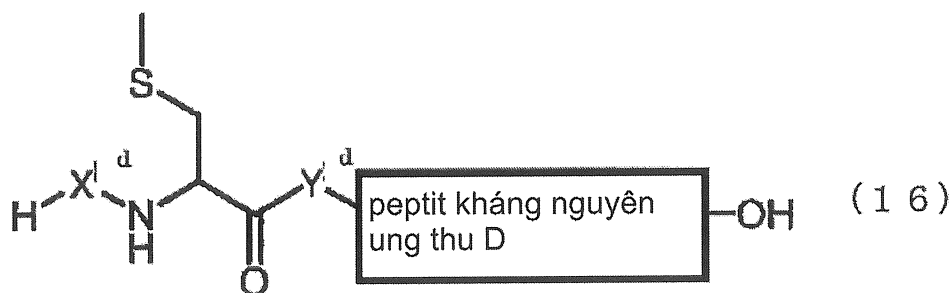


trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

38. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 33, trong đó, khi peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein còn được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C, thì nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit mà được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16):



trong đó mỗi trong số X^d và Y^d độc lập là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có từ 1 đến 4 gốc axit amin, và tổng số gốc axit amin đối với X^d và gốc axit amin

đôi với Y^d là số nguyên từ 0 đến 4, peptit kháng nguyên ung thư D là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư D liên kết với Y^d trong công thức (16), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư D liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (16), hoặc liên kết với nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư E, mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II gồm có 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, hoặc muối được dụng của nó;

39. Hợp chất theo mục 38, trong đó peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C là dipeptit chứa CA, hoặc muối được dụng của nó;

40. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 39, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 15 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

41. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 40, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

hoặc muối được dụng của nó;

42. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 41, trong đó X^d là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn, hoặc mỗi trong số X^d và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai độc lập có 1 gốc axit amin, hoặc X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai có 2 gốc axit amin, hoặc X^d là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn, hoặc X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, hoặc mỗi trong số X^d và Y^d là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

43. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 42, trong đó X^d là liên kết đơn, và Y^d là liên kết đơn, gốc alanin, gốc leuxin hoặc gốc metionin, hoặc muối được dụng của nó;

44. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 42, trong đó X^d là liên kết đơn hoặc nhóm peptit hóa trị hai có 1 gốc axit amin, và Y^d là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

45. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 44, trong đó mỗi trong số X^d và Y^d là liên kết đơn, hoặc muối được dụng của nó;

46. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 45, trong đó peptit kháng nguyên ung thư D là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 14 đến 30 gốc axit amin, hoặc muối được dụng của nó;

47. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 46, trong đó peptit kháng nguyên ung thư D là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),

SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),

SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

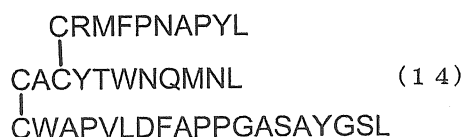
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) và

WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244)

hoặc muối được dụng của nó;

48. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 47, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (14):



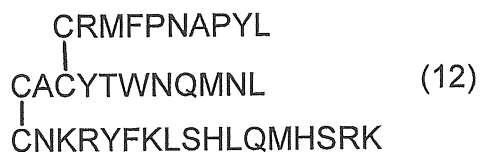
trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

49. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 41 và 44, trong đó peptit kháng nguyên ung thư E là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24)

hoặc muối được dùng của nó;

50. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 38 đến 41 và 49, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (12):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dùng của nó;

51. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 và 33, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 14 đến 30 gốc axit amin, hoặc muối được dùng của nó;

52. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 33 và 51, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), hoặc

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 10 - 11 và 19 - 24 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ, hoặc muối được dụng của nó;

53. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 33 và 51 đến 52, trong đó peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

hoặc muối được dụng của nó;

54. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, 33 và từ 51 đến 53, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (6):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (7):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (8):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc hợp chất có công thức (9):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

55. Dạng được biến đổi của peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin;

56. Dạng được biến đổi theo mục 55, mà là trình tự axit amin sau:

CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) hoặc

WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243);

57. Hợp chất có công thức (10):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

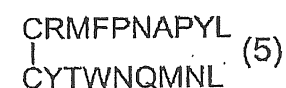
58. Chế phẩm chứa hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có công thức (3):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (4):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243);

59. Dược phẩm chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54 và 57, hoặc muối dược dụng của nó, hoặc chế phẩm theo điểm 58 và chất mang dược dụng;

60. Dược phẩm theo mục 59, mà được sử dụng làm vắc xin ung thư;

61. Hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54 và 57, hoặc muối dược dụng của nó, hoặc chế phẩm theo điểm 58 được sử dụng để sản xuất vắc xin ung thư;

62. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54 và 57 hoặc muối dược dụng của nó hoặc chế phẩm theo mục 58 dùng cho bệnh nhân dương tính với WT1 với lượng có tác dụng chữa bệnh hoặc phòng bệnh để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư;

63. Phương pháp thu hai epitop được giới hạn bởi MHC lớp I khác nhau, hoặc epitop được giới hạn bởi MHC lớp I và epitop được giới hạn bởi MHC lớp II, bao gồm việc cho hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54 và 57 hoặc muối dược dụng phản ứng với ERAP1; và

64. Phương pháp tổng hợp hợp chất, bao gồm các bước sau:

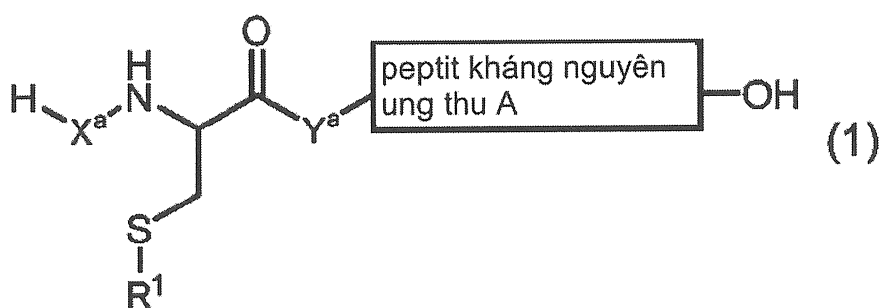
(1) bước tổng hợp, bằng cách sử dụng Fmoc-C(Mmt)A-SBn và peptit kháng nguyên ung thư C, peptit trong đó nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C là C(Mmt)A được liên kết với nhóm amino có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C, trong đó kháng nguyên peptit C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein,

(2) bước tổng hợp, bằng cách sử dụng peptit thu được ở bước (1) nêu trên và peptit kháng nguyên ung thư A trong đó một gốc xystein được bảo vệ bởi nhóm Npys được liên kết với đầu chặn mạch N, peptit trong đó nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C trong peptit thu được ở bước (1) nêu trên được liên kết với nhóm thioete chứa gốc xystein mà được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin, và

(3) bước tổng hợp, bằng cách sử dụng peptit thu được ở bước (2) nêu trên và peptit kháng nguyên ung thư D chứa gốc xystein được bảo vệ bởi nhóm Spy, peptit trong đó nhóm thioete chứa gốc xystein mà được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A trong peptit thu được ở bước (2) nêu trên được liên kết với nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư D, trong đó peptit kháng nguyên ung thư D là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein được liên kết với đầu chặn mạch N hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein,

III. Phương án thứ ba:

1. Hợp chất có công thức (1):



trong đó mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn, peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

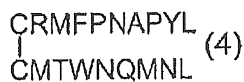
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với Y^a trong công thức (1), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (1), R¹ là peptit kháng nguyên ung thư C, peptit kháng nguyên ung thư C có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, mà là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

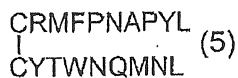
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4), và nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (1), hoặc muối được dụng của nó;

2. Hợp chất theo mục 1, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (4):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

3. Hợp chất theo mục 1, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc muối được dụng của nó;

4. Dược phẩm chứa hợp chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng;

5. Dược phẩm theo mục 4, chứa ít nhất một peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),

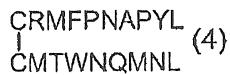
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),

CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và

WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243); và

6. Chế phẩm chứa hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có công thức (4):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và ít nhất một peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (1) nêu trên là hữu dụng làm thuốc điều trị miễn dịch ung thư (sau đây đôi lúc được gọi là hợp chất theo sáng chế). Dựa vào hợp chất theo sáng chế, có thể tạo ra các vắc xin ung thư và các thuốc điều trị miễn dịch ung thư mà cảm ứng một cách hiệu quả CTL in vivo và in vitro. Cụ thể là, dựa vào hợp chất theo sáng chế, có thể tạo ra hai peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có các trình tự khác nhau hoặc hai epitop WT1 giới hạn MHC lớp I có các trình tự khác nhau, peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II, epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II, hai peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có các trình tự khác nhau, hoặc hai epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có các trình tự in vivo và in vitro khác nhau và cảm ứng một cách hiệu quả CTL.

Đối với các kiểu phụ HLA của hai peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp

I có trình tự khác nhau, hợp chất theo sáng chế (thể liên hợp) thu được bằng cách kết hợp peptit kiểu A02 (A-0201, A0206 và tương tự) và peptit kiểu A24 (A-2402 và tương tự) là đặc biệt tốt hơn. Ở người Châu Âu và Châu Mỹ (người Cáp-ca), quần thể của kiểu phụ HLA-A0201 hoặc kiểu phụ HLA-A0206 là cao nhất và là khoảng 47%, tiếp đó là kiểu phụ HLA-A2402 với khoảng 13%, và tổng các kiểu phụ này chiếm khoảng 56%, không bao gồm các sự trùng lặp (tức là, việc tính toán trùng lặp ở những người có cả hai kiểu phụ) (Human Immunol. 62:1009;2001). Ở người Nhật Bản và tương tự, quần thể HLA-A2402 là cao nhất và là khoảng 60%, tiếp đó là HLA-A0201 hoặc HLA-A0206 với khoảng 39%, và tổng các kiểu phụ này chiếm khoảng 81%, không bao gồm các sự trùng lặp (tức là, việc tính toán trùng lặp ở những người có cả hai các kiểu phụ) (www.bmdc.irc.or.jp/GF-A.htm). Do đó, các ưu điểm của hợp chất theo sáng chế cụ thể là quần thể lớn hơn được sử dụng hợp chất riêng theo sáng chế, và việc chọn lọc kiểu phụ HLA ở các bệnh nhân trước khi sử dụng không phải là luôn luôn cần thiết và tương tự. Do các ưu điểm của hợp chất theo sáng chế, nên hợp chất có công thức (3), công thức (4) hoặc công thức (5) là được ưu tiên, và hợp chất có công thức (5) là được ưu tiên hơn.

Ngoài ra, dựa vào hợp chất theo sáng chế, có thể tạo ra thành phần hoạt tính của vắc xin ung thư mà ưu việt về các đặc tính lý hóa và độ ổn định, và được sản xuất và kiểm soát một cách dễ dàng. Kết quả là, dễ dàng sản xuất được chế phẩm vắc xin ung thư.

Cụ thể là, các ví dụ về các đặc tính lý hóa bao gồm độ hòa tan, độ nhớt dung dịch, dễ dàng tinh chế các sản phẩm thu được, dễ dàng xử lý sau khi làm khô lạnh, dễ dàng tinh chế các sản phẩm thu được sau khi làm khô và tương tự. Độ ổn định bao gồm độ ổn định sau khi thay thế muối, độ hút ẩm, độ ổn định nhiệt, độ ổn định sau khi hình thành thể nhũ tương và tương tự. Hoạt tính dược lý bao gồm hiệu lực ở dạng vắc xin ung thư, sự khác biệt được tạo ra bởi các thành phần dược hoạt tính (Active Pharmaceutical Ingredient-API), sự tương tác với chất phụ gia trong việc điều chế và tương tự. Trong số những điều này, sự khác biệt được tạo ra bởi API là sự khác biệt do API ở dạng vắc xin ung thư. Cụ thể là, trong hai API có các độ hòa tan cực kỳ khác nhau, thì API với độ hòa tan nhỏ hơn là dễ kết tủa, và dễ

dàng dự kiến rằng, không thể thực hiện được việc xử lý tiết trùng bằng cách lọc với thiết bị lọc kiểu màng, mà là yêu cầu thiết yếu đối với dược phẩm. Ngay cả khi rõ ràng là có thể việc xử lý tiết trùng bằng cách lọc API với độ hòa tan nhỏ, thì lượng API được chứa trong phần lọc và khả năng cảm ứng CTL mà là thiết yếu đối với vắc xin ung thư suy giảm đáng kể là điều được quan tâm đến. Do đó, khiếm khuyết về việc sự suy giảm đáng kể về hiệu quả sản xuất của API với độ hòa tan nhỏ có thể dễ dàng dự đoán trước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 1 đối với sự thay đổi theo thời gian của việc cắt axit amin có đầu chặn mạch N bởi ERAP1 của mỗi peptit trong số SEQ ID NO: 13, 16, 17 và 18 được tổng hợp trong các ví dụ từ 2 đến 5.

Fig.2 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 2 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1, bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.3 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 2 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402.

Fig.4 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 4 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (3) được tổng hợp trong ví dụ 6, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.5 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 5 đối với khả năng hợp chất có công thức (6) được tổng hợp trong ví dụ 7 cảm ứng các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO:

24.

Fig.6 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 5 đối với khả năng hợp chất có công thức (6) được tổng hợp trong ví dụ 7 cảm ứng các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 24.

Fig.7 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 6 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (8) được tổng hợp trong ví dụ 9 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.8 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 6 đối với khả năng hợp chất có công thức (8) được tổng hợp trong ví dụ 9 cảm ứng các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 in vivo, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 22.

Fig.9 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 8 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (7) được tổng hợp trong ví dụ 8 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.10 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 8 đối với khả năng hợp chất có công thức (7) được tổng hợp trong ví dụ 8 cảm ứng các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23 in vivo, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 23.

Fig.11 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 9 đối

với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (9) được tổng hợp ở ví dụ 10 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 5, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.12 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 9 đối với khả năng hợp chất có công thức (9) được tổng hợp ở ví dụ 10 cảm ứng các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 24.

Fig.13 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ so sánh 1 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 238 và 239 được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 8 và 9 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.14 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ so sánh 1 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 238 và 239 được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 8 và 9 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 4, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402.

Fig.15 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ so sánh 2 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 240 và 241 được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 10 và 11 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.16 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ so sánh 2 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 240 và 241 được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 10 và 11 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 4, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402.

Fig.17 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 11 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (10) được tổng hợp ở ví dụ 13 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.18 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ so sánh 3 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (11) được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 12 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.19 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 12 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (12) được tổng hợp ở ví dụ 14 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.20 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 12 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (12) được tổng hợp ở ví dụ 14 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 4, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402.

Fig.21 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 13 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (14) được tổng hợp ở ví dụ 15 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.22 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 13 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hợp chất có công thức (14) được tổng hợp ở ví dụ 15 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 4, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402.

Fig.23 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 14 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 1 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.24 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 15 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 13 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.25 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 16 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 2 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.26 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 17 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242 được tổng hợp ở ví dụ 11 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Fig.27 là hình thể hiện các kết quả thử nghiệm của ví dụ thử nghiệm 18 đối với khả năng cảm ứng CTL in vivo của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 được tổng hợp ở ví dụ 11 trong trạng thái được xung động hoặc không được xung động bằng peptit SEQ ID NO: 2, bằng thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

“Gốc axit amin” theo sáng chế có nghĩa là vùng tương ứng với một đơn vị axit amin cấu thành nên peptit hoặc protein trong phân tử peptit hoặc protein. Các ví dụ về “gốc axit amin” bao gồm gốc axit amin μ , gốc axit amin β , gốc axit amin γ hoặc gốc axit amin δ tự nhiên hoặc phi tự nhiên. Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm gốc axit amin α tự nhiên, gốc ornitin, gốc homoserin, gốc homoxystein, alanin β , axit aminbutanoic γ hoặc axit aminpentanoic δ và tương tự. Khi “gốc axit amin” có thể là chất hoạt tính quang học, thì tốt hơn là nó có thể ở dạng bất kỳ trong số dạng L và dạng D, và dạng L là được ưu tiên.

Khi “gốc axit amin” theo sáng chế được thể hiện ở dạng viết tắt, những từ viết tắt sau đây được sử dụng.

Ala hoặc A: gốc alanin

Arg hoặc R: gốc acginin

Asn hoặc N: gốc asparagin

Asp hoặc D: gốc axit aspartic

Cys hoặc C: gốc xystein

Gln hoặc Q: gốc glutamin

Glu hoặc E: gốc axit glutamic

Gly hoặc G: gốc glyxin

His hoặc H: gốc histidin

Ile hoặc I: gốc isoleuxin

Leu hoặc L: gốc leuxin

Lys hoặc K: gốc lysin

Met hoặc M: gốc metionin

Phe hoặc F: gốc phenylalanin

Pro hoặc P: gốc prolin

Ser hoặc S: gốc serin

Thr hoặc T: gốc Threonin

Trp hoặc W: gốc tryptophan

Tyr hoặc Y: gốc tyrosin

Val hoặc V: gốc valin

Abu: gốc axit aminbutyric 2 (cũng có thể được gọi là gốc axit aminbutyric α)

Orn: gốc ornitin

Cit: gốc citrulin

Trình tự axit amin của “peptit” theo sáng chế được mô tả theo phương pháp thông thường, trong đó gốc axit amin chứa axit amin có đầu chặn mạch N được đặt ở bên trái, và gốc axit amin của axit amin có đầu chặn mạch C được đặt ở bên phải. Trong “peptit”, trừ khi được chỉ báo cụ thể, nhóm amino của gốc axit amin chứa axit amin có đầu chặn mạch N được liên kết với nguyên tử hydro, và nhóm cacbonyl của gốc axit amin của axit amin có đầu chặn mạch C được liên kết với nhóm hydroxyl. Nhóm hóa trị hai của peptit là nhóm liên kết qua nhóm amino của gốc axit amin chứa axit amin có đầu chặn mạch N và nhóm cacbonyl của gốc axit amin của axit amin có đầu chặn mạch C.

Ví dụ, trong hợp chất theo sáng chế, trong các hợp chất có công thức (3) - (9) và đối với peptit, mà là cấu trúc một phần của nó, trừ khi được chỉ báo cụ thể, nhóm amino của gốc axit amin chứa axit amin có đầu chặn mạch N được liên kết với nguyên tử hydro, và nhóm cacbonyl của gốc axit amin của axit amin có đầu chặn mạch C được liên kết với nhóm hydroxyl.

“ X^a ” và “ Y^a ” độc lập theo sáng chế có nghĩa là liên kết đơn hoặc nhóm hóa trị hai của các peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin. Tổng số gốc axit amin đối với X^a và tổng số gốc đối với Y^a là số nguyên từ 0 đến 4. Ví dụ, số nguyên của tổng nêu trên bằng 0 có nghĩa là X^a và Y^a là mỗi liên kết đơn. Khi tổng là số nguyên bằng 4, các ví dụ của nó bao gồm X^a và Y^a độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin, X^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 3 gốc axit amin và Y^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, X^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 4 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn và tương tự.

Số nguyên của tổng đã đề cập tốt hơn là từ 0 đến 2, tốt hơn nữa là từ 0 đến 1, tốt nhất là 0. Tức là, X^a và Y^a tốt nhất là các liên kết đơn.

Khi tổng là số nguyên bằng 2, các ví dụ của bao gồm X^a là nhóm hóa trị hai

của peptit có 2 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, X^a và Y^a độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, hoặc X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin.

Khi tổng là số nguyên bằng 1, các ví dụ của nó bao gồm X^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin và Y^a là liên kết đơn, và X^a là liên kết đơn và Y^a là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin. Trong số các ví dụ này, tốt hơn là X^a là liên kết đơn và Y^a là gốc alanin, các gốc leucin hoặc gốc metionin.

“Peptit kháng nguyên ung thư A” theo sáng chế là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin. Trong peptit kháng nguyên ung thư A trong công thức (1), nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N được liên kết với Y^a trong công thức (1) và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C được liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (1).

“Được giới hạn bởi MHC lớp I” theo sáng chế có nghĩa là đặc tính cảm ứng CTL bằng cách liên kết với phân tử MHC lớp I mà là lớp I của phức hệ tương hợp mô chính (MHC- major histocompatibility complex).

MHC ở người được gọi là kháng nguyên kiểu leukocyte ở người (HLA-human leukocyte-type antigen). HLA tương ứng với phân tử MHC lớp I được phân loại thành các kiểu phụ là HLA-A, B, Cw, F và G và tương tự. Các ví dụ được ưu tiên về “được giới hạn bởi MHC lớp I” bao gồm được giới hạn bởi HLA-A, được giới hạn bởi HLA-B và được giới hạn bởi HLA-Cw.

Dạng đa hình (alen) của mỗi kiểu phụ của HLA đã được biến đến. Các ví dụ về dạng đa hình này của HLA-A bao gồm không dưới 27 loại như HLA-A1, HLA-A0201, HLA-A24 và tương tự, các ví dụ về dạng đa hình của HLA-B bao gồm không dưới 59 loại như HLA-B7, HLA-B40, HLA-B4403 và tương tự, và các ví dụ về dạng đa hình của HLA-Cw bao gồm không dưới 10 loại như HLA-Cw0301, HLA-Cw0401, HLA-Cw0602 và tương tự. Trong số các dạng đa hình này, HLA-A0201 và HLA-A24 là được ưu tiên.

“Peptit WT1” theo sáng chế là peptit một phần có từ 7 đến 30 gốc axit amin trong trình tự axit amin của WT1 người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1.

Do đó, “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” theo sáng chế là peptit

mà liên kết với kháng nguyên MHC lớp I in vitro và/hoặc in vivo và được trình diện dưới dạng phức hệ, và cảm ứng CTL bằng các tế bào T tiền chất là kết quả của sự nhận biết phức hệ này. Số lượng các gốc axit amin của “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” là từ 7 đến 30, tốt hơn là từ 7 đến 15, tốt hơn nữa là từ 8 đến 12, tốt hơn nữa là từ 8 đến 11, tốt nhất là 8 hoặc 9.

“Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” có từ 7 đến 12 hoặc tốt hơn là 9 gốc axit amin cũng được gọi là “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I”. “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” theo sáng chế có nghĩa là bản thân peptit mà liên kết với kháng nguyên MHC lớp I và được trình diện làm phức hệ. Tức là, “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” tạo ra “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” in vitro và/hoặc in vivo, bởi sự thoái biến nội bào của hợp chất theo sáng chế bởi proteosom và/hoặc proteaza như Gama-Interferon-cảm ứng Lysosomal Thiol Reductase (GILT, GLT) và tương tự (sự phân giải protein, sự phân cắt tiêu giảm của liên kết disulfua), và/hoặc sự phân cắt thành số lượng gốc tối ưu (cũng được gọi là cắt) bởi aminopeptidaza mô lưới nội chất 1 (ERAP1, ER-aminopeptidaza 1). Trong sự sản xuất này, chủ yếu xem xét đến quá trình sản xuất trong đó axit amin có đầu chặn mạch C của “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” ban đầu bắt nguồn từ sự suy biến bởi proteosom và/hoặc proteaza, sau đó axit amin có đầu chặn mạch N của “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” bắt nguồn từ sự cắt (sự phân cắt) bởi ERAP1. Tuy nhiên, trong sự sản xuất này, có thể có quá trình ngoài quá trình sản xuất nêu trên. Hiện tại, ERAP1 cũng được gọi là ERAAP (ER aminopeptidaza được liên kết với trình diện kháng nguyên), và cũng đã từng được gọi là A-LAP, PILS-AP or ARTS-1.

Do đó, “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” tốt hơn là peptit có từ 7 đến 30 gốc axit amin được tạo ra bằng cách bổ sung từ 1 đến 23 gốc axit amin vào nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của “Epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” có từ 7 đến 12 gốc axit amin.

Các ví dụ về “Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” bao gồm các peptit đã được mô tả trong các bảng từ 1 đến 44. Trong mỗi bảng, “vị trí” có nghĩa là vị trí trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1.

Bảng 1

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
2-10	GSDVRDLNA	26	A1
3-11	SDVRDLNAL	27	B40, B60, B61, B3701, B4403, Cw0301, Cw0602
4-12	DVRDLNALL	28	A24, A68,1, A3302, B7, B8, B3501, B3701, Cw0401, Cw0602
6-14	RDLNALLPA	29	B40, B61, B3701
7-15	DLNALLPAV	30	A0201, B62, B5201
10-18	ALLPAVPSL	5	A0201, A0205, A24, A3, B14, B7, B8, B3801, B3901, B3902, Cw0301, Cw0401, Cw0602

Bảng 2

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
17-25	SLGGGGGCA	31	B62
18-26	LGGGGGCAL	32	B60, B7, B3801, B5101, B5102
20-28	GGGGCALPV	33	B61, B5101, B5102, B5201

Bảng 3

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
23-31	GCALPVSGA	34	B40, B61
24-32	CALPVSGAA	35	B40, B5102, Cw0301
26-34	LPVSGAAQW	36	B40, B3501, B5801
29-37	SGAAQWAPV	37	B5101, B5102, B5201, B61

30-38	GAAQWAPVL	38	B40, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602
-------	-----------	----	---

Bảng 4

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
32-40	AQWAPVLDF	39	A3, A3101, B62, B2702, B2705, B3902, B5201
33-41	QWAPVL DFA	40	Cw0702
37-45	VLDFAPPGA	41	A1, A0201
38-46	LDFAPPGAS	42	B40, B3701
39-47	DFAPPGASA	43	Cw0401
40-48	FAPPGASAY	44	A1, B62, B3501, B4403, B5801, Cw0702

Bảng 5

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
47-55	AYGSLGGPA	45	A24

Bảng 6

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
63-71	PPPPPHSF	46	Cw0401
64-72	PPPPHSFI	47	B5101, B5102, B5201
65-73	PPPPHSFIK	48	A1101
70-78	SFIKQEPSW	49	Cw0401

Bảng 7

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
73-81	KQEPSWGGA	50	A1, A0205
80-88	GAEPHEEQC	51	A1

Bảng 8

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
81-89	AEPHEEQCL	52	A0205, B40, B60, B61, B3701, B4403
82-90	EPHEEQCLS	53	B3501, B5101
83-91	PHEEQCLSA	54	B3801
84-92	HEEQCLSAF	55	B40, B3701, B4403, Cw0702
85-93	EEQCLSAFT	56	B40, B60, B61, B3701, B4403
86-94	EQCLSAFTV	57	A0201, B62, B5201
88-96	CLSAFTVHF	58	A3, B62

Bảng 9

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
92-100	FTVHFGSQF	59	B62, B5801, Cw0301
93-101	TVHFGSQFT	60	A0201, A0205
96-104	FSGQFTGTA	61	B5801, B4403
98-106	GQFTGTAGA	62	A0205, B40, B62, B2702, B5201
99-107	QFTGTAGAC	63	Cw0401
100-108	FTGTAGACR	64	A68,1, A1101, A3101, A3302

Bảng 10

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
101-109	TGTAGACRY	65	B62, B4403, Cw0702
104-112	AGACRYGPF	66	B4403, B5201
107-115	CRYGPFGPP	67	B2702
110-118	GPFGPPPPS	68	B5101, B5102

Bảng 11

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
118-126	SQASSGQAR	69	A68,1, A1101, A3101, A3302
119-127	QASSGQARM	70	B3501, B5101, B5102
120-128	ASSGQARMF	71	B3501, B3801, B4403, B5801

Bảng 12

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
123-131	GQARMFPNA	72	B62
125-133	ARMFPNAPY	73	B14, B2702, B2705, Cw0702
126-134	RMFPNAPYL	2	A0201, A0205, A24, A3, B14, B7, B2702, B2705, B3901, B3902, Cw0301
128-136	FPNAPYLPS	74	B5101
130-138	NAPYLPSCL	75	A24, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602, Cw0702

Bảng 13

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
136-144	SCLESQPAI	76	B8, B3901, B5102, Cw0301
137-145	CLESQPAIR	77	A1, A3, A68,1, A1101, A3101, A3302
138-146	LESQPAIRN	78	B60, B61
139-147	ESQPAIRNQ	79	A3302

Bảng 14

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
141-149	QPAIRNQGY	80	B8, B3501, B4403, Cw0401, Cw0702
143-151	AIRNQGYST	81	B7
144-152	IRNQGYSTV	82	B14, B2702, B2705, B3901
146-154	NQGYSTVTF	83	B62, B2702, B3902, B5201

Bảng 15

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
152-160	VTFDGTPSY	84	A1, A3, B62, B3501, B4403, B5801, Cw0702

Bảng 16

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
161-169	GHTPSHHAA	85	B3801
163-171	TPSHHAAQF	86	B3501, B3801, Cw0401, Cw0702

165-173	SHHAAQFPN	87	B3801
168-176	AAQFPNHSF	88	B5801
169-177	AQFPNHSFK	89	A3, A68,1, A1101, A3101, B2705

Bảng 17

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
174-182	HSFKHEDPM	90	B14, B3501, B5801
177-185	KHEDPMGQQ	91	B3801
179-187	EDPMGQQGS	92	B3701
180-188	DPMGQQGSL	93	A24, B14, B60, B7, B8, B3501, B3801, B3901, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0401, Cw0602

Bảng 18

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	HLA kiểu phụ
185-193	QGS LG EQQY	94	B4403, Cw0702
187-195	SLGEQQYSV	6	A0201, A0205, A3, B62

Bảng 19

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
191-199	QQYSVPPP V	95	A0201, A0205, B61, B62, B2702, B2705, B5201
192-200	QYSVPPP VY	96	A24, Cw0401, Cw0702
194-202	SVPPP VYGC	97	A0205, A3

Bảng 20

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
202-210	CHTPDSCCT	98	B3801
204-212	TPTDSCCTGS	99	B5101
206-214	TDSCCTGSQA	100	B40, B61, B3701
207-215	DSCTGSQAL	101	A24, A3302, B60, B7, B8, B3501, B3901, B3902, Cw0602
208-216	SCTGSQALL	102	B60, B7, B8, B3701, B3801, B3901, B3902
209-217	CTGSQALLL	103	B60, B7, B3701, B3902
210-218	TGSQALLLR	104	A3302

Bảng 21

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
211-219	GSQALLLRT	105	B5801
213-221	QALLLRTPY	106	A1, B3501, B4403, B5801, Cw0602, Cw0702
217-225	L RTPYSSDN	107	B2702
218-226	RTPYSSDNL	108	A24, B60, B7, B3902, B5801
219-227	TPYSSDNL Y	109	B3501, B5101, B5102, Cw0401, Cw0702

Bảng 22

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
221-229	YSSDNL YQM	110	B60, B3501

222-230	SSDNLYQMT	111	A1, B5801
223-231	SDNLYQMTS	112	B3701
225-233	NLYQMTSQL	113	A0201, A0205, A24, B14, B7, B8, B3801, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
227-235	YQMTSQLEEC	114	A0201, A0205, B62
228-236	QMTSQLECM	115	A0201
230-238	TSQLECMTW	116	B5801

Bảng 23

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
232-240	QLECMTWNQ	117	A1
233-241	LECMTWNQM	118	B40, B60, B61, B3701, B4403
235-243	CMTWNQMNL	3	A0201, A0205, A24, A3, B7
239-247	NQMNLGATL	119	A0201, A0205, A24, B14, B60, B62, B7, B2702, B2705, B3901, B3902, B5201, Cw0301, Cw0602
240-248	QMNLGATLK	120	A24, A3, A1101, A3101

Bảng 24

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
242-250	NLGATLKG V	121	A0201, A0205, B62, Cw0602
243-251	LGATLKGVA	122	B5201
244-252	GATLKGVA A	123	B61, B8

250-258	VAAGSSSSV	124	B61, B5101, B5102
---------	-----------	-----	-------------------

Bảng 25

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
251-259	AAGSSSSVK	125	A68,1, A1101
252-260	AGSSSSVKW	126	B5801
260-268	WTEGQSNHS	127	A1

Bảng 26

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
261-269	TEGQSNHST	128	B40, B60, B61, B4403
263-271	GQSNHSTGY	129	A3, B62, B2702, Cw0702
269-277	TGYESDNHT	130	B5102, B5201
270-278	GYESDNHTT	131	A24

Bảng 27

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
272-280	ESDNHTTPI	132	A1, A3302, B5101
273-281	SDNHTTPIL	133	B40, B60, B3701, B5201
276-284	HTTPILCGA	134	B5801
278-286	TPILCGAQY	135	B3501, B4403, Cw0401, Cw0702
279-287	PILCGAQYR	136	A3101
280-288	ILCGAQYRI	137	A0201, A0205, A3, B62, B5101

Bảng 28

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
285-293	QYRIHTHGV	138	A24, Cw0401
286-294	YRIHTHGVF	139	B14, B2702, B2705, B5201, Cw0301
287-295	RIHTHGVFR	140	A3, A1101, A3101, A3302
289-297	HTHGVFRGI	141	B5801

Bảng 29

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
292-300	GVFRGIQDV	142	A0201, A0205, A3, A68,1, A1101, B3901, B5102, B5201, Cw0602
293-301	VFRGIQDVR	143	A3101
294-302	FRGIQDVRR	144	B2705
295-303	RGIQDVRRV	145	B61, B5101, B5102, B5201, Cw0602
298-306	QDVRRVPGV	146	B61, B3701
299-307	DVRRVPGVA	147	A68,1, A3302, B7, B8

Bảng 30

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
301-309	RRVPGVAPT	148	B14, B2702, B2705, Cw0301
302-310	RVPGVAPTL	7	A0205, A24, B7, B3701, B3801, B3901, B3902
303-311	VPGVAPTLV	149	B7, B3501, B5102, B5201, Cw0401
306-314	VAPTLVRSA	150	B4403

309-317	TLVRSASET	151	A0201, A0205
---------	-----------	-----	--------------

Bảng 31

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
312-320	RSASETSEK	152	A68,1, A1101
313-321	SASETSEKR	153	A3101, A3302
315-323	SETSEKRPF	154	B40, B3701, B4403
316-324	ETSEKRPFM	155	B8, B3501
317-325	TSEKRPFMC	156	A1, B5801
318-326	SEKRPFMCA	157	B40, B60, B61, B4403
319-327	EKRPFMCAY	158	Cw0602, Cw0702

Bảng 32

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
324-332	MCAYPGCNK	159	A68,1, A1101
325-333	CAYPGCNKR	160	A1, A68,1, A1101, A3101, A3302
326-334	AYPGCNKRY	161	A24, Cw0401, Cw0702
327-335	YPGCNKRYF	162	B3501, B3801, B5201, Cw0401, Cw0702
329-337	GCNKRYFKL	163	A24, B14, B60, B7, B8, B3902, Cw0301

Bảng 33

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
--------	--------------------	-------------	--------------

332-340	KRYFKLSHL	164	B14, B8, B2702, B2705, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
334-342	YFKLSHLQM	165	Cw0401
337-345	LSHLQMHSR	166	A68,1, A3302
340-348	LQMHSRKHT	167	A0201, A0205

Bảng 34

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
343-351	HSRKHTGEK	168	A68,1
345-353	RKHTGEKPY	169	Cw0702
347-355	HTGEKPYQC	170	B8, B5801
349-357	GEKPYQCDF	171	B40, B3701, B4403

Bảng 35

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
351-359	KPYQCDFKD	172	B5102
354-362	QCDFKDCER	173	A1, A68,1, A3101, A3302
356-364	DFKDCERRF	174	A24, Cw0401
358-366	KDCERRFSR	175	A3101

Bảng 36

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
362-370	RRFSRSDQL	176	B2702, B2705, B3901, Cw0301, Cw0602
363-371	RFSRSDQLK	177	A1101
364-372	FSRSDQLKR	178	A68,1, A3302
366-374	RSDQLKRHQ	179	A1
368-376	DQLKRHQRR	180	A68,1, A3101, A3302

Bảng 37

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
371-379	KRHQRRHTG	181	B14
372-380	RHQRRHTGV	182	B14, B3801, B3901
373-381	HQRRHTGVK	183	A1101, A3101, B2705
375-383	RRHTGVKPF	184	B2702, B2705, Cw0702
379-387	GVKPFQCKT	185	A68,1

Bảng 38

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
383-391	FQCKTCQRK	186	A3, A1101, A3101, B2705
384-392	QCKTCQRKF	187	B62, B8
386-394	KTCQRKFSR	188	A1, A3, A68,1, A1101, A3101
387-395	TCQRKFSRS	189	B8
389-397	QRKFSRSDH	190	B2702, B2705
390-398	RKFSRSDHL	191	B14, B3901, B3902, Cw0301

Bảng 39

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
391-399	KFSRSDHLK	192	A1101, A3101
394-402	RSDHLKTHT	193	A1, B5801
396-404	DHLKTHTRT	194	B3801, B3901

Bảng 40

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
401-409	HTRHTGKT	195	B8
406-414	TGKTSEKPF	196	B5201
408-416	KTSEKPFSC	197	A0201, B5801
409-417	TSEKPFSCR	198	A1, A68,1, A3302
410-418	SEKPFSCRW	199	B40, B4403

Bảng 41

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
412-420	KPFSCRWPS	200	B3501, B5102
415-423	SCRWPSCQK	201	A1101
416-424	CRWPSCQKK	202	B2702, B2705
417-425	RWPSCQKKF	203	A24, B3801, Cw0401
418-426	WPSCQKKFA	204	B5102
419-427	PSCQKKFAR	205	A3302
420-428	SCQKKFARS	206	B8

Bảng 42

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
423-431	KKFARSDEL	207	B14, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
424-432	KFARSDELV	208	Cw0401
425-433	FARSDELVR	209	A68,1, A1101, A3101, A3302
426-434	ARSDELVRH	210	B2702, B2705
427-435	RSDELVRHH	211	A1
428-436	SDELVRHHN	212	B3701
429-437	DELVRHHNM	213	B14, B40, B60, B61, B3701, B4403, Cw0301

Bảng 43

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
432-440	VRHHNMHQR	214	B2705
433-441	RHHNMHQRN	215	B3801
434-442	HHNMHQARN	216	B3901
436-444	NMHQARNMTK	217	A3, A1101, A3101
437-445	MHQARNMTKL	218	B14, B3701, B3901, B3902, Cw0301
439-447	QRNMTKLQL	220	B14, B2702, B2705, B3901, Cw0602
440-448	RNMTKLQLA	221	B61

Bảng 44

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
441-449	NMTKLQLAL	222	A0201, A0205, A24, A3, B7, B3902, Cw0602

Các ví dụ được ưu tiên về “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” bao gồm peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), và

peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL, tốt hơn là peptit có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 và 7.

Thông thường, “peptit có trình tự axit amin” theo sáng chế có nghĩa là peptit trong đó có thêm axit amin được bổ sung vào axit amin có đầu chặn mạch N

và/hoặc axit amin có đầu chặn mạch C của trình tự axit amin. Khi “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” trong “peptit kháng nguyên ung thư A” và “peptit kháng nguyên ung thư B” được bổ sung, thì peptit có sự bổ sung vào phía đầu chặn mạch C là được ưu tiên. Khi “epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” được bổ sung, thì sự bổ sung vào phía đầu chặn mạch C là được ưu tiên.

“Peptit có trình tự axit amin được biến đổi mà chứa sự biến đổi của (các) gốc axit amin trong trình tự axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL” theo sáng chế cũng được gọi là “peptit bào diệt được biến đổi”. Peptit bào diệt được biến đổi này có nghĩa là peptit mà có trình tự axit amin trong đó có từ 1 đến 3 axit amin được loại bỏ, được thay thế và/hoặc được bổ sung và liên kết với MHC lớp I cảm ứng CTL. Vị trí thay thế của axit amin được thay thế này bao gồm vị trí thứ nhất (đầu chặn mạch N), vị trí thứ hai, vị trí thứ ba hoặc vị trí thứ chín đối với peptit có 9 các gốc axit amin. Số lượng các axit amin được bổ sung (cũng kể cả việc chèn) tốt hơn là 1 hoặc 2, tốt hơn nữa là 1. Vị trí bổ sung tốt hơn là đầu chặn mạch C. Số lượng axit amin được loại bỏ tốt hơn là 1. Trong sự biến đổi này, axit amin được bổ sung hoặc axit amin được thay thế có thể là axit amin phi tự nhiên ngoài 20 loại các axit amin được mã hóa bởi gen.

Được biết đến là trình tự axit amin của peptit có thể liên kết với HLA kháng nguyên có tính thường xuyên (môtíp liên kết) đối với mỗi dạng đa hình của kiểu phụ HLA. Ví dụ, , peptit có từ 8 đến 11 các gốc axit amin, trong đó axit amin có vị trí thứ hai là Tyr, Phe, Met hoặc Trp, và axit amin có đầu chặn mạch C là Phe, Leu, Ile, Trp or Met, được biết đến là môtíp liên kết HLA-A24 (J. Immunol., 152, p3913, 1994, J. Immunol., 155, p4307, 1994, Immunogenetics, 41, p178, 1995). Do đó, ví dụ, đối với trường hợp của peptit chứa 9 các gốc axit amin, vị trí thứ hai có thể được thay thế bằng Tyr, Phe, Met hoặc Trp và/hoặc vị trí thứ chín có thể được thay thế bằng Phe, Leu, Ile, Trp or Met, và đối với peptit bào diệt được biến đổi thì peptit có các sự thay thế như vậy là được ưu tiên. Tương tự, peptit có từ 8 đến 11 các gốc axit amin, trong đó axit amin có vị trí thứ hai là Leu hoặc Met và axit amin có đầu chặn mạch C là Val hoặc Leu, được biết đến là môtíp liên kết HLA-A0201. Do đó, ví dụ, đối với trường hợp của peptit chứa 9 các gốc axit amin, vị trí thứ hai có thể được thay thế bằng Leu hoặc Met và/hoặc vị trí thứ chín có thể được thay

thể bằng Val hoặc Leu, và đối với peptit bào diệt được biến đổi thì peptit có các sự thay thế như vậy là được ưu tiên.

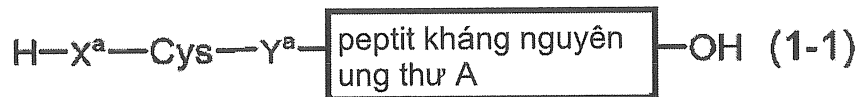
Các ví dụ về peptit bào diệt được biến đổi bao gồm các peptit sau đây.

RYFPNAPYL (SEQ ID NO: 223) (xem tài liệu WO03/106682),
 FMFPNAPYL (SEQ ID NO: 224),
 RLFPNAPYL (SEQ ID NO: 225),
 RMMPNAPYL (SEQ ID NO: 226),
 RMFPNAPYV (SEQ ID NO: 227) và
 YMFPNAPYL (SEQ ID NO: 228) (xem tài liệu WO2009/072610), mà là các peptit bào diệt được biến đổi của RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2);
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) (xem tài liệu WO02/79253);
 Xaa-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 229)
 (trong đó Xaa là Ser hoặc Ala) và
 Xaa-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 230)
 (trong đó Xaa là Ser, Ala, Abu, Arg, Lys, hoặcn, Cit, Leu, Phe or Asn) (xem tài liệu WO2004/026897), mà là các peptit bào diệt được biến đổi của CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3);
 AYLPAVPSL (SEQ ID NO: 231) (t WO2003/106682), mà là peptit bào diệt được biến đổi của ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5);
 FLGEQQYSV (SEQ ID NO: 232),
 SMGEQQYSV (SEQ ID NO: 233) và
 SLMEQQYSV (SEQ ID NO: 234) (WO2009/072610), mà là các peptit bào diệt được biến đổi của SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6); và
 RYPGVAPTL (SEQ ID NO: 235) (WO2003/106682), mà là peptit bào diệt được biến đổi của RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7).

“R¹” theo sáng chế là nguyên tử hydro, nhóm có công thức (2) đã được đề cập ở trên hoặc peptit kháng nguyên ung thư C, tốt hơn là nhóm có công thức (2) đã được đề cập ở trên hoặc peptit kháng nguyên ung thư C.

Khi R¹ là nguyên tử hydro, thì hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức

(1-1):



trong đó X^a , Y^a và peptit kháng nguyên ung thư A là peptit đã được xác định ở trên trong công thức (1), và Cys là gốc xystein.

Hợp chất có công thức (1), trong đó R^1 là nguyên tử hydro, là peptit có công thức (1-1), có trình tự khác với một phần trình tự của protein WT1. Yêu cầu của công thức (1), “có trình tự khác với một phần trình tự của protein WT1” có nghĩa là peptit có công thức (1-1) không phải là một phần peptit có từ 8 đến 35 gốc axit amin liên tục trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1.

Tức là, hợp chất có công thức (1), trong đó R^1 là nguyên tử hydro, không phải là một phần peptit có từ 8 đến 35 gốc axit amin liên tục trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1. Giải thích cụ thể được đưa ra bằng cách lấy ví dụ trường hợp khi peptit kháng nguyên ung thư A là peptit $\text{WT1}_{138-146}$. Peptit $\text{WT1}_{138-146}$ là một phần peptit có 9 gốc axit amin liên tục ở các vị trí từ 138 đến 146 của trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1, và có trình tự axit amin LESQPAIRN (SEQ ID NO: 78). Trong trình tự SEQ ID NO: 1, vị trí liên tục thứ 137 tính từ phía đầu chặn mạch N của peptit $\text{WT1}_{138-146}$ là C. Do đó, peptit $\text{WT1}_{137-146}$ (CLESQPAIRN) (SEQ ID NO: 236) tương ứng với một phần peptit có 10 gốc axit amin liên tục của trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1. Mặt khác, dựa trên yêu cầu của sáng chế, “hợp chất có công thức (1), trong đó R^1 là nguyên tử hydro, không phải là một phần peptit có từ 8 đến 35 axit amin liên tục trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1”, trong hợp chất có công thức (1) trong đó R^1 là nguyên tử hydro, khi peptit kháng nguyên ung thư A là peptit $\text{WT1}_{138-146}$ (LESQPAIRN) (SEQ ID NO: 78), thì peptit $\text{WT1}_{137-146}$ (CLESQPAIRN) (SEQ ID NO: 236) được loại bỏ khỏi hợp chất theo sáng chế, và do đó, đồng thời X^a và Y^a không phải là liên kết đơn.

Đối với hợp chất có công thức (1) trong đó R^1 là nguyên tử hydro, tốt hơn

là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),

CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),

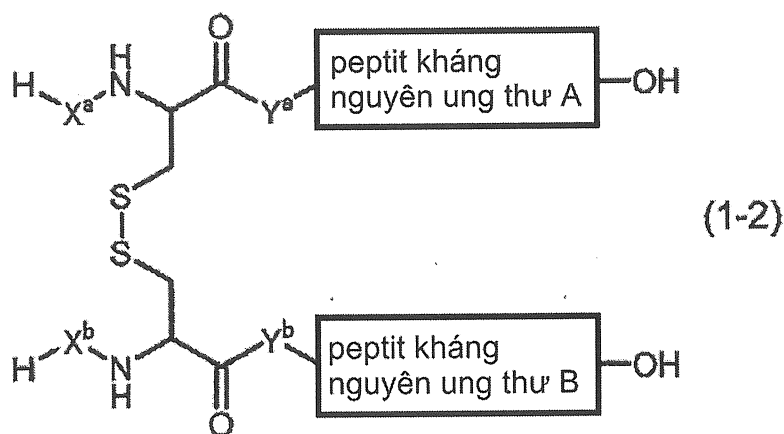
CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),

CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),

CSLGEQQYSV (SEQ ID NO: 17) và

CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18).

Khi “R¹” là nhóm có công thức (2) đã được đề cập ở trên, thì hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (1-2):



trong đó X^a, Y^a và peptit kháng nguyên ung thư A là đã được xác định trong ở trên trong công thức (1), và X^b, Y^b và peptit kháng nguyên ung thư B đã được xác định ở trên trong công thức (2).

“X^b” và “Y^b” độc lập theo sáng chế có nghĩa là, liên kết đơn hoặc nhóm hóa trị hai của các peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin. Tổng số gốc axit amin đối với X^b và tổng số gốc axit amin đối với Y^b là số nguyên từ 0 đến 4. Ví dụ, số nguyên của tổng nêu trên bằng 0 có nghĩa là mỗi trong số X^b và Y^b là liên kết đơn. Khi tổng là số nguyên là 4, các ví dụ của nó bao gồm X^b và Y^b độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin, X^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 3 gốc axit amin và Y^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, X^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 4 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn và tương tự.

Số nguyên của tổng nêu trên tốt hơn là từ 0 đến 2, tốt hơn nữa là từ 0 đến 1, tốt hơn nữa là 0. Tức là, tốt nhất X^b và Y^b là các liên kết đơn.

Khi tổng là số nguyên bằng 2, các ví dụ của nó bao gồm X^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, X^b và Y^b độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, và X^b là liên kết đơn và Y^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin.

Khi tổng là số nguyên bằng 1, các ví dụ của nó bao gồm X^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, và X^b là liên kết đơn và Y^b là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin. Trong số đó, tốt hơn là X^b là liên kết đơn và Y^b là gốc alanin, leuxin các gốc hoặc gốc metionin.

“Peptit kháng nguyên ung thư B” theo sáng chế là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin. “Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” là như đã được xác định ở trên. Tuy nhiên, trong hợp chất có công thức (1), peptit kháng nguyên ung thư A và peptit kháng nguyên ung thư B đồng thời không phải là các peptit giống nhau. Tức là, peptit kháng nguyên ung thư B bị giới hạn bởi yêu cầu, “khác với peptit kháng nguyên ung thư A”.

Do peptit kháng nguyên ung thư A và peptit kháng nguyên ung thư B đồng thời không phải là các peptit giống nhau, nên hợp chất có công thức (1), trong đó R^1 là nhóm có công thức (2) đã được đề cập ở trên, không phải là chất nhị trùng giống nhau ngoài dị chất nhị trùng, ngay cả khi X^a và X^b là giống nhau và Y^a và Y^b là giống nhau. Chất nhị trùng giống nhau có nghĩa là chất nhị trùng trong đó các đơn phân peptit giống nhau là được nhị trùng hóa, và dị chất nhị trùng có nghĩa là chất nhị trùng trong đó các đơn phân peptit khác nhau được nhị trùng hóa.

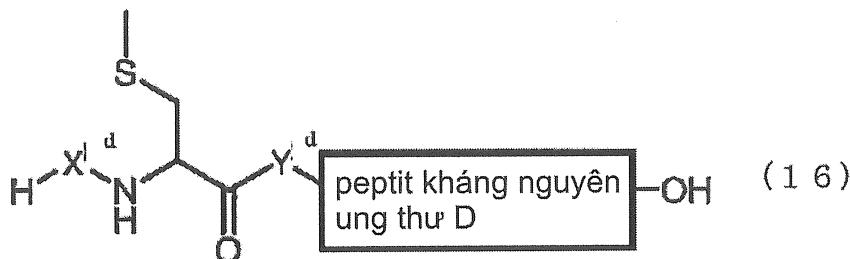
Trong peptit kháng nguyên ung thư B, nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N được liên kết với Y^b trong công thức (2) (tức là, cũng được liên kết với Y^b trong công thức (1-2)), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C được liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (2).

Hợp chất có công thức (3) là hợp chất có công thức (1) trong đó R^1 là nhóm có công thức (2), tức là, hợp chất có công thức (1-2):



trong đó liên kết giữa C và C tốt hơn là là liên kết disulfua.

Ngoài ra, theo sáng chế, khi “peptit kháng nguyên ung thư B” là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có một gốc xystein, thì hợp chất có công thức (1) có thể là hợp chất trong đó nhóm thioete trong peptit kháng nguyên ung thư B được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16):



hoặc được liên kết với nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư E.

Theo sáng chế “X^d” và “Y^d” độc lập có nghĩa là liên kết đơn hoặc nhóm hóa trị hai của các peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin. Tổng số gốc axit amin đối với X^d và tổng số gốc axit amin đối với Y^d là số nguyên từ 0 đến 4. Ví dụ, số nguyên của tổng nêu trên bằng 0 có nghĩa là mỗi trong số X^d và Y^d là liên kết đơn. Khi tổng này là số nguyên bằng 4, các ví dụ của nó bao gồm X^d và Y^d độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin, X^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 3 gốc axit amin và Y^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, X^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 4 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn và tương tự.

Số nguyên của tổng nêu trên tốt hơn là từ 0 đến 2, tốt hơn nữa là từ 0 đến 1, tốt nhất là 0. Tức là, X^d và Y^d tốt nhất là các liên kết đơn.

Khi tổng này là số nguyên bằng 2, các ví dụ của nó bao gồm X^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin và Y^b là liên kết đơn, X^d và Y^d độc lập là các nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin, hoặc X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 2 gốc axit amin.

Khi tổng này là số nguyên bằng 1, các ví dụ của nó bao gồm X^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin và Y^d là liên kết đơn, và X^d là liên kết đơn và Y^d là nhóm hóa trị hai của peptit có 1 gốc axit amin. Trong số đó, tốt hơn là X^d là liên kết đơn và Y^d là gốc alanin, leuxin các gốc hoặc gốc metionin.

Theo sáng chế “peptit kháng nguyên ung thư D” là peptit WT1 được giới

hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin. Trong công thức (16), nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư D liên kết với Y^d trong công thức (16), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (16).

Theo sáng chế, “được giới hạn bởi MHC lớp II” có nghĩa là đặc tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ bằng cách liên kết với phân tử MHC lớp II, và đã được xác định đối với “peptit kháng nguyên ung thư C” được đề cập ở dưới đây.

HLA tương ứng với phân tử MHC lớp II được phân loại thành các kiểu phụ là HLA-DR, DQ và DP và tương tự. Các ví dụ được ưu tiên về “được giới hạn bởi MHC lớp II” bao gồm được giới hạn bởi HLA-DR, được giới hạn bởi HLA-DQ và được giới hạn bởi HLA-DP.

Do đó, “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II” theo sáng chế là peptit mà liên kết với kháng nguyên MHC lớp II in vitro và/hoặc in vivo và cảm ứng các tế bào T hỗ trợ. Số lượng các gốc axit amin của “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II” là từ 7 đến 30, tốt hơn là từ 14 đến 30.

Giống như trình tự axit amin được liệt kê trong “peptit kháng nguyên ung thư C” được đề cập ở dưới, peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau có thể được đề cập làm “peptit kháng nguyên ung thư D”:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),

SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),

SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

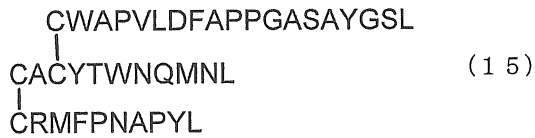
CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) và

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244)

Ngoài ra, trong hợp chất có công thức (1), khi “peptit kháng nguyên ung thư B” là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có một gốc xystein, thì tốt hơn là hợp chất có công thức (15):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, có thể được đề cập đến là hợp chất trong đó nhóm thioete trong peptit kháng nguyên ung thư B được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16).

Theo sáng chế, “peptit kháng nguyên ung thư E” là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein, và đã được xác định đối với “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein” trong “peptit kháng nguyên ung thư C” được đề cập ở dưới.

Giống như trình tự axit amin được liệt kê trong “peptit kháng nguyên ung thư C” được đề cập ở dưới, peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24)

có thể được đề cập làm “peptit kháng nguyên ung thư E”.

Khi R¹ là peptit kháng nguyên ung thư C, nhóm thioete của gốc xystein của

peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (1).

Peptit kháng nguyên ung thư C là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein hoặc peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein.

Trong “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein” theo sáng chế, trình tự axit amin của peptit này chỉ cần có ít nhất một gốc xystein. Số lượng các gốc xystein được chứa tốt hơn là từ 1 đến 3, tốt hơn nữa là từ 1 đến 2, tốt nhất là 1. “Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I” là như đã được xác định ở trên. Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) trong đó R¹ là “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein” không phải là chất nhị trùng giống nhau ngoài dị chất nhị trùng.

Các ví dụ được ưu tiên về “Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein” bao gồm các peptit đã được mô tả ở các bảng từ 45 đến 52. Trong mỗi bảng, “vị trí” có nghĩa là vị trí trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1.

Bảng 45

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
17-25	SLGGGGGCA	31	B62
18-26	LGGGGGCAL	32	B60, B7, B3801, B5101, B5102
20-28	GGGGCALPV	33	B61, B5101, B5102, B5201
23-31	GCALPVSGA	34	B40, B61
24-32	CALPVSGAA	35	B40, B5102, Cw0301

Bảng 46

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
80-88	GAEPHEEQC	51	A1
81-89	AEPHEEQCL	52	A0205, B40, B60, B61, B3701, B4403
82-90	EPHEEQCLS	53	B3501, B5101
83-91	PHEEQCLSA	54	B3801

84-92	HEEQCLSAF	55	B40, B3701, B4403, Cw0702
85-93	EEQCLSAFT	56	B40, B60, B61, B3701, B4403
86-94	EQCLSAFTV	57	A0201, B62, B5201
88-96	CLSAFTVHF	58	A3, B62
99-107	QFTGTAGAC	63	Cw0401
100-108	FTGTAGACR	64	A68,1, A1101, A3101, A3302

Bảng 47

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
101-109	TGTAGACRY	65	B62, B4403, Cw0702
104-112	AGACRYGPF	66	B4403, B5201
107-115	CRYGPF GPP	67	B2702
130-138	NAPYLP SCL	75	A24, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602, Cw0702
136-144	SCLESQPAI	76	B8, B3901, B5102, Cw0301
137-145	CLESQPAIR	77	A1, A3, A68,1, A1101, A3101, A3302
194-202	SVPPP VYGC	97	A0205, A3

Bảng 48

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
202-210	CHTP TDSCT	98	B3801
204-212	TPTDSCTGS	99	B5101
206-214	TDSCTGSQA	100	B40, B61, B3701
207-215	DSC TGSQAL	101	A24, A3302, B60, B7, B8, B3501, B3901, B3902, Cw0602

208-216	SCTGSQALL	102	B60, B7, B8, B3701, B3801, B3901, B3902
209-217	CTGSQALLL	103	B60, B7, B3701, B3902
227-235	YQMTSQLEC	114	A0201, A0205, B62
228-236	QMTSQLECM	115	A0201

Bảng 49

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
230-238	TSQLECMTW	116	B5801
232-240	QLECMTWNQ	117	A1
233-241	LECMTWNQM	118	B40, B60, B61, B3701, B4403
235-243	CMTWNQMNL	3	A0201, A0205, A24, A3, B7
276-284	HTTPILCGA	134	B5801
278-286	TPILCGAQY	135	B3501, B4403, Cw0401, Cw0702
279-287	PILCGAQYR	136	A3101
280-288	ILCGAQYRI	137	A0201, A0205, A3, B62, B5101

Bảng 50

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
317-325	TSEKRPFMC	156	A1, B5801
318-326	SEKRPFMCA	157	B40, B60, B61, B4403
319-327	EKRPFMCAY	158	Cw0602, Cw0702
324-332	MCAYPGCNK	159	A68,1, A1101
325-333	CAYPGCNKR	160	A1, A68,1, A1101, A3101, A3302

326-334	AYPGCNKRY	161	A24, Cw0401, Cw0702
327-335	YPGCNKRYF	162	B3501, B3801, B5201, Cw0401, Cw0702
329-337	GCNKRYFKL	163	A24, B14, B60, B7, B8, B3902, Cw0301
347-355	HTGEKPYQC	170	B8, B5801
349-357	GEKPYQCDF	171	B40, B3701, B4403

Bảng 51

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
351-359	KPYQCDFKD	172	B5102
354-362	QCDFKDCER	173	A1, A68,1, A3101, A3302
356-364	DFKDCERRF	174	A24, Cw0401
358-366	KDCERRFSR	175	A3101
379-387	GVKPFQCKT	185	A68,1
383-391	FQCKTCQRK	186	A3, A1101, A3101, B2705
384-392	QCKTCQRKF	187	B62, B8
386-394	KTCQRKF SR	188	A1, A3, A68,1, A1101, A3101
387-395	TCQRKF SR	189	B8

Bảng 52

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự	kiểu phụ HLA
408-416	KTSEKPFSC	197	A0201, B5801
409-417	TSEKPFSCR	198	A1, A68,1, A3302
410-418	SEKPFSCRW	199	B40, B4403

412-420	KPFSCRWPS	200	B3501, B5102
415-423	SCRWPSCQK	201	A1101
416-424	CRWPSCQKK	202	B2702, B2705
417-425	RWPSCQKKF	203	A24, B3801, Cw0401
418-426	WPSCQKKFA	204	B5102
419-427	PSCQKKFAR	205	A3302
420-428	SCQKKFARS	206	B8

Các ví dụ về tốt hơn về “Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein” bao gồm peptit có trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3)

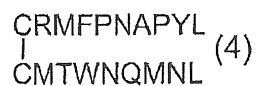
và peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL. “Chứa trình tự axit amin” và “peptit có trình tự axit amin được biến đổi chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin trong trình tự axit amin, và có hoạt tính cảm ứng CTL” nêu trên là như đã được xác định ở trên. Tốt nhất là, peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

có thể được đề cập.

Hợp chất có công thức (4):

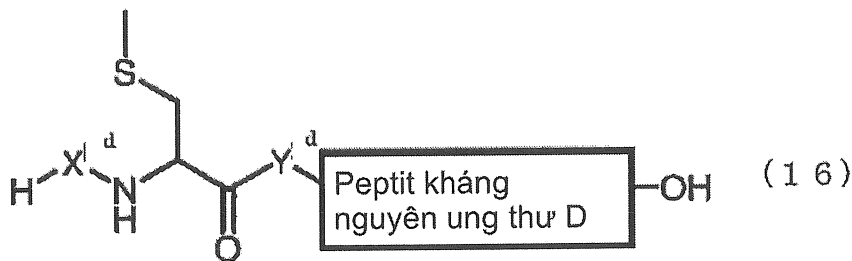


trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hoặc hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, tốt hơn là làm hợp chất có công thức (1) trong đó R¹ là “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein”. Trong số đó, hợp chất có công thức (5) là được ưu tiên.

Ngoài ra, theo sáng chế, khi peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein còn được liên kết với đầu chặn mạch N của “peptit kháng nguyên ung thư C” mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I, hợp chất có công thức (1) có thể là hợp chất trong đó nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit này được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16):

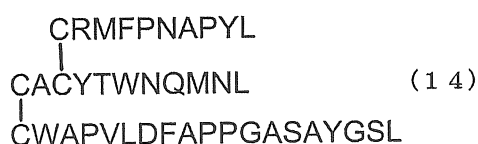


hoặc được liên kết với nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư E.

“X^d”, “Y^d”, “peptit kháng nguyên ung thư D” và “peptit kháng nguyên ung thư E” theo sáng chế là như đã được xác định như đối với “X^d”, “Y^d”, “peptit kháng nguyên ung thư D” và “peptit kháng nguyên ung thư E” đã được đề cập ở trên.

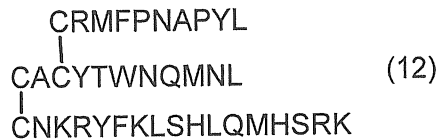
Theo sáng chế, peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein, mà được liên kết với đầu chặn mạch N của “peptit kháng nguyên ung thư C” mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I, tốt hơn là dipeptit chứa CA.

Trong hợp chất có công thức (1), khi peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein còn được liên kết với đầu chặn mạch N của “peptit kháng nguyên ung thư C” mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I, hợp chất trong đó nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit này được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (16) tốt hơn là hợp chất có công thức (14):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Ngoài ra, trong hợp chất có công thức (1), khi peptit có từ 1 đến 4 gốc axit amin chứa một gốc xystein còn được liên kết với đầu chặn mạch N của “peptit kháng nguyên ung thư C” mà là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I, hợp chất trong đó nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit này được liên kết với đầu chặn mạch N of peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong “peptit kháng nguyên ung thư E” tốt hơn là hợp chất có công thức (12):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Trong “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein ” theo sáng chế, trình tự axit amin của peptit chỉ cần chứa ít nhất một gốc xystein. Số lượng các gốc xystein được chứa tốt hơn là từ 1 đến 3, tốt hơn nữa là từ 1 đến 2, tốt nhất là 1.

Theo sáng chế, “được giới hạn bởi MHC lớp II” có nghĩa là đặc tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ bằng cách liên kết với phân tử MHC lớp II.

HLA tương ứng với phân tử MHC lớp II được phân loại thành các kiểu phụ là HLA-DR, DQ và DP và tương tự. Các ví dụ được ưu tiên về “được giới hạn bởi MHC lớp II” bao gồm được giới hạn bởi HLA-DR, được giới hạn bởi HLA-DQ và được giới hạn bởi HLA-DP.

Do đó, “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II” theo sáng chế là peptit mà liên kết với kháng nguyên MHC lớp II in vitro và/hoặc in vivo và cảm ứng các tế bào T hỗ trợ. Số lượng các gốc axit amin của “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II” là từ 7 đến 30, tốt hơn là từ 14 đến 30.

Các ví dụ về “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein ” bao gồm các peptit đã được mô tả trong bảng 53. Trong mỗi bảng, “vị trí” có nghĩa là vị trí trong trình tự axit amin WT1 ở người đã được mô tả trong SEQ ID NO: 1.

Bảng 53

vị trí	trình tự axit amin	số trình tự
117-139	PSQASSGQARMFPNAPYLPSCLE	237
122-140	SGQARMFPNAPYLPSCLES	11
202-233	CHTPTDSCTGSQALLRTPYSSDNLYQMTSQL	9
328-349	PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	10
421-441	CQKKFARSDELVRHHNMHQRN	219

Peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11) và

PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

hoặc peptit có trình tự axit amin được biến đổi, mà là trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 10 - 11 nhưng chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin, và có hoạt tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ tốt hơn là làm “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein”.

Như đã được đề cập ở trên, “peptit chứa trình tự axit amin” có nghĩa là peptit trong đó có thêm axit amin được bổ sung vào axit amin có đầu chặn mạch N và/hoặc axit amin có đầu chặn mạch C của trình tự axit amin. Khi được bổ sung vào “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II chứa một gốc xystein”, việc bổ sung này có thể được thực hiện ở phía đầu chặn mạch N và/hoặc phía đầu chặn mạch C.

Theo sáng chế “peptit có trình tự axit amin được biến đổi chứa sự biến đổi về (các) gốc axit amin trong trình tự axit amin, và có hoạt tính cảm ứng các tế bào T hỗ trợ” cũng được gọi là “peptit hỗ trợ được biến đổi”. Peptit hỗ trợ được biến đổi này có nghĩa là peptit mà có trình tự axit amin trong đó có từ 1 đến 3 axit amin được loại bỏ, được thay thế và/hoặc được bổ sung và liên kết với MHC lớp II cảm ứng các tế bào T hỗ trợ. Số lượng axit amin được bổ sung (cũng kể cả việc chèn) tốt hơn là từ 1 đến 3. Số lượng axit amin được loại bỏ tốt hơn là 1 đến 5. Trong sự biến đổi này, axit amin được bổ sung hoặc axit amin được thay thế có thể là axit amin phi tự nhiên ngoài 20 loại axit amin được mã hóa bởi gen.

Ví dụ, các peptit sau đây có thể được đề cập là peptit hỗ trợ được biến đổi:

SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12) (xem tài liệu sáng chế 6),
 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19) và
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25), mà là peptit hỗ trợ được biến đổi của
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11); và
 GCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), mà là peptit hỗ trợ được biến
 đổi của PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10).

Tốt hơn là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit
 amin sau:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) và
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) làm “peptit WT1 được giới
 hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein”.

Hợp chất có công thức (6):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua,
 hợp chất có công thức (7):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua,

hợp chất có công thức (8):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

hợp chất có công thức (9):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, tốt hơn là làm hợp chất có công thức (1) trong đó R¹ là “peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II có từ 7 đến 30 gốc axit amin chứa một gốc xystein”.

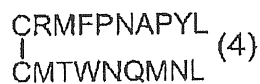
Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II.

Các ví dụ về hợp chất theo sáng chế được chứa trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm

hợp chất có công thức (3):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, hợp chất có công thức (4):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Các ví dụ về peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II được chứa trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tổng hợp hợp chất trong đó mỗi hai peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II khác nhau, hoặc hai epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I và epitop WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II khác nhau được liên kết thông qua liên kết disulfua. Phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước sau đây (1) - (3).

Ở bước (1) theo sáng chế, peptit trong đó nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C là C(Mmt)A và nhóm amino có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết được tổng hợp bằng cách sử dụng Fmoc-C(Mmt)A-SBn và peptit kháng nguyên ung thư C.

“Peptit kháng nguyên ung thư C” là “peptit kháng nguyên ung thư C” như đã được xác định ở trên. “Fmoc” là 9-fluorenylmethoxy nhóm cacbonyl. “Mmt” là nhóm monometoxytrityl. “SBn” là nhóm thiobenzyl.

Ở bước (2) theo sáng chế, peptit trong đó nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C trong peptit thu được trong bước (1) nêu trên và nhóm thioete của gốc xystein được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A được liên kết được tổng hợp bằng cách sử dụng peptit thu được trong bước (1) nêu trên và peptit kháng nguyên ung thư A trong đó một gốc xystein được bảo vệ bởi nhóm Npys được liên kết với đầu chặn mạch N.

“Peptit kháng nguyên ung thư A” là “peptit kháng nguyên ung thư A” như đã được xác định ở trên. “Npys” là nhóm 3-nitro-2-pyridylthio.

Ở bước (3) theo sáng chế, peptit trong đó nhóm thioete chứa gốc xystein được liên kết với đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A trong peptit thu được ở bước (2) nêu trên, và nhóm thioete chứa gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư D được liên kết, được tổng hợp bằng cách sử dụng peptit thu được ở bước (2) nêu trên và peptit kháng nguyên ung thư D chứa gốc xystein được bảo

vệ bởi nhóm Spy.

“Peptit kháng nguyên ung thư D” là “peptit kháng nguyên ung thư D” như đã được xác định ở trên. “SPy” là nhóm pyridylsulfite 2.

Hợp chất và peptit theo sáng chế, và các peptit là các sản phẩm trung gian của nó có thể được tạo ra theo phương pháp đã được mô tả trong các ví dụ của hoặc phương pháp thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit. Các ví dụ về phương pháp sản xuất bao gồm các phương pháp đã được mô tả trong các tài liệu (Peptit Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptit synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics và Experiment of Peptit Synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product subsequent vol. 14, Peptit Synthesis, Hirokawa Shoten, 1991) và tương tự.

Các ví dụ của nó bao gồm phương pháp sản xuất bằng bộ tổng hợp pha rắn sử dụng phương pháp Fmoc hoặc phương pháp Boc, và phương pháp sản xuất bằng cách cô liên tiếp amin Boc-axit or axit amin Z bằng quy trình tổng hợp pha lỏng (Fmoc là nhóm 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Boc là nhóm t-butoxycarbonyl, và Z là nhóm benzyloxycarbonyl).

Trong sản phẩm trung gian đối với việc tạo ra hợp chất theo sáng chế, nhóm chức như nhóm amino, nhóm carboxy, nhóm mercapto và tương tự có thể được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ thích hợp hoặc chống được bảo vệ nếu cần bằng cách sử dụng các kỹ thuật bảo vệ và chống bảo vệ. Đối với các nhóm bảo vệ phương pháp bảo vệ và phương pháp chống bảo vệ đã được mô tả chi tiết trong tài liệu “Protective Groups in Organic Synthesis 2nd Edition (John Wiley & Sons, Inc.; 1990)” và tương tự. Các ví dụ về protecting nhóm bảo vệ mercapto bao gồm nhóm acetamidomethyl, nhóm trityl và tương tự.

Khi hợp chất theo sáng chế có liên kết disulfua, liên kết disulfua có thể được tạo ra giữa hai peptit khác nhau chứa gốc cysteine hoặc giữa peptit chứa gốc cysteine và cysteine theo phương pháp thông thường được sử dụng đối với ngành hóa peptit. Các ví dụ về phương pháp tạo ra liên kết disulfua bao gồm các phương pháp đã được mô tả trong các tài liệu (Peptit Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptide

synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics và Experiment of peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product sequential vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten, 1991) và tương tự.

Cụ thể là, khi peptit chứa một gốc xystein, hợp chất có liên kết disulfua (hợp chất disulfua) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ tất cả các bảo vệ gồm có nhóm bảo vệ mercapto trên mạch bên xystein và oxy hóa trong dung môi trơ. Ngoài ra, nó có thể được tạo ra bằng cách trộn hai sản phẩm trung gian có nhóm mercapto trong dung môi phù hợp để cho phép xảy ra sự oxy hóa. Phương pháp đã biết để tạo ra liên kết disulfua trong việc tổng hợp peptit thông thường có thể được chọn lọc một cách phù hợp làm phương pháp để oxy hóa. Ví dụ, đối với việc oxy hóa iot, phương pháp gồm có tiến hành phản ứng oxy hóa bằng không khí trong các điều kiện kiềm, phương pháp để tạo ra liên kết disulfua bằng cách bổ sung chất oxy hóa trong các điều kiện kiềm hoặc axit và tương tự có thể được đề cập. Trong bản mô tả này, iot, dimetyl sulfoxit (DMSO), kali fericyanit và tương tự có thể được đề cập làm chất oxy hóa. Axit axetic, metanol, clorofom, DMF, DMSO và tương tự, hoặc hỗn hợp của nó có thể được sử dụng làm dung môi. Phản ứng oxy hóa thường đủ điều kiện làm hỗn hợp của các hợp chất disulfua đối xứng, không đối xứng. Hợp chất disulfua không đối xứng đích có thể thu được bằng cách tinh chế bằng nhiều phép ghi sắc ký, sự kết tinh lại và tương tự. Theo cách khác, sản phẩm trung gian có nhóm mercapto được kích hoạt và sản phẩm trung gian có nhóm mercapto được trộn để tạo ra liên kết disulfua chọn lọc. Nhóm mercapto được liên kết với nhóm Npys (nhóm 3-nitro-2-pyridinesulphenyl) và tương tự có thể được đề cập làm sản phẩm trung gian có nhóm mercapto được kích hoạt. Theo cách khác, một sản phẩm trung gian và, ví dụ, 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) được trộn trước để kích hoạt nhóm mercapto, và sau đó sản phẩm trung gian khác được bổ sung, nhờ đó liên kết disulfua chọn lọc có thể được tạo ra (Tetrahedron Letters. Vol. 37. No. 9, pp. 1347-1350).

Ngoài ra, khi hai hoặc nhiều hơn hai gốc xystein được chứa trong peptit, phương pháp tương tự như phương pháp nêu trên có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, thu được chất đồng phân với cách liên kết disulfua khác nhau. Chất nhũ trùng trong đó liên kết disulfua được tạo ra giữa các gốc xystein đích có

thể thu được bằng cách sử dụng sự kết hợp riêng giữa mạch bên xystein với các nhóm bảo vệ. Sự kết hợp của nhóm MeBzl (metylbenzyl) và nhóm Acm (axetamidometyl), nhóm Trt (trityl) và nhóm Acm, nhóm Npys (3-nitro-2-pyridylthio) và nhóm Acm, nhóm S-Bu-t (S-tert-butyl) và nhóm Acm và tương tự có thể được đề cập làm sự kết hợp nêu trên của các nhóm bảo vệ. Ví dụ, đối với trường hợp của sự kết hợp nhóm MeBzl và nhóm Acm, phương pháp tạo ra liên kết disulfua giữa nhóm Acm được bảo vệ bằng các gốc xystein, mà bao gồm việc loại bỏ nhóm bảo vệ ngoài nhóm MeBzl và mạch bên xystein, tiến hành phản ứng oxy hóa bằng không khí đối với dung dịch chứa peptit đơn phân để tạo ra liên kết disulfua giữa các gốc xystein chống được bảo vệ, và sau đó thực hiện việc chống bảo vệ bằng iot và sự oxy hóa và tương tự có thể được đề cập.

Hợp chất, peptit và sản phẩm trung gian thu được theo sáng chế có thể được tinh chế theo phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và phương pháp thường được sử dụng cho hóa học peptit. Ví dụ, chúng có thể được tinh chế bằng các phép sắc ký (ví dụ, phép sắc ký cột gel silic điôxit, phép sắc ký cột trao đổi ion, lọc gel, phép sắc ký pha đảo), kết tinh lại và tương tự. Ví dụ, các dung môi rượu như metanol, etanol, 2-propanol và tương tự, các dung môi ête như dietyl ête và tương tự, este các dung môi như etyl axetat và tương tự, các dung môi hydrocacbon thơm như benzen, toluen và tương tự, các dung môi xeton như axeton và tương tự, các dung môi hydrocacbon như hexan và tương tự, các dung môi aprotic như dimethylformamit, axetonitril và tương tự, nước, dung môi hỗn hợp của nó và tương tự có thể được sử dụng làm dung môi kết tinh lại. Các phương pháp được mô tả trong tài liệu Jikken Kagaku Kouza (The Chemical Society of Japan ed., Maruzen) vol. 1 v.v., và tương tự có thể được sử dụng làm các phương pháp tinh chế khác.

Các phương pháp tinh chế hợp chất disulfua được mô tả trong các tài liệu (Peptit Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics và Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product sequential vol. 14 peptide synthesis, Hirokawa Shoten, 1991) và tương tự. Trong số các tài liệu này, tài liệu HPLC là được ưu tiên hơn.

Khi hợp chất theo sáng chế có một hoặc nhiều điểm không đối xứng, có thể tạo ra hợp chất theo phương pháp thông thường và sử dụng nguyên liệu gốc có các điểm không đối xứng này (axit amin). Ngoài ra, để tăng độ tinh khiết quang học của hợp chất theo sáng chế, sự phân giải quang học và tương tự có thể được thực hiện ở các giai đoạn thích hợp của bước sản xuất. Ví dụ, phương pháp đồng phân phi đối ảnh bao gồm tạo ra muối của hợp chất theo sáng chế hoặc sản phẩm trung gian của nó với axit có hoạt tính quang học (ví dụ, các axit monocarboxylic như axit mandelic, N-benzyloxyalanin, axit lactic và tương tự, các axit dicarboxylic như axit tartaric, axit o-diisopropylidenetartaric, axit malic và tương tự, hoặc các axit sulfonic như axit camphorsulfonic, axit bromocamphorsulfonic và tương tự) trong dung môi trơ (ví dụ, các dung môi cồn như metanol, etanol, 2-propanol và tương tự, ête các dung môi như diethyl ête và tương tự, este các dung môi như ethyl axetat và tương tự, hydrocacbon các dung môi như toluen và tương tự, aprotic các dung môi như axetonitril và tương tự, và dung môi được trộn lẫn của nó) có thể được sử dụng làm phương pháp phân giải quang học phương pháp. Khi hợp chất theo sáng chế hoặc sản phẩm trung gian có nhóm chức có tính axit như nhóm carboxy và tương tự, sự phân giải quang học có thể được thực hiện bằng cách tạo ra muối có hoạt tính quang học (ví dụ, amin hữu cơ như α -phenetylamin, kinin, quinidin, cinchonidin, cinchonin, strychnin và tương tự).

Nhiệt độ để tạo ra muối được chọn ở khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ sôi của dung môi. Việc tăng nhiệt độ đến gần nhiệt độ sôi của dung môi là điều được mong muốn để cải thiện độ tinh khiết quang học. Khi muối được kết tủa được thu gom bằng cách lọc, để tăng hiệu suất thì việc làm nguội là cần thiết. Lượng phù hợp của axit có hoạt tính quang học, hoặc amin được sử dụng là ở trong khoảng từ 0,5 đến khoảng 2,0 đương lượng, tốt hơn là khoảng 1 đương lượng, tương ứng với chất nền. Khi cần, các tinh thể có thể được kết tinh lại trong dung môi trơ (ví dụ, các dung môi cồn như metanol, etanol, hoặc 2-propanol và tương tự, ête các dung môi như diethyl ête và tương tự, este các dung môi như ethyl axetat và tương tự, hydrocacbon các dung môi như toluen và tương tự, aprotic các dung môi như axetonitril và tương tự, và dung môi được trộn lẫn của nó) cũng là đủ điều kiện để làm muối có hoạt tính quang học có độ tinh khiết cao. Khi cần, muối được

phân giải quang học này có thể được xử lý với axit hoặc bazơ bằng phương pháp thông thường để tạo ra dạng tự do.

Các ví dụ về “muối được dụng” theo sáng chế bao gồm muối bổ sung axit và muối bổ sung bazơ. Các ví dụ về muối bổ sung axit bao gồm các muối axit vô cơ như hydroclorit, hydrobromua, sulfat, hydroiodit, nitrat, phosphat và tương tự, và các muối axit hữu cơ như citrat, oxalat, axetat, format, propionat, benzoat, trifluoroaxetat, maleat, tartrat, metanesulfonat, benzensulfonat, p-toluensulfonat và tương tự. Các ví dụ về muối bổ sung bazơ bao gồm các muối chứa bazơ vô cơ như muối natri, muối kali, muối canxi, muối magiê, muối amoni và tương tự, các muối có bazơ hữu cơ như muối trietylamoni, muối trietanolamoni, muối pyridinium, muối diisopropylammoni v.v., và tương tự, ngoài ra, các muối axit amin của bazơ hoặc các axit amin axitic như axit acginin, axit aspartic, axit glutamic và tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các hydrat, các dung môi như dung môi etanol và tương tự của hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó. Ngoài ra, sáng chế bao gồm các chất đồng phân lập thể bất kỳ như chất đồng phân phi đối ảnh, chất đồng phân đối ảnh bất kỳ và tương tự và các tinh thể bất kỳ trong các phương án bất kỳ, của hợp chất có công thức (1), mà có thể được có mặt.

Nói chung, trong việc sản xuất peptit, nhiều sản phẩm phụ như peptit khuyết axit amin, peptit bị suy biến bởi sự thủy phân, sự ôxi hóa và tương tự, peptit có axit amin bị triệt quang và tương tự xảy ra trong bước ngưng tụ axit amin α có hoạt tính quang học, bước loại bỏ các nhóm bảo vệ khác, bước cắt peptit khỏi nhựa và tương tự. Ở quy mô phòng thí nghiệm, các phép sắc ký khác nhau (ví dụ, phép sắc ký cột gel silic điôxit, phép sắc ký cột trao đổi ion, lọc gel, và phép sắc ký pha đảo) có thể được kết hợp để loại bỏ các tạp chất, nhờ đó có thể thu được peptit và hợp chất có độ tinh khiết cao. Tuy nhiên, không dễ để thu được peptit và hợp chất có độ tinh khiết cao ở mức quy mô công nghiệp để tạo ra các sản phẩm được.

Hợp chất theo sáng chế có các đặc tính lý hóa cho phép sản xuất khối lượng lớn được chất cho các sản phẩm được. Cụ thể là, có độ hòa tan cao, là ưu việt về độ ổn định trong dung dịch, khó bị đóng gel khi được cô và tương tự, và hợp chất có thể dễ dàng được sản xuất dưới dạng được chất có độ tinh khiết cao ở quy mô lớn bởi việc được tinh chế bằng bước sử dụng phép sắc ký cột như HPLC

pha đảo và tương tự.

Do các gốc xystein tạo ra liên kết disulfua và tương tự, và giữ lại đặc tính được quy định làm dược chất của các thuốc và có hoạt tính cảm ứng CTL hiệu quả. Nên hợp chất được tạo ra theo sáng chế là ưu việt về độ ổn định đối với chất oxy hóa và tương tự trong dung dịch.

Hợp chất theo sáng chế là hữu ích để làm thành phần hoạt tính của chất cảm ứng CTL đối với miễn dịch trị liệu bệnh ung thư, thành phần hoạt tính của vắc xin ung thư, hoặc thành phần hoạt tính của dược phẩm. Tức là, hợp chất theo sáng chế, như được thể hiện trong các ví dụ của bản mô tả này, có tính sinh miễn dịch ưu việt và có thể thể hiện hoạt tính cảm ứng CTL một cách hiệu quả. Ngoài ra, CTL được cảm ứng bởi hợp chất theo sáng chế có thể nhận biết một cách đáng kinh ngạc một phần peptit WT1 kiểu tự nhiên vốn đã có mặt trong các tế bào ung thư.

Hoạt tính cảm ứng CTL có thể được phát hiện bằng cách đo số lượng CTL bằng phương pháp HLA tứ phân (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)) hoặc bằng phương pháp pha loãng có giới hạn (Nat. Med.: 4, 321-327 (1998)). Theo cách khác, ví dụ, hoạt tính cảm ứng CTL được giới hạn bởi HLA-A24 có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng chuột mẫu HLA-A24 đã được mô tả trong tài liệu WO 02/47474 và Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002) và tương tự.

Do đó, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc điều trị hoặc thuốc phòng ngừa (thuốc ngăn ngừa sự tái phát) bệnh ung thư thể hiện gen WT1 hoặc bệnh ung thư được liên kết với việc gia tăng trong mức biểu hiện gen WT1. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm ung thư huyết như bệnh bạch cầu, hội chứng loạn tủy sản, u đa tủy, u lym pho ác tính và tương tự, và khối u thể bướu như ung thư dạ dày, ung thư trực kết tràng, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tế bào mầm, ung thư da, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tử cung, ung thư cổ tử cung, u não và tương tự.

Hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng có thể là thành phần hoạt tính của chất cảm ứng CTL đối với sự miễn dịch tế bào trị liệu bệnh ung thư, thành phần hoạt tính của vắc xin ung thư hoặc/và thành phần hoạt tính của dược

phẩm, bằng cách bào chế mỗi hợp chất hoặc muối ở dạng thích hợp.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với chất mang có thể được chấp nhận dưới dạng thuốc như tá chất phù hợp sao cho sự miễn dịch tế bào của nó sẽ được thiết lập một cách hiệu quả. Các tá chất đã được mô tả trong tài liệu (Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994) và tương tự có thể được sử dụng làm với tá chất. Cụ thể là, các thành phần có nguồn gốc từ nấm, GM-CSF, các xytokin như interleukin-2, interleukin-7, interleukin-12 và tương tự, các thành phần có nguồn gốc thực vật, các thành phần có nguồn gốc từ sinh vật biển, gel khoáng như nhôm hydroxit, lysolecitin, các chất hoạt động bề mặt như pluronic polyol, polyanion, peptit, nhũ tương dầu (sự điều chế nhũ tương) và tương tự có thể được đề cập. Lipit A, monophosphoryl lipit A, mà là dẫn xuất của nó, vi khuẩn chết (vi khuẩn *Mycobacterium* như vi khuẩn BCG và tương tự), các protein có nguồn gốc từ vi khuẩn, các polynucleotit, tá chất Freund không hoàn toàn, Freund tá chất hoàn toàn, các thành phần khung thành tế bào (ví dụ, BCG-CWS và tương tự), trehalose dimycolat (TDM) và tương tự có thể được đề cập làm các thành phần có nguồn gốc từ nấm.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng ở dạng điều chế liposom, sự điều chế hạt gồm có việc liên kết với các hạt có đường kính vài μm , sự điều chế gồm có liên kết với lipit và tương tự.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế (thể liên hợp) có thể được sử dụng cùng với peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là peptit hỗ trợ). Đối với phương pháp cùng sử dụng, thể liên hợp và peptit hỗ trợ có thể được sử dụng riêng rẽ. Sự điều chế hỗn hợp (chất hỗn hợp, hỗn hợp) chứa thể liên hợp và peptit hỗ trợ trong được phẩm riêng rẽ là được ưu tiên hơn. Sự điều chế hỗn hợp chứa thể liên hợp có khả năng tạo ra peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp I (tức là, peptit giết) và peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là peptit hỗ trợ). Do đó, bằng cách sử dụng sự điều chế hỗn hợp chứa peptit hỗ trợ, làm vắc xin ung thư đối với việc miễn dịch trị liệu bệnh ung thư, các tế bào T hỗ trợ mà là quan trọng đối với sự kích thích chức năng của các tế bào T khác bao gồm CTL cũng có thể được kích hoạt, và có thể cải thiện chức năng và hiệu lực (miễn dịch bình thường tế bào và tương tự) của liên hợp.

Peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ) đã được mô tả trong phần mô tả. Các ví dụ về peptit hỗ trợ đối với sự điều chế hỗn hợp bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243). Trong số chúng,
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) là được ưu tiên hơn.

Có thể xác nhận rằng sự điều chế hỗn hợp làm vắc xin ung thư thể hiện hiệu lực được cải thiện như miễn dịch bình thường tế bào và tương tự, ví dụ như được thể hiện trong các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm trong phần mô tả.

Trong khi liều chứa hợp chất theo sáng chế trong việc điều chế có thể được kiểm soát một cách thích hợp theo bệnh cần điều trị, tuổi tác và trọng lượng cơ thể của các bệnh nhân và tương tự, nói chung là từ 0,0001mg đến 1000mg, tốt hơn là từ 0,001mg đến 1000mg, tốt hơn nữa là từ 0,1mg đến 10mg.

Sử dụng trong da, sử dụng dưới da, sử dụng trong cơ, sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng áp da và tương tự có thể được đề cập làm phương pháp sử dụng. Sử dụng trong da và sử dụng dưới da là được ưu tiên do chúng cảm ứng một cách hiệu quả CTL. Trong khi tần suất sử dụng và các khoảng thời gian sử dụng có thể được kiểm soát một cách thích hợp theo bệnh cần phòng hoặc cần điều trị, và sự khác biệt riêng ở các bệnh nhân, về số lần sử dụng nói chung, thì tốt hơn là sử dụng một lần trong từ một vài ngày đến một vài tháng.

Bằng cách sử dụng được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính cho các bệnh nhân dương tính với WT1, có thể đề xuất phương pháp phòng bệnh hoặc điều trị bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích cụ thể trong phần dưới đây dựa vào các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Tổng hợp hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

bước 1. Tổng hợp H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH
(tổng hợp C(Npys)RMFPNAPYL)

Sử dụng nhựa Fmoc-Leu-Alko (Alko là rượu p-alkoxybenzyl), 282mg, (do Watanabe Chemical sản xuất; 0,71mmol/g, 0,2mmol) làm nguyên liệu, mạch peptit được lắp ráp bằng cách tổng hợp pha rắn theo phương pháp Fmoc/tBu. Sự tổng hợp pha rắn này được thực hiện bằng cách sử dụng máy tổng hợp peptit CS336X do CS Bio sản xuất, và việc loại bỏ nhóm bảo vệ của nhóm Fmoc được thực hiện bằng cách xử lý bằng dung dịch DMF chứa 20% piperidin trong 5 phút và trong 20 phút. Việc liên kết axit amin được bảo vệ được thực hiện bằng cách phản ứng với dung dịch DMF chứa 1,05mmol axit amin được bảo vệ, 1mmol HBTU và 2mmol DIPEA trong 1 giờ. Nhựa thu được này được rửa bằng DMF và ête, và được làm khô dưới áp suất giảm để tạo ra nhựa Boc-Cys(Npys)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Alko (630mg). Đối với nhựa peptit được bổ sung hỗn hợp TFA/H₂O/TIS=95/2,5/2,5 (10ml), và hỗn hợp này được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Nhựa này được lọc, và hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng nước đá và diethyl ête (50ml) được bổ sung vào. Chất kết tủa thu được được thu gom bằng cách lọc, được rửa bằng ête và được làm khô dưới áp suất giảm để thu được peptit thô (217mg). Dung dịch peptit thô thu được này được hòa tan trong hỗn hợp gồm 20% axit axetic dạng nước (7ml) và axetonitril (1ml) và được tinh chế bằng HPLC pha đảo.

bơm: LC-8A do Shimadzu sản xuất;

cột: YMC ODS-A 3 cmφ×25 cml, 10μm

nước giải hấp 1: H₂O/0,1%TFA

nước giải hấp 2: CH₃CN/0,1%TFA

tốc độ dòng: 20ml/phút

phát hiện: UV220nm

Dung dịch peptit thô được bơm vào cột được làm cân bằng với 15% nước giải hấp 2. Sau đó, nồng độ nước giải hấp 2 tăng lên đến 37% trong 10 phút, và tiếp theo tăng lên với tỷ lệ 0,24% trên phút. Các phân chứa sản phẩm đích được thu gom và được làm khô lạnh để tạo ra H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (53mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=1366,1$ $[M+1]^+$ (Được tính=1366,6)

bước 2. tổng hợp (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) liên kết disulfua

[Tức là, tổng hợp hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.]

H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (50mg) thu được ở bước 1 và H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (tức là, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4)) (43mg) được tổng hợp bằng phương pháp đã biết (ví dụ, tài liệu WO07/063903) được trộn, DMSO (1ml) được bổ sung, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 20 phút. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng với 0,1% TFA nước (5ml) và được tinh chế bằng HPLC pha đảo.

bơm: LC-8A do Shimadzu sản xuất;

cột: YMC ODS-A 3 cmφ×25 cml, 10μm

nước giải hấp 1: H₂O/0,1% TFA

nước giải hấp 2: CH₃CN/0,1% TFA

tốc độ dòng: 20ml/phút

phát hiện: UV220nm

Dung dịch phản ứng này được bơm vào cột được làm cân bằng với 25%

nước giải hấp 2. Sau đó, nồng độ nước giải hấp 2 được tăng lên với tỷ lệ là 0,25% trên phút. Các phần chứa sản phẩm đích được thu gom, được làm khô lạnh, được tinh chế lại bằng HPLC pha đảo, và được làm khô lạnh để tạo ra (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) liên kết disulfua (tức là, hợp chất có công thức (5), 21 mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z = 1191,8$ $[M+2]^{2+}$ (Được tính=1191,9)

Ví dụ 2

Tổng hợp peptit có trình tự axit amin sau:

CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13)

bước 1. Sử dụng nhựa Fmoc-Leu-Alko (Alko là rượu p-alkoxybenzyl) (338mg, do Watanabe Chemical sản xuất; 0,74mmol/g, 0,25mmol) làm nguyên liệu gốc, và sự tổng hợp pha rắn như trong phương pháp đã được mô tả trong ví dụ 1 được thực hiện hai lần để tạo ra nhựa H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Alko (1,54g). Đối với nhựa peptit này được bổ sung hỗn hợp TFA/H₂O/TIS=95/2,5/2,5 (15ml), và hỗn hợp này được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 3 giờ. Nhựa này được lọc, và hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. Hỗn hợp phản ứng này được làm mát bằng đá và diethyl ête (50 ml) được bổ sung. Kết tủa thu được được thu gom bằng cách lọc, được rửa bằng ête và được làm khô dưới áp suất giảm để tạo ra peptit thô (637mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=1211,9$ $[M+1]^+$ (Được tính=1212,5)

bước 2. peptit thô (321mg) thu được ở bước 1 được hòa tan trong TFA (10ml), và được nạp, bằng bơm HPLC, vào trong cột YMC-PACK ODS-A 3 cmφ×25 cml được làm cân bằng với HPLC (do Shimadzu sản xuất; LC6AD) nước giải hấp 1 =H₂O/0,1% TFA. Trạng thái này được duy trì trong khoảng 20 phút và, sau 20 phút, nồng độ nước giải hấp 2=CH₃CN/0,1% TFA tăng lên đến 27%. Sau đó, trong khi định phân nước giải hấp của peptit đích bằng 220nm UV, nồng độ nước giải hấp 2 được tăng lên với tỷ lệ là 0,25% trên phút và các phần chứa sản phẩm đích được thu gom. Peptit (100 mg) thu được sau khi được làm khô lạnh được tinh chế

lại bằng pha đảo dưới cùng các điều kiện, và axetonitril được làm bay hơi dưới áp suất giảm và gốc được làm khô lạnh để tạo ra peptit đích (CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13), 37,2mg).

bơm: LC-6A do Shimadzu sản xuất;

cột: YMC ODS-A 3 cmφ×25 cm, 10 μm

nước giải hấp 1: H₂O/0,1%TFA

nước giải hấp 2: CH₃CN/0,1%TFA

tốc độ dòng: 20ml/phút

phát hiện: UV220nm

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/z =1212,0 [M+1]⁺ (Được tính=1211,6)

Các ví dụ 3 - 5

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2, các peptit có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, 18 hoặc 17 được tổng hợp. Bảng 54 thể hiện lượng được tổng hợp và các kết quả của phép ghi phổ khối lượng.

Bảng 54

Số ví dụ	trình tự axit amin	Số trình tự	lượng được tổng hợp (mg)	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
3	CALLPAVPSL	16	42	983,8 [M+1] ⁺	983,2
4	CRVPGVAPTL	18	53	1012,7 [M+1H] ⁺	1012,2
5	CSLGEQQYSV	17	31	1113,7 [M+1] ⁺	1113,2

Ví dụ thử nghiệm 1

Các thay đổi theo thời gian của việc cắt axit amin có đầu chặn mạch N bằng ERAP1

Các peptit là các SEQ ID NO: 13, 16, 18 và 17 được tổng hợp trong các ví dụ từ 2 đến 5 được đánh giá đối với việc cắt axit amin có đầu chặn mạch N bằng ERAP1 (PLoS One November 2008, vol,3, Issue 11, e3658).

30 μ l ERAP1 (2,0mg/ml) trong dung dịch đệm PBS được bổ sung vào 258 μ l chất đệm Tris·HCl. Dung dịch DMSO (12,0 μ l) trên 10mM mỗi peptit được bổ sung vào dung dịch ERAP1 đã được đề cập ở trên và hỗn hợp này được trộn đều và được duy trì ở nhiệt độ trong phòng. 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 giờ sau, 50 μ l của mẫu được bổ sung vào 150 μ l MeOH để kết thúc phản ứng, 25 μ l được tiêm vào UFLC (các điều kiện phân tích được thể hiện ở dưới), và AUC của peptit đích được xác định. Peptit thu được bằng cách cắt được tổng hợp riêng rẽ về mặt hóa học, và được phân tích trong các điều kiện tương tự về độ tự do của enzym. Tỷ lệ hình thành của peptit thu được bằng cách cắt được xác định dựa trên AUC thu được.

các điều kiện phân tích

bơm: UFLC do Shimadzu sản xuất

cột: Shim-pack XR-ODS 3,0 mm i.d.x75 mm

dung dịch: 0,1% TFA H₂O(A) — 0,1% TFA CH₃CN(B)

nhiệt độ trong lò: 40°C

tốc độ dòng: 1,0ml/phút

độ dài bước sóng phát hiện: λ =220nm

độ dốc:

1. Nồng độ DUNG DỊCH B được tăng từ 1,0% đến 70% từ 0,0 phút đến 5,0 phút
 2. Nồng độ DUNG DỊCH B được tăng từ 1,0% đến 50% từ 0,0 phút đến 5,0 phút
- peptit đích:

Đối với các peptit được tổng hợp trong các ví dụ 2 – 5, các trình tự axit amin của các peptit thu được bằng cách cắt axit amin có đầu chặn mạch N bằng ERAP1 được thể hiện trong bảng 55.

Bảng 55

peptit được sử dụng cho thử nghiệm cắt			peptit thu được bằng cách cắt	
Số ví dụ	trình tự axit amin	Số trình tự	trình tự axit amin	Số trình tự
2	CRMFPNAPYL	13	RMFPNAPYL	2
3	CALLPAVPSL	16	ALLPAVPSL	5
4	CRVPGVAPTL	18	RVPGVAPTL	7
5	CSLGEQQYSV	17	SLGEQQYSV	6

Các thay đổi theo thời gian trong tỷ lệ hình thành của các peptit thu được bằng cách cắt được thể hiện trong bảng 56 và Fig.1.

Bảng 56

Số ví dụ	Số trình tự	độ dốc	tỷ lệ hình thành (%)			
			1 giờ sau	2 giờ sau	4 giờ sau	8 giờ sau
2	13	1	25,5	35,2	46,2	47,6
3	16	1	65,5	50,6	13,5	0
4	18	1	59,1	57,5	30,1	7,80
5	17	2	77,6	72,8	46,0	7,90

Các kết quả cắt thể hiện rõ ràng rằng trong các peptit được mở rộng bởi Cys (các SEQ ID NO: 13, 16, 17 và 18), Cys trên đầu chặn mạch N được mở rộng được cắt một cách có chọn lọc bằng ERAP-1, là, peptit được mở rộng bởi Cys trải qua việc cắt thích hợp bằng ERAP-1 mà không có sự phụ thuộc rõ rệt vào trình tự peptit, và cuối cùng được chuyển thành peptit kháng nguyên ung thư đích (SEQ ID NO: 2, 5, 6 hoặc 7).

Ví dụ thử nghiệm 2

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402

Hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ 1 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402. Hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã được đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư B là CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1

được giới hạn bởi HLA-A0201, và CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A24.

Chuột chuyển gen HLA-A0201 (C57BL/6CrHLA-A2,1DR1) là chuột mà mà khuyết MHC chuột, và thể hiện HLA chứa gen của loài khác là MHC HLA-A0201 người và MHC H-2D^b chuột, và HLA-DRB1*0101. Bằng cách sử dụng chuột này, peptit dương tính với HLA-A02 có khả năng cảm ứng CTL ở người có thể được chọn lọc (Eur J Immunol. 2004; 34: 3060-9). Mặt khác, chuột chuyển gen HLA-A2402 (C57BL/6CrHLA-A2402/K^b) là chuột mà thể hiện HLA chứa gen của loài khác là MHC HLA-A2402 người và MHC H-2K^b chuột. Bằng cách sử dụng chuột này, peptit dương tính với HLA-A24 có khả năng cảm ứng CTL ở người có thể được chọn lọc (Int J Cancer. 2002; 100: 565-70).

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 4) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bằng cách tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 4), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng hợp chất có công thức (5).

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 40mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 5mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa này được sử dụng ở 4 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 250 μ g/vị trí. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức 0,15 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ, và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được cấy vào đĩa ở mức 1 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ, trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40 μ g/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào

các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10 µg/ml. Ngoài ra, peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 4) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 ở nồng độ cuối là 10 µg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 20 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó thực hiện sự tái kích thích peptit in vitro. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.2, và các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 được thể hiện trên Fig.3.

Trên mỗi Fig trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.2, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng của peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trên Fig.3, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng của peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đối tượng, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong chuột in vivo bằng cách sử dụng hợp chất có công thức (5).

Trên mỗi Fig giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng hoàn toàn không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201, và sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng là hợp chất có công thức (5) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 và CTL đặc hiệu đối với

peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (5) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và việc cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 4.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (5), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai peptit WT1 khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng hai loại CTL in vivo khác nhau.

Các ví dụ tham chiếu từ 1 đến 7

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2, các peptit tương ứng có các trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22, 24, 23, 2, 4, 6 và 5 được tổng hợp. Bảng 57 thể hiện các kết quả của phép ghi phổ khối lượng. Do các SEQ ID NO: 22, 24, 23, 2, 4, 6 và 5 không phải là hợp chất theo sáng chế, nên chúng được mô tả dưới dạng các ví dụ tham chiếu.

Bảng 57

Số ví dụ tham chiếu	trình tự axit amin	Số trình tự	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/ MS m/z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
1	CNKRYFKLSHLQM HSRK	22	1089,1 [M+2H] ⁺	1089,3
2	CNKRYFKLSHLQM HSRKHTG	24	825,1 [M+3H] ⁺	824,8
3	CNKRYFKLSHLQM HSRKH	23	772,4 [M+3H] ⁺	772,2
4	RMFPNAPYL	2	1109,0 [M+H] ⁺	1109,3
5	CYTWNQMNL	4	1172,9 [M+H] ⁺	1173,4
6	SLGEQQYSV	6	1010,9 [M+H] ⁺	1011,1
7	ALLPAVPSL	5	881,0 [M+H] ⁺	881,1

Các ví dụ 6 - 9

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 1, các hợp chất tương ứng (các thể liên hợp) được thể hiện bởi các công thức (3), (6), (7) và (8) được tổng hợp. Bảng 58 thể hiện các kết quả của phép ghi phổ khối lượng. (Trong mỗi công thức, liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.)

Bảng 58

Số ví dụ	công thức cấu tạo	Số công thức	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/ MS m/z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
6	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CSLGEQQYSV} \end{array}$	(3)	1162,3 [M+2H] ⁺	1162,0
7	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG} \end{array}$	(6)	1228,0 [M+3H] ⁺	1227,6
8	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKH} \end{array}$	(7)	705,8 [M+5H] ⁺	705,3
9	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRK} \end{array}$	(8)	1129,8 [M+3H] ⁺	1129,2

Ví dụ thử nghiệm 3

Đo độ hòa tan

bước 1. Điều chế chất đệm isotonic

1,75% dung dịch dạng nước của dinatri hydro phosphat và 5,53% dung dịch dạng nước của axit citric được trộn, và các chất đệm tương ứng (pH 6,0 và 7,4) được điều chế.

bước 2. Điều chế dung dịch thử nghiệm

khoảng 1mg của sản phẩm thử nghiệm được đo, chất đệm isotonic (0,5ml) được bổ sung, và dung dịch này được sử dụng làm dung dịch thử nghiệm. Dung dịch thử nghiệm được điều chế này được lắc ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 90 phút (các điều kiện lắc: RECIPRO SHAKER SR-1N do TAITTEC sản xuất, ở tốc độ=8), được quay ly tâm (15000vòng/phút, trong 5 phút, ở nhiệt độ trong

phòng), và dịch nổi sau khi quay ly tâm được sử dụng làm dung dịch thử nghiệm.

bước 3. Điều chế dung dịch tiêu chuẩn

Khoảng 1mg của sản phẩm thử nghiệm được đo một cách chính xác, được hòa tan trong 0,1% TFA nước/axetonitril=1/1, tạo ra lượng tổng cộng là 10 ml, và dung dịch này được sử dụng làm dung dịch tiêu chuẩn của sản phẩm thử nghiệm.

bước 4. đo nồng độ của sản phẩm thử nghiệm

Dung dịch tiêu chuẩn của sản phẩm thử nghiệm và dung dịch thử nghiệm được phân tích bằng HPLC (các điều kiện phân tích đã được mô tả trong bảng 59), và độ hòa tan của sản phẩm thử nghiệm được tính từ tỷ số vùng đỉnh của dung dịch tiêu chuẩn này.

Các điều kiện đo HPLC

cột: ChemcoPack Quicksorb (4,6mmφ×150mm, 5μm) do Chemco Scientific Co., Ltd. sản xuất

pha di động: DUNG DỊCH A; 0,1% TFA nước, DUNG DỊCH B; 0,1% TFA dung dịch axetonitril

nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng

tốc độ dòng: 1ml/phút

độ dài bước sóng phát hiện: UV 254nm, 230nm (phát hiện độ dài bước sóng 2)

thể tích tiêm mẫu: 10μL

Bảng 59

độ dốc các điều kiện phân tích		
Thời gian (phút)	DUNG DỊCH A (%)	DUNG DỊCH B (%)
0,00	80	20
10,00	0	100
15,00	0	100
15,01	80	20
25,00	80	20
25,01	STOP	

Các peptit được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 1 - 2 và 4 - 7 và các hợp chất (các thể liên hợp) được tổng hợp trong các ví dụ 1, 7 và 9 được đo độ hòa

tan được đề cập ở trên. Mỗi độ hòa tan được thể hiện trong bảng 60.

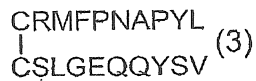
Bảng 60

Số ví dụ tham chiều hoặc Số ví dụ	trình tự axit amin hoặc công thức cấu tạo	SEQ ID NO: Hoặc Số công thức	pH 6,0 (mg/ml)	pH 7,4 (mg/ml)
Ví dụ tham chiều 6	SLGEQQYSV	SEQ ID NO: 6	>1,0	>1,0
Ví dụ tham chiều 7	ALLPAVPSL	SEQ ID NO: 5	>1,0	>1,0
Ví dụ tham chiều 2	CNKRYFKLSHLQMHSRKH TG	SEQ ID NO: 24	>1,0	0,556
Ví dụ tham chiều 1	CNKRYFKLSHLQMHSRK	SEQ ID NO: 22	>1,0	0,931
Ví dụ 7	CRMFPNAPYL CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	công thức (6)	>1,0	0,279
Ví dụ 9	CRMFPNAPYL CNKRYFKLSHLQMHSRK	công thức (8)	>1,0	0,789
Ví dụ tham chiều 4	RMFPNAPYL	SEQ ID NO: 2	>1,0	>1,0
Ví dụ tham chiều 5	CYTWNQMNL	SEQ ID NO: 4	0,106	0,167
Ví dụ 1	CRMFPNAPYL CYTWNQMNL	công thức (5)	0,511	0,200

Ví dụ thử nghiệm 4

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (3) được tổng hợp trong ví dụ 6 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (3):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là hợp chất của công thức (1) nêu trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư B là SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) là các peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201.

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (3) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 6) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 6), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (3).

Cụ thể là, hợp chất có công thức (3) được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 10mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 500 μ g/vị trí. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO $_2$, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,75 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 6) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2, 6) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 20 giờ ở 37°C, 5% CO $_2$, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát

triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.4.

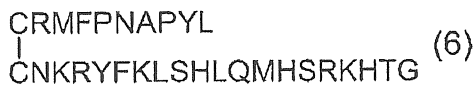
Trên Fig.4, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.4, thanh màu đen và thanh bóng mờ thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng mỗi peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, 6, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả việc nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen hoặc thanh bóng mờ và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng hợp chất có công thức (3) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với mỗi peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 2, 6 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.4, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, 6 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (3) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, 6. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (3) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và việc cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và 6. Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (3), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại peptit khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng hai loại CTL in vivo khác nhau.

Ví dụ thử nghiệm 5

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (6) được tổng hợp trong ví dụ 7 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (6):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã được đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư C là CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2. Bằng cách sử dụng chuột này, peptit dương tính với HLA-A02 có khả năng cảm ứng CTL ở người có thể được chọn lọc, cũng như hoạt tính mở rộng cảm ứng CTL của peptit hỗ trợ có khả năng cảm ứng các tế bào T hỗ trợ bằng cách liên kết với HLA-DRB1*0101 người có thể được đánh giá.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (6) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 24) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 24), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (6). Ngoài ra, các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (6) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2), và các số lượng tế bào sản sinh IFN γ được so sánh.

Cụ thể là, peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 6mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Peptit được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Hợp chất có công thức (6) được hòa tan trong nước để tiêm (19,8mg/ml), và được nhũ tương hóa bằng cách trộn

với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 495 $\mu\text{g}/\text{vị trí}$. Số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều của hợp chất có công thức (6) trên một con chuột được điều chỉnh để cân bằng với số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều trên chuột. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO_2 , lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT $\text{IFN}\gamma$ được sử dụng để đo sự sản sinh $\text{IFN}\gamma$. Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng $\text{IFN}\gamma$ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ hoặc $0,5 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 24) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2, 24) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 20 giờ ở 37°C , 5% CO_2 , nhờ đó thực hiện sự tái kích thích peptit in vitro. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT $\text{IFN}\gamma$ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên các Fig.5 và 6.

Trên Fig.5 và 6, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử dụng cho con chuột này. Trên Fig.5, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 hoặc hợp chất có công thức (6) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện

bởi SEQ ID NO: 2 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.5, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Ngoài ra, trên Fig.5, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (6), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được cảm ứng bằng cách sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2.

Trên Fig.6, ngoài ra, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng các tế bào phản ứng lại peptit, và rằng việc sử dụng hợp chất có công thức (6) dẫn đến sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo trong con chuột này, và việc sử dụng hợp chất được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 không cảm ứng được các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.6, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (6) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (6) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và 24. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được tạo ra từ hợp chất có công thức (6) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit

được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện, khi so sánh với việc sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (6), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại các peptit khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ thử nghiệm 6

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (8) được tổng hợp trong ví dụ 9 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bằng thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (8):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư C là CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (8) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 22), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (8). Ngoài ra, các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (8) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất được thể

hiện bởi SEQ ID NO: 2 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2), và các số lượng tế bào sản sinh IFN γ được so sánh.

Cụ thể là, peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 6mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Peptit được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Hợp chất có công thức (8) được hòa tan trong nước để tiêm (18mg/ml), và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 450 μ g/vị trí. Số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều của hợp chất có công thức (8) trên một con chuột được điều chỉnh để cân bằng với số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều trên chuột. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO $_2$, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức 0,25 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ hoặc 0,5 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 22) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2, 22) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 20 giờ ở 37°C, 5% CO $_2$, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên các Fig.7 và 8.

Trên các Fig.7 và 8, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử

dụng cho con chuột này. Trên Fig.7, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 hoặc hợp chất có công thức (8) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.7, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Ngoài ra, trên Fig.7, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (8), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được cảm ứng bằng cách sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2.

Trên Fig.8, ngoài ra, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng các tế bào phản ứng lại peptit, và rằng việc sử dụng hợp chất có công thức (8) dẫn đến sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 in vivo trong con chuột này, và việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 không cảm ứng được các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.8, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (8) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và các tế bào phản

ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (8) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và 22. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 được tạo ra từ hợp chất có công thức (8) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện, khi so sánh với việc sử dụng hợp chất được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (8), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại peptit tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ 10

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 1, các hợp chất tương ứng (các thể liên hợp) có công thức (9) được tổng hợp. Bảng 61 thể hiện các kết quả của phép ghi phổ khối lượng. (Trong mỗi công thức, liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.)

Bảng 61

Số ví dụ	công thức cấu tạo	Số công thức	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/Z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
10	$\begin{array}{c} \text{CALLPAVPSL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG} \end{array}$	9	1151,9 [M+3H] ³⁺	1152,0

Ví dụ tham chiếu 8 - 9

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2, các peptit chứa các trình tự axit amin được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 238 – 239 được tổng hợp. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 62.

Do các peptit đã được mô tả trong bảng này không phải là hợp chất theo sáng chế, nên chúng được thể hiện dưới dạng các ví dụ tham chiếu.

Bảng 62

Số ví dụ	trình tự axit amin	SEQ ID NO:	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/Z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
8	RMFPNAPYLCYTWNQMN L	238	1132,2 [M+2H] ²⁺	1132,3
9	CYTWNQMNLRMFPNAPY L	239	1133,0 [M+2H] ²⁺	1132,3

Các ví dụ tham chiếu 10 - 11

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2, các peptit chứa các trình tự axit amin được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 240 - 241 được tổng hợp. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 63. Do các peptit đã được mô tả trong bảng này không phải là hợp chất theo sáng chế, nên chúng được thể hiện dưới dạng các ví dụ tham chiếu.

Bảng 63

Số ví dụ tham chiếu	trình tự axit amin	SEQ ID NO:	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
10	RMFPNAPYLG GGGGGCYT WNQMNL	240	1303,7 [M+2H] ²⁺	1303,5
11	CYTWNQMNGGGGGGRMF PNAPYL	241	1303,0 [M+2H] ²⁺	1303,5

Các peptit được thể hiện ở bảng 63 được tổng hợp bằng cách viện dẫn đến tài liệu phi sáng chế, Cancer Science January 2012, Vol. 103, no. 1, 150-153.

Ví dụ thử nghiệm 7

Thử nghiệm độ ổn định của thể liên hợp và hỗn hợp vắc xin

bước 1

Thể liên hợp (công thức số (6)) (2,4 mg) được hòa tan trong 120 μ L nước để tiêm và được bảo quản trong điều kiện tạo màu ở nhiệt độ trong phòng.

bước 2

Peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 (1,1 mg) được hòa tan trong 180 μ L nước để tiêm, 123 μ L của nó được sử dụng để hoàn tan peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 (1,3 mg), và dung dịch được bảo quản trong điều kiện tạo màu ở nhiệt độ trong phòng làm hỗn hợp vắc xin.

bước 3

Các dung dịch (2,5 μ L) thu được ở bước 1 và bước 2 được pha loãng với nước để tiêm (50 μ L) và được phân tích HPLC (các điều kiện phân tích được thể hiện ở dưới), và tỷ lệ phần trăm hàm lượng của thể liên hợp và peptit trong dung dịch dạng nước được đo với giá trị diện tích ngay sau khi bắt đầu việc bảo quản là 100%. Tỷ lệ phần trăm hàm lượng của thể liên hợp được thể hiện trong bảng 64, và tỷ lệ phần trăm hàm lượng của mỗi peptit trong hỗn hợp vắc xin được thể hiện trong bảng 65.

các điều kiện phân tích

bơm: UFLC do Shimadzu sản xuất

cột: Kinetex 2,6u C18 100A 3,0 mm i.d. x 75 mm

pha di động: DUNG DỊCH A; 0,1% TFA nước, DUNG DỊCH B; 0,1% TFA

dung dịch axetonitril

nhiệt độ cột: 40°C

tốc độ dòng: 1ml/phút

độ dài bước sóng phát hiện: UV 220, 254nm (phát hiện độ dài bước sóng 2)

thể tích tiêm mẫu: 10 μ L

Bảng 64

thời gian trôi qua	Số công thức. (6) tỷ lệ phần trăm hàm lượng (%)
1 ngày	107
2 tuần	96

Bảng 65

thời gian trôi qua	SEQ ID NO: 2 tỷ lệ phần trăm hàm lượng (%)	SEQ ID NO: 24 tỷ lệ phần trăm hàm lượng (%)
1 ngày	97	65
1 tuần	99	9
2 tuần	94	6

Trong ví dụ thử nghiệm 7, thể liên hợp có công thức số (6) chứa 96% hợp chất có công thức (6) ở thời điểm 2 tuần từ khi điều chế dung dịch. Ngược lại, trong dung dịch được trộn giữa SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 24, mà là hỗn hợp vắc xin, tỷ lệ phần trăm hàm lượng của SEQ ID NO: 24 giảm xuống mức 65% ở thời điểm 1 ngày trôi qua, và xuống 6% 2 tuần sau. Các kết quả này thể hiện rằng thể liên hợp được bảo quản trong hình thành ở dạng dung dịch dạng nước là ổn định hơn hỗn hợp vắc xin được bảo quản trong các điều kiện tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 8

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (7) được tổng hợp trong ví dụ 8 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (7):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức

(1) đã đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư C là CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (7) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 23) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 23), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (7). Ngoài ra, các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (7) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2), và các số lượng tế bào sản sinh IFN γ được so sánh.

Cụ thể là, peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 6mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Peptit được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Hợp chất có công thức (7) được hòa tan trong nước để tiêm (19mg/ml), và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 475 μ g/vị trí. Số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều của hợp chất có công thức (7) trên một con chuột được điều chỉnh để cân bằng với số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều trên chuột. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO $_2$, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen

HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ hoặc $0,5 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 23) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2, 23) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 17 giờ ở 37°C , 5% CO_2 , nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên các Fig.9 và Fig.10. Trên các Fig.9 và Fig.10, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử dụng cho con chuột này. Trên Fig.9, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 hoặc hợp chất có công thức (7) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.9, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Ngoài ra, trên Fig.9, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (7), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được cảm ứng bằng cách sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2.

Trên Fig.10, ngoài ra, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng các tế bào phản ứng lại peptit, và rằng việc sử dụng hợp chất có công thức (7) dẫn đến sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23 in vivo trong con chuột này, và việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 không cảm ứng được các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.10, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (7) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (7) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và 23. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 23 được tạo ra từ hợp chất có công thức (7) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện, khi so sánh với việc sử dụng hợp chất được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (7), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại peptit tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ thử nghiệm 9

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (9) được tổng hợp ở ví dụ 10 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (9):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5) và peptit kháng nguyên ung thư C là CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24). ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5) là HLA-A0201 và peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (9) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 5) và các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 24) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 5, 24), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (9). Ngoài ra, các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (9) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 5), và các số lượng tế bào sản sinh IFN γ được so sánh.

Cụ thể là, peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 6mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Peptit được nhũ tương hóa này được sử dụng cho 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Hợp chất có công thức (9) được hòa tan trong nước để tiêm (23,6mg/ml), và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA- incomplete Freund's tá chất). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 590 μ g/vị trí. Số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 5 được chứa

trong liều của hợp chất có công thức (9) trên một con chuột được điều chỉnh để cân bằng với số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 5 được chứa trong liều trên chuột. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ hoặc $0,75 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 5, 24) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 5, 24) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 17 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên các Fig.11 và 12. Trên các Fig.11 và 12, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử dụng cho con chuột này. trên Fig.11, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc hợp chất có công thức (9) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.11, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 không

phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Trên Fig.11, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (9), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được cảm ứng bằng cách sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5.

Ngoài ra, trên Fig.12, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng các tế bào phản ứng lại peptit, và rằng việc sử dụng hợp chất có công thức (9) dẫn đến sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo trong con chuột này, và việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5 không cảm ứng được các tế bào phản ứng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.12, giá trị của thanh màu trắng hầu như không phát hiện thấy. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (9) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5 và CTL phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24. Điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (9) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 5 và 24. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được tạo ra từ hợp chất có công thức (9) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5, và các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5 được phát hiện, khi so sánh với việc sử dụng hợp chất được thể thiện bởi SEQ ID NO: 5.

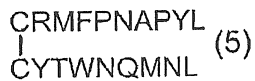
Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (9), mà là một phương án của

hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại peptit khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ so sánh 1

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402

Hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 238 và 239 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 8 và 9 được đánh giá đối với khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402. Hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là như đã được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2. Peptit được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 238 và 239 là peptit mạch dài trong đó RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2), mà là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4), mà là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, được liên kết bởi liên kết amit.

Chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402 đã được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 238, 239 dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 4) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 4), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 238, 239.

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 238, 239 mỗi trong số chúng được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 40mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 5mg/ml, và được

nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 4 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 250µg/vị trí. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức 0,25 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ, và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được cấy vào đĩa ở mức 1 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ, trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40 µg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10µg/ml. Ngoài ra, peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 4) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 ở nồng độ cuối là 10µg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 18 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó thực hiện sự tái kích thích peptit in vitro. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.13, và các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 được thể hiện trên Fig.14.

Trên mỗi Fig trực tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.13, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trên Fig.14, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 với sự

xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đối tượng, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột in vivo bằng việc sử dụng hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 238, 239.

Trên mỗi Fig giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng hoàn toàn không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với hợp chất có công thức (5), và sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A02402 được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Mặt khác, trong khi sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 238; tuy nhiên, khi so sánh với các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với hợp chất có công thức (5), số lượng của nó là rất nhỏ. Sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 238. Trong khi sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 239; tuy nhiên, khi so sánh với các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với hợp chất có công thức (5), số lượng của nó là nhỏ. Việc sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với peptit SEQ ID NO: 239.

Từ đó, hợp chất có công thức (5) theo sáng chế rõ ràng có thể cảm ứng một cách hiệu quả CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4. Mặt khác, peptit

mạch dài được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 238, 239 có thể không cảm ứng một cách hiệu quả cả CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4.

Ví dụ so sánh 2

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402

Hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 240 và 241 được tổng hợp trong các ví dụ tham chiếu 10 và 11 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bằng thử nghiệm cảm ứng CLT in vivo sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402. Hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, đã được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2. Peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 240 và 241 là peptit mạch dài trong đó RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2), mà là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4), mà là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, được liên kết bởi liên kết amit thông qua 6 glyxin làm đệm peptit.

Chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402 là như đã được chỉ ra trong ví dụ thử nghiệm 2.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) và SEQ ID NO: 240, 241 peptit được thể thiện bởi dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 4) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 4), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 240, 241.

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 10mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn

toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 500 µg/vị trí. Ngoài ra, các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 240, 241 được hòa tan trong dimetyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 11mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 550 µg/vị trí. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 ở mức $1,5 \times 10^6$ các tế bào/lỗ được cấy vào đĩa trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40mg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10mg/ml. Ngoài ra, peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 4) được bổ sung vào Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 ở nồng độ cuối là 10µg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 17 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.15, và các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 được thể hiện trên Fig.16.

Trên mỗi Fig trực tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.15, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các

kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trên Fig.16, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đối tượng, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5) và các peptit được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 240, 241.

Trên mỗi Fig giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với hợp chất có công thức (5), và sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Mặt khác, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 là cực kỳ ít trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 240; tuy nhiên, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A02402 được sử dụng với hợp chất được thể hiện bởi SEQ ID NO: 240. Ngoài ra, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 là cực kỳ ít trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241. Trong khi sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241; tuy nhiên, khi so sánh với các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với hợp chất có công thức (5), số lượng của nó là rất nhỏ.

Từ đó, hợp chất có công thức (5) theo sáng chế rõ ràng có thể cảm ứng một cách hiệu quả CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4. Mặt khác, peptit mạch dài chứa đệm peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 240, 241 có thể không cảm ứng một cách hiệu quả cả CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 và CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4.

Ví dụ thử nghiệm 10

Peptit được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 3 và các hợp chất (các thể liên hợp) được tổng hợp trong các ví dụ 6 và 9 được tiến hành đo độ hòa tan bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 3. Mỗi độ tan được thể hiện trong bảng 66.

Bảng 66

Số ví dụ và số ví dụ tham chiếu	trình tự axit amin or công thức cấu tạo	SEQ ID NO: hoặc số công thức	pH 6,0 (mg/ml)	pH 7,4 (mg/ml)
Ví dụ tham chiếu 3	CNKRYFKLSHLQMHSRKH	SEQ ID NO: 23	>1,0	0,712
Ví dụ 6	CRMFPNAPYL CSLGEQQYSV	công thức (3)	>1,0	>1,0
Ví dụ 10	CALLPAVPSL CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	công thức (9)	>1,0	0,565

Các ví dụ 11 - 12

Các peptit có các trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 242 – 243 được tổng hợp. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 67. Các peptit đã được mô tả trong bảng 67 là các hợp chất theo sáng chế.

Bảng 67

Số ví dụ	trình tự axit amin	SEQ ID NO:	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
11	CWAPVLDFAPPGASAYGSL	242	1923,5 [M+H] ¹⁺	1923,2
12	WAPVLDFAPPGASAYGSLC	243	1923,6 [M+H] ¹⁺	1923,2

Ví dụ 13

Mỗi hợp chất (thể liên hợp) có công thức 10 được tổng hợp bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 1. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 68, trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Bảng 68

Số ví dụ	công thức cấu tạo	công thức No.	phép ghi phổ khối lượng:LC-ESI/MS m/Z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
13	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CWAPVLDFAPPGASAYGSL} \end{array}$	10	1566,6 [M+2H] ²⁺	1566,8

Ví dụ tham chiếu 12

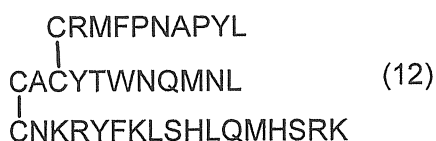
Mỗi hợp chất (thể liên hợp) có công thức 11 được tổng hợp bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 1. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 69, trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua. Peptit đã được mô tả trong bảng không phải là hợp chất theo sáng chế, và do đó, nó được mô tả dưới dạng ví dụ tham chiếu.

Bảng 69

Số ví dụ tham chiếu	công thức cấu tạo	công thức No.	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
12	$\begin{array}{c} \text{WAPVLDFA} \\ \\ \text{PPGASAYGSLC} \\ \\ \text{CRMFPNAPYL} \end{array}$	11	1044,8 [M+3H] ³⁺	1044,9

Ví dụ 14

Tổng hợp hợp chất có công thức (12):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua

bước 1. Tổng hợp Fmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBn (Mmt is 4-Methoxytrityl)

(Tổng hợp Fmoc-C(Mmt)A-SBn)

Dung dịch Fmoc-Cys(Mmt)-OH (4,80 g), N,N-diisopropyletylamin (2,56 ml), axit hexafluorophosphoric (benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium (4,50g) và H-Ala-SBn được tổng hợp bằng phương pháp đã biết (ví dụ, tài liệu Journal of Organic Chemistry, Vol. 64, No. 24 8761-8769) trong clorofom (20 ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tinh chế bằng phép sắc ký cột (dung môi rửa giải, hexan/etyl axetat) để tạo ra hợp chất đích, Fmoc-C(Mmt)A-SBn (2,80 g).

NMR:¹H NMR (CDCl₃) δ 7,72 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,38-7,34 (m, 7H), 7,29-7,25 (m, 6H), 7,23-7,15 (m, 7H), 6,76 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,15 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,95 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,57 (quin, J = 7,6 Hz, 1H), 4,35 (d, J = 6,8 Hz, 2H) 4,19-4,17 (m, 1H), 4,04 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,72 (dd, J = 13,2, 8,4 Hz, 1H), 2,61 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 1,31 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

bước 2. Tổng hợp H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH

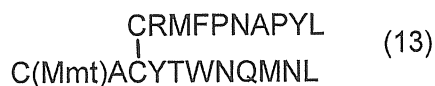
(Tổng hợp C(Mmt)ACYTWNQMNL)

Dung dịch Fmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBn(11mg) thu được ở bước 1, H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (21 mg) được tổng hợp bằng phương pháp đã biết (ví dụ, tài liệu WO07/063903), N,N-diisopropyletylamin (200 μ L), 3,3',3''-Phosphanetriyl tripropanoic axit hydrochlorit (1mg), 4-mercaptophenylaxetic axit (1mg) và 0,1M chất đệm natri phosphat (pH 7,5, 200 μ L) trong DMF (400 μ L) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng 4 giờ. Đối với hỗn hợp phản ứng này được bổ sung diethylamin (200 μ L) và hỗn hợp này còn được khuấy trong khoảng 15 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tinh chế bằng HPLC pha đảo để tạo ra hợp chất đích, C(Mmt)ACYTWNQMNL (7mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=810,2$ $[M+2H]^{2+}$ (Được tính=810,5)

bước 3. Tổng hợp (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) liên kết disulfua

[tức là, tổng hợp hợp chất có công thức (13):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Dung dịch H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (51mg) thu được ở bước 2 và (H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (43mg) thu được trong ví dụ 1, bước 1 trong DMF (4ml) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tinh chế bằng HPLC pha đảo để tạo ra 39g hợp chất đích, (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) liên kết disulfua [tức là, hợp chất có công thức (13)].

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=1414,4$ $[M+2H]^{2+}$ (Được tính=1415,2)

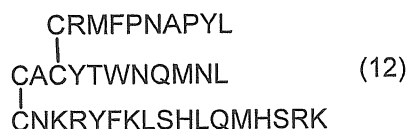
bước 4. Tổng hợp H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH

(Tổng hợp C(SPy)NKRYFKLSHLQMHSRK)

20% khối lượng/thể tích dung dịch H-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH (182mg) thu được trong ví dụ tham chiếu 1 và 2,2'-dipyridylbisulfit (dung dịch isopropanol 0,2M, 544 μ L) trong nước axít axetic (4 ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 17 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tinh chế bằng HPLC pha đảo để tạo ra hợp chất đích, H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH (177 mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=1143,5$ $[M+2H]^{2+}$ (Được tính=1142,9)

bước 5. Tổng hợp hợp chất có công thức (12):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua

Dung dịch (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) liên kết disulfua thu được ở bước 3 [tức là, hợp chất có công thức (13)] (9mg), H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH (24 mg) thu được ở bước 4 và triisopropylsilan (10 μ L) trong axit trifluoroaxetic (190 μ L) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tinh chế bằng HPLC pha đảo để tạo ra hợp chất đích, hợp chất có công thức 12 (5mg).

phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS $m/z=1577,2$ $[M+3H]^{3+}$ (Được tính=1577,9)

Các ví dụ 15 - 16

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 14, mỗi hợp chất (thể liên hợp) có công thức 14 hoặc 15 được tổng hợp. Các kết quả của phép ghi phổ khối lượng được thể hiện trong bảng 70, trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

Bảng 70

Số ví dụ	công thức cấu tạo	công thức No.	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/Z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
15	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CACYTWNQMNL} \\ \\ \text{CWAPVLDFAPPGASAYGSL} \end{array}$	14	1492,5 [M+3H] ³⁺	1493,1
16	$\begin{array}{c} \text{CWAPVLDFAPPGASAYGSL} \\ \\ \text{CACYTWNQMNL} \\ \\ \text{CRMFPNAPYL} \end{array}$	15	1492,5 [M+3H] ³⁺	1493,1

Ví dụ tham chiếu 13

Bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2, các peptit có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 244 được tổng hợp. Bảng 71 thể hiện các kết quả của phép ghi phổ khối lượng. Peptit đã được mô tả trong bảng không phải là hợp chất theo sáng chế, và do đó, nó được mô tả dưới dạng ví dụ tham chiếu.

Bảng 71

Số ví dụ tham chiếu	trình tự axit amin	SEQ ID NO:	phép ghi phổ khối lượng: LC-ESI/MS m/Z	phép ghi phổ khối lượng: Được tính
13	WAPVLDFAPPGASAYGSL	244	1819,8 [M+H] ⁺	1819,1

Ví dụ thử nghiệm 11

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (10) được tổng hợp ở ví dụ 13 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột

chuột gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (10):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư B là WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (10) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (10). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (10) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Cụ thể là, hợp chất được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 3mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Ngoài ra, hợp chất có công thức (10) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 8,5mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng tá chất Freund không hoàn toàn (IFA). Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 425 μ g/vị trí. Số lượng phân tử của peptit SEQ ID NO: 2 được chứa trong liều của hợp chất có công thức (10) trên

chuột được kiểm soát để làm cân bằng với số lượng phân tử được chứa trong liều of peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 trên chuột. Ngoài ra, nồng độ DMSO được chứa trong mỗi nhũ tương cũng được thiết đặt ở mức tương tự. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,125 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40 μ g/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10 μ g/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 19 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó thực hiện sự tái kích thích peptit in vitro. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.17. Trên Fig.17, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử dụng cho con chuột này. Trên Fig.17, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 hoặc hợp chất có công thức (10) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 in vivo trong con chuột này. Trên Fig.17, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà

thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Ngoài ra, trên Fig.17, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (10), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được cảm ứng bằng cách sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (10) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Khi hợp chất có công thức (10) được sử dụng, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được quan sát khi so sánh với việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được tạo ra từ hợp chất có công thức (10) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (10) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 2 và 244.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (10), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó hai loại peptit tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua được thể hiện trong công thức (1), và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ so sánh 3

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hợp chất có công thức (11) được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 12 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. Hợp chất có công thức (11):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, cụ thể là, hợp chất của công thức (1) đã đề cập ở trên, trong đó peptit kháng nguyên ung thư A là RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) và peptit kháng nguyên ung thư C là WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, và WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (11) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), trong số các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (11). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (11) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Thử nghiệm cảm ứng CTL được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 11.

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.18. Trên Fig.18, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa, và trục hoành thể hiện hợp chất hoặc peptit được sử dụng cho con chuột này. Trên Fig.18, thanh màu đen thể hiện các kết quả nuôi cấy của các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 trong khi được xung động bằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, và thanh màu trắng thể hiện các kết quả nuôi cấy mà không có sự xung động. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng peptit đặc hiệu CTL, và rằng việc sử dụng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 hoặc hợp chất có công thức (11) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 in vivo trong con chuột này. Trên

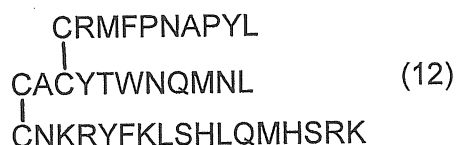
Fig.18, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột biến đổi gen HLA-A0201 hoàn toàn không phản ứng mà thiếu sự xung động với peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201. Mặt khác, trên Fig.18, để tăng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, có thể không bị phát hiện bằng việc sử dụng hợp chất có công thức (11).

Các kết quả của ví dụ thử nghiệm 11 và ví dụ so sánh 3 gợi ý rằng, khi WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) được sử dụng làm peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II, WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) làm peptit kháng nguyên ung thư B trong công thức (1) đã được đề cập ở trên là phương án tốt hơn theo sáng chế so với WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243) làm peptit kháng nguyên ung thư C.

Ví dụ thử nghiệm 12

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402

Khả năng cảm ứng CTL của hợp chất có công thức 12 được tổng hợp ở ví dụ 4 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (12):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402 đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (12) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 4) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 4), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (12). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 22) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (12) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5) được tái kích thích bằng (SEQ ID NOs: 2, 4).

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 3mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng Montanit ISA51VG. Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Ngoài ra, hợp chất có công thức (12) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 6mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng Montanit ISA51VG. Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 300 μ g/vị trí. Số lượng phân tử của hợp chất có công thức (5) được chứa trong liều của hợp chất có công thức (12) trên chuột được kiểm soát để làm cân bằng với số lượng phân tử được chứa trong liều của hợp chất có công thức (5) trên chuột. Ngoài ra, nồng độ DMSO được chứa trong mỗi nhũ tương cũng được thiết đặt ở mức tương tự. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO $_2$, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa, và mỗi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được cấy vào đĩa ở mức 0,25 $\times 10^6$ các tế bào/lỗ, trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2, 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40 μ g/ml.

Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10 $\mu\text{g/ml}$. Ngoài ra, peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 4) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 ở nồng độ cuối là 10 $\mu\text{g/ml}$. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 17 giờ ở mức 37°C, 5% CO₂, nhờ đó thực hiện sự tái kích thích peptit in vitro. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.19, và các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 được thể hiện trên Fig.20.

Trên mỗi Fig trực tiếp thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.19, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trên Fig.20, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đối tượng, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bằng việc sử dụng các hợp chất có công thức (5) và công thức (12).

Trên mỗi Fig giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng các hợp chất có công thức (5) và công thức (12), và sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng các hợp chất có công

thức (5) và công thức (12). Trên Fig.19, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (12), là cao hơn số lượng các tế bào sản sinh IFN γ các tế bào đặc hiệu đối với peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5). Mặt khác, trên Fig.20, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (12), không khác nhiều so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ các tế bào đặc hiệu đối với peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5).

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (12) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 2, 4. Khi hợp chất có công thức (12) được sử dụng, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được quan sát khi so sánh với việc sử dụng hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 được tạo ra từ hợp chất có công thức (12) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Không có sự khác biệt lớn về số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4 giữa việc sử dụng hợp chất có công thức 12 và việc sử dụng hợp chất có công thức (5) được giả sử rằng là do thiếu sự cảm ứng về các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22, do chuột chuyển gen HLA-A2402 không thể hiện MHC lớp II người. Do đó, điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (12) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 2, 4 và 22.

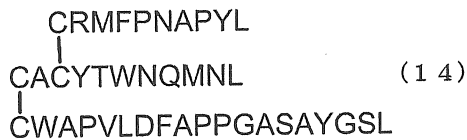
Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (12), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó ba loại peptit khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua, và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ thử nghiệm 13

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển

gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402

Khả năng cảm ứng CTL của hợp chất có công thức (14) được tổng hợp ở ví dụ 15 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (14):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 và chuột chuyển gen HLA-A2402 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (14) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2, 4) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2, 4), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (14). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (14) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5) được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Thử nghiệm cảm ứng CTL được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 12. Hợp chất có công thức (14) được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO) ở mức 80mg/ml, được pha loãng với nước để tiêm ở mức 5,6mg/ml, và được trộn với đường lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 280 μ g/vị trí.

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.21, và các kết quả của thử nghiệm

ELISPOT IFN γ bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 được thể hiện trên Fig.22.

Trên mỗi Fig trực tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.21, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trên Fig.22, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đối tượng, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bằng việc sử dụng các hợp chất được thể hiện bởi các công thức (5) và (14).

Trên mỗi Fig giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với các hợp chất được thể hiện bởi các công thức (5) và (14), và sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 được sử dụng với các hợp chất được thể hiện bởi các công thức (5) và (14). Trên các Fig.21 và Fig.22, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, 4, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (14), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5).

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (14) có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với các peptit được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 2 và 4. Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 244 được tạo ra từ hợp chất có công thức (14) mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi

hợp chất có công thức (14) được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng hợp chất có công thức (5). Mặt khác, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4 được phát hiện khi hợp chất có công thức (14) được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được gắn kết vào MHC lớp II chuột được thể hiện trong chuột chuyển gen HLA-A2402 cảm ứng tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ, mà lần lượt mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 4. Do đó, điều này rõ ràng gợi ý rằng hợp chất có công thức (14) trải qua sự phân cắt về liên kết disulfua và sự cắt một cách thích hợp bởi ERAP-1 ở chuột in vivo và thực tế là được xử lý thành các peptit được thể thiện bởi các SEQ ID NO: 2, 4 và 244.

Tức là, rõ ràng rằng hợp chất có công thức (14), mà là một phương án của hợp chất theo sáng chế, là thể liên hợp trong đó ba loại peptit khác nhau tạo ra sự lai ghép thông qua liên kết disulfua, và là kháng nguyên peptit WT1 ung thư vắc xin liên hợp mà trong thực tế có thể cảm ứng các CTL và các tế bào phản ứng lại peptit hỗ trợ in vivo.

Ví dụ thử nghiệm 14

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Hỗn hợp vắc xin mà là hỗn hợp của hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 1 được đánh giá về khả năng cảm ứng CTL bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử

nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 22) được trộn với công thức (5) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất được thể hiện bởi riêng công thức (5) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 22 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 3mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng Montanit ISA51VG. Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Ngoài ra, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 22 được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, được pha loãng với nước để tiêm và được trộn sao cho nồng độ sau khi pha loãng là 3mg/ml đối với hợp chất có công thức (5), và là 2,7mg/ml đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 22. Dung dịch được pha loãng này được trộn với đương lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) ở mức 150 μ g/vị trí, và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 22 ở mức 137 μ g/vị trí được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột. Nồng độ DMSO của mỗi nhũ tương được thiết đặt cùng mức. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO $_2$, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT

được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40µg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10µg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 17 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.23.

Trên Fig.23, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.23, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đích, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bằng cách sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 22).

Trên Fig.23, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với riêng hợp chất có công thức (5), và hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 22). Trên Fig.23, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 22), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5) một.

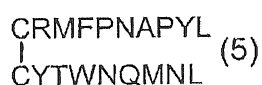
Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 22 có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối

với các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi hỗn hợp vắc xin được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 22 được chứa trong hỗn hợp vắc xin mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ có thể cảm ứng mạnh mẽ CTL trong cơ thể chuột khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5).

Ví dụ thử nghiệm 15

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

Khả năng cảm ứng CTL of hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 13 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và WAPVLDFAAPP GASAYGSL (SEQ ID NO: 244) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244) được trộn với công thức (5) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế

bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Thử nghiệm cảm ứng CTL được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 14. Để tạo ra hỗn hợp vắc xin, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được hòa tan trong dimetyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, được pha loãng với nước để tiêm và được trộn sao cho nồng độ sau khi pha loãng là 3mg/ml hoặc hợp chất có công thức (5), và 2,3mg/ml đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244. Dung dịch được pha loãng này được trộn với đương lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) ở mức 150 μ g/vị trí, và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 ở mức 115 μ g/vị trí được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột.

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.24.

Trên Fig.24, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.24, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đích, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bằng việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244).

Trên Fig.24, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng với hợp chất có công thức (5) almột, và hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244). Trên

Fig.24, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 244), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng riêng hợp chất có công thức (5).

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi hỗn hợp vắc xin được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được chứa trong hỗn hợp vắc xin mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ có thể cảm ứng mạnh mẽ CTL trong cơ thể chuột khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5).

Hỗn hợp vắc xin chứa hai peptit khác nhau làm chế phẩm riêng rẽ có thể được đề cập là một phương án sản xuất vắc xin chứa hai kháng nguyên peptit WT1. Khi tạo ra hỗn hợp vắc xin, các đặc tính của các peptit kháng nguyên ung thư được trộn lẫn đặt ra một vấn đề. Như được thể hiện ở bảng 60 và bảng 66, việc sản xuất hỗn hợp của hai kháng nguyên peptit WT1 có nghĩa là việc xử lý hai các peptit có độ hòa tan khác nhau, là đặc tính, thành một chế phẩm. Ngược lại, thể liên hợp theo sáng chế là hợp chất trong đó hai kháng nguyên peptit WT1 được liên kết thông qua liên kết disulfua, và thể hiện độ hòa tan riêng, là đặc tính. Điều này có nghĩa là thể liên hợp theo sáng chế có đặc tính riêng và cũng có đặc tính tương ứng với hai kháng nguyên peptit WT1, như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 2. Trong khía cạnh này, thể hiện rằng thể liên hợp theo sáng chế là hợp chất có khả năng cảm ứng phản ứng đối với hai kháng nguyên peptit WT1 mà không cần xem xét đến sự tác động qua lại giữa hai kháng nguyên peptit WT1 và tương tự, khác với hỗn hợp các vắc xin.

Ví dụ thử nghiệm 16

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển

gen HLA-A0201.

Khả năng cảm ứng CTL của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được tổng hợp trong ví dụ tham chiếu 2 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và CNKRYFKLSHLQMHSRKTG (SEQ ID NO: 24) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 24) được trộn với công thức (5) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Cụ thể là, hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, còn được pha loãng bằng nước để tiêm ở mức 3mg/ml, và được nhũ tương hóa bằng cách trộn với đương lượng Montanit ISA51VG. Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột ở mức 150 μ g/vị trí. Ngoài ra, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, và được

pha loãng với nước để tiêm. Chúng được trộn sao cho nồng độ sau khi pha loãng là 3mg/ml đối với hợp chất có công thức (5), và là 3,11mg/ml đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24. Dung dịch được pha loãng này được trộn với đương lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) ở mức 150 µg/vị trí, và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 ở mức 156µg/vị trí được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột. Nồng độ DMSO mỗi nhũ tương được thiết đặt cùng mức. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách được cô lập, và các tế bào lách được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào lách, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được cấy vào đĩa ở mức $0,25 \times 10^6$ các tế bào/lỗ trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 2) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40µg/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 2) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 ở nồng độ cuối là 10µg/ml. Các tế bào lách được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng 19 giờ ở 37°C, 5% CO₂, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bằng máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.25.

Trên Fig.25, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.25, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đích, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bằng việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ

(SEQ ID NO: 24).

Trên Fig.25, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5), và hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 24). Trên Fig.25, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 24), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5) al một.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi hỗn hợp vắc xin được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 24 được chứa trong hỗn hợp vắc xin mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ có thể cảm ứng mạnh mẽ CTL trong cơ thể chuột khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5).

Ví dụ thử nghiệm 17

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

SEQ ID NO: 242 được tổng hợp ở ví dụ 11 là peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 có xystein được mở rộng ở đầu chặn mạch N. SEQ ID NO: 244 trong hỗn hợp vắc xin trong ví dụ thử nghiệm 15 thể hiện hoạt tính mở rộng cảm ứng CTL. Trong thử nghiệm này, do đó, khả năng cảm ứng CTL của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo

bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) được chứa trong CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 242) được trộn với công thức (5) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Thử nghiệm cảm ứng CTL được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 16. Để tạo ra hỗn hợp vắc xin, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242 được hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, được pha loãng với nước để tiêm và được trộn sao cho nồng độ sau khi pha loãng là 3mg/ml đối với hợp chất có công thức (5), và 2,42mg/ml đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242. Dung dịch được pha loãng này được trộn với đương lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) ở mức 150 μ g/vị trí, và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 242 ở mức 121 μ g/vị trí được sử dụng ở 2 vị

trí tại gốc đuôi của chuột.

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.26.

Trên Fig.26, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.26, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đích, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 242).

Trên Fig.26, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5), và hỗn hợp vắc xin chứa a peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 242). Trên Fig.26, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 242), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng riêng hợp chất có công thức (5).

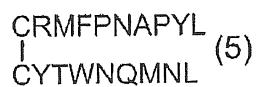
Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với các peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi hỗn hợp vắc xin được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 244 được chứa trong peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 được chứa trong hỗn hợp vắc xin mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, rõ ràng rằng hỗn hợp

vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ có thể cảm ứng mạnh mẽ CTL trong cơ thể chuột khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5).

Ví dụ thử nghiệm 18

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201

SEQ ID NO: 243 được tổng hợp ở ví dụ 12 là peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 có xystein được mở rộng ở đầu chặn mạch N. SEQ ID NO: 244 in hỗn hợp vắc xin trong ví dụ thử nghiệm 15 thể hiện hoạt tính mở rộng cảm ứng CTL. Do đó, trong thử nghiệm này, khả năng cảm ứng CTL của hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) được tổng hợp ở ví dụ và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 được đánh giá bởi thử nghiệm cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) được chứa trong hợp chất có công thức (5):



trong đó liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) là peptit WT1 được giới hạn bởi HLA-A2402, và WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) được chứa trong WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243) là peptit WT1 được giới hạn bởi MHC lớp II (là, peptit hỗ trợ).

Chuột chuyển gen HLA-A0201 là như đã được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm 2 và 5.

Có hay không việc sử dụng hợp chất có công thức (5) dẫn đến sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit đích (SEQ ID NO: 2) được đánh giá dựa trên việc đo sự sản sinh IFN γ bởi việc tái kích thích, bằng peptit (SEQ ID NO: 2), của tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng với hợp chất có công thức (5). Có hay không peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 243) được trộn với công thức (5) hoạt động trong cơ thể sống được đánh giá bằng cách so sánh với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ khi các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột đã nêu ở trên được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5) và các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột

đã nêu ở trên được sử dụng với hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 được tái kích thích bằng peptit (SEQ ID NO: 2).

Thử nghiệm cảm ứng CTL được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 16. Để tạo ra hỗn hợp vắc xin, hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 được hòa tan trong dimetyl sulfoxit (DMSO) ở mức 80mg/ml, được pha loãng với nước để tiêm và được trộn sao cho nồng độ sau khi pha loãng là 3mg/ml đối với hợp chất có công thức (5), và 2,42mg/ml đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243. Dung dịch được pha loãng này được trộn với đương lượng Montanit ISA51VG để tạo ra nhũ tương. Hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) ở mức 150µg/vị trí, và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 ở mức 121µg/vị trí được sử dụng ở 2 vị trí tại gốc đuôi của chuột.

Các kết quả của thử nghiệm ELISPOT IFN γ sử dụng chuột chuyển gen HLA-A0201 được thể hiện trên Fig.27.

Trên Fig.27, trục tung thể hiện số lượng các tế bào mà phản ứng trong tế bào được cấy vào đĩa. Trên Fig.27, thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện các kết quả của việc nuôi cấy các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 với sự xuất hiện hoặc thiếu vắng peptit đích được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Tức là, sự khác biệt về các giá trị của thanh màu đen và thanh màu trắng thể hiện số lượng đích, mỗi peptit đặc hiệu CTL được cảm ứng trong con chuột này in vivo by việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 243).

Trên Fig.27, giá trị của thanh màu trắng không được phát hiện. Điều này có nghĩa là các tế bào lách của chuột chuyển gen tương ứng không phản ứng với sự xuất hiện của peptit đích. Kết quả của thử nghiệm này là, sự sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit đích được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện trong tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A0201 được sử dụng riêng với hợp chất có công thức (5), và hỗn hợp vắc xin chứa a peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 243). Trên Fig.27, số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hỗn hợp vắc xin chứa

peptit hỗ trợ (SEQ ID NO: 243), là cao hơn so với số lượng các tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu peptit, mà được cảm ứng bởi việc sử dụng hợp chất có công thức (5) almot.

Từ kết quả ở trên, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 có thể cảm ứng CTL đặc hiệu đối với các peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, nhiều tế bào sản sinh IFN γ đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2 được phát hiện khi hỗn hợp vắc xin được sử dụng khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5). Giả sử rằng sự cảm ứng của các tế bào phản ứng với peptit hỗ trợ được thể thiện bởi SEQ ID NO: 244 được chứa trong peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 243 được chứa trong hỗn hợp vắc xin mở rộng sự cảm ứng CTL đặc hiệu đối với peptit được thể thiện bởi SEQ ID NO: 2. Do đó, rõ ràng rằng hỗn hợp vắc xin chứa hợp chất có công thức (5) và peptit hỗ trợ có thể cảm ứng mạnh mẽ CTL trong cơ thể chuột khi so sánh với việc sử dụng riêng rẽ hợp chất có công thức (5).

Hỗn hợp vắc xin chứa hai peptit khác nhau là chế phẩm riêng có thể được đề cập là một phương án sản xuất vắc xin chứa hai kháng nguyên peptit WT1. Khi tạo ra hỗn hợp vắc xin, các đặc tính của các peptit kháng nguyên ung thư được trộn lẫn đặt ra một vấn đề. Như được thể hiện ở bảng 60 và bảng 66, việc sản xuất hỗn hợp của hai kháng nguyên peptit WT1 có nghĩa là việc xử lý hai các peptit có độ hòa tan khác nhau, là đặc tính, thành một chế phẩm. Ngược lại, thể liên hợp theo sáng chế là hợp chất trong đó hai kháng nguyên peptit WT1 được liên kết thông qua liên kết disulfua, và thể hiện độ hòa tan riêng, là, đặc tính. Điều này có nghĩa là thể liên hợp theo sáng chế có đặc tính riêng và cũng có đặc tính tương ứng với hai kháng nguyên peptit WT1, như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 2. Trong khía cạnh này, thể liên hợp theo sáng chế là hợp chất có khả năng cảm ứng phản ứng với hai kháng nguyên peptit WT1 mà không cần xem xét đến sự tác động qua lại giữa hai kháng nguyên peptit WT1 và tương tự, khác với hỗn hợp các vắc xin.

Ví dụ thử nghiệm 19

Đánh giá khả năng cảm ứng CTL in vivo bằng cách sử dụng chuột chuyển

gen HLA-A2402 sau khi lọc bằng màng lọc

Chất nhũ trùng giống nhau được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 được tạo ra thông qua liên kết disulfua và hợp chất có công thức (5) được hòa tan trong nước để tiêm ở mức 3-10mg/ml. Hoạt tính được lý của mỗi hợp chất được đánh giá bằng cách sử dụng chuột chuyển gen HLA-A2402 (C57BL/6CrHLA-A2402/K^b) có hoạt tính cảm ứng CTL làm chỉ số. Để sử dụng cho chuột chuyển gen HLA-A2402, hợp chất được hòa tan trong nước để tiêm, được tiệt trùng bằng cách lọc sử dụng màng lọc gắn kết protein thấp (thiết bị lọc kiểu màng có mục đích xử lý tiệt trùng để tiêm) và được trộn với tá chất Freund không hoàn toàn để tạo ra nhũ tương.

Hợp chất được nhũ tương hóa được sử dụng ở gốc đuôi của chuột chuyển gen HLA-A2402. Sau một tuần, con chuột này được làm chết một cách nhẹ nhàng bằng khí CO₂, lá lách hoặc nút bạch huyết bẹn được cô lập, và các tế bào lách hoặc các tế bào được nút bạch huyết được điều chế. Bộ kit dùng cho thử nghiệm ELISPOT IFN γ được sử dụng để đo sự sản sinh IFN γ . Một ngày trước khi điều chế tế bào, đĩa ELISPOT được xử lý bằng kháng nguyên kháng IFN γ chuột, và được khóa bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở ngày tiếp theo. Các tế bào có nguồn gốc từ chuột được điều chế được cấy vào đĩa trên đĩa ELISPOT được khóa. Peptit (SEQ ID NO: 4) được hòa tan trong DMSO ở mức 40mg/ml, và còn được pha loãng bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS ở mức 40 μ g/ml. Peptit được pha loãng này (SEQ ID NO: 4) được bổ sung vào các tế bào lách có nguồn gốc từ chuột chuyển gen HLA-A2402 hoặc các tế bào nút bạch huyết ở nồng độ cuối là 10 μ g/ml. Các tế bào được bổ sung với peptit được nuôi cấy trong khoảng từ 16 đến 20 giờ ở 37 °C, 5% CO₂, nhờ đó sự tái kích thích peptit in vitro được thực hiện. Sau khi được nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ, và đĩa ELISPOT được cho phép phát triển màu theo giao thức đính kèm. Số lượng các điểm mà phát triển màu được đo bởi máy phân tích điểm miễn dịch (do C.T.L. sản xuất).

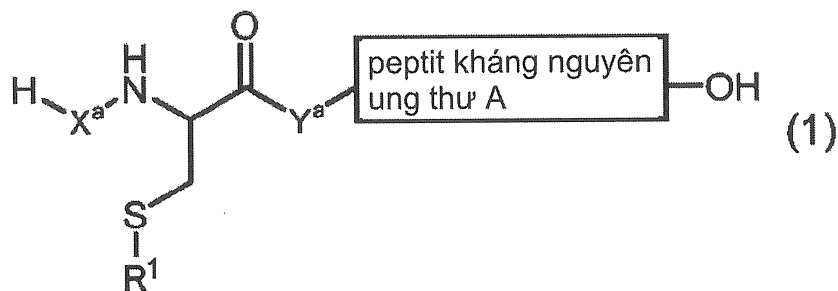
Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Hợp chất theo sáng chế là hữu ích để làm thành phần hoạt tính của vắc xin ung thư mà cảm ứng CTL một cách hiệu quả và dễ dàng được tạo ra. Đơn sáng chế này hưởng quyền ưu tiên từ các đơn sáng chế số 2013-072173 (nộp ngày 29/03/2013) và 2013-158383 (nộp ngày 31/07/2013) tại Nhật Bản, toàn bộ nội dung của

các đơn ưu tiên này được tích hợp vào bản mô tả này bằng cách trích dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (1):



trong đó:

mỗi trong số X^a và Y^a là liên kết đơn,

peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

nhóm amino của axit amin có đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với Y^a trong công thức (1), và nhóm cacbonyl của axit amin có đầu chặn mạch C của peptit kháng nguyên ung thư A liên kết với nhóm hydroxyl trong công thức (1),

R^1 là peptit kháng nguyên ung thư C,

peptit kháng nguyên ung thư C có trình tự khác với trình tự của peptit kháng nguyên ung thư A, mà là peptit có trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các trình tự axit amin sau:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

và nhóm thioete của gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C được liên kết với nhóm thioete trong công thức (1),

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (4):

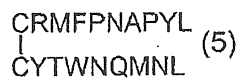


trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua,

hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức (1) là hợp chất có công thức (5):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua,

hoặc muối được dụng của nó.

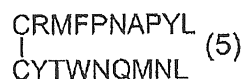
4. Chế phẩm chứa hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có công thức (4):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua,

và hợp chất có công thức (5):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

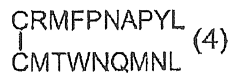
ít nhất một peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),

CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

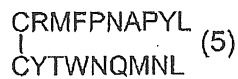
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa hợp chất có công thức (4):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

6. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa hợp chất có công thức (5):



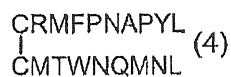
trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

7. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất một peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) và
 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

8. Chế phẩm chứa hợp chất có công thức (4):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

peptit có trình tự axit amin:

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

9. Chế phẩm chứa hợp chất có công thức (5):



trong đó:

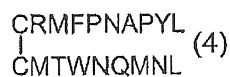
liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

peptit có trình tự axit amin:

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

10. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc muối dược dụng của nó, hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 9, và chất mang dược dụng.

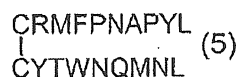
11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa hợp chất có công thức (4):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

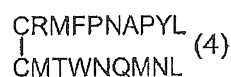
12. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa hợp chất có công thức (5):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua.

13. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa hợp chất có công thức (4):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

peptit có trình tự axit amin:

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

14. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa hợp chất có công thức (5):



trong đó:

liên kết giữa C và C là liên kết disulfua, và

peptit có trình tự axit amin:

WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

15. Phương pháp điều chế hợp chất có công thức (1), trong đó phương pháp này bao gồm bước tạo liên kết disulfua giữa gốc xystein được bổ sung vào đầu chặn mạch N của peptit kháng nguyên ung thư A và gốc xystein của peptit kháng nguyên ung thư C, trong đó:

peptit kháng nguyên ung thư A là peptit có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),

ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),

SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) và

RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7); và

peptit kháng nguyên ung thư C là peptit có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) và

CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4).

Fig.1

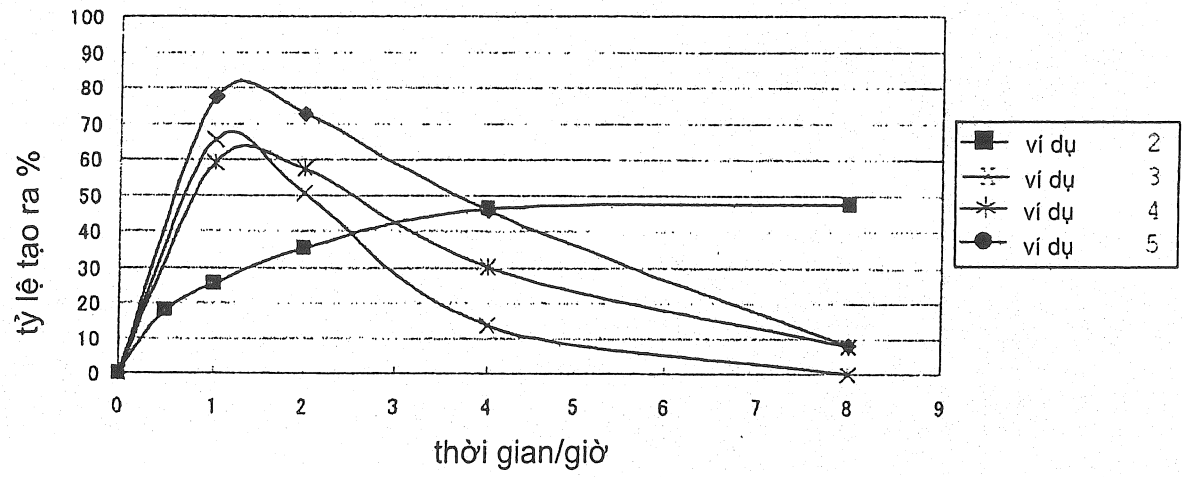


Fig.2

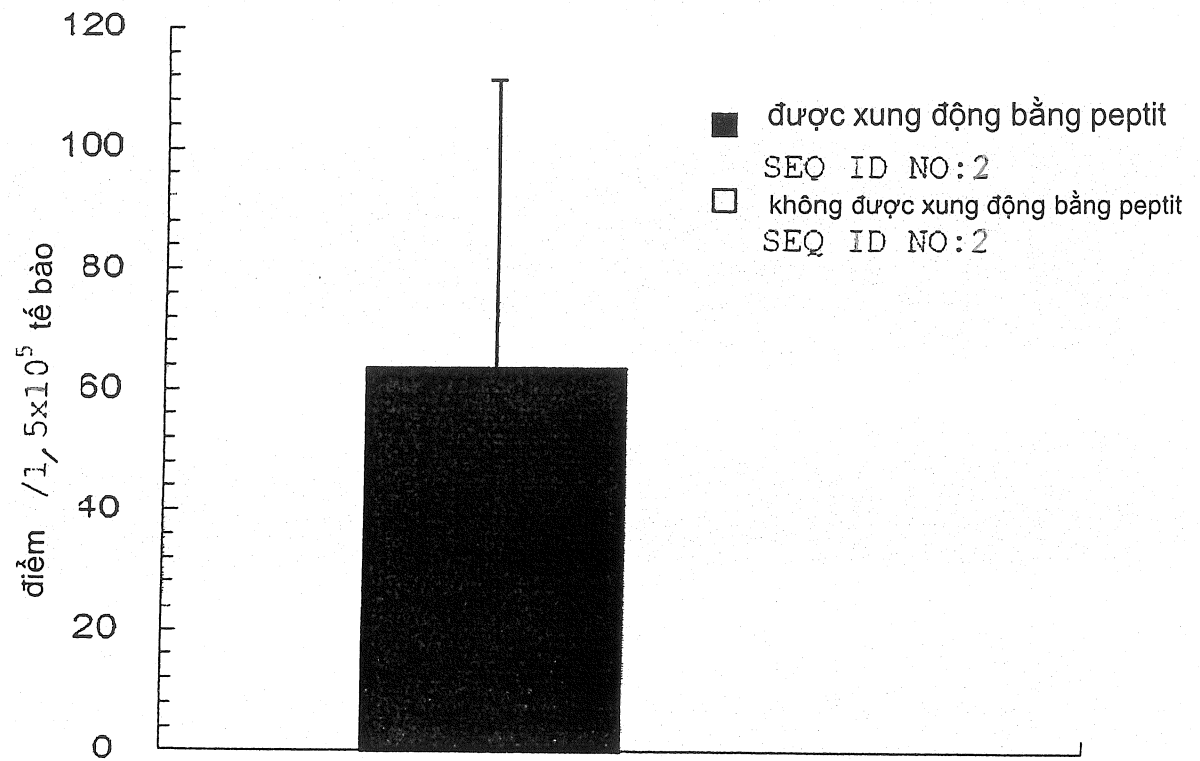


Fig.3

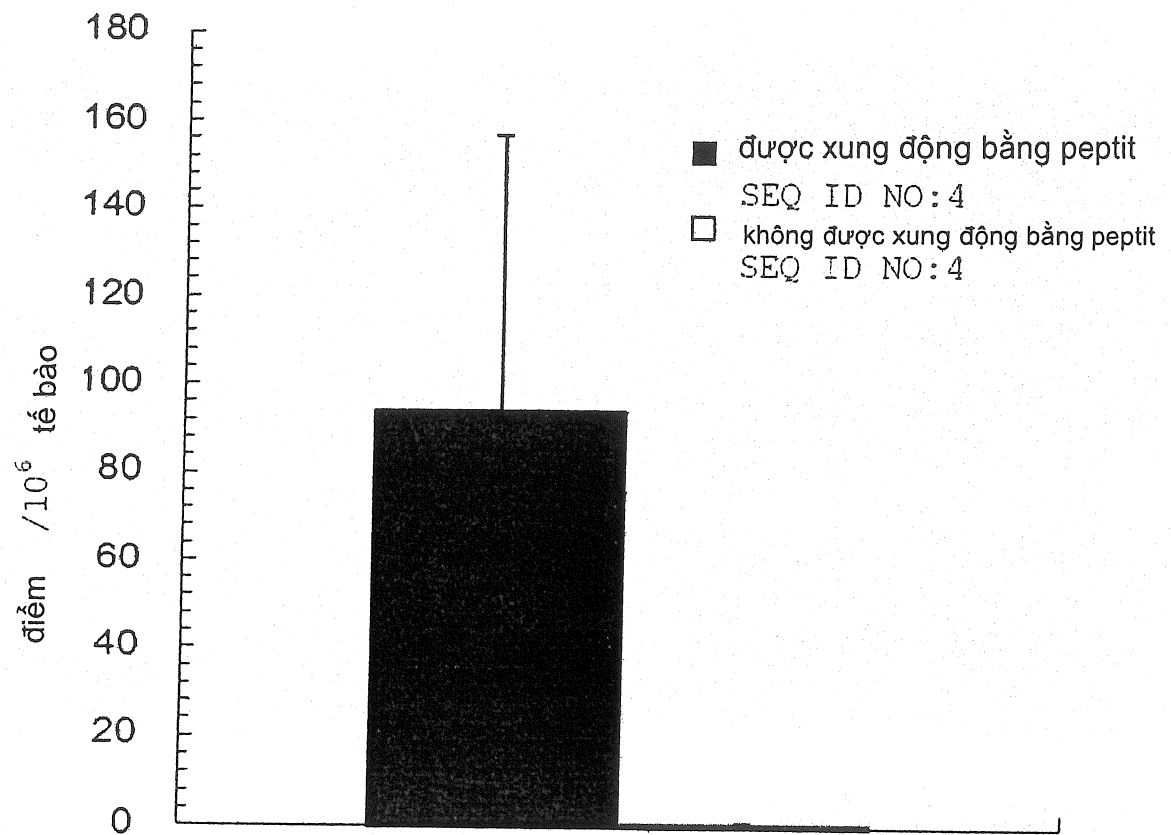


Fig.4

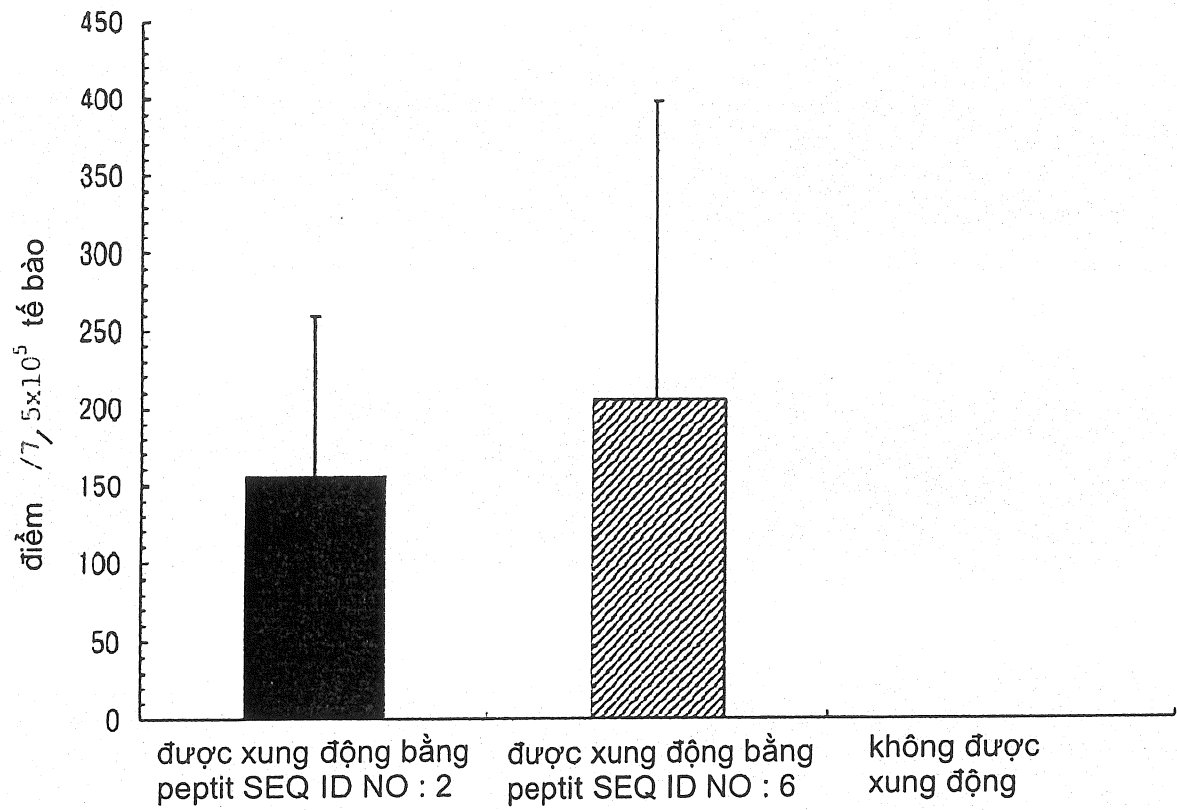


Fig.5

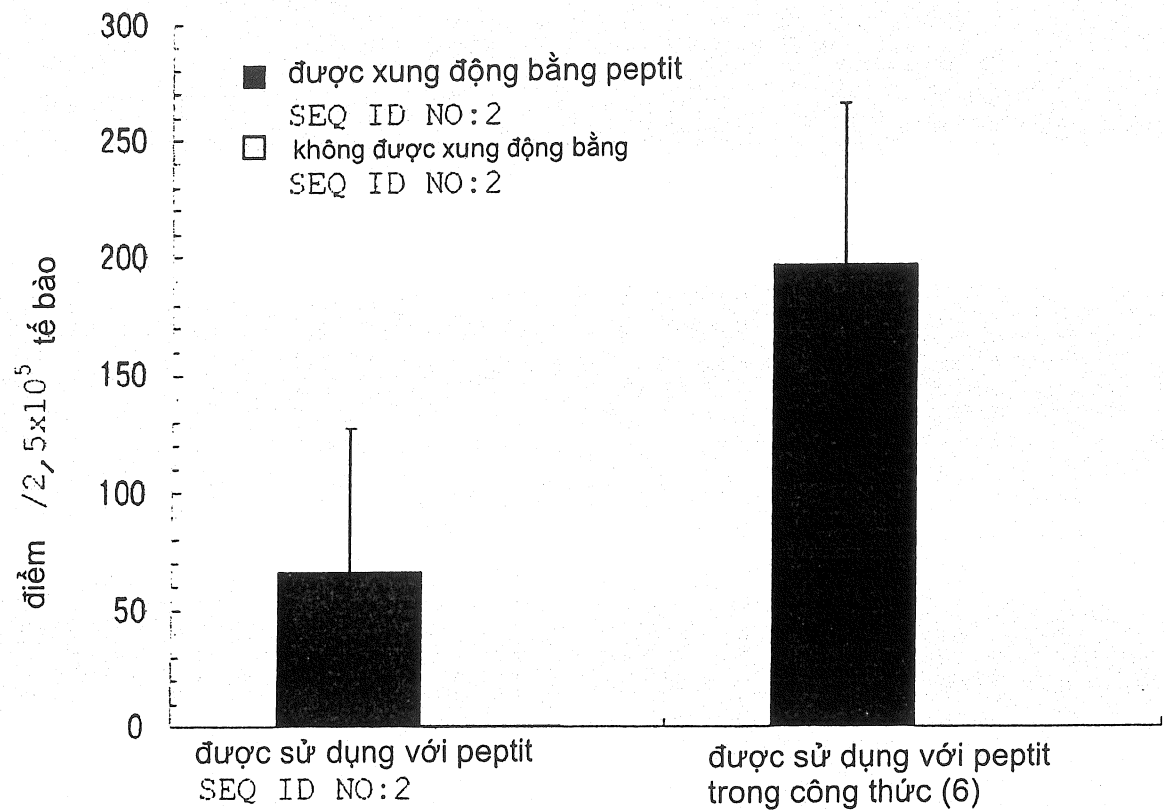


Fig.6

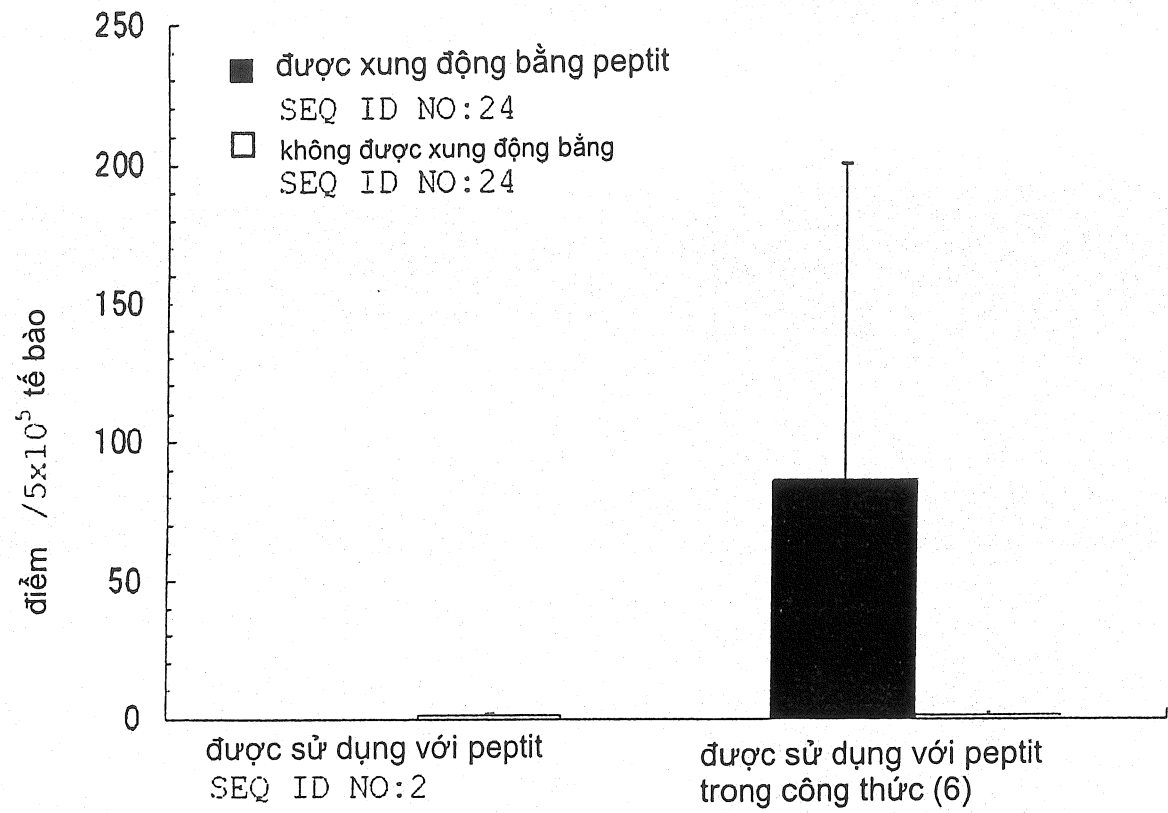


Fig.7

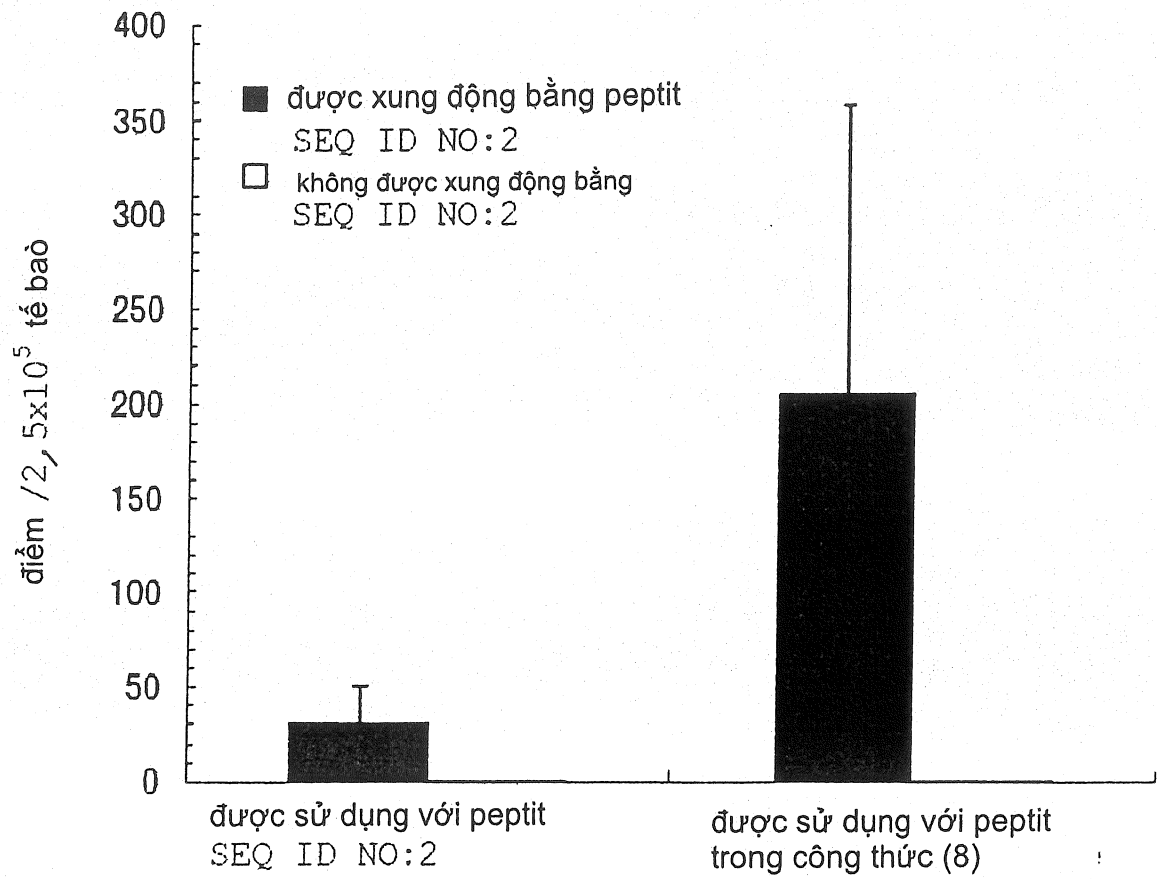


Fig.8

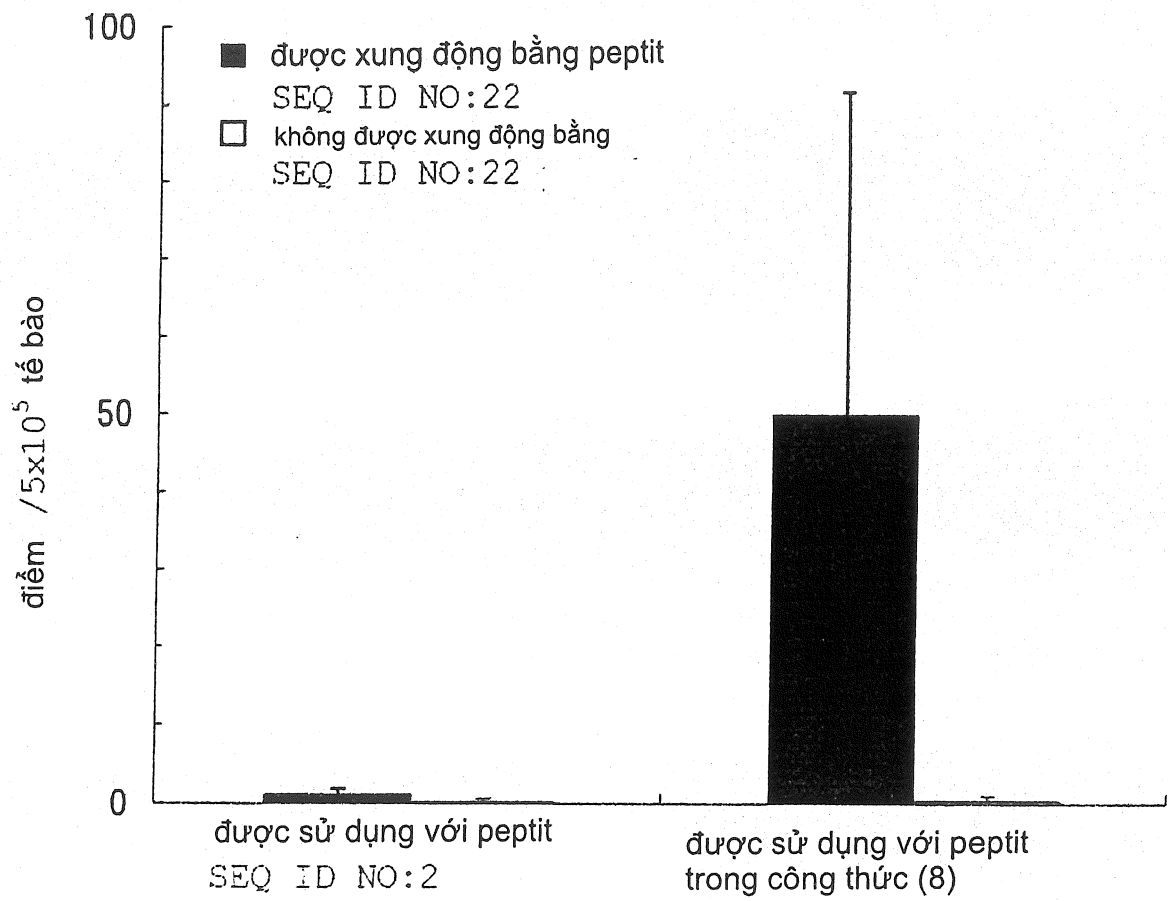


Fig.9

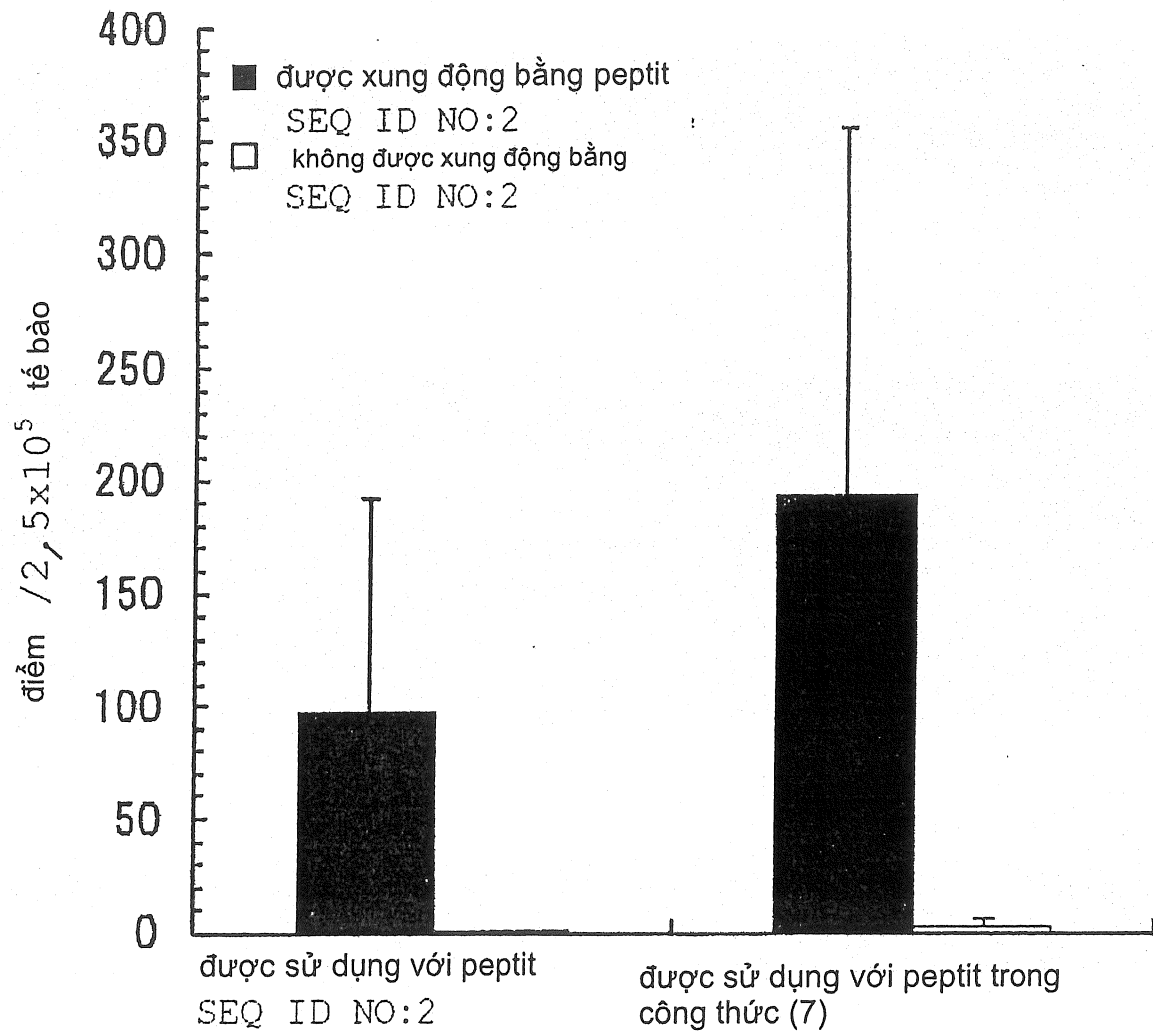


Fig.10

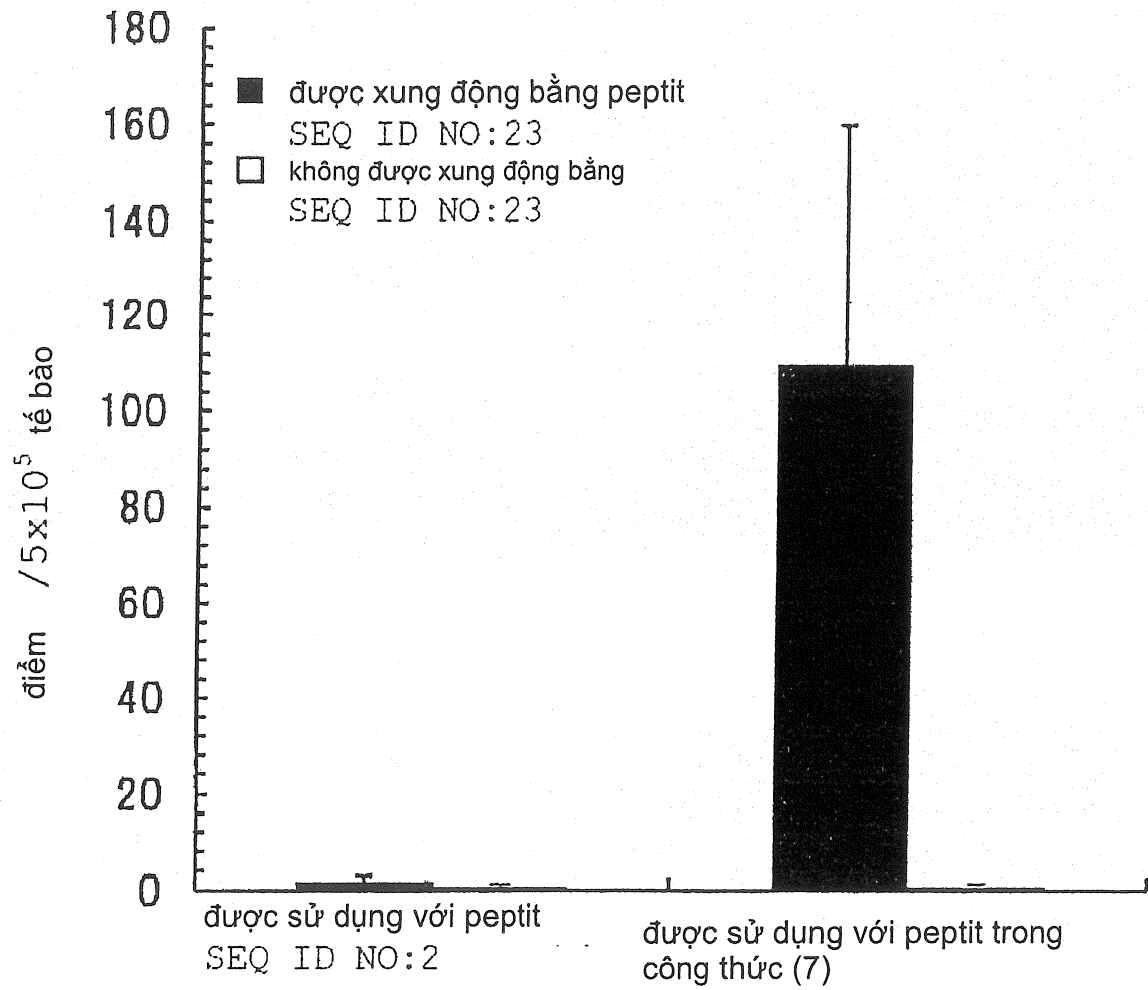


Fig.11

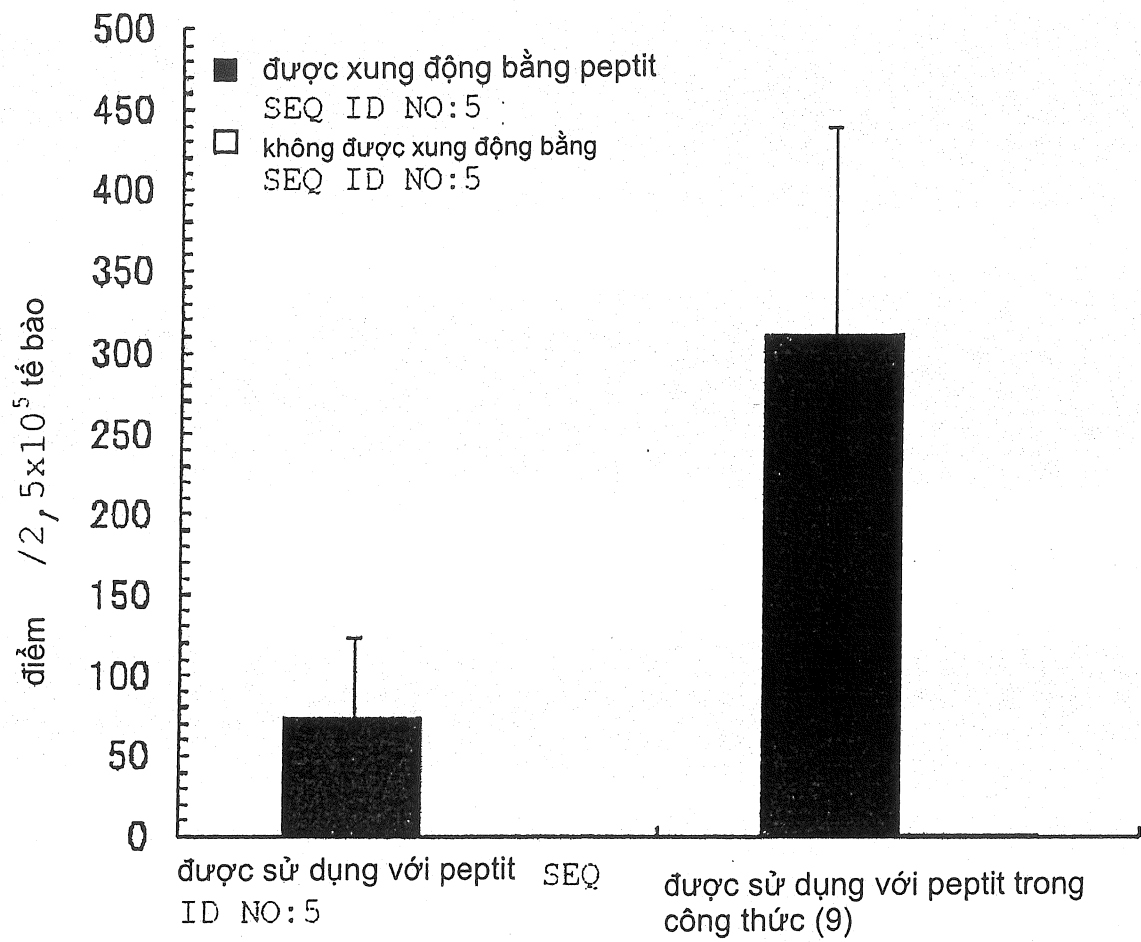


Fig.12

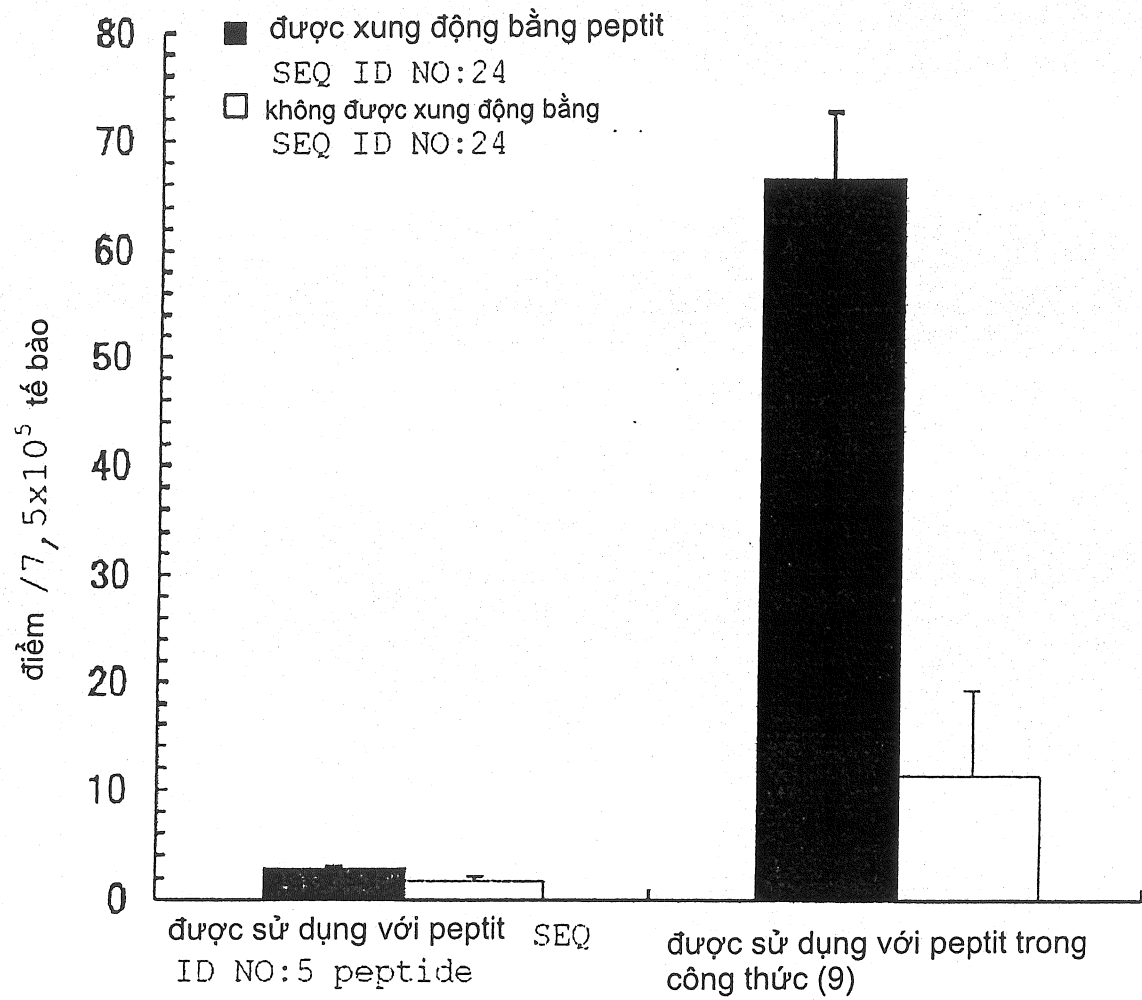


Fig.13

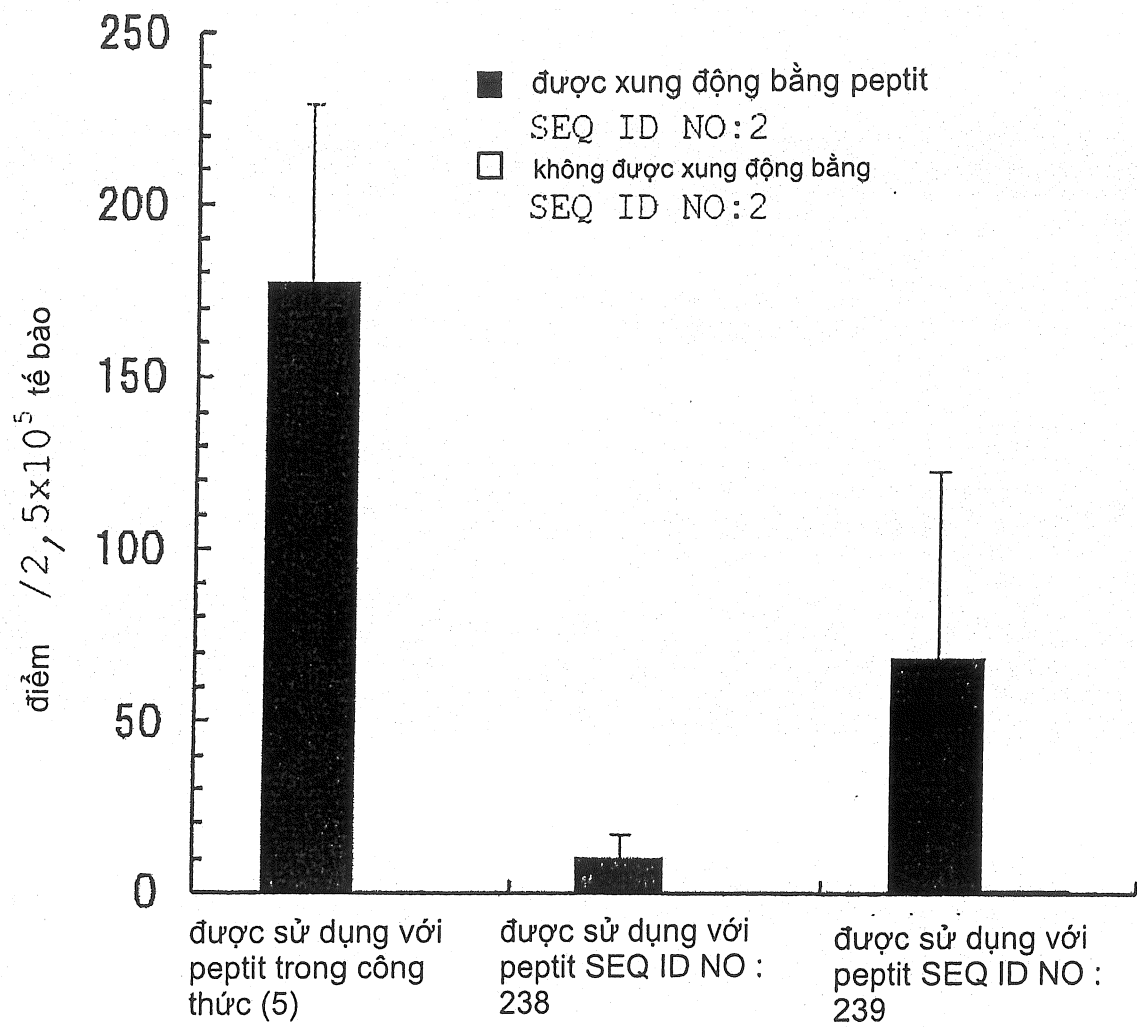


Fig.14

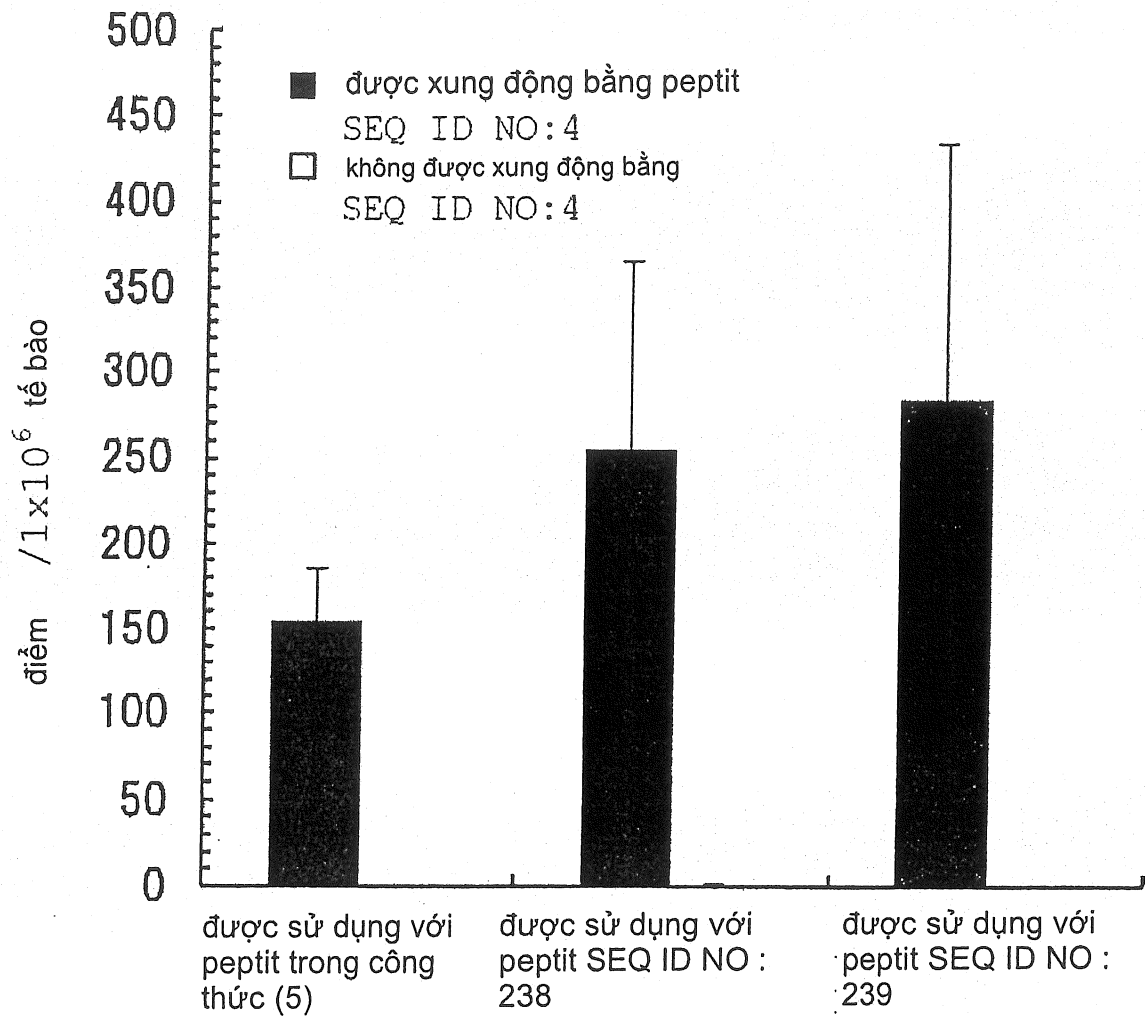


Fig.15

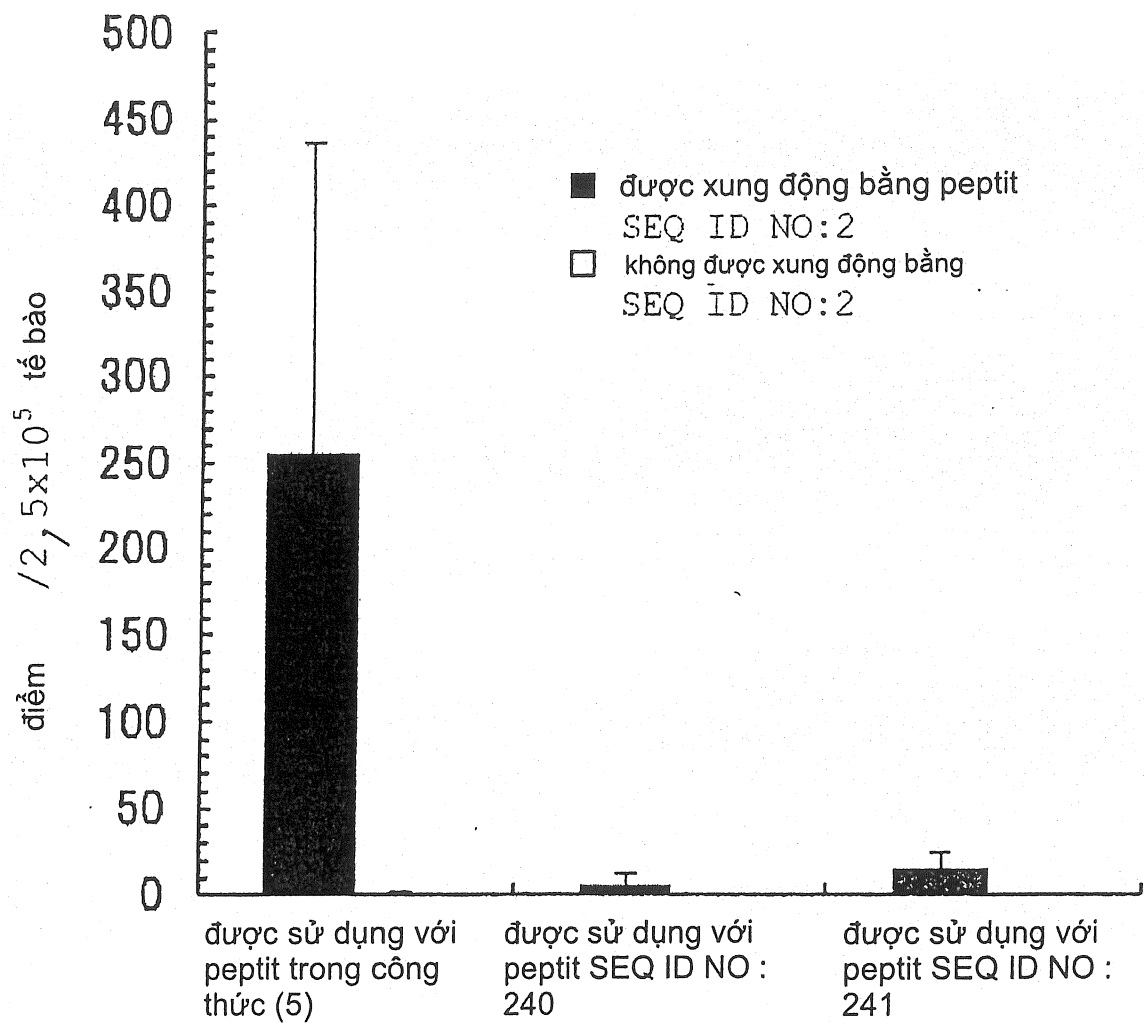


Fig.16

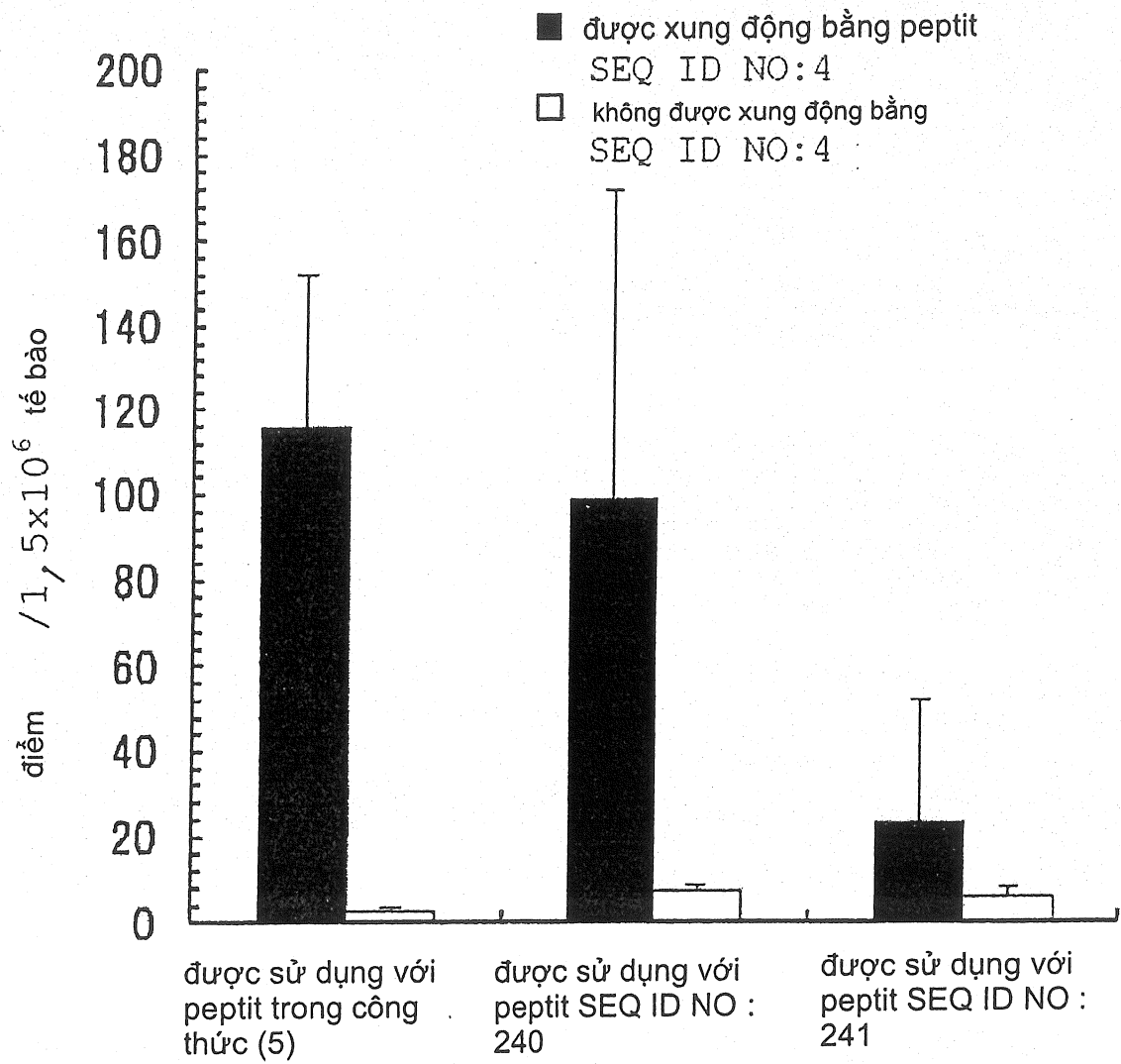


Fig.17

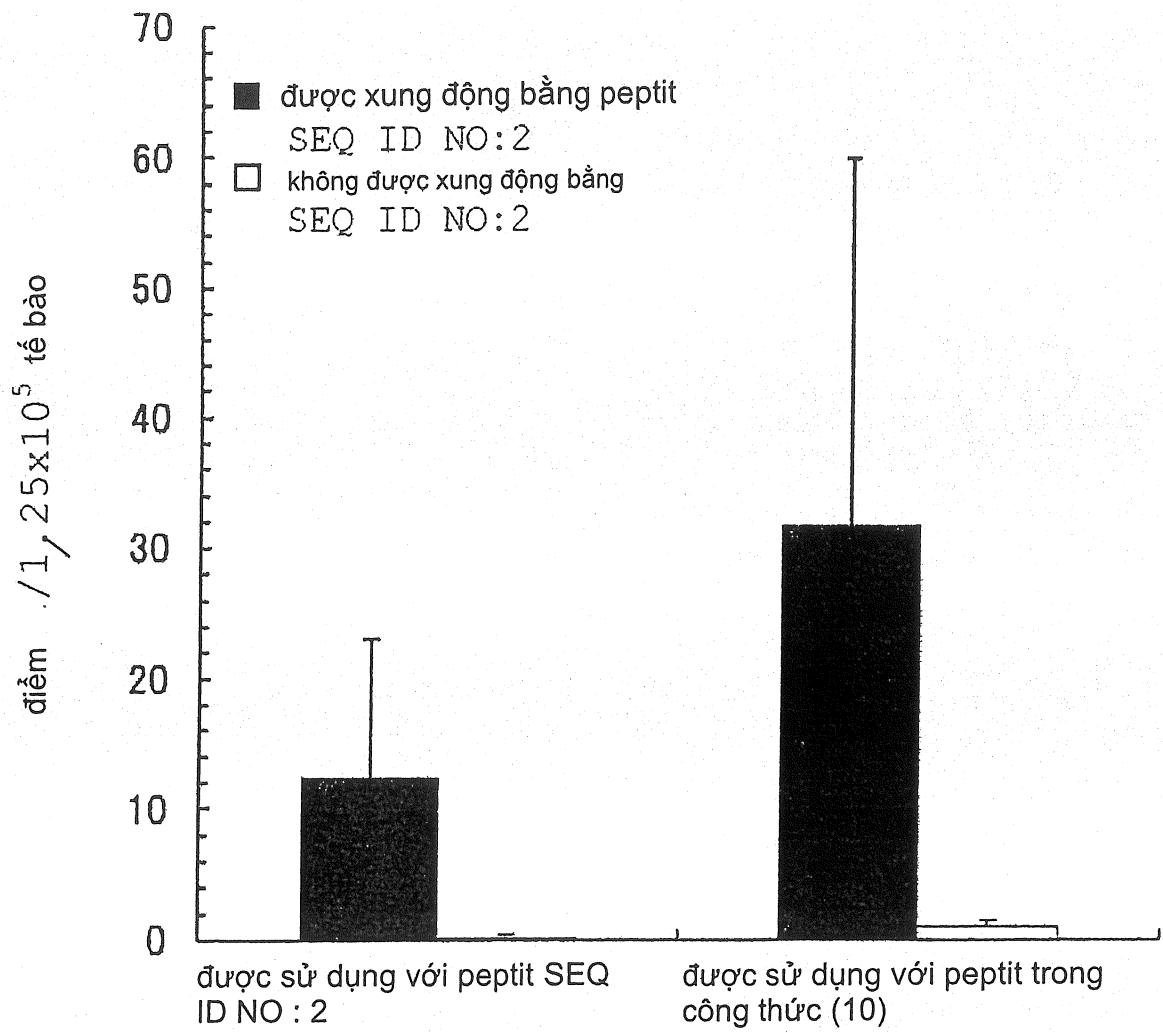


Fig.18

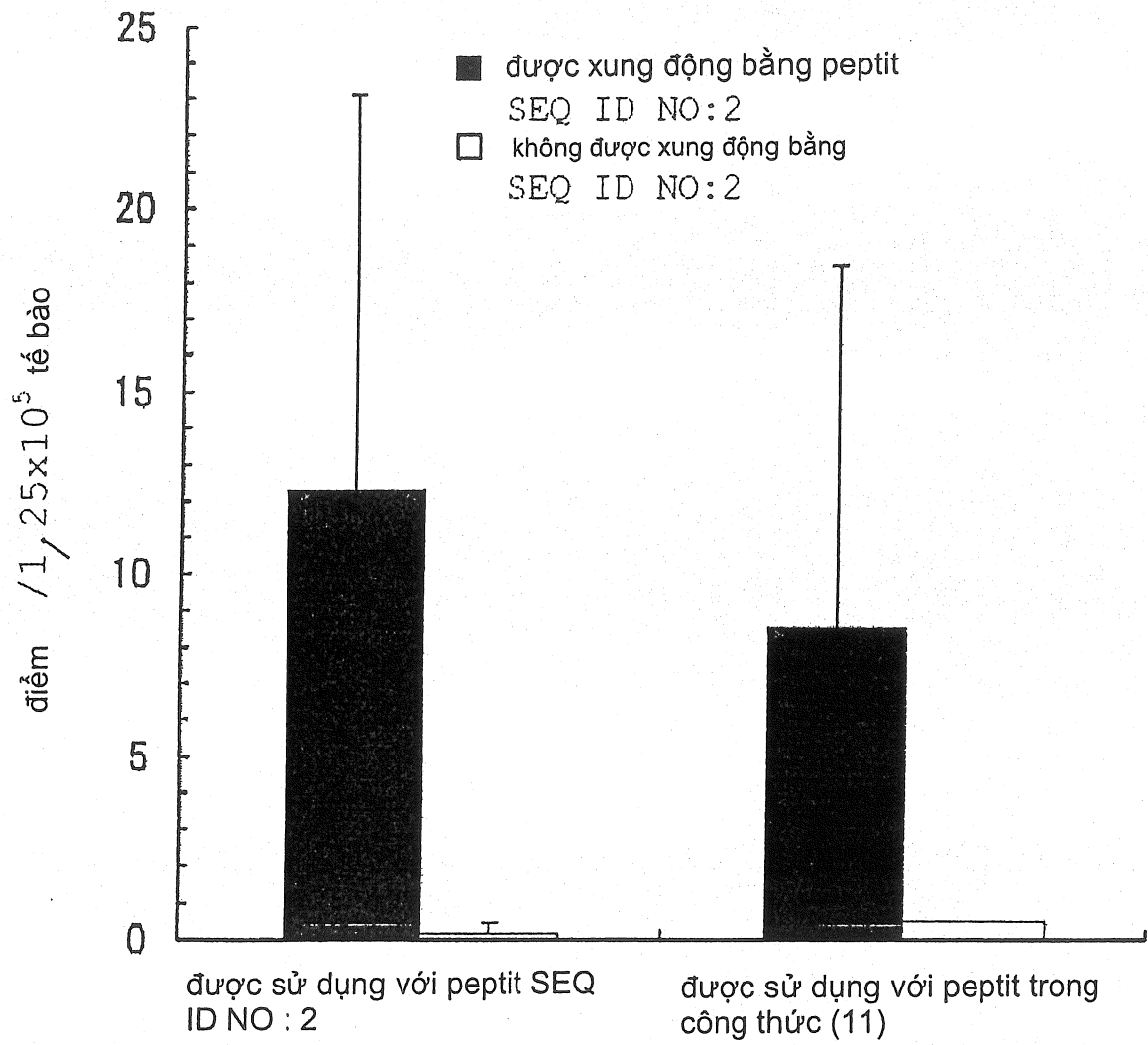


Fig.19

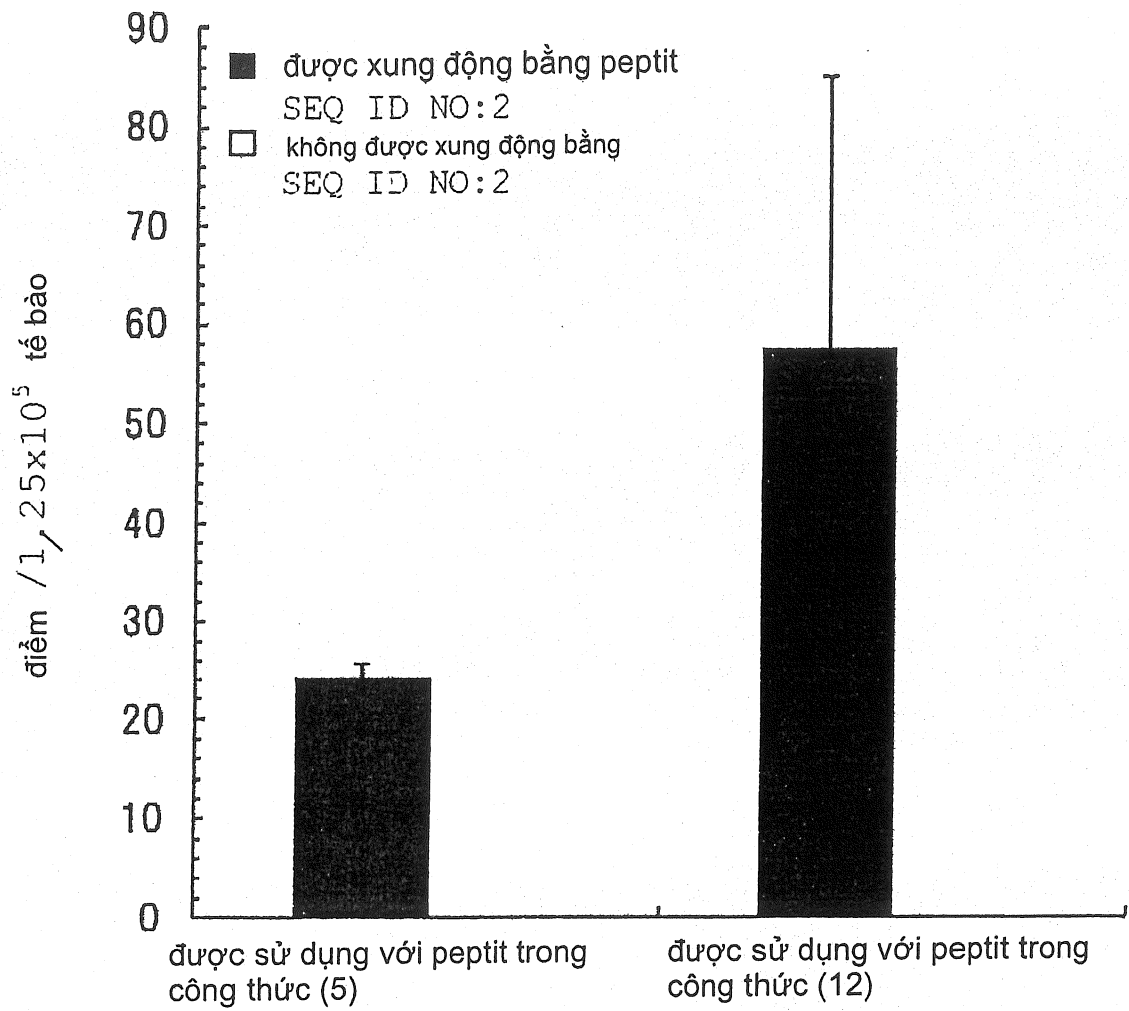


Fig.20

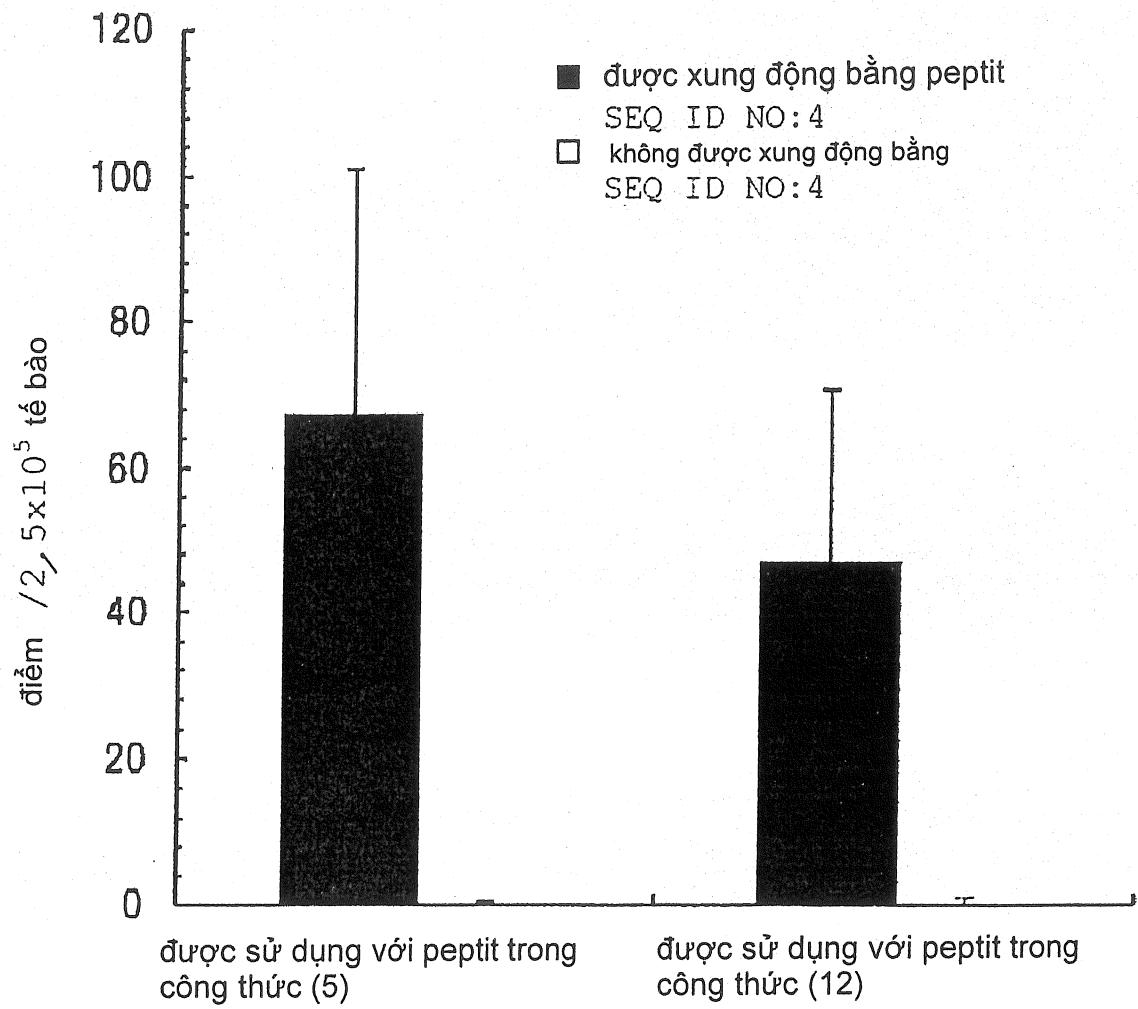


Fig.21

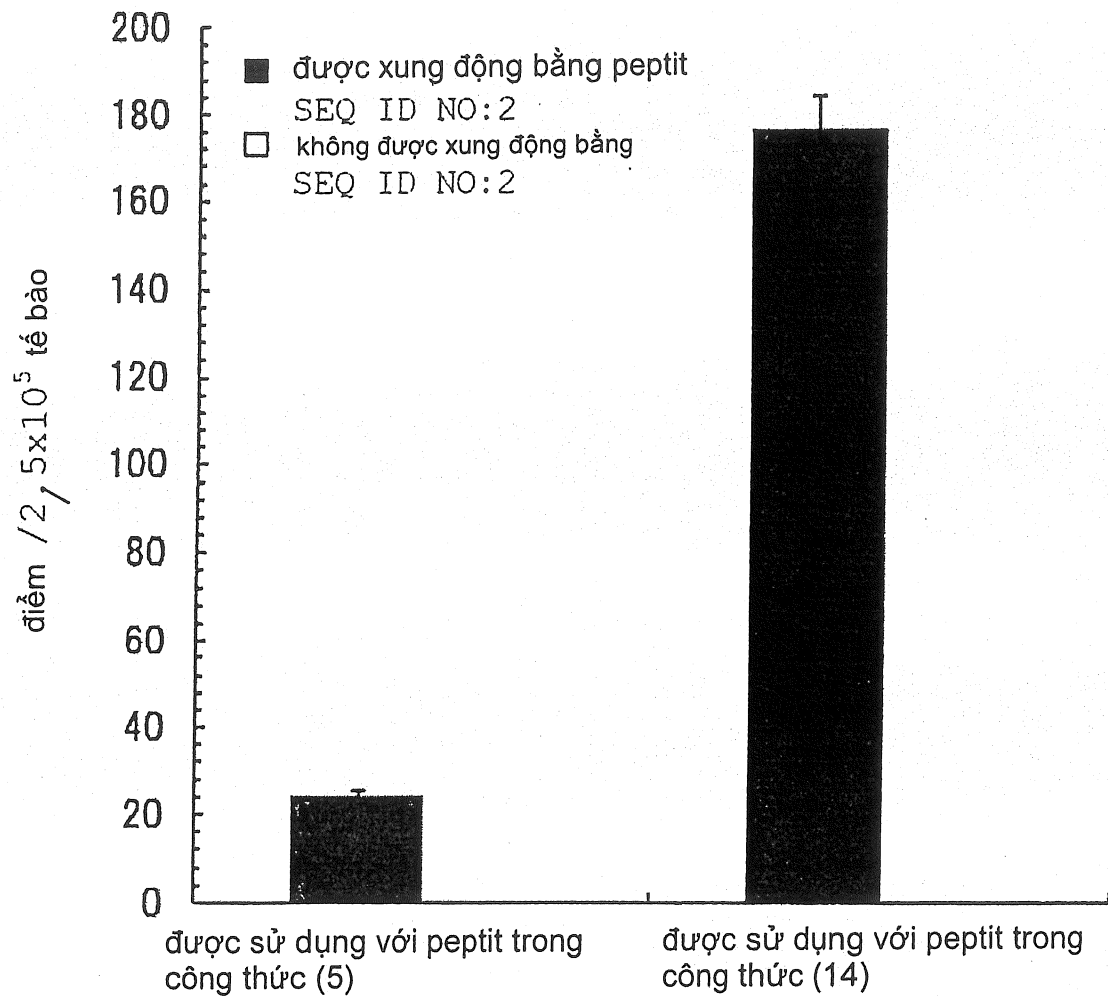


Fig.22

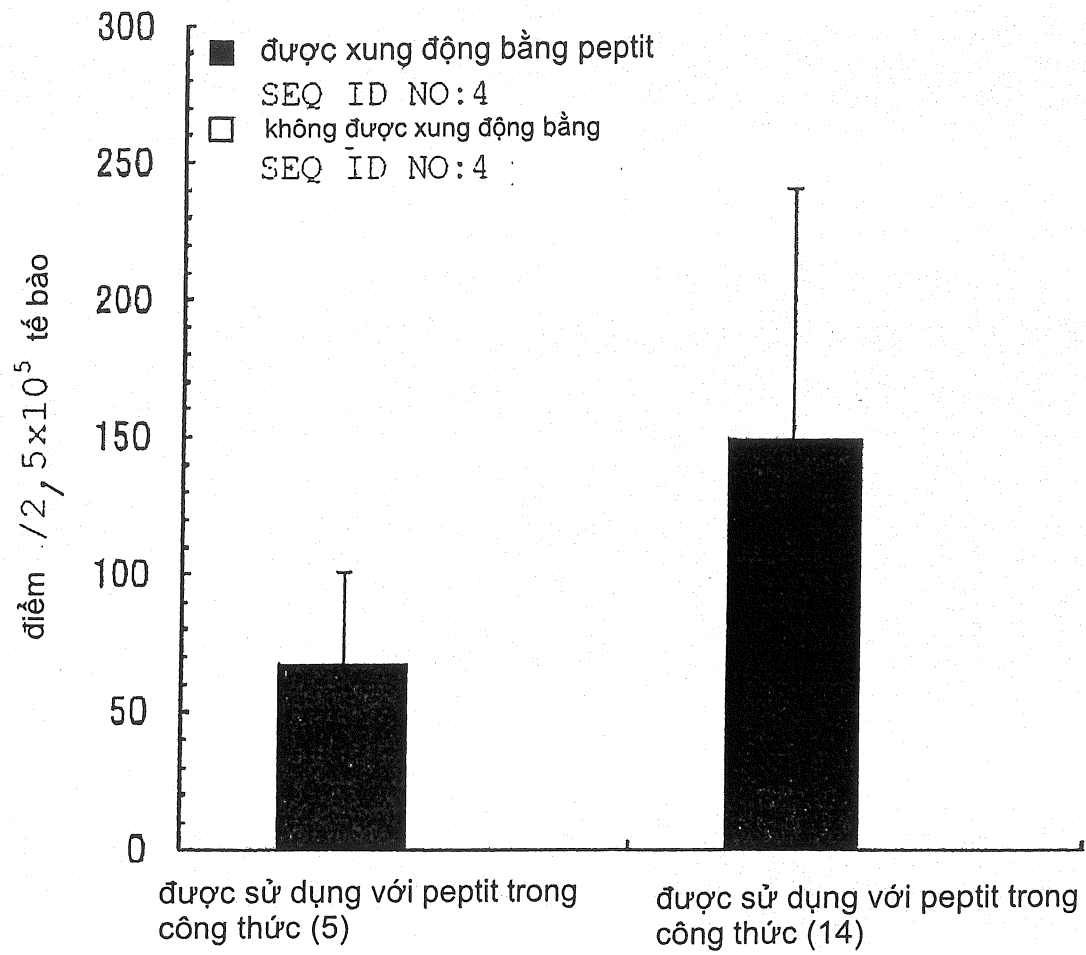


Fig.23

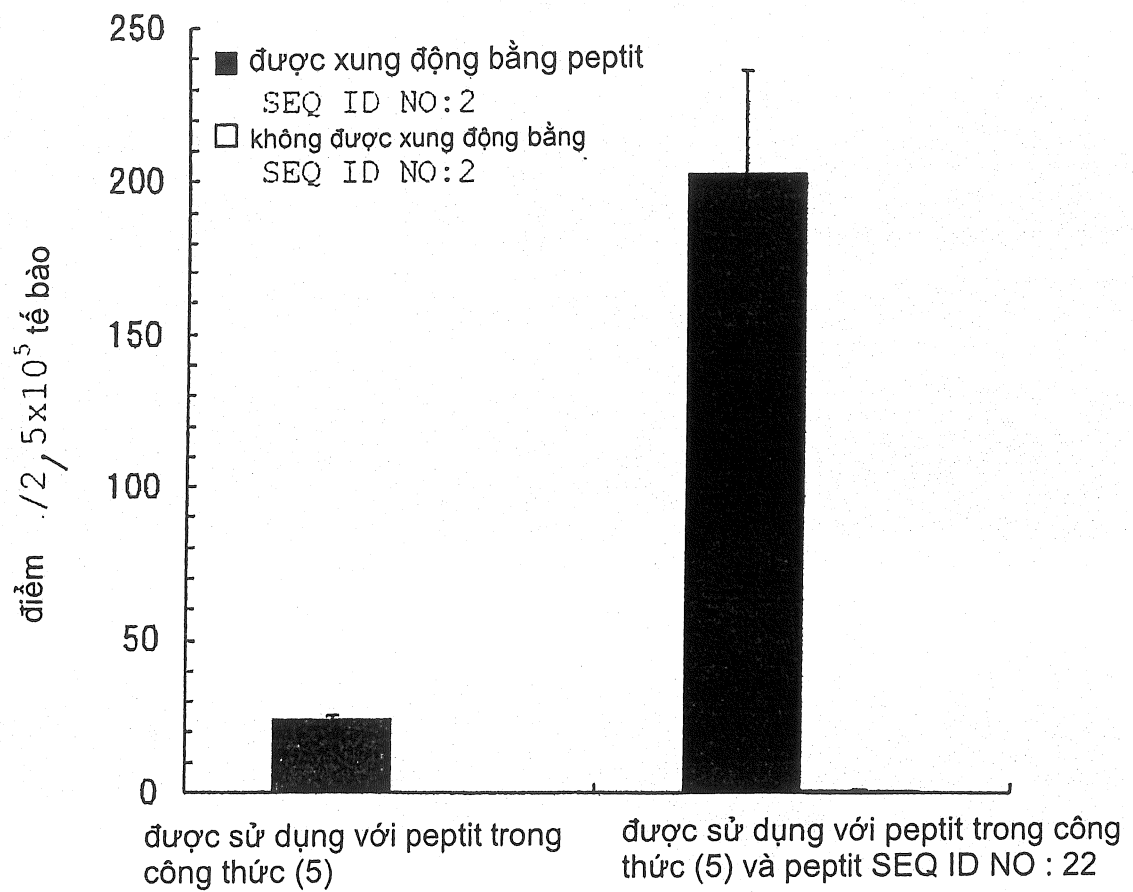


Fig.24

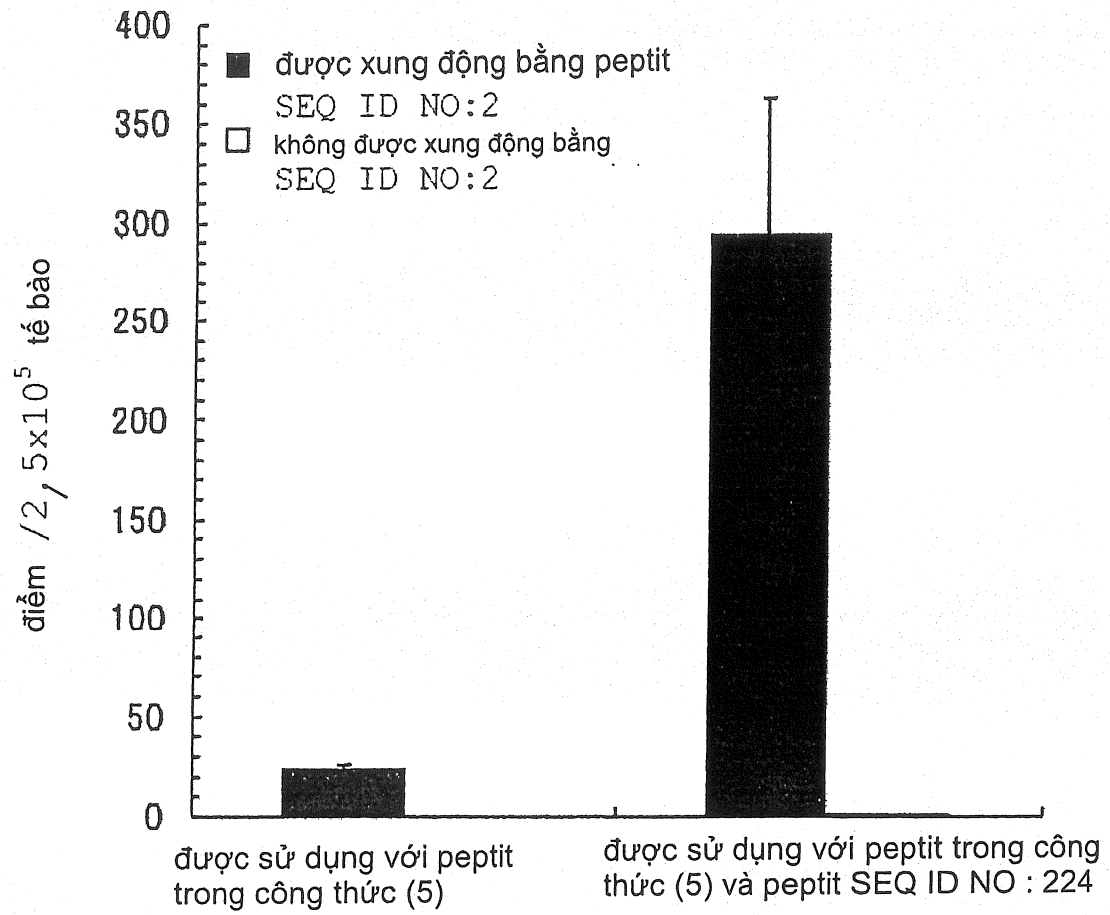


Fig.25

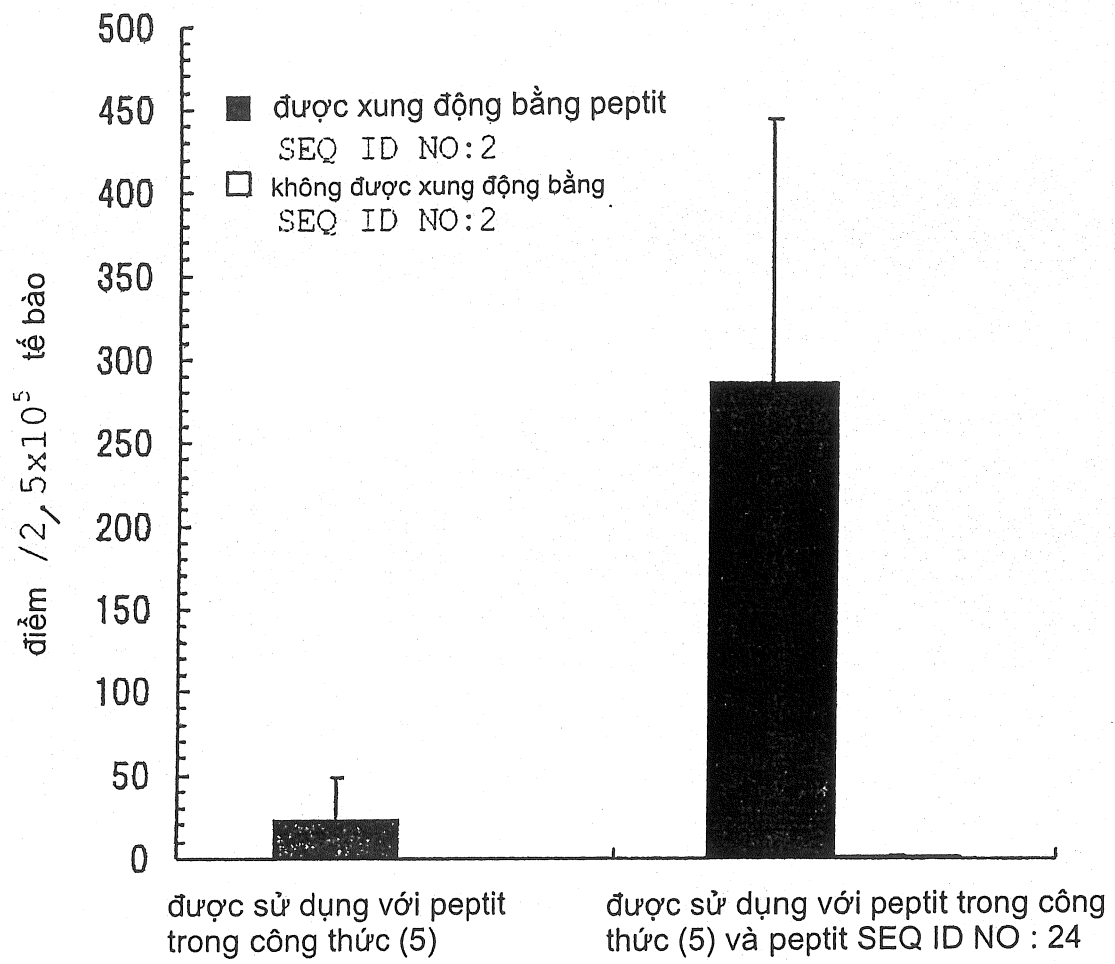


Fig.26

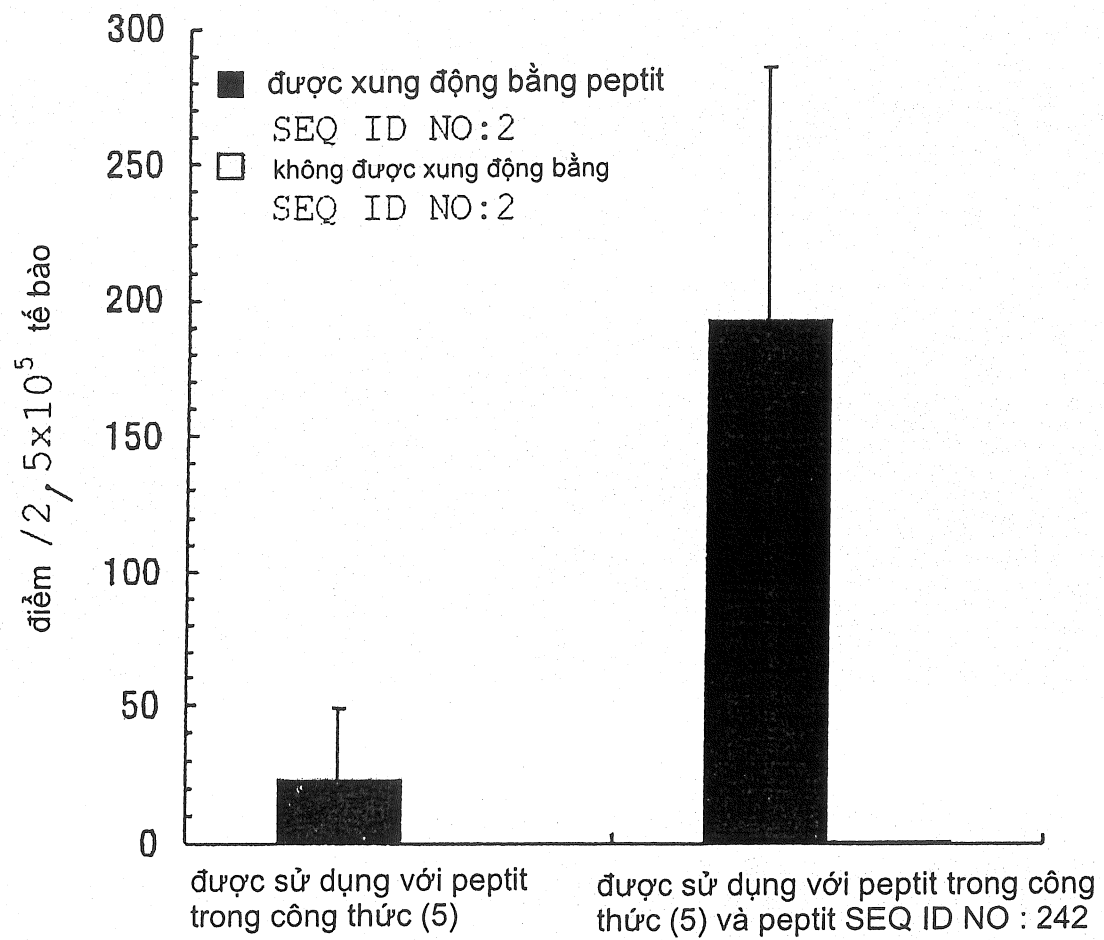
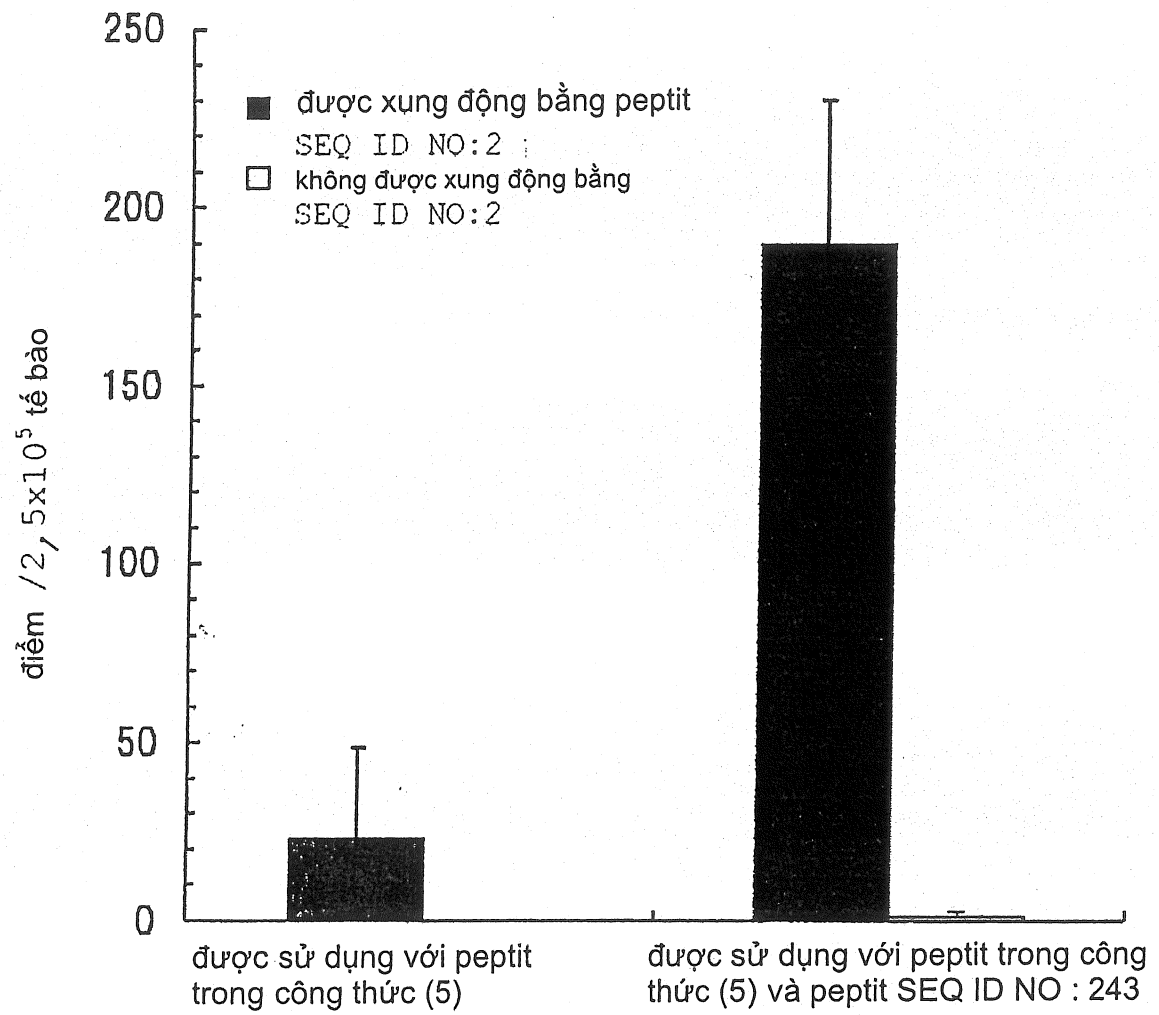


Fig.27



Danh mục trình tự

<110> Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.
 International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> HỢP CHẤT LIÊN HỢP KHÁNG NGUYÊN PEPTIT WT1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

<130> 672495

<150> JP 2013-072173
 <151> 2013-03-29

<150> JP 2013-158383
 <151> 2013-07-31

<160> 244

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Loài người

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 3

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 4

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 5

Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 6

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 7

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 8

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 9

Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu
 20 25 30

<210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 10

Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
1 5 10 15

Ser Arg Lys His Thr Gly
20

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 11

Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
1 5 10 15

Leu Glu Ser

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 12

Ser Gly Gln Ala Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
1 5 10 15

Leu Glu Ser

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 13

Cys	Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu
1				5					10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 14

Cys	Cys	Met	Thr	Trp	Asn	Gln	Met	Asn	Leu
1				5					10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 15

Cys	Cys	Tyr	Thr	Trp	Asn	Gln	Met	Asn	Leu
1				5					10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 16

Cys	Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Pro	Ser	Leu
1				5					10

<210> 17
<211> 10

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 17

Cys	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Gln	Tyr	Ser	Val
1				5					10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 18

Cys	Arg	Val	Pro	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Leu
1				5					10

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 19

Ser	Gly	Gln	Ala	Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	

<210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 20

Pro	Gly	Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His
1				5					10					15	

Ser Arg Lys

<210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 21

Pro	Gly	Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His
1				5					10					15	

Ser Arg Lys His
 20

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 22

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

Lys

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 23

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

Lys His

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 24

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

Lys His Thr Gly
 20

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 25

Ser	Gly	Gln	Ala	Tyr	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 26

Gly	Ser	Asp	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Ala
1				5				

<210> 27

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 27

Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 28

Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 29

Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 30

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 31

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 32

Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 34

Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 35

Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 36

Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 37

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 38

Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 39

Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 40

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 41

Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 42

Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 43

Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 44

Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 45

Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala
1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 46

Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 47

Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile
 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 48

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys
 1 5

<210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 49

Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp

1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 50

Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 51

Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 52

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 53

Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 54

Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 55

His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 56

Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 57

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 58

Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 59

Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 60

Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr
1 5

<210> 61
<211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 61

Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 62

Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 63

Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 64

Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 65

Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 66

Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 67

Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 68

Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 69

Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 70

Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 71

Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 72

Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 73

Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 74

Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 75

Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 76

Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile

1

5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 77

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg

1

5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 78

Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn

1

5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 79

Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln

1

5

<210> 80

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 80

Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 81

Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 82

Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 83

Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 84

Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 85

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala
 1 5

<210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 86

Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe
 1 5

<210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 87

Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 88

Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 89

Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 90

His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 91

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 92

Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 93

Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 94

Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 95

Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 96

Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 97

Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 98

Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr
1 5

<210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 99

Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser
 1 5

<210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 100

Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 101

Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu
 1 5

<210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 102

Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu

1 5

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 103

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu
 1 5

<210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 104

Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg
 1 5

<210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 105

Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr
 1 5

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 106

Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr
1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 107

Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn
1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 108

Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 109

Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 110

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met
 1 5

<210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 111

Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr
 1 5

<210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 112

Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser
 1 5

<210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 113

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu
 1 5

<210> 114
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 114

Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys
 1 5

<210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 115

Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 1 5

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 116

Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 117

Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 118

Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 119

Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
 1 5

<210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 120

Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 121

Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 122

Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 123

Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 124

Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 125

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 126

Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 127

Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 128

Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr
1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 129

Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr

1

5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 130

Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr

1

5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 131

Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr

1

5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 132

Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile

1

5

<210> 133

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 133

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu
 1 5

<210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 134

His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 1 5

<210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 135

Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr
 1 5

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 136

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
 1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 137

Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 1 5

<210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 138

Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val
 1 5

<210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 139

Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe
 1 5

<210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 140

Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 141

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 142

Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 143

Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 144

Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg
1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 145

Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 146

Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 147

Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala
1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 148

Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr
1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 149

Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val
1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 150

Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala
1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 151

Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
1 5

<210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 152

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 1 5

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 153

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
 1 5

<210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 154

Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe
 1 5

<210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 155

Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met

1 5

<210> 156
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 156

Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys
 1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 157

Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala
 1 5

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 158

Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr
 1 5

<210> 159
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 159

Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 160

Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 161

Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr
1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 162

Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe
1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 163

Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 164

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 165

Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 166

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
1 5

<210> 167
<211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 167

Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
 1 5

<210> 168
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 168

His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys
 1 5

<210> 169
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 169

Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
 1 5

<210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 170

His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys
 1 5

<210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 171

Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe
 1 5

<210> 172
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 172

Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp
 1 5

<210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 173

Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg
 1 5

<210> 174
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 174

Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 175

Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 176

Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 177

Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 178

Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg
1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 179

Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln
1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 180

Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 181

Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 182

Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
 1 5

<210> 183
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 183

His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
 1 5

<210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 184

Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe
 1 5

<210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 185

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
 1 5

<210> 186

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 186

Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys
 1 5

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 187

Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe
 1 5

<210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 188

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 189

Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser
 1 5

<210> 190
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 190

Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His
 1 5

<210> 191
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 191

Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu
 1 5

<210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 192

Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys
 1 5

<210> 193
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 193

Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 194

Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr
1 5

<210> 195
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 195

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 196

Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe
1 5

<210> 197
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 197

Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 198

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 199

Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp
1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 200

Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser
1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 201

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys
1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 202

Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys
1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 203

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 204

Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala
1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 205

Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg
 1 5

<210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 206

Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser
 1 5

<210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 207

Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu
 1 5

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 208

Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val

1 5

<210> 209
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 209

Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
 1 5

<210> 210
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 210

Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His
 1 5

<210> 211
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 211

Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His
 1 5

<210> 212
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 212

Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn
1 5

<210> 213

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 213

Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met
1 5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 214

Val Arg His His Asn Met His Gln Arg
1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 215

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn
1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 216

His His Asn Met His Gln Arg Asn Met
1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 217

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 218

Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu
1 5

<210> 219

<211> 21

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 219

Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn
1 5 10 15

Met His Gln Arg Asn
20

<210> 220
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 220

Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
 1 5

<210> 221
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 221

Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 1 5

<210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 222

Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 1 5

<210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 223

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 224

Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 225

Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 226

Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 227

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val
1 5

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<400> 228

Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Ser or Ala

<400> 229

Xaa Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa is selected from the group consisting of Ser, Ala, Abu, Arg, Lys, Orn, Cit, Leu, Phe and Asn

<400> 230

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

<210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 231

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

<210> 232
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 232

Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

<210> 233
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 233

Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

<210> 234

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 234

Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

<210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 235

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 1 5

<210> 236
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 236

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn
 1 5 10

<210> 237
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 237

Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro
 1 5 10 15

Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu
20

<210> 238
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 238

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met
1 5 10 15

Asn Leu

<210> 239
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 239

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro
1 5 10 15

Tyr Leu

<210> 240
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 240

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys

1 5 10 15

Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
20

<210> 241
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 241

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg
1 5 10 15

Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
20

<210> 242
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 242

Cys Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
1 5 10 15

Gly Ser Leu

<210> 243
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 243

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Leu Cys

<210> 244
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit

<400> 244

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Leu