



(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)



1-0032519

(51)⁷ C07K 7/00

(13) B

(21) 1-2016-01301

(22) 11/08/2014

(86) PCT/US2014/050516 11/08/2014

(87) WO 2015/038264 19/03/2015

(30) 61/877,767 13/09/2013 US

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/08/2016 341A

(73) SOLIGENIX, INC. (US)

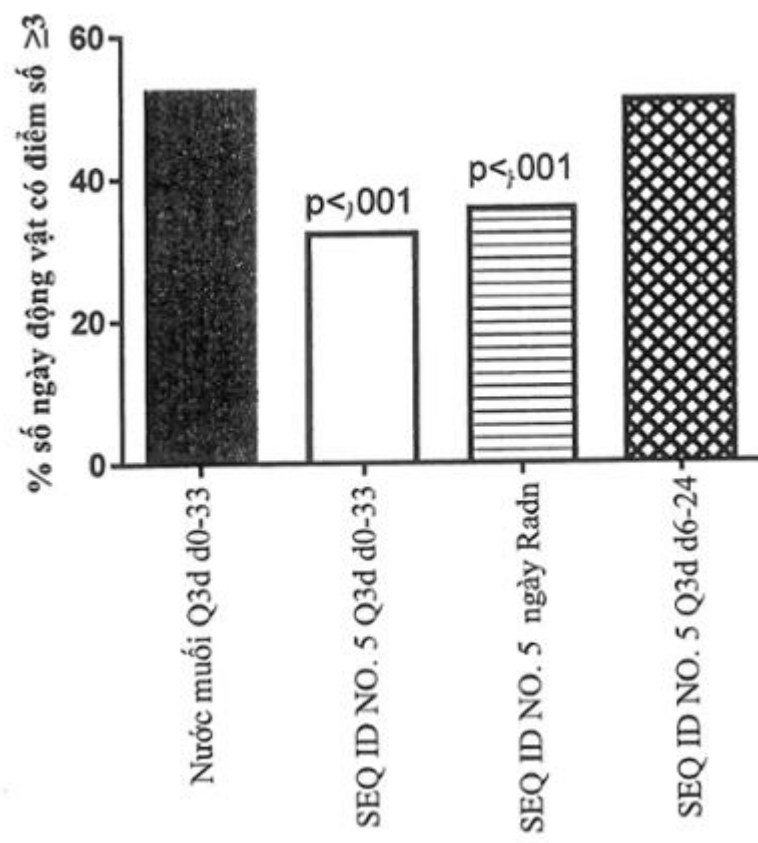
29 Emmons Drive, Suite C-10, Princeton, NJ 08540, United States of America

(72) DONINI, Oreola (CA); ROZEK, Annett (CA); LEE, Jackson (CA); NORTH, John (CA); ABRAMS, Michael (US).

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

(54) PEPTIT DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ VIÊM NIÊM MẠC MIỆNG

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực điều hòa phòng vệ bẩm sinh (Innate Defense Regulator - IDR). Sáng chế cũng đề cập đến peptit được phân lập và phương pháp tạo ra peptit IDR tổng hợp trong việc điều trị và làm giảm viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng. Đặc biệt là, sáng chế mô tả cơ chế để làm giảm tỷ lệ mắc, mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian của bệnh viêm niêm mạc miệng ở một đối tượng do tiếp xúc với lượng bức xạ và/hoặc tác nhân hóa trị liệu có hại.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực điều hòa phòng vệ bẩm sinh (Innate Defense Regulator - IDR). Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra peptit IDR tổng hợp trong việc điều trị và làm giảm viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng. Đặc biệt là, sáng chế mô tả cơ chế để làm giảm tỷ lệ mắc, mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian của bệnh viêm niêm mạc miệng ở một đối tượng do tiếp xúc với lượng bức xạ và/hoặc tác nhân hóa trị liệu có hại.

Tình trạng kỹ thuật được đề cập

Hệ thống miễn dịch bẩm sinh

Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh là hệ thống bảo vệ được bảo tồn theo cách tiến hóa liên quan đến các hàng rào giữa mô và môi trường bên ngoài, như da, niêm mạc miệng dạ dày và đường không khí. Việc nhận diện và loại trừ nhanh chóng sự lây lan của mầm bệnh cũng như tạo ra đáp ứng với tổn thương tế bào thường liên quan đến đáp ứng viêm và là thành phần đóng quan trọng góp phần vào việc hoạt hóa tính miễn dịch thích ứng. Phòng vệ bẩm sinh được kích hoạt bởi sự gắn kết của mầm bệnh và/hoặc phân tử liên quan đến tổn thương (PAMP hoặc DAMP) với thụ thể nhận diện kiểu mẫu, bao gồm các thụ thể giống Toll (TLR). Các thụ thể nhận diện kiểu mẫu được phát hiện trong và trên nhiều loại tế bào, phân bố khắp cơ thể trong các gian trong hệ tuần hoàn và tồn tại, và đóng vai trò cung cấp các tín hiệu “cảnh báo” sớm, dẫn đến việc giải phóng các phân tử kháng vi sinh vật không đặc hiệu, xytokin, chemokin, và protein và peptit phòng vệ ở vật chủ cũng như thu nhận tế bào miễn dịch (bạch cầu trung tính, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân) theo cách có trật tự cao (Janeway 2002; Beutler 2003; Beutler 2004; Athman 2004; Tosi 2005; Doyle 2006; Foster 2007; Matzinger 2002). Hơn nữa, hệ thống miễn dịch bẩm sinh trực tiếp tham gia vào việc tạo ra khả năng dung nhận vi sinh vật cộng sinh trong đường dạ dày ruột và việc phòng vệ miễn dịch và phục hồi dạ dày ruột (Santaolalla, 2011; Molloy 2012).

Viêm niêm mạc

Viêm niêm mạc miệng là thuật ngữ lâm sàng chỉ sự tổn thương ở niêm mạc do các liệu pháp điều trị chống ung thư gây ra. Nó có thể xuất hiện trong vùng niêm mạc

bất kỳ, nhưng thường xuất hiện ở miệng, tiếp theo là ruột non. Mặc dù hiện nay có nhiều hệ thống phân cấp độ viêm niêm mạc được sử dụng trong lâm sàng, nhưng có hai hệ thống thường được sử dụng nhất là hệ thống phân cấp độ NCI và WHO.

Cơ chế viêm niêm mạc miệng đã được nghiên cứu chuyên sâu và gần đây được cho là có liên quan đến tương tác của liệu pháp hóa trị và/hoặc bức xạ với hệ thống phòng vệ bẩm sinh (Sonis 2010). Việc nhiễm khuẩn ở các tổn thương gây loét hiện được coi là hậu quả thứ phát của chứng viêm cục bộ rối loạn điều hòa được kích hoạt thông qua sự chết tế bào do liệu pháp dùng để điều trị bệnh, chứ không phải là nguyên nhân khởi phát từ các thương tổn. Viêm niêm mạc miệng gây ảnh hưởng trên 500,000 người ở Mỹ mỗi năm và xuất hiện ở 40% bệnh nhân được điều trị bằng liệu pháp hóa trị (Sonis 2010, Curr. Op.). Viêm niêm mạc miệng gần như luôn xảy ra ở bệnh nhân bị ung thư đầu và cổ được điều trị bằng xạ trị (>80% bệnh nhân mắc viêm niêm mạc nghiêm trọng) (Elting et al. 2008). Viêm niêm mạc miệng thường gặp (tỷ lệ mắc là 40%-100%) ở bệnh nhân trải qua hóa trị liều cao và cấy ghép tế bào gốc (SCT) trong đó tỷ lệ mắc và mức độ nghiêm trọng của viêm niêm mạc phần lớn phụ thuộc vào bản chất của phác đồ điều kiện hóa được sử dụng để diệt tủy (Murphy 2007). Trong số các thuốc được dùng trong liệu pháp hóa trị, 5-FU và irinotecan được đặc biệt lưu ý do nó gây viêm niêm mạc miệng nhưng hiện tượng này cũng xảy ra với các chất mới hơn như chất ức chế mTOR và chất ức chế kinaza (Mateus et al. 2009; Sankhala et al. 2009). Viêm niêm mạc miệng có thể gây suy nhược trầm trọng và có thể dẫn tới nhiễm khuẩn, nhiễm khuẩn huyết, cần nuôi dưỡng ngoài đường tiêu hóa và thuốc giảm đau ảnh hưởng đến thần kinh. Các tổn thương ở ruột gây tiêu chảy nặng. Các triệu chứng này có thể hạn chế liều lượng và thời gian điều trị ung thư, vì thế dẫn đến kết quả điều trị dưới mức tối ưu bao gồm khả năng sống giảm. Hậu quả trực tiếp và gián tiếp của viêm niêm mạc làm cho chi phí điều trị ung thư cho mỗi bệnh nhân tăng thêm khoảng ~\$18K (Nonzee et al. 2008). Viêm niêm mạc miệng xuất hiện 3-12 tuần sau khi bắt đầu chiếu xạ, hoặc 3-12 ngày sau khi bắt đầu điều trị bằng hóa chất, và hồi phục sau 2-3 tuần, trong trường hợp không tiếp tục hóa trị hoặc xạ trị.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) là IDR (Innate Defense Regulator), là một nhóm peptit mới ngán, tổng hợp có cơ chế tác động mới được thiết kế để mô phỏng một trong các chức năng được phát hiện gần đây của peptit bảo vệ niêm mạc tự nhiên, IDR không có hoạt tính kháng sinh trực tiếp nhưng điều biến đáp ứng của vật chủ, tăng khả năng

sống sau khi nhiễm mầm bệnh vi khuẩn gram âm và gram dương phổ rộng, cũng như tăng cường khả năng phục hồi các tổn thương mô sau khi tiếp xúc với nhiều tác nhân bao gồm vi khuẩn gây bệnh, chấn thương và hóa trị hoặc xạ trị.

Dựa trên số liệu tiền lâm sàng thu được trên mô hình viêm niêm mạc miệng do hóa trị, viêm niêm mạc gây ra bởi bức xạ, nhiễm khuẩn giảm bạch cầu trung tính và viêm đại tràng, có thể cho thấy rằng tình trạng viêm niêm mạc miệng có thể được điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) và peptit IDR khác. Do các chất này có thể được dùng ngay sau khi truyền hóa chất hoặc chiếu xạ, RIVPA (SEQ ID NO. 5) dạng liều dùng trong tĩnh mạch IV đặc biệt thích hợp cho chỉ định viêm niêm mạc. Kết quả hiệu lực tiền lâm sàng của RIVPA (SEQ ID NO. 5) trên mô hình chuột nhắt và chuột đồng bị viêm niêm mạc cho thấy rằng việc dùng ba ngày một lần có thể không chế được giai đoạn “cửa sổ” của tình trạng viêm niêm mạc miệng bằng 7 đến 14 liều, và hiệu lực này phụ thuộc vào khoảng thời gian điều trị bằng hóa trị hoặc chiếu xạ.

Liên quan đến bệnh ung thư vú, khoảng 20% bệnh nhân tiếp nhận trị liệu ACT mắc viêm niêm mạc miệng gây loét trong đợt hóa trị thứ nhất nhưng ~70% trong số các bệnh nhân này bị viêm niêm mạc gây loét ở đợt điều trị thứ hai (Sonis 2010). Đây là nhóm bệnh nhân có “nguy cơ cao” có thể được hưởng lợi từ việc điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5). Hiện nay chưa có chất được dùng toàn thân được phê chuẩn dùng cho mục đích giảm tình trạng viêm niêm mạc miệng trong quần thể này.

Bệnh nhân trải qua việc hóa trị và SCT liều cao để điều trị ung thư máu là nhóm bị ức chế miễn dịch có nguy cơ nhiễm khuẩn cao. Trong quá trình điều trị, hóa chất liều cao (đôi khi kết hợp với chiếu xạ), “chế độ điều kiện hóa”, được dùng để tiêu diệt phần lớn tế bào ung thư. Các cấp độ điều trị này có thể dẫn đến suy tủy gây chết trừ khi phương pháp tế bào gốc (từ tủy xương hoặc máu) được dùng sau đó để cho phép tái cấu trúc tế bào máu. Ghép tự thân sử dụng tế bào gốc của chính bệnh nhân đó được dùng cho mục đích này trong khi ghép khác loài sử dụng tế bào từ đối tượng cho khỏe mạnh phù hợp. Ghép tự thân thường được sử dụng trong điều trị đa u tủy (MM) và u lympho không Hodgkins (NHL). Ghép khác loài thường được sử dụng để điều trị ung thư bạch cầu như AML.

Liên quan đến SCT, cho đến gần đây các chế độ hóa trị điều kiện hóa khác nhau

đều dẫn đến tỷ lệ viêm niêm mạc miệng khá cao (40%-100%) và ở hầu hết các trung tâm của Mỹ, các bệnh nhân này được theo dõi trong bệnh viện. Viêm niêm mạc miệng liên quan đến bức xạ và/hoặc hóa bức xạ đối với ung thư đầu và cổ là một vấn đề lớn, với 85% đối tượng có mức độ viêm niêm mạc nhất định – 42% tương đương với độ 3 hoặc 4.

Hội chứng nhiễm xạ cấp

Hội chứng nhiễm xạ cấp (ARS) là bệnh nghiêm trọng xuất hiện khi toàn thân (hoặc phần lớn cơ thể) tiếp nhận bức xạ liều cao, thường trong khoảng thời gian ngắn. Nhiều người sống sót trong vụ ném bom nguyên tử Hiroshima và Nagasaki vào những năm 1940 và nhiều lính cứu hỏa là những người đầu tiên tiếp cận ngay sau khi tai nạn nhà máy điện hạt nhân Chernobyl năm 1986 trở nên đau yếu do ARS gây ra (CDC 2013).

Các đối tượng tiếp xúc với bức xạ sẽ bị ARS nếu:

- liều bức xạ cao (các liều dùng trong quy trình y tế như chụp X quang ngực là quá thấp để gây ra ARS),
- bức xạ thâm nhập (đó là, có thể tới các cơ quan nội tạng),
- toàn bộ cơ thể của người đó, hoặc phần lớn cơ thể họ, đã tiếp nhận liều, và
- bức xạ được tiếp nhận trong thời gian ngắn, thường trong vòng vài phút.

Bức xạ gây thương tổn tỷ lệ thuận với liều dùng trên tế bào và mô động vật có vú. Ở liều thấp, tổn thương có thể được hạn chế đến các đột biến điểm trong ADN tế bào xô ma và/hoặc ADN dòng mầm có thể liên quan đến tác dụng lâu dài như tăng nguy cơ ung thư hoặc dị tật bẩm sinh. Ở liều trung bình, bức xạ bao gồm các bất thường ở nhiễm sắc thể như đứt gãy hoặc chuyển vị, mà cũng tăng nguy cơ ung thư và dị tật bẩm sinh, và nếu đủ nghiêm trọng sẽ gây chết tế bào phân chia nhanh trong vòng vài giờ tiếp xúc. Ở liều rất cao, bức xạ có thể làm biến tính protein, dẫn đến hầu hết tế bào và mô chết ngay lập tức. Mô với tế bào phân chia nhanh thường bị ảnh hưởng lớn nhất bởi liều bức xạ vừa phải bao gồm tủy xương, đường dạ dày ruột và tinh hoàn. Việc tiếp xúc với bức xạ liên quan đến tác động cấp tính, bao gồm phát ban da và bong, suy tủy xương, bao gồm thiếu máu, số lượng tế bào bạch cầu giảm, và giảm tiểu

cầu, cũng như gây độc dạ dày ruột như tiêu chảy, và các tác động lâu dài hơn như phát triển khối u, đặc biệt là sacôm và ung thư bạch cầu, và các khuyết tật bẩm sinh.

Các triệu chứng đầu tiên của ARS thường là buồn nôn, nôn, và tiêu chảy. Các triệu chứng này sẽ bắt đầu trong vòng vài phút đến vài ngày sau khi tiếp xúc, sẽ kéo dài trong vài phút đến vài ngày, và có thể xuất hiện rồi biến mất. Sau đó người đó trông có vẻ khỏe và cảm thấy khỏe mạnh trong một thời gian ngắn, sau đó họ sẽ ốm yếu trở lại với cảm giác chán ăn, mệt mỏi, sốt, buồn nôn, nôn, tiêu chảy, và thậm chí có thể co giật và hôn mê. Giai đoạn đau yếu nghiêm trọng này có thể kéo dài từ vài giờ đến vài tháng.

Người bị ARS thường cũng có một số tổn thương da. Tổn thương này có thể bắt đầu biểu hiện trong vài giờ sau khi tiếp xúc và có thể bao gồm sưng, ngứa, mẩn đỏ trên da và rụng tóc. Giống như các triệu chứng khác, da có thể lành lại trong thời gian ngắn, sau đó hiện tượng sưng, ngứa và mẩn đỏ sẽ quay trở lại vài ngày hoặc tuần sau đó. Da có thể lành hoàn toàn sau vài tuần đến vài năm phụ thuộc vào liều bức xạ mà da của người đó đã tiếp nhận.

Các biểu hiện ở dạ dày ruột của ARS được gọi là hội chứng dạ dày ruột nhiễm xạ cấp hoặc GI-ARS. GI-ARS bao gồm tiêu chảy, mất nước, nhiễm khuẩn đường ruột, và trong các trường hợp nghiêm trọng, sốc nhiễm khuẩn và chết (Potten 1990). Sau khi tiếp xúc với bức xạ, GI-ARS được cho là gây ra bởi sự tổn hại trực tiếp cho tế bào gốc trong nền của các tiểu nang của Lieberkuhn, dẫn đến ngừng phân bào và chết thông qua cơ chế chết theo chương trình (Potten 1997a, Potten 1997b). Tính toàn vẹn của niêm mạc dạ dày ruột phụ thuộc vào sự tăng sinh nhanh của nhóm tế bào gốc toàn năng nằm dưới đáy của các tiểu nang (Brittan 2002, Gordon 1994, Potten 1997b). Vì thế, việc chết tế bào gốc được coi là yếu tố quan trọng trong quá trình này, do tế bào gốc ruột còn sống có vẻ là đủ để khôi phục đơn vị mào ruột-lông nhưng (Potten 1990). Sự tái sinh của hàng rào biểu mô ruột phụ thuộc vào ngăn tế bào gốc hoạt động giống như hệ thống tạo máu. Tế bào có tính tạo dòng tiền thân mào ruột-lông nhưng ruột đặc biệt nhạy với sự tiếp xúc bức xạ ion hóa sao cho với liều bức xạ tăng, tế bào mào ruột-lông nhưng có tính tạo dòng không thể tạo ra tế bào đủ để phục hồi quần thể lông nhưng. Điều này dẫn đến việc làm giảm và rút ngắn chiều cao của lông nhưng và do đó nó không đảm nhiệm được chức năng sau cùng, dẫn đến sự hấp thụ chất dinh

duỡng và chức năng hàng rào giảm, mất dịch và chất điện giải, và chuyển dịch vi khuẩn hàng rào ruột (Monti 2005, Zhao 2009). Ở liều trên 8 Gray (Gy) sẽ gây chết tế bào gốc phụ thuộc liều dẫn đến giảm tái tạo mào ruột, cho đến khi mức tái tạo không đủ để giải cứu niêm mạc dạ dày ruột. Từ các nghiên cứu trên chuột, sự bong tróc tiến triển biểu mô, khoảng ngày thứ 6 đến 7 sau khi bức xạ, dẫn kết quả tử chết do hội chứng GI. Khi hoạt động nguyên phân tiếp tục lại, việc thiếu hụt nghiêm trọng mào ruột do, dự đoán là kết quả của việc mất khả năng sinh sôi của các gen có tính tạo dòng mào ruột (Withers 1971). Ở khoảng liều thấp hơn (8–13 Gy), các gen có tính tạo dòng sống được tạo ra hệ thống mào ruột, dẫn đến sự phục hồi hoàn toàn niêm mạc đã tổn thương. Ở liều trên 14 Gy, việc mất gen có tính tạo dòng số lượng lớn gây phá hủy hệ thống mào ruột-lông nhung, bong tróc niêm mạc và động vật chết do hội chứng dạ dày ruột (Paris 2001; Potten 1990; Withers 1971; Withers 1969).

Gian tế bào mầm ruột không chỉ là gian nhạy với bức xạ ion hóa. Một yếu tố quan trọng nữa bao gồm sự phản ứng của đường dạ dày ruột với chấn thương lớn do vật lý là sự dẫn huyết kém của ruột. Việc ruột dẫn huyết kém kéo dài là sự kiện kích thích quan trọng trong sự phát triển của hội chứng đáp ứng viêm toàn thân và suy đa cơ quan (MOF) (Moore 1999). Tính thấm thành mạch ruột tăng cùng với sự rò rỉ mao mạch quan sát được ở khoảng thời gian sớm sau khi chiếu xạ (Cockerham 1984; Eddy 1968, Willoughby 1960). Các biến đổi sau chiếu xạ bổ sung bao gồm hiện tượng giãn vừa phải và trạng thái uốn khúc của các động mạch nhỏ, làm giảm số lượng và/hoặc chiều dài mạch sau đó diễn ra các kiểu xuất huyết (Eddy 1968). Hiện đang có sự tranh cãi liên quan đến tổn thương chính sau chiếu xạ là việc chết tế bào gốc biểu mô ruột hay là kết quả của việc chết tế bào nội mô (Kirsch 2010). Không liên quan đến tổn thương chính, rõ ràng là chiếu xạ dẫn đến sự phản ứng tổn thương phức tạp bao gồm hiện tượng chết tế bào biểu mô đường ruột, tế bào nội mô và ruột dẫn huyết kém (Williams 2010).

Các phương thức điều trị như yếu tố kích thích tăng trưởng tạo máu, tức là, yếu tố kích thích nhóm bạch cầu hạt- và/hoặc bạch cầu hạt-đại thực bào (G-CSF và G/M-CSF) và erythropoietin (EPO), và việc ghép tế bào gốc tạo máu/tủy xương, có thể sử dụng để giảm tỷ lệ chết do suy tạo máu.

Cơ hội sống với người bị ARS giảm khi tăng liều bức xạ. Gây chết trong vòng

15 ngày tiếp xúc với bức xạ thường gây tổn thương đường dạ dày ruột trong khi chết sau 15 ngày thường là hậu quả của sự tổn thương tủy xương. Đối với những người sống sót, quá trình phục hồi có thể kéo dài từ vài tuần đến 2 năm (CDC 2013).

Vì vậy, hiện nay có nhu cầu cấp thiết để phát triển chất giảm nhẹ sự tác động của bức xạ, mà hiện nay chưa được chấp thuận để điều trị hội chứng nhiễm xạ cấp. RIVPA (SEQ ID NO. 5) có khả năng làm giảm tỷ lệ tử vong cấp tính trong ARS, tạo điều kiện cho các nỗ lực chăm sóc hỗ trợ, và hỗ trợ phục hồi tổn thương da.

Nhiễm khuẩn

Nhiều vi sinh vật, bao gồm virus, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng có thể gây bệnh. Tế bào vi sinh vật khác với tế bào động vật và thực vật ở chỗ chúng không thể sống một mình trong tự nhiên, chỉ tồn tại dưới dạng là bộ phận của sinh vật đa bào. Tế bào vi sinh vật có thể gây bệnh hoặc không gây bệnh, phụ thuộc, một phần, vào vi sinh vật và tình trạng của vật chủ. Ví dụ, trong vật chủ bị suy giảm miễn dịch, vi khuẩn vô hại bình thường có thể trở thành mầm bệnh. Việc đi vào tế bào chủ quan trọng đối với sự sống sót của vi khuẩn gây bệnh sao chép trong môi trường nội bào. Với sinh vật sao chép ở vị trí ngoại bào, tầm quan trọng của việc đi vào tế bào chủ của vi khuẩn chưa được xác định rõ.

Sự kháng thuốc vẫn là trở ngại trong sự nỗ lực không ngừng để chống nhiễm khuẩn. Ví dụ, penicillin hữu hiệu trong điều trị *Staphylococcus aureus* cho đến khi vi khuẩn trở nên kháng thuốc. Trong nửa cuối thế kỷ 20, các chất kháng sinh mới, như vancomycin và methicillin, đã được phát triển; các kháng sinh này chữa trị thành công các trường hợp nhiễm *S. aureus*. Tuy nhiên, chủng kháng methicillin của *S. aureus* đã phát triển vào những năm 1970, và từ đó nó gây trở ngại cho các bệnh viện trên toàn thế giới. Gần đây hơn, chủng kháng vancomycin của *S. aureus* đã xuất hiện.

Với mối đe dọa ngày càng tăng về việc kháng thuốc kháng vi sinh vật và sự xuất hiện của các bệnh nhiễm khuẩn mới, do đó vẫn có nhu cầu về các hợp chất điều trị bệnh mới. Mong muốn là các hợp chất điều trị bệnh này tác động trên vật chủ, không tác động trên mầm bệnh, do chúng không khuyến khích tính kháng mầm bệnh. Cụ thể, thuốc tác động trên vật chủ thông qua hệ thống miễn dịch bẩm sinh tạo ra một nguồn phương pháp điều trị bệnh đầy hứa hẹn. Đã có bằng chứng cho thấy rằng các đáp ứng bẩm sinh là công cụ phòng trừ hầu hết các nhiễm khuẩn và cũng góp phần vào

đáp ứng viêm. Đáp ứng viêm được kích hoạt bởi nhiễm khuẩn được biết là thành phần trung tâm của sự phát sinh bệnh. Một khả năng để tăng cường sức đề kháng của vật chủ với nhiễm khuẩn, trong khi kiểm soát được chứng viêm, có thể có lợi trong cuộc chiến chống nhiễm khuẩn, bao gồm nhiễm khuẩn gây ra bởi sinh vật kháng thuốc.

IDR và hệ thống miễn dịch bẩm sinh

Chất điều hòa phòng vệ bẩm sinh (IDR) tương tác với sự kiện truyền tín hiệu nội bào và điều biến đáp ứng phòng vệ bẩm sinh. Trong khi nhiều công việc ban đầu với IDR tập trung vào vai trò chống nhiễm khuẩn đồng thời kiểm soát chứng viêm, thì các kết quả gần đây trên mô hình động vật có viêm niêm mạc gây ra bởi hóa trị hoặc bức xạ và việc làm lành vết thương đề xuất rằng IDR có thể có lợi trong quá trình đáp ứng với khoảng rộng hơn của các tác nhân gây thương tổn ngoài mầm bệnh. IDR điều trị và ngăn ngừa nhiễm khuẩn bằng cách biến đổi chọn lọc đáp ứng phòng vệ bẩm sinh của cơ thể khi chúng được hoạt hóa bằng PAMP hoặc DAMP, mà không kích hoạt đáp ứng viêm liên quan (Matzinger 2002). Các cơ chế tương tự cho hiệu quả tích cực quan sát được ở viêm niêm mạc và mô hình làm lành vết thương, khi việc truyền tín hiệu sau đó về sự nhận diện của DAMP bị ảnh hưởng. RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã chứng tỏ độ an toàn ở người và sự hữu hiệu trên mô hình động vật bị viêm niêm mạc miệng gây ra bởi chiếu xạ phân đoạn và hóa trị, trong mô hình hóa trị gây thương tổn đường dạ dày ruột và trong mô hình nhiễm vi khuẩn Gram-dương và Gram-âm cục bộ và toàn thân ở vật chủ có năng lực miễn dịch và bị suy giảm miễn dịch.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến peptit để sử dụng trong việc điều trị viêm niêm mạc miệng ở một đối tượng đã tiếp xúc với một lượng bức xạ hoặc tác nhân hóa trị liệu có hại. Mục đích của sáng chế là đề cập đến peptit, trong đó peptit là peptit bao gồm trình tự axit amin trong bất kỳ SEQ ID NO: 5, 10, 24, 27, 28, 31, 34, 63, và 90, hoặc muối, este hoặc amit được dụng của nó và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Theo sáng chế, peptit tốt hơn là SEQ ID NO: 5 hoặc muối, este hoặc amit được dụng của nó và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Theo sáng chế, peptit có thể được sử dụng qua đường miệng, ngoài ruột, áp da, hoặc trong mũi. Sáng chế đề xuất lượng hữu hiệu của peptit được dùng cho đối tượng là ít nhất 1,5 mg/kg. Tốt hơn là, lượng hữu hiệu của peptit được dùng cho đối tượng là nằm trong khoảng từ

1,5 mg/kg đến 6 mg/kg. Theo sáng chế, peptit có thể được sử dụng kết hợp với dạng liều dùng qua đường miệng của corticosteroid có hoạt tính khu trú hoặc chất chuyển hóa của nó cho đối tượng, trong đó dạng liều dùng qua đường miệng là hữu hiệu cho điều trị khu trú hoặc tại chỗ của dải dạ dày – ruột và khoang miệng của đối tượng và cũng trong đó đối tượng có các triệu chứng viêm do tổn thương mô do xạ trị hoặc hóa trị liệu. Corticosteroid có hoạt tính khu trú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, beclometason 17,21-dipropionat, alclometason dipropionat, budesonit, 22S budesonit, 22R budesonit, beclometason-17-monopropionat, clobetasol propionat, diflorason diacetat, flunisolit, flurandrenolit, fluticason propionat, halobetasol propionat, halxinolit, mometason furoat, và triamxinolon axetonit. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, corticosteroid có hoạt tính khu trú là beclometason dipropionat. Lượng hữu hiệu của corticosteroid có hoạt tính khu trú trong mỗi dạng liều có thể khác nhau tùy từng bệnh nhân, và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng các nghiên cứu đáp ứng đã biết. Lượng hữu hiệu thường nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/ngày đến khoảng 8 mg/ngày, và thường nằm trong khoảng từ khoảng 2 mg/ngày đến khoảng 4 mg/ngày.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng trong mô hình chiếu xạ phân đoạn.

Fig. 2. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng trong mô hình chiếu xạ phân đoạn bằng cách sử dụng chế độ liều tối ưu.

Fig. 3. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm độ nghiêm trọng của viêm đại tràng do DSS khi được xác định bằng nội soi vào ngày 7, 14, và 21 (A) và mô bệnh học vào ngày 21 (B,C,D).

Fig. 4. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng (A), mức độ nghiêm trọng của viêm đại tràng (B) và sự sụt cân (C) trong mô hình hóa trị (thử nghiệm thứ nhất).

Fig. 5. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng (A), mức độ nghiêm trọng của viêm đại tràng (B) và sự sụt cân (C) trong mô hình hóa trị (thử nghiệm thứ hai).

Fig. 6. RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng (A), mức độ nghiêm trọng của viêm đại tràng (B) và sự sụt cân (C) trong mô hình hóa trị theo cách đáp ứng liều.

Fig. 7. Tổ hợp của RIVPA (SEQ ID NO. 5) và điều trị bằng Vancomycin trong mô hình nhiễm MRSA IP.

Fig. 8. Hoạt tính RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong chuột bị giảm bạch cầu trung tính trong mô hình áp xe đuôi do nhiễm MRSA.

Fig. 9. Đáp ứng liều của RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong mô hình vi khuẩn MRSA ở chuột có năng lực miễn dịch.

Fig. 10. Đáp ứng liều của RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong mô hình vi khuẩn MRSA ở chuột thiếu tế bào T.

Fig. 11. RIVPA trị liệu (SEQ ID NO. 5) hữu hiệu trong mô hình nhiễm *S. aureus* màng bụng cấp tính.

Fig. 12. Hoạt tính RIVPA (SEQ ID NO. 5) ở chuột bị giảm bạch cầu trung tính trong mô hình áp xe đuôi do nhiễm *S. aureus*.

Fig. 13. RIVPA (SEQ ID NO. 5) hữu hiệu trong mô hình nhiễm *Klebsiella* trong màng bụng với nhiễm vi khuẩn cao (A) thấp (B) . *không có cột đồ thị ở đồ thị (A) cho biết tất cả chuột đã chết (sống sót 0%).

Fig. 14. RIVPA (SEQ ID NO. 5) cải thiện làm giảm sự tổn hại mô ở da bị nhiễm MRSA khu trú. Lượng vi khuẩn lúc 48h (A), Đồ thị phân tán 96h (B), Chấm điểm ảnh mù ở 48h (C), Chấm điểm ảnh mù ở 96h (D). * Thiếu cột trong đồ thị (C) và (D) cho biết tất cả chuột có điểm 0, thu được giá trị trung bình và sai số chuẩn trung bình (SEM) là 0 ± 0 .

Fig. 15. Thiếu RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong việc phục hồi tế bào bạch cầu tuần hoàn (A) hoặc bạch cầu trung tính (B) sau khi gây giảm bạch cầu ở chuột CD-1.

Fig. 16. R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) làm giảm mức độ nghiêm trọng của viêm niêm mạc miệng trong mô hình hóa trị.

Fig. 17. RIV(mp2)A-NH2 (SEQ ID NO. 92) giảm mức độ nghiêm trọng của viêm niêm mạc miệng trong mô hình hóa trị.

Fig. 18. R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) tăng cường sống sót trong mô hình vi khuẩn MRSA.

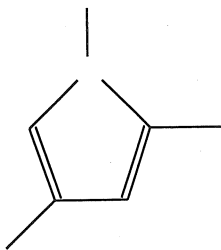
Fig. 19. RIV(mp2)A-NH₂ (SEQ ID NO. 92) tăng cường sống sót trong mô hình vi khuẩn MRSA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất peptit phân lập được bao gồm trình tự axit amin R(tBg)V1KR(tBg)V2, trong đó tBg là tert-butyl glyxin và trong đó R(tBg)V2 liên kết V1 và K bằng liên kết amit.

Sáng chế đề cập đến peptit phân lập được bao gồm trình tự axit amin RIV(mp2)A-NH₂,

trong đó mp2 là axit 4-amino-1-metyl-1H-pyrol-2-carboxylic



Sáng chế mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu:

- a) peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong trong bảng 1; hoặc
- b) peptit chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 5, 7, 10, 14, 17, 18, 22, 23, 24, 27, 28, 31, 34, 35, 63, 64, 66-69, 72, 76, 77, 90, 91 và 92 hoặc muối, este hoặc amit được dụng của chúng và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dụng được dụng.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu:

- a) peptit chứa trình tự axit amin tối đa 7 axit amin, peptit này chứa trình tự axit

amin $X_1X_2X_3P$ (SEQ ID NO: 56), trong đó:

X_1 là R;

X_2 là I hoặc V, trong đó X_2 có thể được N-metyl hóa;

X_3 là I hoặc V, trong đó X_3 có thể được N-metyl hóa;

P là prolin hoặc chất tương tự prolin;

trong đó SEQ ID NO: 56 nếu bốn axit amin thứ nhất ở đầu tận N của peptit, hoặc muối, este hoặc amit được dụng của chúng và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng; hoặc

b) peptit chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 5, 7, 10, 14, 17, 18, 22, 23, 24, 27, 28, 31, 34, 35, 63, 64, 66-69, 72, 76, 77, 90 và 92 hoặc muối, este hoặc amit được dụng của chúng và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, trong đó peptit là SEQ ID NO: 5 hoặc muối, este hoặc amit được dụng của nó và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, trong đó peptit được dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua da, trong mũi.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, trong đó lượng hữu hiệu của peptit được dùng cho đối tượng ít nhất là 1 mg/kg. Theo một phương án ưu tiên lượng hữu hiệu của peptit được dùng cho đối tượng là khoảng 1,5 mg/kg đến 6 mg/kg.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, trong đó peptit được dùng cho đối tượng ba ngày một lần trong khi bức xạ hoặc dùng hóa chất trị liệu.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị viêm niêm mạc miệng ở đối tượng phơi nhiễm với bức xạ hoặc hóa chất trị liệu ở liều gây tổn thương, trong đó peptit được dùng kết hợp với dạng dùng qua đường miệng của corticosteroid có tác dụng khu trú

hoặc chất chuyển hóa của nó cho đối tượng, trong đó dạng dùng qua đường miệng hữu hiệu để điều trị khu trú hoặc cục bộ ở đường dạ dày ruột và khoang miệng của đối tượng và trong đó đối tượng biểu hiện các triệu chứng của viêm do sự tổn hại mô gây ra bởi bức xạ hoặc hóa trị. Corticosteroid có tác dụng khu trú điển hình bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, beclometason 17,21-dipropionat, alclometason dipropionat, budesonit, 22S budesonit, 22R budesonit, beclometason-17-monopropionat, clobetasol propionat, diflorason diacetat, flunisolit, flurandrenolit, fluticason propionat, halobetasol propionat, halcinocit, mometason furoat, và triamxinolon axetonit. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, corticosteroid có tác dụng khu trú là beclometason dipropionat. Lượng hữu hiệu của corticosteroid có tác dụng khu trú trong mỗi dạng liều có thể khác nhau giữa bệnh này với bệnh nhân khác, và có thể xác định dễ dàng bằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bởi các nghiên cứu đáp ứng đã biết rõ. Lượng hữu hiệu này nằm trong khoảng từ 0,1 mg/ngày đến khoảng 8 mg/ngày, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 mg/ngày đến khoảng 4 mg/ngày.

Sáng chế mô tả phương pháp giảm nhẹ sự tác động đến dạ dày ruột, sự tạo máu và da của hội chứng nhiễm xạ cấp ở đối tượng đã tiếp nhận liều bức xạ cao, thâm nhập đến phần lớn cơ thể trong khoảng thời gian ngắn.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hội chứng nhiễm xạ cấp ở đối tượng đã tiếp nhận liều bức xạ cao, thâm nhập đến phần đáng kể của cơ thể trong khoảng thời gian ngắn, trong đó peptit được dùng kết hợp với dạng dùng qua đường miệng của corticosteroid có tác dụng khu trú hoặc chất chuyển hóa của nó cho đối tượng, trong đó dạng dùng qua đường miệng hữu hiệu để điều trị khu trú hoặc cục bộ đường dạ dày ruột và khoang miệng của đối tượng và trong đó đối tượng biểu hiện các triệu chứng viêm do sự tổn hại mô gây ra bởi bức xạ hoặc hóa trị. Corticosteroid có tác dụng khu trú đại diện bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, beclometason 17,21-dipropionat, alclometason dipropionat, budesonit, 22S budesonit, 22R budesonit, beclometason-17-monopropionat, clobetasol propionat, diflorason diacetat, flunisolit, flurandrenolit, fluticason propionat, halobetasol propionat, halcinocit, mometason furoat, và triamxinolon axetonit. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, corticosteroid có tác dụng khu trú là beclometason dipropionat. Lượng hữu hiệu của corticosteroid có tác dụng khu trú trong mỗi dạng liều có thể khác nhau giữa bệnh này với bệnh nhân khác,

và có thể xác định dễ dàng bằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng các nghiên cứu đáp ứng đã biết rõ. Lượng hữu hiệu này nằm trong khoảng từ 0,1 mg/ngày đến khoảng 8 mg/ngày, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 mg/ngày đến khoảng 4 mg/ngày.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa nhiễm khuẩn (ví dụ, microbial nhiễm khuẩn) ở đối tượng, bằng cách cho đối tượng dùng peptit có hoặc chứa trình tự axit amin của TABLE 1 hoặc chất tương tự, dẫn xuất, hoặc biến thể của chúng hoặc chất tương đương hóa học hiển nhiên của nó. Theo cách ví dụ, đối tượng có thể có, hoặc ít nhất là có nguy cơ có, nhiễm khuẩn. Theo một phương án, peptit điều biến tính miễn dịch bẩm sinh ở đối tượng, nhờ đó điều trị và/hoặc ngăn ngừa nhiễm khuẩn ở đối tượng.

Các nhiễm khuẩn ví dụ có thể được điều trị và/hoặc ngăn ngừa bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm nhiễm vi khuẩn (ví dụ, vi khuẩn gram-dương hoặc gram-âm), nhiễm nấm, nhiễm ký sinh trùng, và nhiễm virus. Theo một phương án của sáng chế, nhiễm khuẩn là nhiễm vi khuẩn (ví dụ, nhiễm khuẩn *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., hoặc cầu trùng khuẩn kháng vancomycin). Theo một phương án khác, nhiễm khuẩn là nhiễm nấm (ví dụ, nhiễm nấm mốc, nấm men, hoặc nấm bậc cao). Theo một phương án khác, nhiễm khuẩn nhiễm ký sinh trùng (ví dụ, nhiễm ký sinh trùng đơn bào hoặc đa bào, bao gồm *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*, và *Toxoplasma gondii*). Theo một phương án khác, nhiễm khuẩn là nhiễm virus (ví dụ, nhiễm virus liên quan đến AIDS, cúm gia cầm, bệnh thủy đậu, bệnh loét miệng, cảm cúm thông thường, viêm dạ dày ruột, bệnh sốt tuyến, bệnh cúm, sởi, quai bị, viêm họng, viêm phổi, bệnh sởi Đức, SARS, và nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới hoặc trên (ví dụ, virus hợp bào hô hấp)).

Chế phẩm dạng liều

Dạng liều lượng của RIVPA (SEQ ID NO. 5) là dung dịch nước, được xử lý vô trùng, dung dịch vô trùng để tiêm. Mỗi ống chứa 5 mL dung dịch 60 mg/mL (300 mg RIVPA (SEQ ID NO. 5)). RIVPA (SEQ ID NO. 5) được bào chế trong nước để tiêm độ pH được điều chỉnh đến giá trị đích là 6,0. Chế phẩm không chứa tá dược và có nồng độ osmol là ~300 mOsm/kg.

Đường dùng

Sản phẩm thuốc RIVPA (SEQ ID NO. 5) được pha loãng trong nước muối vô trùng đến nồng độ thích hợp để tiêm, được xác định trên cơ sở mg/kg của cân nặng của người nhận và mức độ liều được thiết kế. RIVPA loãng (SEQ ID NO. 5) sẽ được dùng dưới dạng truyền tĩnh mạch (IV) trong 25 mL trong 4 phút, ba ngày một lần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tổng hợp peptit

Peptit trong bảng 1 được tổng hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn.

Tất cả axit amin được bảo vệ Fmoc yêu cầu được cân trong nhiều hơn 3 lần số mol so với 1 mmol peptit mong muốn. Sau đó, axit amin được hòa tan trong Dimethylformamit (DMF) (7,5 ml) để tạo ra dung dịch 3mMol. Lượng thích hợp nhựa Rink amit MBHA được cân có xem xét sự chuyển đổi của nhựa. Sau đó, nhựa được chuyển vào bình phản ứng tổng hợp tự động và được ngâm trước với Diclometan (DCM) trong 15 phút.

Nhựa được khử bảo vệ bằng cách bổ sung piperidin 25% trong DMF (30 ml) vào nhựa và trộn trong 20 phút. Sau khi khử bảo vệ nhựa phản ứng kết hợp thứ nhất được thực hiện bằng cách trộn dung dịch axit amin 3mMol với 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroni hexaflophosphat (HBTU) 4mMol và N,N-diisopropyletylamin (DIEPA) 8mMol. Dung dịch được hoạt hóa trước trong 5 phút trước khi được bổ sung vào nhựa. Axit amin được kết hợp 45 phút.

Sau khi kết hợp nhựa được rửa kỹ bằng DMF và dimethylacetamid (DMA). Axit amin được bảo vệ Fmoc được gắn vào được khử bảo vệ theo cách tương tự được mô tả ở trên và axit amin tiếp theo được gắn vào bằng cách sử dụng quy trình ghép cặp tương tự AA:HBTU:DIEPA.

Sau khi hoàn tất việc tổng hợp peptit được tách khỏi nhựa bằng việc sử dụng dung dịch hỗn hợp thuốc phân cắt chứa axit trifloaxetic (TFA) 97,5% và 2,5% nước. Nhựa được nhúng trong dung dịch hỗn hợp thuốc phân cắt trong 1 ½ giờ. Sau đó, dung dịch được lọc bằng tỷ trọng bằng cách sử dụng phễu Buchner và phần lọc được thu gom trong ống ly tâm 50 ml. Peptit được phân lập bằng cách kết tủa với dietyl ete

lạnh. Sau khi ly tâm và lắng gạn diethyl ete peptit thô được rửa bằng diethyl ete một lần nữa trước khi được làm khô trong thiết bị hút ẩm chân không trong 2 giờ. Peptit sau đó được hòa tan trong nước được khử ion (10 ml), được đông lạnh tại -80°C và được làm đông khô. Sau đó peptit khô sẵn sàng để tinh chế HPLC.

Do bản chất ưa nước của peptit này nên việc phân lập diethyl ete peptit không thực hiện được. Vì thế chiết cloroform được yêu cầu. TFA được bay hơi và phần lắng peptit thu được được hòa tan trong axit axetic 10% (15 ml). Tạp chất và chất làm sạch được lấy ra khỏi dung dịch axit axetic peptit bằng cách rửa dung dịch hai lần với cloroform (30ml). Dung dịch peptit trong nước sau đó được đông lạnh tại -80°C và được làm đông khô thu được peptit dạng bột sẵn sàng để tinh chế HPLC.

Mỗi peptit +RIxVPA (SEQ ID NO. 33) và +RIVPAx (SEQ ID NO. 34) chứa một N-metyl axit amin. Việc ghép cặp này được kết hợp bằng cách kết hợp các dung dịch N-metyl axit amin, PyBroP và N-hydroxybenzotriazol*H₂O (HOBt) và DIEPA cùng nhau trong RV chứa nhựa. Sau khi ghép cặp trong 45 phút sau đó N-metyl axit amin được cặp đôi để đảm bảo việc ghép cặp hoàn toàn. Quan sát thấy rằng việc ghép cặp sau N-metyl axit amin không hoàn toàn hoàn chỉnh. Vì thế việc ghép cặp này được thực hiện bằng cách sử dụng N,N,N',N'-tetrametyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uron hexaflophosphat (HATU) thay vì HBTU. Điều này vẫn dẫn đến peptit thô thường chứa hai tạp chất chiếm đến 30%-40% tổng độ tinh khiết. Peptit được tinh chế dưới điều kiện HPLC biến đổi để phân lập đỉnh peptit tinh khiết cách xa tạp chất rửa giải gần đó.

R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) là peptit dendrime 8 gốc với các nhánh đối xứng xuất hiện trên 4 axit amin lysin có hai nhóm chức amin. Peptit được tổng hợp bằng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn, có thể sử dụng 4 axit amin được bảo vệ Fmoc hai lần để hỗ trợ việc ghép cặp của các nhánh, bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp chung được mô tả ở trên.

Ngoài ra, các peptit này cũng có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật tổng hợp peptit pha dung dịch (Tsuda et al. 2010) và quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hữu hiệu trong điều trị viêm niêm mạc miệng

RIVPA (SEQ ID NO. 5) và IDR khác điều biến phản ứng phòng vệ bẩm sinh với thương tổn mô, giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương gây ra bởi đợt viêm và tăng cường sự làm giảm bệnh. Đặc tính này của IDR đã được chứng tỏ trong viêm niêm mạc miệng và dạ dày-ruột gây ra bởi hóa trị ở chuột, ở viêm niêm mạc miệng do bức xạ ở chuột đồng và viêm đại tràng gây ra bởi DSS ở chuột. Trong mỗi mô hình này, tổn thương ban đầu được coi là yếu tố kích hoạt dòng tín hiệu phòng vệ bẩm sinh làm tăng mức độ nghiêm trọng của thương tổn (Marks 2011; Sonis 2010). RIVPA (SEQ ID NO. 5) và IDR khác bù dòng tín hiệu này, làm giảm mức độ nghiêm trọng đạt được của thương tổn và làm giảm khoảng thời gian mô tổn hại nghiêm trọng.

Chế độ liều tối ưu của RIVPA (SEQ ID NO. 5) và IDR được biết trong mô hình vi khuẩn MRSA cũng được khẳng định thêm trong các mô hình thương tổn, khi thời gian bệnh dài hơn khiến cho phải dùng thuốc lặp lại cung cấp thông tin nhiều hơn. Dùng liều 25 mg/kg ba ngày một lần được phát hiện là tối ưu, phản ánh tác động được lực học bền hơn của RIVPA và IDR khác (SEQ ID NO. 5) mặc dù thời gian đào thải PK của nó nhanh (trong vòng phút) ra khỏi hệ tuần hoàn của chuột.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng và thời gian viêm niêm mạc trong mô hình viêm niêm mạc miệng do bức xạ ở chuột đồng, cụ thể là khi được dùng ba ngày một lần trong thời gian chiếu xạ phân đoạn. Các thử nghiệm này khẳng định rằng liều tối ưu của RIVPA (SEQ ID NO. 5) bao gồm dùng liều ba ngày một lần và mức liều 25 mg/kg hữu hiệu. Trong mô hình này, chuột đồng Golden Syrian đực được đưa ống dò vào cơ thể được điều trị bằng bức xạ 7,5 Gy, trực tiếp lên túi má trái được lộn ra ngoài, vào ngày 0, 1, 2, 3, 6, 7, 8 và 9. Viêm niêm mạc được đánh giá hai ngày một lần từ ngày 7 đến 35, với viêm niêm mạc nghiêm trọng nhất thường diễn ra khoảng ngày 19. Trong nghiên cứu thứ nhất, RIVPA (SEQ ID NO. 5) (25 mg/kg IV) được dùng ba ngày một lần bắt đầu vào ngày 0 và liên tục đến ngày 33 (Q3d d0-33), hoặc vào ngày chiếu xạ (ngày 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9) hoặc ba ngày một lần bắt đầu vào ngày 6 và tiếp tục đến ngày 24 (Q3d d6-24). Vào ngày cả RIVPA (SEQ ID NO. 5) và chiếu xạ được dùng, RIVPA (SEQ ID NO. 5) được cấp 2 giờ sau khi chiếu xạ. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 1. Việc điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) hầu hết có hiệu quả khi được dùng ba ngày một lần trong suốt khoảng thời gian này hoặc vào ngày chiếu xạ, trong khi việc điều trị bắt đầu 6 ngày sau khi bắt đầu chiếu xạ là không có lợi (tức là, Q3d d6-24). Thử nghiệm theo dõi được thực hiện

để đánh giá việc dùng liều với 25 mg/kg IV RIVPA (SEQ ID NO. 5) Q3d d0-33, vào ngày chiếu xạ, hoặc ba ngày một lần trong thời gian điều trị bức xạ (tức là, ngày 0, 3, 6 và 9). Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 2. Chế độ điều trị ba ngày một lần trong thời gian chiếu xạ được phát hiện là tối ưu, cũng có thể phản ánh tính lâu bền của tác dụng dược lực học của RIVPA (SEQ ID NO. 5), kèm theo việc giảm áp lực tiềm gây ra bởi sốt do tiêm tĩnh mạch ở các con chuột nhỏ này.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) cũng thể hiện hiệu quả ở mô hình chuột nhắt bị viêm niêm mạc miệng và dạ dày ruột do hóa trị, phù hợp với đáp ứng của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh với tổn thương do hóa trị và/hoặc bức xạ. Trong các nghiên cứu này, việc dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) liên quan đến việc giảm đáng kể thời gian viêm niêm mạc miệng nghiêm trọng có ý nghĩa về mặt thống kê trong mô hình viêm niêm mạc gây ra bởi hóa trị ở chuột. Viêm đại tràng có xu hướng giảm cũng quan sát được, mặc dù tổn thương GI nhẹ trong nhóm đối chứng cho kết quả không có ý nghĩa về mặt thống kê. Trong mỗi nghiên cứu, 5-flouraxil (60 mg/kg IP) được dùng cho chuột C3H/HeN đực vào ngày 4 và 2. Vào ngày 0, tạo ra bỏng hóa chất dưới lưỡi của chuột, gây viêm niêm mạc mà thường nặng nhất vào ngày 2. Lưỡi của chuột được chấm mức độ viêm niêm mạc hằng ngày từ ngày 1 đến 14, với điểm ≥ 3 là viêm niêm mạc nghiêm trọng. Thể trọng cũng được cân hằng ngày và mức độ nghiêm trọng của viêm đại tràng được xác định bằng nội soi video vào ngày 4 và 7. Trong nghiên cứu thứ nhất, RIVPA (SEQ ID NO. 5) (25 mg/kg IV) được dùng một lần vào ngày 4 ngay trước khi hóa trị, hai lần vào ngày 4 và 2 ngay sau khi hóa trị hoặc 3 lần vào ngày 1, 2 và 5. RIVPA (SEQ ID NO. 5) việc dùng nhiều lần trong suốt thời gian tổn thương viêm niêm mạc nặng nhất không đạt hiệu quả nhất (tức là, vào ngày 1, 2 và 5). Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 4. Trong thử nghiệm thứ hai, RIVPA (SEQ ID NO. 5) (25 mg/kg IV) được dùng vào ngày 1, 2 và 5, ngày 1, 1 và 3 hoặc ngày 0, 2, và 4. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 5. Sự thay đổi đáng kể có ý nghĩa về mặt thống kê về thời gian viêm niêm mạc nghiêm trọng (Fig. 5 – đồ thị A), viêm đại tràng nghiêm trọng vào ngày 4 (Fig. 5 – đồ thị B) và sự sụt cân trung bình (Fig. 5 – đồ thị C) tương quan giữa các nhóm. Trong thử nghiệm thứ ba, RIVPA (SEQ ID NO. 5) (25 hoặc 5 mg/kg IV, như được chỉ ra) được dùng vào ngày 1, 2 và 5 hoặc vào ngày 1 và 3. Một lần nữa, chế độ liều sử dụng RIVPA (SEQ ID NO. 5) ba ngày một có hiệu quả nhất, với mức độ liều giảm thu được hiệu quả giảm. Viêm

niêm mạc, viêm đại tràng và cân nặng từ kết quả này được thể hiện trong Fig. 6 là A, B, và C, tương ứng. Đánh giá có ý nghĩa về mặt thống kê với viêm niêm mạc miệng bằng phân tích chi-bình phương và vùng cân nặng dưới đường cong (AUC) với ANOVA theo các bậc. R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) và 92 cũng đã chứng tỏ hữu hiệu trong mô hình chuột bị viêm niêm mạc gây ra bởi hóa trị, khi điểm số viêm niêm mạc được đánh giá trong 4 ngày sau khi gây viêm niêm mạc (Fig. 16, Fig. 17). Điều trị bằng R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) và RIV(mp2)A-NH2 (SEQ ID NO. 92) được dùng vào ngày 1 và 2 ở liều bằng 25 mg/kg IV.

Hữu hiệu trong đáp ứng với tổn thương do bức xạ

RIVPA (SEQ ID NO. 5) và IDR khác điều biến phản ứng phòng vệ bẩm sinh với thương tổn mô, giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương gây ra bởi đợt viêm và tăng cường sự làm giảm bệnh. Như được mô tả ở trên, IDR có thể giảm nhẹ việc đáp ứng với bức xạ tổn thương trong mô hình viêm niêm mạc miệng (Fig. 1, Fig. 2). Trong mô hình khác, đánh giá sự ngăn ngừa viêm niêm mạc gây ra bởi bức xạ (25 Gy được dùng cho mõm chuột vào vào ngày 0), RIVPA (SEQ ID NO. 5) (5 liều là 25 mg/kg được dùng qua tĩnh mạch hai ngày một lần) không tác động đáng kể trên sự tiến triển bệnh. Việc ngày càng mỏng của lưỡi chuột được đánh giá vào ngày 0, 2, 4, 6, 8, và 10 dựa trên phân tích mô bệnh học về số lượng tế bào đáy và tế bào sừng chết theo chương trình, tế bào nguyên phân và tổng số tế bào biểu mô trong mỗi đơn vị diện tích và trong mỗi đơn vị chiều dài. Lưu ý là liều bức xạ được sử dụng (25 Gy) được chọn sao cho quan sát thấy biểu mô lưỡi ngày càng mỏng nhưng không thấy diễn ra viêm niêm mạc rõ ràng. Kết quả này chứng tỏ RIVPA (SEQ ID NO. 5) thiếu khả năng tăng sinh, và đề xuất rằng hiệu quả của RIVPA (SEQ ID NO. 5) chỉ quan sát được khi các con đường liên quan được kích thích bằng sự tổn hại mô hoặc sự lây lan rõ rệt của mầm bệnh.

Hữu hiệu cho đường dạ dày ruột

Khả năng của RIVPA qua tĩnh mạch (SEQ ID NO. 5), được dùng phòng bệnh hoặc điều trị bệnh, trực tiếp bảo vệ bề mặt niêm mạc GI được khẳng định trong viêm đại tràng gây ra bởi mô hình DSS. Trong mô hình này, DSS được dùng là dung dịch DSS 3% trong nước uống của chuột C57BL/6 đực từ ngày 0 đến 5 của nghiên cứu. Viêm đại tràng được theo dõi bằng nội soi video vào ngày 7, 14 và 21. RIVPA (SEQ

ID NO. 5) (25 mg/kg IV) được dùng ba ngày một lần từ ngày 0 đến 18 (Q3d d0-18), từ ngày 3 đến 18 (Q3d d3-18) hoặc từ ngày 6 đến 18 (Q3d d6-18). Kết quả của nghiên cứu được thể hiện trong Fig. 3. Đến ngày 14, tất cả chế độ điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã chứng tỏ việc giảm đáng kể có ý nghĩa về mật thống kê trong nội soi viêm đại tràng mức độ nghiêm trọng. Tuy nhiên, điểm số giảm vào ngày 7 chỉ được quan sát ở nhóm đã tiếp nhận ít nhất 2 liều RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong thời gian đó (tức là, Q3d d0-18 và Q3d d3-18 nhưng không giảm ở Q3d d6-18). Vào ngày 21, cả 3 nhóm điều trị có vẻ đáp ứng theo cách giống nhau. Mô bệnh học của đại tràng vào ngày 21 cho thấy rằng một số nhóm được điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã giảm phù nề và hoại tử đáng kể về mật thống kê, trong khi nhóm được điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) có đáp ứng tương tự không đạt được ý nghĩa về mật thống kê. Phân tích thống kê được thực hiện bằng kiểm định t và dấu hoa thị cho biết sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa về mật thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$).

Như được mô tả ở trên, IDR cũng có thể làm giảm thời gian duration và/hoặc mức độ nghiêm trọng của viêm niêm mạc dạ dày ruột trong mô hình viêm niêm mạc gây ra bởi hóa trị (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6).

Hữu hiệu trong điều trị động vật nhiễm khuẩn

RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm lượng vi khuẩn và cải thiện sự sống khi có mặt hoặc vắng mặt điều trị kháng sinh trong mô hình chuột nhiễm khuẩn khác nhau, với hiệu quả phù hợp ở liều dùng qua tĩnh mạch bằng và cao hơn 25 mg/kg và với tác dụng được lực học kéo dài đến 5 ngày. Hiệu quả của RIVPA (SEQ ID NO. 5) bổ sung cho điều trị kháng sinh ở cả chuột bình thường và bị suy giảm miễn dịch. Hiệu quả của RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã chứng tỏ khả năng kháng bệnh gây ra bởi sự nhiễm khuẩn gram-dương (*S. aureus* và MRSA) và Gram-âm (*Klebsiella*, *E. coli* và *B. pseudomallei*).

S. aureus

RIVPA (SEQ ID NO. 5) được thử nghiệm cả kết hợp với điều trị vancomycin và điều trị độc lập.

Việc điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm tăng khả năng sống ở mô hình

nhiễm MRSA màng bụng khi được dùng kết hợp với liều dưới tối ưu của thuốc kháng sinh vancomycin (thử nghiệm #: D-7-E-11). RIVPA (SEQ ID NO. 5) (50 mg/kg) hoặc điều trị bằng nước muối được dùng trong mạch ở 48 hoặc 72 giờ trước khi nhiễm truyền MRSA (UC6685; $8,2 \times 10^7$ đơn vị tạo khuẩn lạc [cfu]) cho chuột CF-1 cái (N=10/nhóm). Vancomycin (3 mg/kg) được dùng dưới da (SC), 1 và 5 giờ sau khi nhiễm khuẩn. Sự sống được theo dõi một lần mỗi ngày trong 5 ngày. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 7.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) cũng có hiệu quả khi được dùng một mình. Nhiều thử nghiệm với IV được dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) được tiến hành trong mô hình vi khuẩn MRSA. Việc RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã chứng tỏ sự đáp ứng liều trong mô hình này ở chuột Balb/c có năng lực miễn dịch hoặc chuột thiếu hụt miễn dịch thiếu tế bào T, với liều đơn 50 mg/kg thu được sự sống được tăng cường đáng kể về mặt thống kê so với đối chứng nước muối. Trong nghiên cứu thứ nhất, MRSA (USA300, $7,3 \log_{10}$ cfu) được dùng bằng cách tiêm vào mạch trong tĩnh mạch đuôi của chuột Balb/c cái tại thời điểm 0. 4 giờ trước khi nhiễm khuẩn, một liều đơn nước muối hoặc RIVPA (SEQ ID NO. 5) ở liều dùng cho trước được tiêm trong mạch vào tĩnh mạch đuôi. Điều trị kháng sinh với liều dưới tối ưu (linezolid, 6,25 mg/kg) được dùng một lần qua đường miệng ngay sau khi nhiễm khuẩn. Sự sống được theo dõi trong 21 ngày sau khi nhiễm khuẩn. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 9. Trong thử nghiệm thứ hai, RIVPA (SEQ ID NO. 5) (IV) hoặc nước muối (IV) được dùng một lần 4 giờ trước khi nhiễm MRSA (chủng USA300, $7,0 \log_{10}$ cfu) qua tĩnh mạch đuôi vào chuột cái thiếu hụt miễn dịch. Sự sống được theo dõi trong 14 ngày, như được thể hiện trong Fig. 10. Sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa về mặt thống kê (tức là, $p \leq 0,05$) về sự sống sót được phát hiện với liều dùng 50 mg/kg khi được đánh giá bằng dụng phân tích Kaplan Meier mỗi nhóm điều trị so với đối chứng nước muối.

Tóm lại, đánh giá bằng cách điều trị độc lập IV RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong các thử nghiệm nhiễm khuẩn *S. aureus* đã chứng tỏ được rằng:

- Hiệu quả của RIVPA (SEQ ID NO. 5) là phụ thuộc liều trong khoảng từ 1 đến 50 mg/kg ở chuột nhắt, với liều dùng là và cao hơn 25 mg/kg chứng tỏ hiệu quả phù hợp (bảng 2; Fig. 9 và Fig. 10). Mức độ liều này cũng hữu hiệu nhiều mức độ bệnh mạn tính trong các mô hình tổn thương (Fig. 1 đến Fig. 6).

Bảng 2: Tỷ lệ điều trị thành công nhiễm khuẩn *S. aureus* với điều trị IV RIVPA (SEQ ID NO. 5) là hàm của mức liều dùng

RIVPA (SEQ ID NO. 5) Mức liều dùng (mg/kg)	% Điều trị thành công ⁽¹⁾	% Điều trị thành công
	Chế độ dùng liều bất kỳ (# nhóm được thử nghiệm)	RIVPA (SEQ ID NO. 5) được dùng 4 giờ trước khi nhiễm khuẩn (# thử nghiệm)
50 ⁽²⁾	100 (N=4)	100 (N=2)
25 ⁽³⁾	67 (N=6)	50 (N=4)
5 ⁽⁴⁾	42 (N=12)	33 (N=6)
1 ⁽⁵⁾	0 (N=2)	0 (N=2)

⁽¹⁾ Điều trị thành công đã chứng tỏ ít nhất tỷ lệ sống tăng 20% so với nhóm điều trị bằng nước muối tương ứng.

⁽²⁾ Thử nghiệm #: TPS-8-B-100, TPS-8-B-150, TPS-8-B-116, D-7-E-9

⁽³⁾ Thử nghiệm #: TPS-8-B-100, TPS-8-B-150, TPS-8-B-120, TPS-8-B-112

⁽⁴⁾ Thử nghiệm #: TPS-8-B-100, TPS-8-B-150, TPS-8-B-116, TPS-8-B-114, TPS-8-B-120, TPS-8-B-101

⁽⁵⁾ Thử nghiệm #: TPS-8-B-100, TPS-8-B-150

- Không cần phải dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) hằng ngày và dùng liều mỗi 2 hoặc 3 ngày là thích hợp. Trong trường hợp bệnh mãn tính hơn trong mô hình thương tổn, cũng khẳng định thêm rằng việc dùng liều 3 ngày một lần có vẻ tối ưu (số liệu không được thể hiện).

- RIVPA (SEQ ID NO. 5) có thể được dùng lên đến 24 giờ sau khi bắt đầu nhiễm khuẩn trong mô hình vi khuẩn MRSA vẫn mang lại lợi ích sống còn (số liệu không được thể hiện). Do đó hoạt động của nó nhanh chóng.

- Phụ thuộc vào mức liều dùng, một liều đơn RIVPA (SEQ ID NO. 5) có thể được dùng 5 ngày trước khi bắt đầu nhiễm khuẩn và vẫn mang lại lợi ích sống còn (số liệu không được thể hiện), phản ánh tác động được lực học bền hơn của RIVPA (SEQ ID NO. 5) mặc dù thời gian đào thải được động học (PK) của nó nhanh (trong vài phút) ra khỏi hệ tuần hoàn của chuột.

- Lợi ích sống còn có được do việc điều trị RIVPA (SEQ ID NO. 5) có thể được duy trì ít nhất 21 ngày (Fig. 9).

RIVPAY* (SEQ ID NO. 90) và R(tBg)V1KR(tBg)V2 (SEQ ID NO. 91) (5 mg/kg được dùng 4 giờ trước khi nhiễm khuẩn) cũng cải thiện sự sống trong mô hình vi khuẩn MRSA (Fig. 18; Fig. 19).

Việc dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) cục bộ cũng đã chứng tỏ có hiệu quả khi dùng cục bộ tại vị trí nhiễm khuẩn. Trong hình nhiễm trong vi khuẩn gram-dương ở mô màng bụng ở chuột nhắt, RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm đáng kể tải lượng vi khuẩn đến 7 logs (thử nghiệm #: D-7-E-14). Tiêm trong màng bụng (IP) *S. aureus* (Catalog No. 25923, ATCC, 6×10^7 cfu) với 5% muxin được dùng IP cho chuột CD-1 cái (N=8/nhóm) và RIVPA (SEQ ID NO. 5) (9,5 mg/kg) được tiêm IP 4 h sau đó. Chuột bị giết 24 h sau khi nhiễm khuẩn và dịch rửa màng bụng được đánh giá số lượng vi khuẩn. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 11 (mỗi điểm dữ liệu là kết quả từ chuột riêng rẽ – chuột bị chết đã nhận lượng vi khuẩn cao nhất trong số các chuột bất kỳ thu được trong thử nghiệm và được trình bày là ký hiệu mở trong đồ thị).

RIVPA (SEQ ID NO. 5) cũng làm giảm đáng kể tải lượng vi khuẩn ở chuột bị giảm bạch cầu trung tính trong mô hình áp-xe đùi do nhiễm *S. aureus* khi được dùng khi tiêm trong cơ cục bộ (IM). Chuột bạch tạng Thụy Sĩ cái (N=8/nhóm) bị làm giảm bạch cầu bằng cách xử lý với Cp (100 mg/kg), 3 và 1 ngày trước khi nhiễm khuẩn IM với *S. aureus* (Catalog No. 29213, ATCC, $\sim 9,5 \times 10^5$ cfu). RIVPA (SEQ ID NO. 5) (50 mg/kg) được dùng IM 24 giờ trước khi nhiễm khuẩn và vancomycin (100 mg/kg) được dùng SC ở 1, 6 và 18 giờ sau khi nhiễm khuẩn. Số lượng cfu vi khuẩn có mặt trong đùi nhiễm khuẩn được đánh giá 24 giờ sau khi bắt đầu nhiễm khuẩn trong mỗi nhóm. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Fig. 12.

Klebsiella

RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm tăng khả năng sống ở mô hình nhiễm gram-âm màng bụng khi được dùng cục bộ (IP) hoặc toàn thân (IV). Chú ý là, việc dùng toàn thân có vẻ tốt và tốt hơn việc dùng cục bộ. Việc điều trị bằng RIVPA (SEQ ID NO. 5) (24 mg/kg) được dùng IP (24 giờ trước khi nhiễm khuẩn hoặc 4 giờ sau nhiễm khuẩn) hoặc IV (4 giờ sau nhiễm khuẩn) cho chuột Balb/c cái (N=8/nhóm) bị nhiễm truyền *Klebsiella pneumoniae* (Catalog số 43816, ATCC) với lượng $2,8 \times 10^5$ cfu (Fig. 13 – đồ thị A) hoặc $5,3 \times 10^2$ cfu (Fig. 13 – đồ thị B) và sự sống được theo dõi trong 24 giờ.

Hiệu quả bảo vệ của RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong trường hợp này được thể hiện trong Fig. 13. Điểm sống sót được thể hiện đối với chuột tiếp nhận lượng vi khuẩn nhiễm truyền cao (đồ thị A). Tất cả chuột tiếp nhận chất nhiễm truyền thấp hơn đã sống sót ở tất cả các nhóm (đồ thị B) và được đánh giá dấu hiệu lâm sàng (ví dụ, hiện tượng “nổi da gà”, vận động giảm, bụng to, v.v.) 24 giờ sau khi nhiễm khuẩn; kết quả này được tóm tắt dưới dạng bảng điểm lâm sàng.

Hữu hiệu trong điều trị tổn thương da

Toàn thân được dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) cũng có hiệu quả trong trường hợp tổn thương da và nhiễm khuẩn, đẩy nhanh tốc độ làm lành vết thương trong mô hình nhiễm khuẩn MRSA trên da. Nhiễm khuẩn được bắt đầu 1 ngày sau khi lông trên vùng lưng của mỗi chuột được loại bỏ. RIVPA (SEQ ID NO. 5) (25 mg/kg IV hoặc 100 mg/kg SC) được dùng 4 giờ trước khi nhiễm khuẩn tại các thời điểm khác nhau sau khi nhiễm khuẩn như được chỉ ra. Linezolid dùng qua đường miệng được dùng làm chất so sánh và được dùng hằng ngày với lượng 12,5 mg/kg. Vào ngày 0 (lúc -1 giờ), mỗi chuột được gây tê bằng cách sử dụng isofluran và da lưng đã cạo lông bị gây tổn thương bởi 7 áp dụng liên tiếp và loại bỏ bằng keo phẫu thuật. Sau đó, tổn thương này ngay lập tức được nhiễm khuẩn bằng cách dùng khu trú 10 μ L thể huyền phù vi khuẩn, đưa vào tổng 7,6 log₁₀ cfu trong mỗi chuột. Hiệu quả được đánh giá bằng cách đo số lượng vi khuẩn trong sinh thiết “bấm” da ở 48 giờ (Fig. 14 – đồ thị A) và 96 giờ (Fig. 14 – đồ thị B) sau khi thử thách vi khuẩn và chuyên gia bệnh học có chứng chỉ hành nghề chưa biết các thông số thử nghiệm đánh giá sơ bộ ảnh kỹ thuật số của da này tại thời điểm 48 giờ (Fig. 14 – đồ thị C) và 96 giờ (Fig. 14 – đồ thị D) sau khi nhiễm khuẩn. Chú ý là, cả linezolid lẫn RIVPA (SEQ ID NO. 5) đều không làm giảm tải lượng vi khuẩn trong mẫu sinh thiết tại thời điểm 48 hoặc 96 giờ so với đối chứng, mặc dù việc xác định vị trí của vi khuẩn bất kỳ trong số các vi khuẩn phân lập được (tức là, trên bề mặt da hoặc trong mô) không xác định được. Tuy nhiên, quá trình làm lành vết thương rõ ràng đã diễn ra. Lượng vi khuẩn trung bình cho mỗi nhóm điều trị bệnh được so sánh thống kê với lượng vi khuẩn được điều trị bằng nước muối trong thời gian tương đương bằng cách sử dụng phương pháp so sánh giá trị trung bình bằng kiểm định t, giả sử phương sai không đều, được thực hiện trên Excel. Các kết quả so sánh có giá trị $p \leq 0,05$ được xem là khác biệt về mặt thống kê.

Dược lý an toàn đối với sức khỏe động vật

Hai nghiên cứu thử nghiệm và hai nghiên cứu xác định độc tính khi dùng nhiều lần được tiến hành với RIVPA (SEQ ID NO. 5) trên chuột và khỉ đầu chó bằng đường dùng trong tĩnh mạch (IV; liều lớn chậm). Tất cả các nghiên cứu đều được tiến hành tại Viện nghiên cứu LAB của Canada.

Nghiên cứu độc tính thử nghiệm không GLP cho thấy mức liều lớn nhất được dung nhận (MTD) khi dùng liều đơn RIVPA (SEQ ID NO. 5), được dùng dưới dạng tiêm tĩnh mạch trong thời gian từ 30 đến 60 giây, là 88 mg/kg (liều thực tế) cho chuột nhắt. Trong các nghiên cứu độc tính thử nghiệm không GLP thực hiện trên các động vật linh trưởng không phải là người (nonhuman primate - NHP), đều ghi nhận thấy dấu hiệu lâm sàng ở cấp độ trung bình (sung phòng/khó thở, giảm hoạt động, mất nhắm từng phần và co giật cơ) ở 1 hoặc cả hai động vật sau khi dùng 90 (1 con), 180 (cả hai con) và 220 (1 con) mg/kg RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong khi dùng hoặc sau khi dùng một thời gian ngắn. Các dấu hiệu này biến mất trong vòng vài phút mà không để lại tác động ở mức có thể phát hiện được.

Độ an toàn khi tiêm RIVPA (SEQ ID NO. 5) nhiều lần trong ngày cũng được đánh giá trong các nghiên cứu GLP (“Good Laboratory Practice” - “Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm”) trên chuột và khỉ đầu chó. Ở chuột nhắt, liều dùng là 20, 60, hoặc 90 mg/kg/ngày, dùng trong tĩnh mạch trong 14 ngày. Quan sát thấy một số con bị chết khi dùng ở liều cao, trước đó chủ yếu có dấu hiệu khó thở và ở tư thế nằm nghiêng. Hiện tượng chết cũng quan sát thấy ở 1 con khi dùng liều 60 mg/kg nhưng không có con nào có dấu hiệu lâm sàng ở liều này. Tỷ lệ chết liên quan đến chất được thử hoặc dấu hiệu lâm sàng đều được quan sát thấy ở liều 20 mg/kg. Ở các con còn sống trong tất cả các nhóm, không có biểu hiện ngộ độc biểu hiện trên cơ quan bất kỳ hoặc có chỉ số hóa sinh hoặc huyết học bất thường. Cũng không quan sát thấy tác dụng phụ ở liều 20 mg/kg khi dùng trong 14 ngày.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) ở liều 20, 80, 160 mg/kg/ngày được dùng trong tĩnh mạch cho khỉ đầu chó trong 14 ngày. Ở hầu hết các đối tượng được thử nghiệm, quan sát thấy dấu hiệu chúng giảm hoạt động tạm thời hiện tượng và mất đóng một phần trong và sau khi dùng liều 160 mg/kg một thời gian ngắn trong 3 ngày đầu tiên, sau đó thỉnh thoảng các dấu hiệu này mới xuất hiện trở lại trong toàn bộ thời gian dùng còn

lại. Trong tất cả các trường hợp, các dấu hiệu lâm sàng này đều biến mất trong vài phút. Không quan sát thấy tác dụng phụ biểu hiện ở thông số bất kỳ khác được đo hoặc được quan sát dưới kính hiển vi ở mô bất kỳ. Việc dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) ở liều 20 và 80 mg/kg/ngày không có biểu hiện bất kỳ cho thấy việc ngộ độc. Mức liều 80 mg/kg/ngày được đánh giá là mức không quan sát thấy tác dụng phụ (No-Observed-Adverse-Effect-Level - NOAEL) cho thử nghiệm này.

Không quan sát thấy tác động của RIVPA (SEQ ID NO. 5) đến hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS) trong thử nghiệm bất kỳ ở mức liều bất kỳ và phát hiện thấy RIVPA ít hoặc được đánh dấu phóng xạ (SEQ ID NO. 5) ở CNS chuột ở mức liều 20 hoặc 90 mg/kg. Không phát hiện thấy tương tác giữa RIVPA (SEQ ID NO. 5) với nguồn của thụ thể CNS và các kênh ion *in vitro*.

Nghiên cứu trên tim mạch (cardiovascular - CV)/phổi ở khi đầu chó dùng liều đơn IV là 20 hoặc 80 mg/kg cho thấy không có tác dụng đến tim mạch hoặc sự thay đổi của các thông số trong điện tim đồ (electrocardiogram - ECG). Không quan sát thấy tác động đến hệ hô hấp ở liều 20 hoặc 80 mg/kg. Ở liều bằng 80 mg/kg trong thử nghiệm này, RIVPA (SEQ ID NO. 5) liên quan đến sụp mí mắt và kiệt sức trong thời gian ngắn trong thời gian dùng liều. Ở liều 220 mg/kg, việc dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) kèm theo dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng, thoáng qua như sụp mí mắt, rung mình, kiệt sức, xanh xao, co giật và suy sụp. Ở 1 con, liều cao làm giảm mạnh nhịp thở, sau đó là nhịp tim chậm, tụt huyết áp và chết.

Tóm lại, NOAEL khi được đánh giá ở mức liều 80 mg/kg/ngày trên khi đầu chó do các dấu hiệu lâm sàng thoáng qua chỉ giới hạn ở một thử nghiệm và xuất hiện chỉ trong hai trường hợp 2 trong số 98 trường hợp dùng thuốc ở mức độ liều này.

Chưa có nghiên cứu bất kỳ về tính sinh u, gây đột biến hoặc gây ảnh hưởng đến khả năng sinh sản được tiến hành với RIVPA (SEQ ID NO. 5).

Tác động của RIVPA (SEQ ID NO. 5) đến hệ thống phòng vệ bẩm sinh có tính chọn lọc cao. Phù hợp với các phát hiện này, không quan sát thấy sự thay đổi về trọng lượng của cơ quan liên quan đến miễn dịch, mô bệnh học, huyết học và hóa học lâm sàng trong các nghiên cứu độc tính trên chuột và trên NHP 14 ngày. Trong thử nghiệm trên NHP, không quan sát thấy ảnh hưởng của RIVPA (SEQ ID NO. 5) đến số lượng tế bào T, tế bào B, hoặc tế bào NK sau 14 ngày dùng trong tĩnh mạch cho NHP.

RIVPA (SEQ ID NO. 5) không làm tăng quá trình tăng sinh các tế bào máu bình thường cả ở chuột nhắt hoặc người *in vitro*, cũng như không làm tăng các tế bào bạch cầu nguyên phát ở người *in vitro*. Tóm lại, không có dấu hiệu cho thấy khả năng RIVPA (SEQ ID NO. 5) gây ra tính độc miễn dịch hoặc hoạt hóa miễn dịch không đặc hiệu. Cũng không phát hiện thấy có việc tăng hoạt hóa hoặc ức chế đáp ứng miễn dịch thích ứng, hoặc ảnh hưởng khác đến kiểu hình của các tế bào liên quan đến tính miễn dịch thích ứng sau khi dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5).

Tóm lại, phát hiện chính liên quan đến độc tính là suy hô hấp khởi phát cấp tính, đi kèm khó thở, nằm nghiêng và giảm hoạt động tạm thời. Ở mức độ nghiêm trọng nhất, ngộ độc cấp tính sẽ dẫn tới tử vong. Tất cả các dấu hiệu lâm sàng này đều thuận nghịch khi việc dùng diễn ra không liên tục và quan sát thấy các đối tượng thử nghiệm đều phục hồi trong ít phút, không có di chứng có hại sau đó của các triệu chứng lâm sàng hoặc các phát hiện về độc tính. Thử nghiệm dược lý đánh giá độ an toàn đối với tim mạch/phổi trên động vật linh trưởng không phải là người đã khẳng định rằng không xuất hiện trường hợp có độc tính đối với tim hoặc kéo dài QT.

Triệu chứng suy hô hấp quan sát được xuất hiện ở các mức liều khác nhau ở các loài khác nhau, và không dự đoán được theo thang điểm sinh trắc (allometric scaling). Cụ thể, chuột nhắt dường như là loài nhạy cảm nhất với việc ngộ độc cấp tính mà hiếm khi xảy ra ở liều 60 mg/kg (HED: ~5 mg/kg) và thường xảy ra ở liều 90 mg/kg (HED: ~7 mg/kg). Ngược lại, ở NHP (khỉ đầu chó), ngộ độc cấp tính đôi khi xuất hiện ở liều 160 mg/kg (HED: ~50 mg/kg) và thường xuyên xảy ra ở liều 240 mg/kg (HED: ~78 mg/kg). Các nghiên cứu khác đối với các chất tương tự RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong các nghiên cứu ngộ độc cấp tính ở chuột cho thấy rằng việc ngộ độc này liên quan đến điện tích chứ không liên quan đến cấu trúc cụ thể (trình tự axit amin) hoặc trạng thái liên kết của protein đích của phân tử, điều này gợi ý rằng việc ngộ độc cấp tính là do nồng độ tức thời cao của các phân tử mang điện mà tỷ lệ với thể tích máu như trái ngược về mặt sinh trắc. Ngoài ra, các nghiên cứu cơ chế trên chuột cho thấy rằng hiện tượng suy hô hấp là do sự thay đổi hoạt động của thần kinh cơ hoành.

Dược lý an toàn đối với tình trạng giảm bạch cầu và/hoặc nhiễm khuẩn:

Trong thử nghiệm dược lý không GLP, RIVPA (SEQ ID NO. 5) không làm thay đổi sự khôi phục các quần thể tế bào máu tuần hoàn sau khi làm giảm bạch cầu ở

chuột CD-1. Tình trạng giảm bạch cầu được tạo ra bằng cách tiêm 2 liều Cp trong màng bụng (150 mg/kg vào ngày 1 và 100 mg/kg vào ngày 4), thu được với bệnh giảm bạch cầu đã được công bố rộng rãi cho tới ngày 4 mà tồn tại dai dẳng cho đến gần ngày 10. Nước muối hoặc RIVPA (SEQ ID NO. 5) (20 hoặc 50 mg/kg) được dùng trong mạch vào ngày 5, 7, 9 và 11. 6 con vật trong mỗi nhóm bị giết vào các Ngày 6, 8, 10, 12 và 14 và đánh giá số đếm máu toàn phần và mức chênh lệch. Cả mức lẫn động học của tổng số lượng tế bào bạch cầu và số lượng bạch cầu chênh lệch đều không thay đổi trong toàn bộ thời gian phục hồi khi so sánh với nhóm đối chứng dùng chất dẫn (Fig.15).

Các nghiên cứu nhiễm khuẩn ở động vật bị bệnh bạch cầu đã cho thấy RIVPA (SEQ ID NO. 5) không ảnh hưởng đến hiệu quả của kháng sinh.

Việc thiếu RIVPA (SEQ ID NO. 5) được gây ra bằng cách, hoặc ức chế các enzym CYP450, chuyển hóa ban đầu RIVPA (SEQ ID NO. 5) bởi các proteaza trong toàn bộ mô cơ thể và vai trò rất nhỏ trong đào thải qua nước tiểu, phân và tiết mật ở RIVPA (SEQ ID NO. 5) đề xuất rằng tương tác dược chất-dược chất động học sẽ rất nhỏ.

iv. Kinh nghiệm lâm sàng

Kinh nghiệm lâm sàng với RIVPA (SEQ ID NO. 5) thu được ở thử nghiệm pha I. Mục tiêu chủ yếu của nghiên cứu là để xác định mức liều tối đa được dung nhận dung dịch tiêm (maximum tolerated dose - MTD) liều đơn và liều tăng dần nhắc lại là RIVPA (SEQ ID NO. 5) dung dịch tiêm sau khi dùng trong tĩnh mạch ở những người tình nguyện khỏe mạnh. Mục đích thứ hai của thử nghiệm này bao gồm việc đánh giá độc tính giới hạn (dose limiting toxicity - DLT), độ an toàn, profin PK và dược động học (pharmacodynamic - PD) của RIVPA (SEQ ID NO. 5) sau khi dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) trong tĩnh mạch ở dạng liều đơn và liều nhắc lại tăng dần. Thử nghiệm được chia ra làm hai pha: pha liều đơn tăng dần (single-ascending dose - SAD) và pha nhiều liều tăng dần (multiple-ascending dose - MAD).

Độ an toàn trên người

Liều đơn dùng trong tĩnh mạch của RIVPA (SEQ ID NO. 5) được dung nhận tốt lên tới mức liều tối đa được thử (8 mg/kg) và liều dùng hằng ngày trong tĩnh mạch

được dung nhận tốt lên tới mức liều tối đa được thử (6,5 mg/kg trong 7 ngày). Không có tính độc giới hạn liều (dose limiting toxicities - DLT) và MTD ở cả hai pha thử nghiệm. Không thấy có hiện tượng tử vong, và các sự kiện bất lợi có ý nghĩa lâm sàng, trầm trọng hoặc nghiêm trọng được thông báo trong thử nghiệm. Không quan sát thấy các vấn đề về độ an toàn hoặc khác biệt đáng kể của giá trị trung bình hoặc các thay đổi so với cơ sở đối với các phép đo tín hiệu sống, các kết quả thử nghiệm lâm sàng hoặc điện tim đồ giữa đối tượng được điều trị bằng thuốc và các đối tượng đối chứng được điều trị bằng giả dược.

Pha liều đơn tăng dần

Tỷ lệ các TEAE cho các đối tượng nhận RIVPA (SEQ ID NO. 5) không có mối liên hệ với liều và các sự kiện không xuất hiện với tỷ lệ cao hơn đáng kể về mặt lâm sàng ở đối tượng nhận RIVPA (SEQ ID NO. 5) so với đối tượng nhận giả dược. Các TEAE xuất hiện thường xuyên đứng vị trí nhất (quan sát được ở nhiều hơn một đối tượng nhận RIVPA (SEQ ID NO. 5) và ở tỷ lệ (%) so với các đối tượng điều trị bằng giả dược) là các sự kiện liên quan đến quy trình điều trị thử nghiệm (General Disorders và Administration Site Conditions) như tụ huyết tại vị trí chích mạch, phản ứng tại vị trí chích mạch và đau tại vị trí chích mạch. Tất cả các sự kiện liên quan đến việc chích mạch đều ở cấp độ nhẹ và được xác định là không liên quan đến việc điều trị thử nghiệm bằng QI. Các sự kiện TEAE thường xuyên xuất hiện đứng vị trí số 2 là các rối loạn của hệ thần kinh trung ương, cụ thể là đau đầu và hoa mắt chóng mặt; các sự kiện này chỉ ở cấp độ nhẹ đến trung bình. Tất cả các TEAE khác đều được thông báo chỉ ở 1 đối tượng ở mức liều bất kỳ (tối đa là 3 mức). Không có xu hướng đáng kể về mặt lâm sàng trong tự nhiên hoặc thời gian TEAE đã chứng tỏ đối với nghiên cứu theo dõi bất kỳ.

Pha nhiều liều tăng dần

Tỷ lệ TEAE cao nhất được quan sát ở hai mức liều cao nhất (4,5 và 6,5 mg/kg/ngày). Tỷ lệ các sự kiện “có thể liên quan” cũng cao hơn ở 2 mức liều cao nhất. Tuy nhiên, do kích thước mẫu nhỏ (4 đối tượng được điều trị ở mỗi nhóm), nên không thể kết luận rằng kết quả được thể hiện chính xác bằng đáp ứng liều. Phần lớn các TEAE đều không có mối liên hệ với việc điều trị thử nghiệm và đều ở mức nhẹ và chỉ trầm trọng đối với chỉ một sự kiện được thông báo là ở mức trung bình. Các TEAE

xuất hiện thường xuyên nhất ở đối tượng nhận RIVPA (SEQ ID NO. 5) là các rối loạn toàn thể và các phản ứng tại vị trí dùng (tức là, các sự kiện liên quan đến quy trình sử dụng) như tụ huyết tại vị trí chích mạch, phản ứng tại vị trí chích mạch và đau tại vị trí chích mạch. Tất cả các sự kiện liên quan đến việc chích mạch đều ở cấp độ nhẹ và được phán đoán là không liên quan đến việc điều trị. Mức alanin aminotransferaza (ALT) tăng và hiện tượng đau lưng được thông báo ở 3 (15,0%) đối tượng nhận RIVPA (SEQ ID NO. 5) và các sự kiện này được quan sát thấy chỉ ở một đối tượng (10,0%) được nhận giả dược.

Dược động học ở người

Sau khi cho đối tượng là người dùng trong tĩnh mạch và phù hợp với các nghiên cứu trên động vật, RIVPA (SEQ ID NO. 5) bị đào thải ra khỏi hệ tuần hoàn trong vài phút. Pha liều đơn ở thử nghiệm pha 1 trên các đối tượng tình nguyện khỏe mạnh, RIVPA (SEQ ID NO. 5) được đào thải rất nhanh, với mức trong huyết tương giảm xuống nhỏ hơn 10% nồng độ tối đa (Cmax) trong vòng 9 phút sau khi bắt đầu truyền trong tĩnh mạch 4 phút. Sau khi giảm nhanh, quan sát thấy pha (giai đoạn) đào thải chậm hơn. Thời gian trung bình ở nồng độ tối đa (Tmax) nằm trong khoảng ~ 4 phút và ~ 4,8 phút sau khi bắt đầu truyền cho khoảng liều từ 0,15 mg/kg đến 8 mg/kg. Nồng độ tối đa trong huyết tương và mức phơi nhiễm toàn bộ có mối quan hệ tỷ lệ với liều và độ đào thải của RIVPA (SEQ ID NO. 5) ra khỏi hệ tuần hoàn nhanh, phù hợp với các kết quả đã quan sát thấy trên chuột và NHP.

Nhờ mức đào thải cao và thời gian bán hủy đào thải ngắn nên việc tích lũy RIVPA sau khi tiêm hằng ngày được kỳ vọng là không diễn ra. Trong thử nghiệm pha I đa liều, RIVPA (SEQ ID NO. 5) được dùng hằng ngày trong 7 ngày và các nồng độ trước khi dùng được đo vào ngày 5, 6, 7, cũng như vào ngày 8 (24 giờ sau khi bắt đầu truyền vào ngày 7) thấp hơn giới hạn định lượng dưới (lower limit of quantitation - LLOQ) ở tất cả các đối tượng.

Dược động học ở người

Các điều tra *ex vivo* sử dụng các mẫu máu thu được từ người khỏe mạnh tình nguyện tham gia thử nghiệm pha 1, số lượng chất phân tích xytokin và chemokin được định lượng sau 4 giờ kích thích *in vitro* máu toàn phần bằng LPS. Tính biến thiên giữa

các cá thể của mức chất phân tích lớn hơn sự thay đổi bất kỳ theo thời gian hoặc đáp ứng với việc dùng RIVPA (SEQ ID NO. 5) hoặc giả dược và số liệu vì thế được tự chuẩn hóa sử dụng mức chất phân tích trước khi dùng ở mỗi cá thể để chuẩn hóa tất cả các đáp ứng ở từng cá thể (tỷ lệ hoạt động). RIVPA (SEQ ID NO. 5) ảnh hưởng đến tỷ lệ AR của chất phân tích (AR) không đổi theo thời gian cũng như gần như không đáp ứng với liều. Tuy nhiên, ở khoảng liều 0,15 - 2 mg/kg, có bằng chứng cho thấy có sự gia tăng của “tình trạng kháng viêm” (tức là, mức TNF RII và IL-1ra gây viêm cao hơn, kết hợp với mức TNF α và IL-1 β thấp hơn sau khi kích thích máu lấy từ mỗi cá thể bằng LPS).

b. Cơ sở khoa học cho việc tiêm IDR

Viêm niêm mạc miệng

Viêm niêm mạc miệng có mối liên hệ với sự rối loạn của hệ thống phòng vệ bẩm sinh, tạo ra các đợt tác động gây viêm mà còn gây tổn thương lớp niêm mạc và dẫn đến chứng viêm niêm mạc rõ rệt (Sonis, 2004). Cụ thể, trong khi hóa trị hoặc xạ trị gây tổn thương cho màng trong và biểu mô được điều trị thì việc đáp ứng của hệ thống phòng vệ bẩm sinh với “DAMPS” thu được lại tạo ra các đợt gây viêm mà tạo ra tổn thương này. Các nghiên cứu gần đây đánh giá mức biểu hiện gen ở động vật và người dễ mắc phải viêm niêm mạc miệng dữ dội đã hỗ trợ giả thiết về vai trò của hệ thống phòng vệ bẩm sinh trong bệnh (Sonis, 2010). Ngoài ra, viêm niêm mạc đường dạ dày-ruột dưới cũng do các cơ chế tương tự (Bowen, 2008).

Hội chứng nhiễm xạ cấp

Việc tiếp xúc cấp với bức xạ thường đi kèm với việc gây tổn thương cho biểu mô (da), tủy xương (hội chứng tạo máu) và đường dạ dày-ruột (GI). Ngoài ra, tỷ lệ tử vong tăng nhanh do tỷ lệ phơi nhiễm với bức xạ tăng, điều này hạn chế khả năng can thiệp bằng điều trị. Tỷ lệ tử vong sớm (< 2 tuần) sau khi phơi nhiễm cấp tính với bức xạ đi kèm với gây tổn thương cho đường dạ dày ruột. Nhiễm xạ cấp tính gây tổn thương trực tiếp cho tế bào gốc bên trong đáy của các tiểu nang Lieberkuhn, làm ngừng quá trình gián phân và tử vong thông qua cơ chế chết theo chương trình (Potten 1997a, Potten 1997b). Khả năng phục hồi và/hoặc di chứng trong thời gian dài của tổn thương này đã được chứng minh là có liên quan đến cả hệ vi sinh vật trong đường ruột và đáp ứng sửa chữa miễn dịch bẩm sinh (Crawford 2005; Garg, 2010). Các nghiên

cứu đang tiến hành về sinh học phóng xạ của mô bình thường và mô sinh ung thư đã cho thấy vai trò đáng kể của đáp ứng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh với bức xạ (Schaue and McBride, 2010; Lauber 2012; Burnette 2012). Ngoài ra, các chất chủ vận có đích là hệ thống phòng vệ bẩm sinh (tức là, chất chủ vận TLR-9) đã được chỉ ra là bảo vệ phóng xạ trong các thiết lập GI ARS (Saha, 2012).

Viêm niêm mạc miệng và dạ dày-ruột dưới dạng hậu quả của liệu pháp chiếu xạ u đóng vai trò làm nguồn cung cấp liên quan cho thành phần GI của ARS. Phù hợp với chức năng của các IDR và vai trò của sự phòng vệ bẩm sinh trong viêm niêm mạc, hiệu lực của các IDR đã được chứng minh trong rất nhiều mô hình tổn thương niêm mạc. Cụ thể, các nghiên cứu trên cả mô hình viêm niêm mạc miệng và dạ dày-ruột do hóa trị và bức xạ đã cho thấy rằng các IDR có thể làm giảm cường độ tối đa và thời gian viêm niêm mạc thu được mức giảm ~50% trong thời gian bị viêm niêm mạc nghiêm trọng (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 16, Fig. 17).

Cũng phù hợp với ảnh hưởng của IDR đến tính miễn dịch bẩm sinh của vật chủ, hiệu lực trên mô hình nhiễm đã chứng minh với cả vi khuẩn gây bệnh gram-âm và gram-dương (Fig. 9, Fig. 10, Fig. 18, Fig. 19) ở cả chuột có năng lực miễn dịch (ví dụ, Fig. 9) và bị thiếu hụt miễn dịch (bị bệnh bạch cầu hoặc thiếu tế bào T).

IDR được dùng toàn thân và bề mặt niêm mạc bị ảnh hưởng (ví dụ, niêm mạc miệng, ruột [Fig. 3]) cũng như da và có hiệu quả trong cả nhiễm khuẩn toàn thân (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 và Fig. 10) và cục bộ.

Tóm lại, các IDR điều biến phản ứng phòng vệ bẩm sinh với tổn thương (Fig. 1 đến Fig. 8, Fig. 16, Fig. 17). Cụ thể, RIVPA (SEQ ID NO. 5) làm giảm tổn thương phát sinh do bức xạ (Fig. 1, Fig. 2) và có tác dụng toàn thân, cho hiệu quả bảo vệ đáng kể như quan sát được trong đường dạ dày ruột khi đáp ứng với hóa trị (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 và Fig. 6). Ngoài ra, IDR có tác dụng ở cả động vật có năng lực miễn dịch và bị bệnh bạch cầu – điều này gợi ý rằng các ảnh hưởng việc tạo máu mà xuất hiện đồng thời cùng với thành phần GI của ARS sẽ không tác động xấu đến hiệu quả của RIVPA (SEQ ID NO. 5). Dựa trên vai trò chống nhiễm, RIVPA (SEQ ID NO. 5) cũng có thể có hiệu quả trong phân nhóm hội chứng tạo máu của ARS, nhưng chỉ có các đánh giá trực tiếp hội chứng này sử dụng việc dùng trong màng bụng ở liều dưới mức liều tối ưu. RIVPA (SEQ ID NO. 5) không được dự đoán là sẽ ảnh hưởng về mặt được động

học đối với các liệu pháp được dùng đồng thời và đã cho thấy không có ảnh hưởng đến các nhóm kháng sinh chính (số liệu không được thể hiện). RIVPA (SEQ ID NO. 5) không ảnh hưởng đến sự phục hồi do giảm bạch cầu (Fig. 15). Kết hợp với độ an toàn RIVPA (SEQ ID NO. 5) đã được chứng minh trên các nghiên cứu ở người tình nguyện khỏe mạnh (xem 4.a.iv ở trên), các thử nghiệm này hỗ trợ mạnh mẽ việc sử dụng RIVPA (SEQ ID NO. 5) và các cách điều trị khác bằng IDR để đáp ứng với việc phơi nhiễm cấp tính với bức xạ để làm giảm tử lệ tử vong cấp.

Tài liệu tham khảo

- Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol.* **2004**;7,25-32.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* **2004**;40,845-59.
- Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* **2003**;74,479-85.
- Bowen J, Keefe D. New Pathways for Alimentary Mucositis. *J Oncology.* **2008**;1-7.
- Burnette B, Fu Y, Weichselbaum R. The confluence of radiotherapy and immunotherapy. *Frontiers in Oncology.* **2012**; 2, article 143.
- Crawford P, Gordon J. Microbial Regulation of Intestinal Radiosensitivity. *PNAS.* **2005**;102(37),13254-13259.
- Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* **2006**;72,1102-13.
- Elting et al. *Cancer.* **2008**;113(10)2704-2713.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* **2007**;447,972-8.
- Garg S, Boerma M, Wang J, Fu Q, Loose D, Kumar K, Hauer-Jensen M. Influence of a Sublethal Total-Body Irradiation on Immune Cell Populations in the Intestinal Mucosa. *Radiat. Res.* **2010**;173(4),469-78.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* **2002**;20,197-216.
- Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M, Belka C. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in Oncology.* **2012**; 2, Article 116.
- Mateus et al. *Br. J. Dermatol.* **2009**; 161(3),515-521.
- Matzinger, P. The Danger Model : A renewed sense of self. *Science.* **2002**;

296(5566), 301-305.

Molloy M, Bouladoux N, Belkaid Y. Intestinal Microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol.* **2012**; 24(1), 58-66.

Murphy. *J Supportive Oncology.* **2007**;5(9) supplement 4, 13-21.

Nonzee NJ, Dandade NA, Markossian T, Agulnik M, Argiris A, Patel JD, Kern RC, Munshi HG, Calhoun EA, Bennett CL. Evaluating the supportive care costs of severe radiochemotherapy-induced mucositis and pharyngitis. *Cancer.* 2008; 113: 1446-52.

Paris F, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* **2001**; 293(5528):293-297.

Potten CS. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int J Radiat Biol.* **1990**; 58(6):925-973.

Potten CS and Booth C. The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comp Biochem Physiol B.* **1997a**; 118(3):473-478.

Potten CS, Booth C and Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol.* **1997b**; 78(4):219-243.

Saha S, Bhanja P, Liu L, Alfieri A, Yu D, Kandimalla E, Agrawal E, Guha C. TLR9 Agonist Protects Mice from Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome. *PLOS one.* **2012**; 7(1), e29357.

Sankhala et al. *Target Oncol.* **2009**; 4(2),135-142.

Santaolalla R, Fukata M, Abreu M. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol.* **2011**; 27(2),125-31.

Schaue D, McBride W. Links between Innate Immunity and Normal Tissue Radiobiology. *Radiat Res.* **2010**; 173(4),406-17.

Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, Wang A, Lee K, Doria S, Hamill P, Yu JJ, Li Y, Donini O, Guarna MM, Finlay BF, North JR, Hancock REW. An anti-infective peptid that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 465-72.

Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* **2007**;581,175-9

Sonis ST. A Biological Approach to Mucositis. *J Supp Onc.* **2004**; 2(1), 21-36.

Sonis. *Oral Diseases* in press & personal communication. **2010**.

Sonis. *Current Opinions in Supportive and palliative care.* **2010**; 4, 29-34.

Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* **2005**;116,241-9; quiz 50.

Tsuda, Y. and Okada, Y. Solution-Phase Peptid Synthesis, in Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Volume 3 (ed A. B. Hughes) **2010**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Williams JP, et al. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res*, **2010**. 173(4): 557-78.

Withers HR. Regeneration of intestinal mucosa after irradiation. *Cancer*. 1971; 28(1):75-81. Withers HR and Elkind MM. Radiosensitivity and fractionation response of crypt cells of mouse jejunum. *Radiat Res*. **1969**; 38(3):598-613.

Wurthwein G, Rohdewald P. Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate. *Biopharm Drug Dispos.* **1990**; 11:381-394.

Yu HB, Kielczewska A, Rozek A, Takenaka S, Li Y, Thorson L, et al. Sequestosome-1/p62 is the key intracellular target of innate defense regulator peptid. *J Biol Chem.* **2009**;284,36007-11.

Bảng 1
tất cả đầu tận C được amit hóa trừ khi được ký hiệu ****

SEQ ID	Lưu ý	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Chiều dài	Diện tích thực	
1	Ac là axetyl hóa			+	K	S	R	I	V	P							6	3	
2				Ac	K	S	R	I	V	P							6	2	
3				+	S	R	I	V	P	A							6	2	
4				+	S	R	I	V	P								5	2	
5	* là D-axit amin					+	R	I	V	P	A						5	2	
6						+	K	I	V	P	A						5	2	
7						+	R	I	V	P	A*						5	2	
8						+	R		V	P	A						4	2	
9	Axit tự do					+	R	I		P	A						4	2	
10						+	R	I	V	P	A	OH					5	1	
11						+	R	A	V	P	A						5	2	
12					+	R	R	I	V	P	A							6	3
13					+	R	K	V	P	A								6	3
14					+	R	I	V	P	K								5	3
15					+	R	P	V	P	A								5	2
16					+	R	I	P	P	A								5	2
17					+	R	I	V	P	P								5	2
18					+	R	I	V	P	G	G	A						7	2
19				+	G	G	I	V	P	A							6	1	
20					+	G	I	V	P	A							5	1	
21					+	R	G	V	P	A							6	2	
22					+	R	I	V	P	G							5	2	
23					+	R	I	V	P	S							5	2	
24					+	R	I	V	P	L							5	2	
25					+	R	H	V	P	A							6	2?	
26						+	R	I	P	V	A						5	2	
27						+	R	V	I	P	A						5	2	
28						+	R	I	I	P	A						5	2	
29						+	A	V	P	I	R						5	2	
30							+	A	P	V	I	R					5	2	
31	vòng từ đầu đến đuôi						R	I	V	P	A						5	1	
32	liên kết vòng-xystein					-	C	R	I	V	P	A	C				7	1	
33	x là N-metyl trong khung					+	R	x	V	P	A						5	2	
34	x là N-metyl trong khung					+	R	I	V	P	A _x						5	2	
35						+	R	I	V	P	F						5	2	
36						+	C	I	V	P	A						5	1	
37						+	R	L	V	P	A						5	2	
38						+	H	I	V	P	A						5	1?	
39				+	I	R	R	V	P	A							6	3	
40						+	A	R	V	P	A						5	2	
41						+	I	R	V	P	A						5	2	
42						+	O	I	V	P	A						5	2	
43						+	S	I	V	P	A						5	1	
44				+	V	S	I	I	K	P	A	R	V	P	S	L	L	13	3
45				+	K	P	A	R	V	P	S						7	3	
46				+	R			V	P	S	L	L					6	2	
47				+	K	P	R	A	V	P							6	3	
48				+	P	A	R	V	P								5	2	
49						+	I	R	V	P							4	2	
50						+	R		V	P	S						5	2	
51						+	R		V	P							3	2	
52								+	P	S	V	P	G	S			8	1	
53				+	G	L	K	H	P	S							6	2?	
54						+	R	I	V	P	A	I	P	V	S	L	L	11	2
55	Xem lưu ý 1							X ₁	X ₂	P								3	

Bảng 1

tất cả đầu tận C được amit hóa trừ khi được ký hiệu ****

SEQ ID	Lưu ý	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Chiều dài	Diện tích thực
56	Xem Lưu ý 2					X ₁	X ₂	X ₃	P									4
57	Xem Lưu ý 3				a	X ₁	X ₂	X ₃	P									5
58	Xem Lưu ý 4					X ₁	X ₂	X ₃	P	b								5
59	Xem Lưu ý 5			a ₁	a ₂	X ₁	X ₂	X ₃	P									6
60	Xem Lưu ý 6				a	X ₁	X ₂	X ₃	P	b								6
61						+	R	I	V	P	A	C					6	2
62						+	r	r	V	P							4	3
63	axit hydroxamic					+	R	I	V	P	A	HOH					5	2
64	---					+	R	I	V	P	P	A					6	2
65						+	R	I	G	P	A						5	2
66						+	R	I	V	Pip	A						5	2
67						+	R	I	V	Thz	A						5	2
68						+	R	I	V	Fpro	A						5	2
69						+	R	I	V	Dhp	A						5	2
70						+	R	I	H	P	A						5	2
71						+	R	I	W	P	A						5	2
72						+	R	I	V	P	W						6	2
73					+	S	P	V	I	R	H						6	2
74					+	C	P	V	I	R	H						6	2
75							R	I	E	P	A						5	1
76						+	R	I	V	P	E						5	1
77						+	R	I	V	P	H						5	1
78						+	R	S	V	P	A						5	2
79					+	E	R	I	V	P	A	G					7	1
80						+	K	V	I	P	S						5	2
81						+	K	V	V	P	S						5	2
82							+	K	P	R	P						4	3
83						+	R		I	P							3	2
84						+	O		V	P							3	2
85						+	S		V	P							3	1
86						+	K		V	P							3	2
87						+	R		R	P							3	3
88						+	G		V	P							3	1
89						+	K	H	P								3	2
90	* là D-axit amin						R	I	V	P	A	Y*					6	2
91							R	IBg	V	K	R	IBg	V-				8	
92							R	I	V	mp2	A	N ¹⁰					5	

Ac là axetyl hóa, O là Ornithin, Cit là Citrulin
khung (so với khung amit).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit được phân lập bao gồm axit amin SEQ ID NO. 91 hoặc SEQ ID NO. 92 hoặc muối, este hoặc amit được dụng của nó.

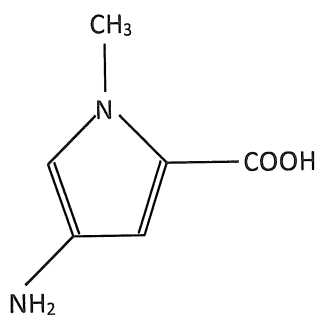
2. Peptit được phân lập chứa trình tự axit amin của R(tBg)V1KR(tBg)V2,

trong đó tBg = tert-butyl glyxin

ngoài ra trong đó R(tBg)V2 được liên kết thông qua liên kết amit giữa V2 và nhóm lysin amino trong chuỗi bên (SEQ ID NO. 91).

3. Peptit được phân lập chứa trình tự axit amin RIV(mp2)A-NH₂,

trong đó mp2 = axit 4-amino-1-metyl-1H-pyrrol-2-carboxylic



(SEQ ID NO. 92).

Fig. 1

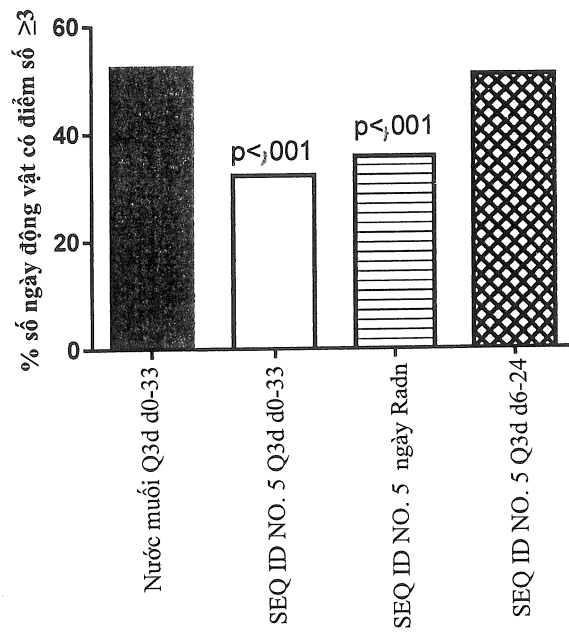


Fig. 2

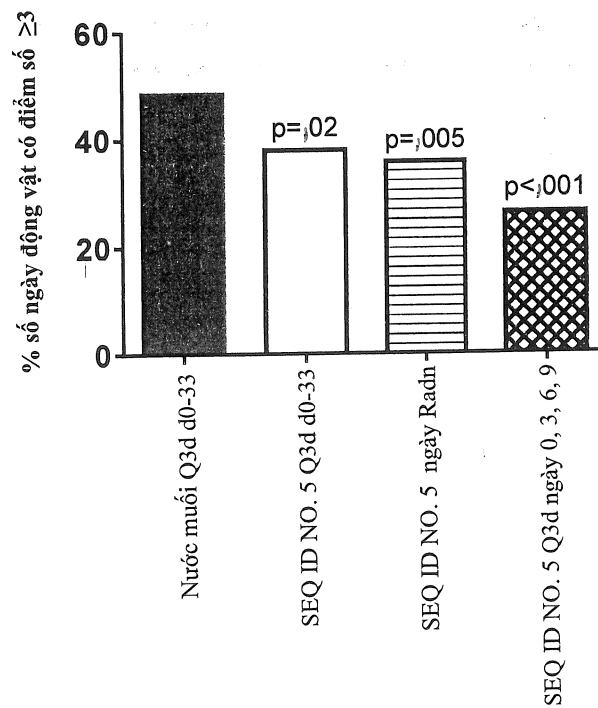


Fig. 3

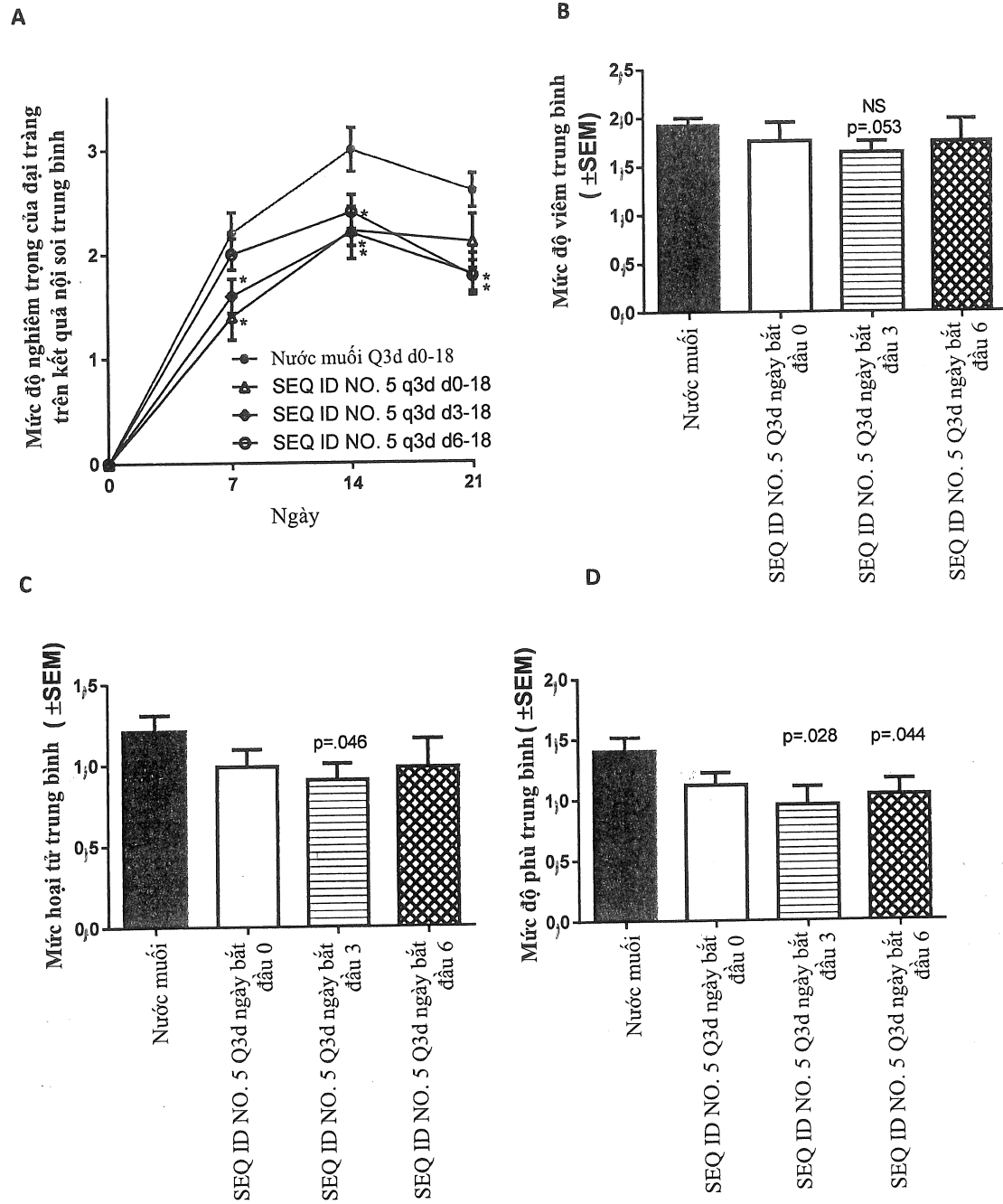


Fig. 4

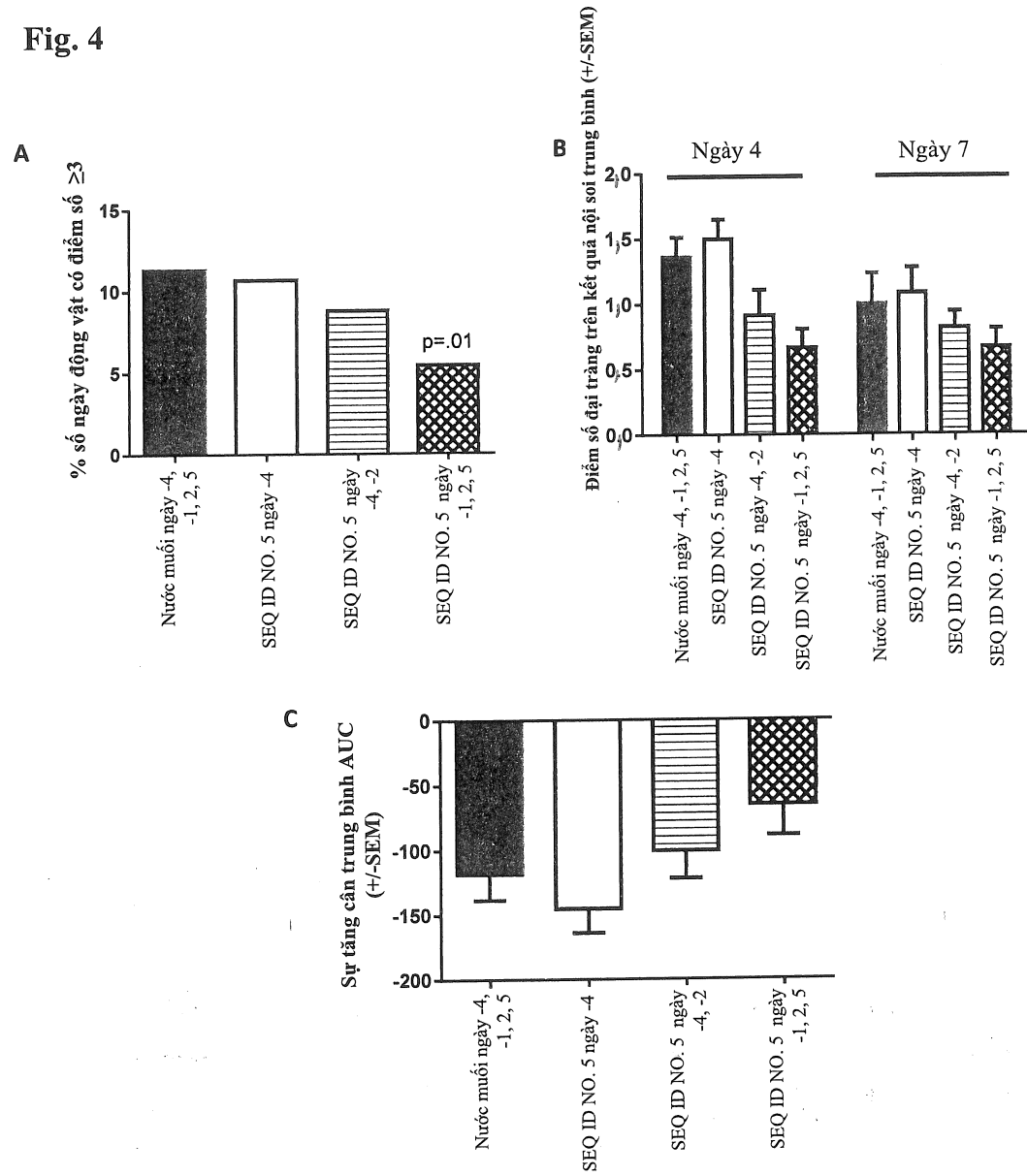


Fig. 5

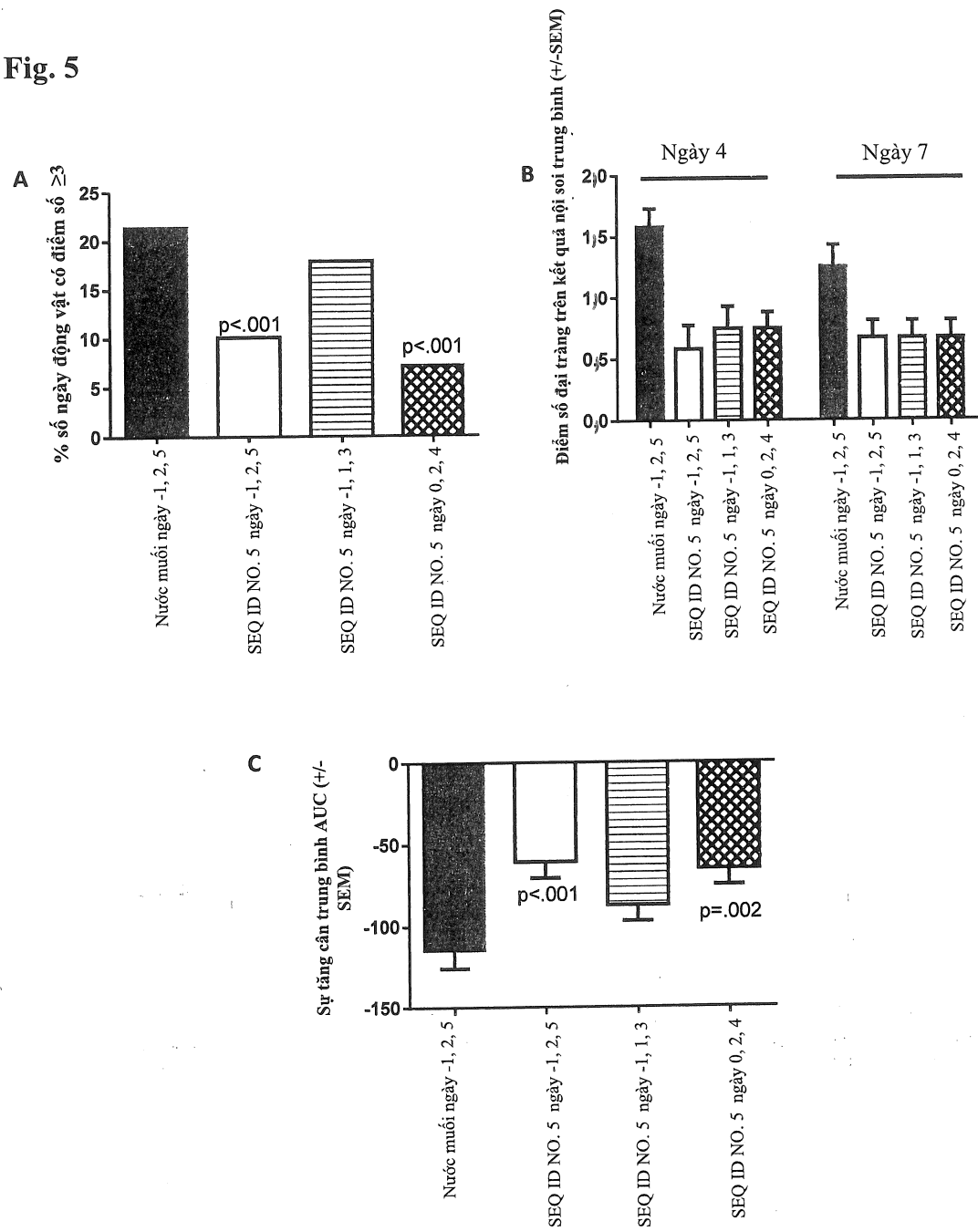


Fig. 6

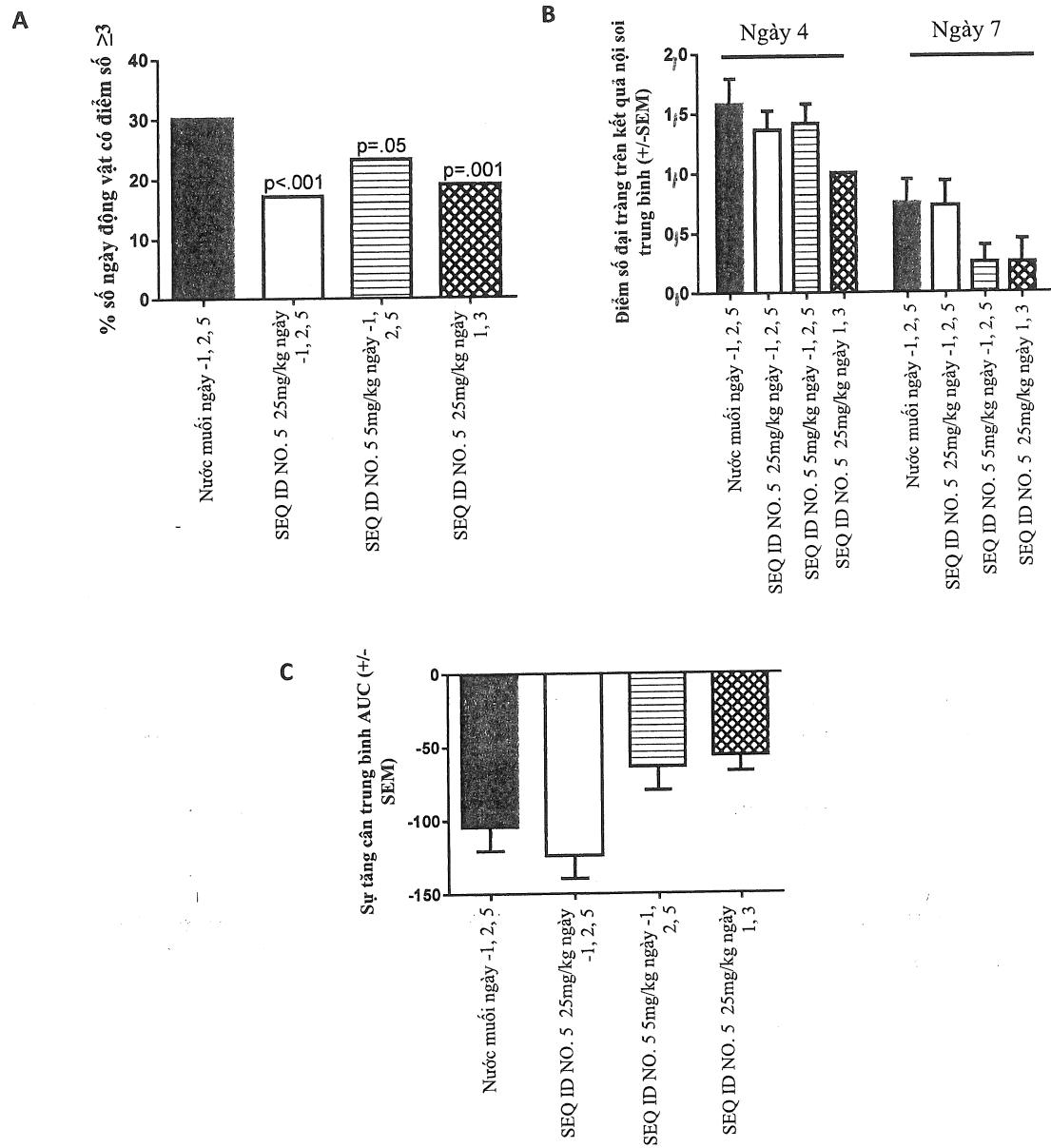


Fig. 7

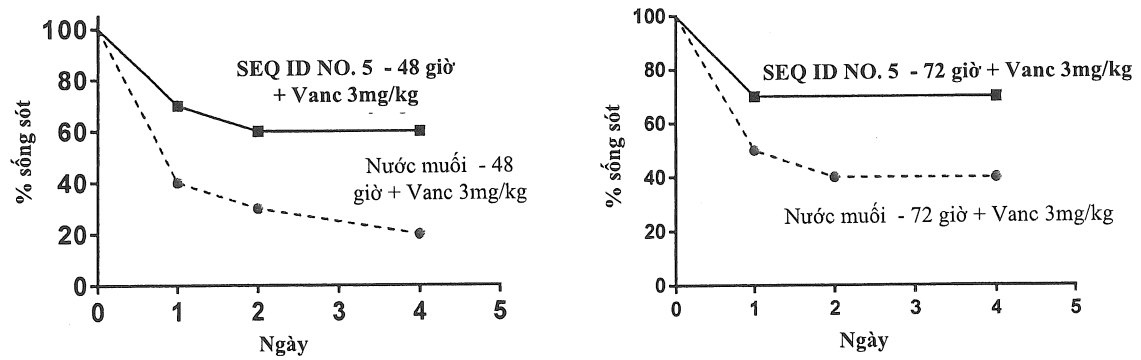


Fig. 8

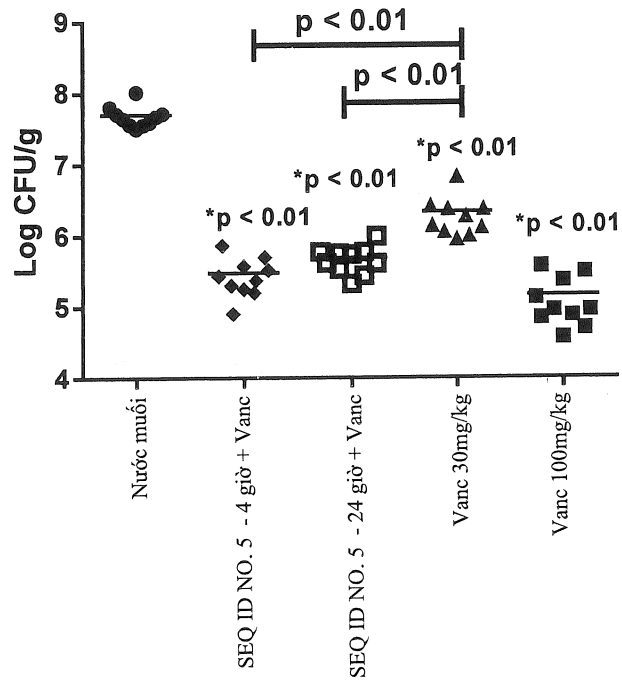


Fig. 9

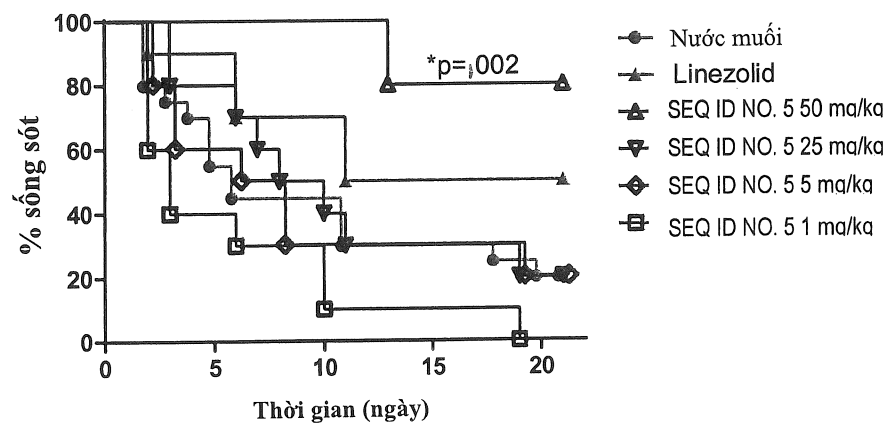


Fig. 10

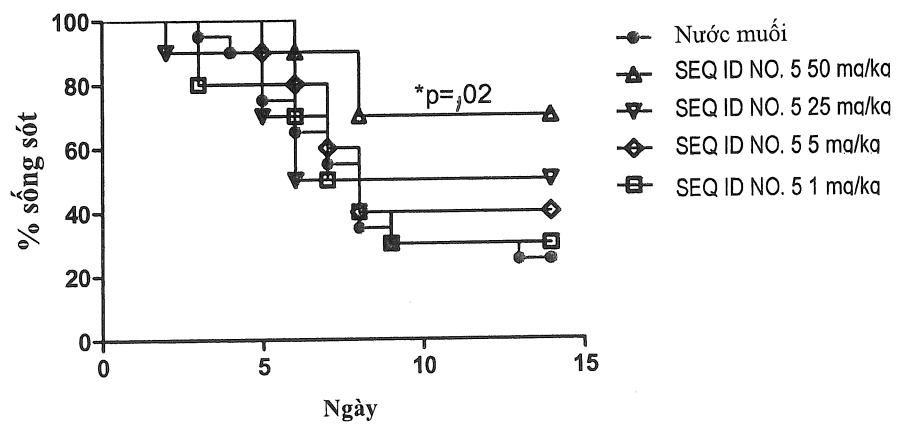


Fig. 12

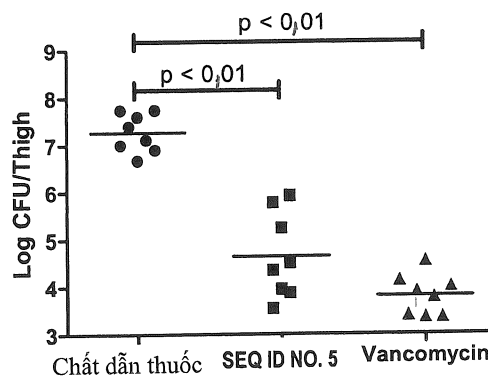
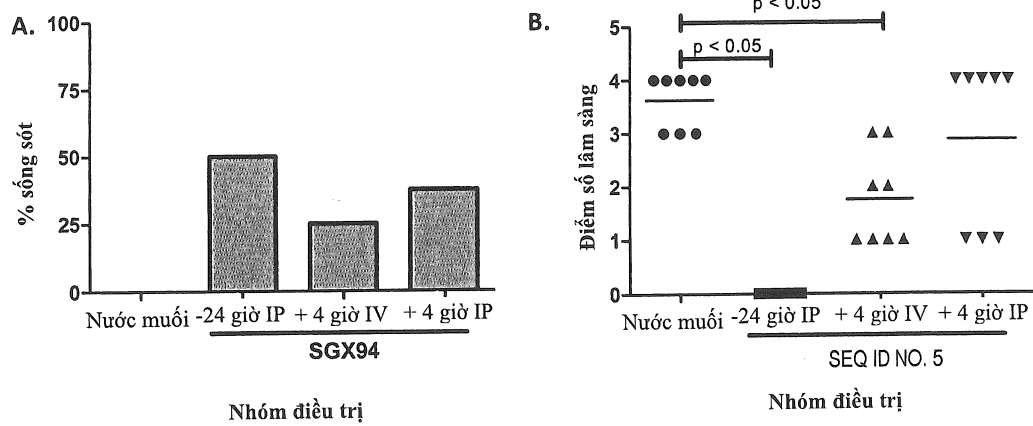
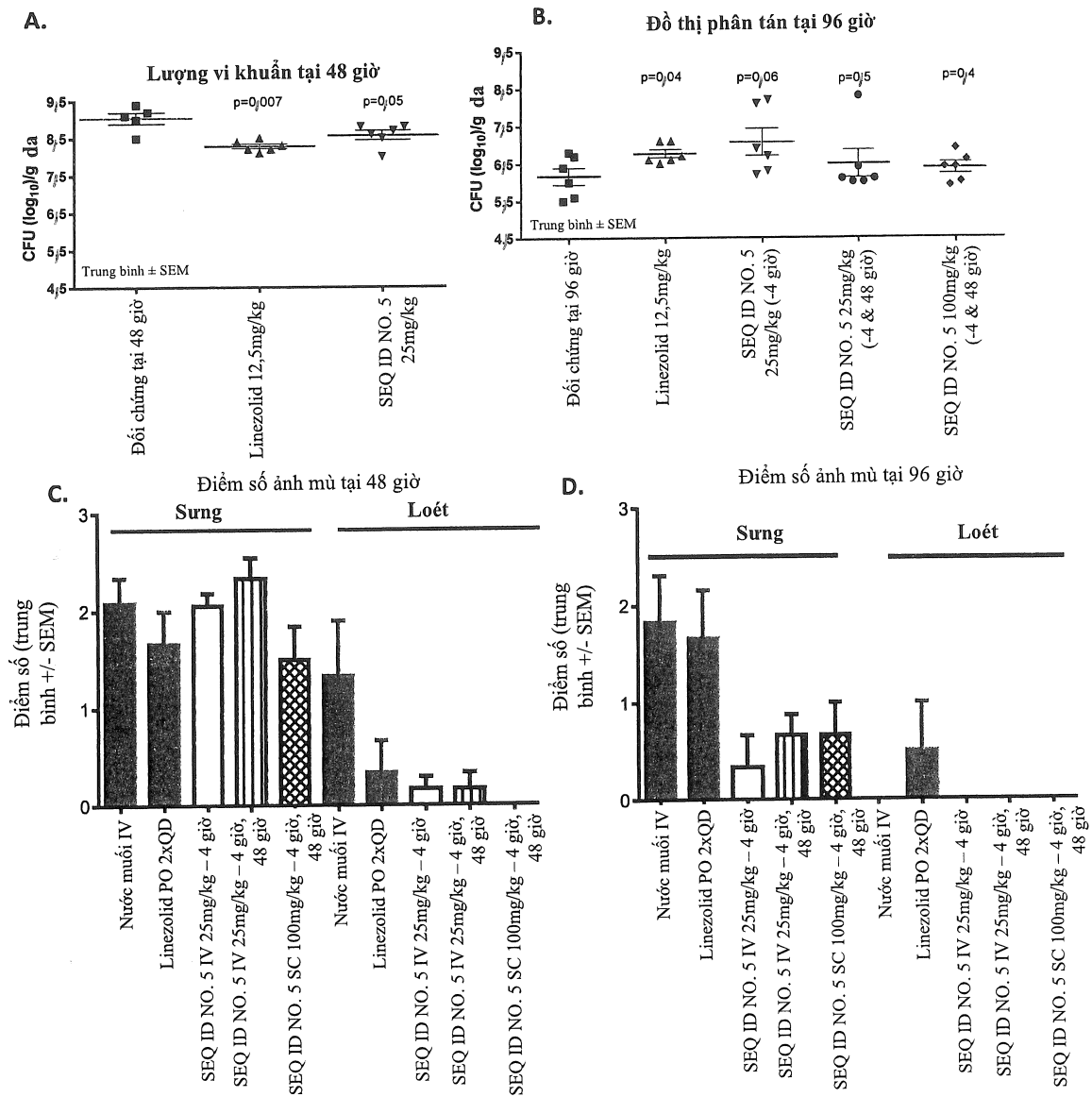


Fig. 13 *



* Không có cột đồ thị trong đồ thị A cho biết tất cả chuột chết (0% sống sót).

Fig. 14 *



* Không có cột đồ thị trong đồ thị C và D cho biết tất cả chuột có điểm số bằng không, có được sai số trung bình và sai số trung bình của trung bình (SEM) là 0 ± 0 .

Fig. 15

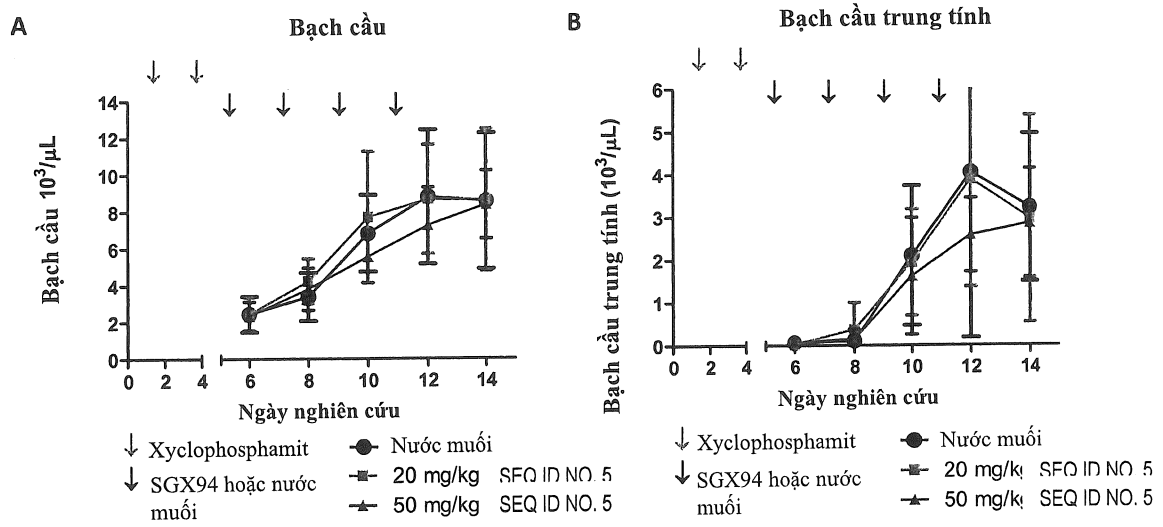


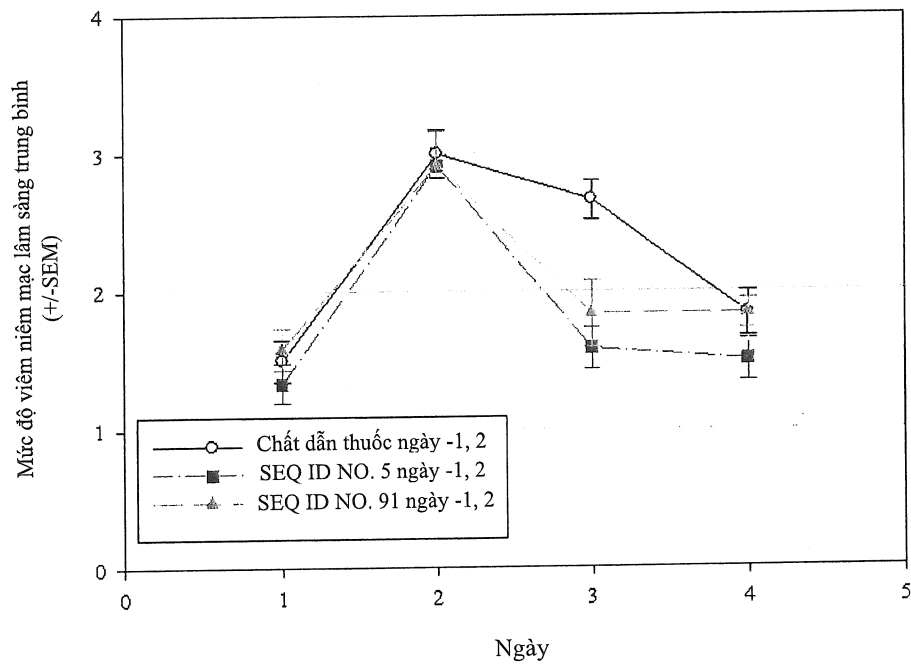
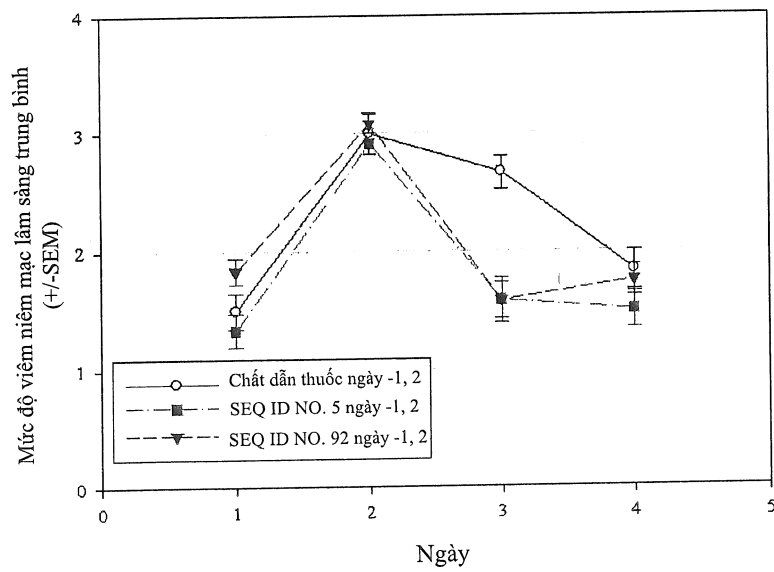
Fig. 16**Fig. 17**

Fig. 18

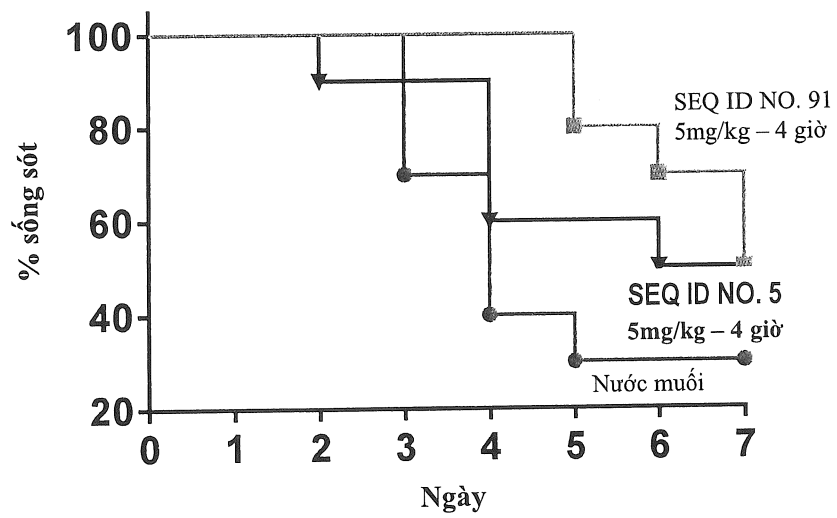
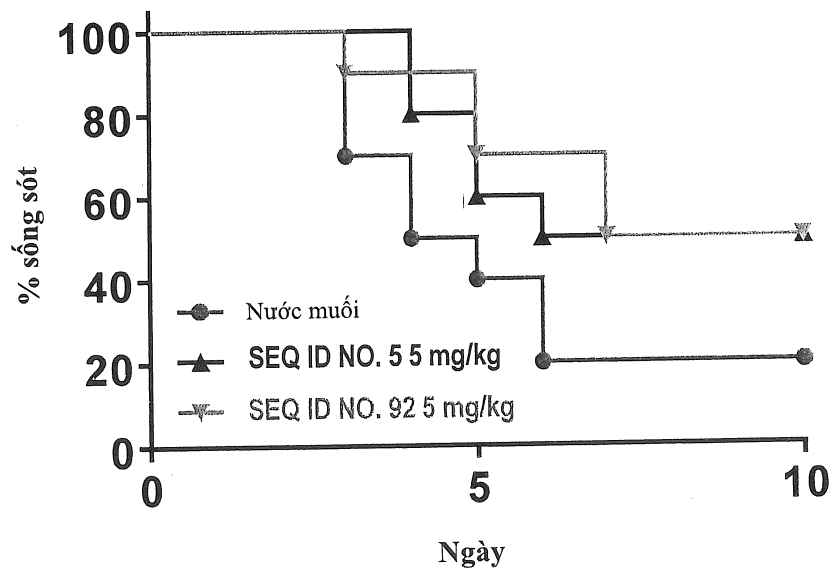


Fig. 19



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Soligenix, Inc.
 Donini, Oreola
 Rozek, Annett
 Lee, Jackson
 North, John
 Abrams, Michael

<120> Peptit dùng để điều trị viêm niêm mạc miệng

<130> 502.223WO

<140> PCT/US14/50516
 <141> 2014-08-11

<150> 61/877767
 <151> 2013-09-13
 <160> 92
 <170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit miễn dịch
 <400> 1
 Lys Ser Arg Ile Val Pro
 1 5

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa bằng với K được axetyl hóa
 <400> 2
 Xaa Ser Arg Ile Val Pro
 1 5

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit miễn dịch
 <400> 3
 Ser Arg Ile Val Pro Ala
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch
 <400> 4
 Ser Arg Ile Val Ala
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 5

Arg Ile Val Pro Ala
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 6

Lys Ile Val Pro Ala
 1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa bằng với D-Axit amin của Ala

<400> 7

Arg Ile Val Pro Xaa
 1 5

<210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 8

Arg Val Pro Ala

1

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 9

Arg Ile Pro Ala

1

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa bằng với Ala-OH

<400> 10
 Arg Ile Val Pro Xaa
 1 5

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 11

Arg Ala Val Pro Ala
 1 5

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 12

Arg Arg Ile Val Pro Ala
 1 5
 <210> 13

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 13

Arg Lys Val Pro Ala
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 14

Arg Ile Val Pro Lys
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 15

Arg Pro Val Pro Ala
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 16

Arg Ile Pro Pro Ala
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 17

Arg Ile Val Pro Pro
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 18

Arg Ile Val Pro Gly Gly Ala
1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 19

Gly Gly Ile Val Pro Ala
1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 20

Gly Ile Val Pro Ala
1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 21

Ala Gly Val Pro Ala
1 5

<210> 22

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 22

Arg Ile Val Pro Gly
 1 5

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 23

Arg Ile Val Pro Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 24

Arg Ile Val Pro Leu
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 25

Arg His Val Pro Ala
 1 5

<210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 26

Arg Ile Pro Val Ala
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 27

Arg Val Ile Pro Ala
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 28

Arg Ile Ile Pro Ala
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 29

Ala Val Pro Ile Arg
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 30

Ala Pro Val Ile Arg
1 5

<210> 31

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 31

Arg Ile Val Pro Ala
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> peptit vòng

<400> 32

Cys Arg Ile Val Pro Ala Cys
 1 5

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa bằng với I với khung NMe

<400> 33

Arg Xaa Val Pro Ala
 1 5

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa bằng với A với khung N-được metyl hóa

<400> 34

Arg Ile Val Pro Xaa

1

5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 35

Arg Ile Val Pro Phe

1

5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(1)

<223> Xaa bằng với Xitruilin

<400> 36

Xaa Ile Val Pro Ala

1

5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<400> 37

Arg Leu Val Pro Ala
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 38

His Ile Val Pro Ala
1 5

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 39

Ile Arg Arg Val Pro Ala
1 5

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

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 40

Ala Arg Val Pro Ala
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 41

Ile Arg Val Pro Ala
1 5

<210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa bằng với Ornithin

<400> 42

Xaa Ile Val Pro Ala
 1 5

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 43

Ser Ile Val Pro Ala
 1 5

<210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 44

Val Ser Ile Ile Lys Pro Ala Arg Val Pro Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 45

Lys Pro Ala Arg Val Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 46

Arg Val Pro Ser Leu Leu
1 5

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 47

Lys Pro Arg Ala Val Pro
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 48

Pro Ala Arg Val Pro
1 5

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 49

Ile Arg Val Pro
1

<210> 50
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 50

Arg Val Pro Ser
 1

<210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 51

Arg Val Pro
 1

<210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 52

Pro Ser Val Pro Gly Ser
 1 5

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 53

Gly Leu Lys His Pro Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 54

Arg Ile Val Pro Ala Ile Pro Val Ser Leu Leu
 1 5 10

<210> 55
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất gốc K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với các nhóm chức bazơ được thế trên đầu tận N, hSer, Val (betaOH)

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm V, I, K, P, và H

<400> 55

Xaa Xaa Pro
 1

<210> 56
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất trên cơ sở K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với các nhóm chức bazơ được thế trên đầu tận N, hSer, Val (betaOH)

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, I, L, V, K, P, G, H, R, S, O, Dab, Dpr, Cit, Hci, Abu, Nva, Nle và trong đó Xaa có thể được N-metyl hóa

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm I, V, P

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Pro
 1

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm S, P, I, R, C, T, L, V, A, G, K, H, R, O, C, M và F

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất trên cơ sở K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với các nhóm chức bazo được thế trên đầu tận N, hSer, Val (betaOH)

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, I, L, V, K, P, G, H, R, S, O, Dab, Dpr, Cit, Hci, Abu, Nva, Nle và trong đó Xaa có thể được N-metyl hóa

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm I, V, P

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
 1 5

<210> 58
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(1)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm trên cơ sở K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với các nhóm chức bazơ được thể trên đầu tận N, hSer, Val (betaOH)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, I, L, V, K, P, G, H, R, S, O, Dab, Dpr, Cit, Hci, Abu, Nva, Nlevà trong đó Xaa có thể được N-metyl hóa

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm I, V, P

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, A*, G, S, L, F, K, C, I, V, T, Y, R, H, O, và M, trong đó A* là D axit amin của A

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Pro Xaa

1

5

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(1)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm K, I, R, H, O, L, V, A, và G

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm S, P, R, T, H, K, O, L, V, A, G, S, I

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất trên cơ sở K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với nhóm chức bazơ được thế trên đầu tận N, hSer, Val
(betaOH)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, I, L, V, K, P, G, H, R, S, O, Dab, Dpr, Cit, Hci, Abu, Nva, Nlevà trong đó Xaa có thể được N-metyl hóa

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm I, V, P

<400> 59

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
1 5

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (1)..(1)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm S, R, K, H, O, T, I, L, V, A, và G

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất trên cơ sở K, H, R, S, T, O, Cit, Hci, Dab, Dpr, hoặc glyxin với nhóm chức bazơ được thế trên đầu tận N, hSer, Val
(betaOH)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, I, L, V, K, P, G, H, R, S, O, Dab, Dpr, Cit, Hci, Abu, Nva, Nle và trong đó Xaa có thể được N-metyl hóa

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm I, V, P

<220>

<221> Dấu hiệu MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa được chọn từ nhóm bao gồm A, V, I, L, G, K, H, R, O, S, T, và F

<400> 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 1 5

<210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 61

Arg Ile Val Pro Ala Cys
 1 5

<210> 62
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 62

Arg Arg Val Pro
 1

<210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa bằng với A-NHOH

<400> 63

Arg Ile Val Pro Xaa
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 64

Arg Ile Val Pro Pro Ala
 1 5

<210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 65

Arg Ile Gly Pro Ala
 1 5

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa bằng với Pip

<400> 66
 Arg Ile Val Xaa Ala
 1 5

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dầu hiệu MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa bằng với Thz

<400> 67

Arg Ile Val Xaa Ala
 1 5

<210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dầu hiệu MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa bằng với Fpro

<400> 68

Arg Ile Val Xaa Ala
 1 5

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dầu hiệu MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa bằng với Dhp

<400> 69

Arg Ile Val Xaa Ala
 1 5

<210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 70

Arg Ile His Pro Ala
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 71

Arg Ile Trp Pro Ala
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 72

Arg Ile Val Pro Trp
1 5

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 73

Ser Pro Val Ile Arg His
1 5

<210> 74
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 74

Cys Pro Val Ile Arg His
1 5

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 75

Arg Ile Glu Pro Ala
1 5

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 76

Arg Ile Val Pro Glu
1 5

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 77

Arg Ile Val Pro His
1 5

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit miễn dịch

<400> 78

Arg Ser Val Pro Ala
1 5

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 79

Glu Arg Ile Val Pro Ala Gly
 1 5

<210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 80

Lys Val Ile Pro Ser
 1 5

<210> 81
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 81

Lys Val Val Pro Ser
 1 5

<210> 82
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 82

Lys Pro Arg Ser
 1

<210> 83
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 83

Arg Ile Pro
 1

<210> 84
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa bằng với Orn

<400> 84

Xaa Val Pro
 1

<210> 85
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 85

Ser Val Pro
 1

<210> 86
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 86

Lys Val Pro

1

<210> 87
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 87

Arg Arg Pro

1

<210> 88
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 88

Gly Val Pro

1

<210> 89
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<400> 89

Lys His Pro

1

<210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit miễn dịch

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (6)..(6)

<223> Xaa bằng với D-axit amin Tyr

<400> 90

Arg Ile Val Pro Ala Xaa
1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa bằng với tBG, tert-butyl glyxin

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa bằng với tBG, tert-butyl glyxin

<400> 91

Arg Xaa Val Lys Arg Xaa Val
1 5

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit miễn dịch

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa bằng với mp2, axit 4-Amino-1-metyl-1H-pyrol-2-carboxylic

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa bằng với NH₂

<400> 92

Arg Ile Val Xaa Ala Xaa
1 5