



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0032814

(51)⁷ C07K 19/00; A61P 35/00; C12N 5/0783; (13) B
C07K 14/82; A61K 39/00; C07K 14/00

(21) 1-2016-01853 (22) 20/10/2014
(86) PCT/JP2014/077807 20/10/2014 (87) WO 2015/060235 30/04/2015
(30) 2013-218524 21/10/2013 JP; 2014-155132 30/07/2014 JP
(45) 25/08/2022 413 (43) 26/09/2016 342A
(73) TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
1-27, Kandanishiki-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 1018444, Japan
(72) FUKAYA Satoshi (JP); OSADA Toshihiro (JP); WADA Hiroshi (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PEPTIT CÓ 4 EPITOP LYMPHO BÀO T GÂY ĐỘC TẾ BÀO LIÊN KẾT VỚI
NHAU VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất peptit kháng nguyên ung thư có thể được sử dụng cho nhiều bệnh nhân ung thư ở dạng vaccin peptit dùng cho bệnh ung thư mà không cần xác định typ HLA và không phụ thuộc vào typ HLA của bệnh nhân. Peptit có 4 CTL epitop liên kết này thu được bằng cách liên kết 4 CTL epitop peptit với nhau thông qua các tác nhân liên kết, các CTL epitop peptit này được chọn trong số các CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u đã biết là có khả năng kích thích CTL. Sáng chế còn xuất được phẩm chứa peptit này.

	Sự kích thích CTL đặc hiệu epitop				PEP2 được phân cắt bằng i20S	PEP10 được phân cắt bằng i20S
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C			
TPV01	PEP5	PEP6	PEP9*	PEP4		
TPV02	PEP9*	PEP5	PEP6	PEP4		
TPV03	PEP6	PEP5	PEP9*	PEP4		
TPV04	PEP6	PEP9*	PEP5	PEP4		
TPV05	PEP9*	PEP6	PEP5	PEP4		
TPV06	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV07	PEP1	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV08	PEP1	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV09	PEP7	PEP1	PEP8*	PEP2*	○	
TPV10	PEP8*	PEP7	PEP1	PEP2*	○	
TPV11	PEP8*	PEP1	PEP7	PEP2*	○	
TPV12	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV13	PEP8*	PEP13	PEP7	PEP2*	○	
TPV14	PEP13	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV15	PEP8*	PEP7	PEP13	PEP2*	○	
TPV16	PEP13	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV17	PEP13	PEP15	PEP18	PEP10*		○
TPV18	PEP13	PEP18	PEP15	PEP10*		○
TPV19	PEP15	PEP13	PEP18	PEP10*		○

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit mới hữu ích dùng làm peptit kháng nguyên ung thư. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên ung thư mới có 4 peptit liên kết có khả năng kích thích đáp ứng CTL được giới hạn bởi HLA-A và được phẩm chứa peptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở Nhật Bản. Khoảng 350.000 bệnh nhân bị chết do ung thư mỗi năm, và bệnh ung thư hiện nay vẫn là căn bệnh nghiêm trọng. Các phương pháp điều trị bệnh ung thư đã được sử dụng bao gồm cắt bỏ bằng phẫu thuật, điều trị bằng thuốc chống ung thư, và xạ trị. Tuy nhiên, các phương pháp điều trị này gặp phải một số vấn đề, chẳng hạn như, sự tái phát, suy giảm chất lượng cuộc sống (Quality of Life - QOL), và thiếu tùy chọn điều trị trong trường hợp ung thư giai đoạn tiến triển không thể điều trị được bằng các phương pháp trên đây.

Trị liệu miễn dịch ung thư (vacxin ung thư) đã được kỳ vọng là kỹ thuật trị liệu mới trong một khoảng thời gian dài, và các nghiên cứu lâm sàng trên các vacxin peptit dùng cho bệnh ung thư đã được bắt đầu triển khai trên toàn thế giới vào năm 1990 khi các epitop peptit trong các kháng nguyên khối u của người đã có thể nhận diện được. Tuy nhiên, theo kết quả phân tích của các nghiên cứu lâm sàng được thực hiện bằng cách sử dụng peptit một mình hoặc kết hợp với các chất khác, tỷ lệ đáp ứng là thấp, bằng 2,7% trong số 1000 trường hợp hoặc cao hơn (Rosenberg SA et al., Nature Med., 2004, 10 (9): 909-15). Do đó, việc ứng dụng chúng trong thực tiễn gặp khó khăn.

Trong khi đó, các nghiên cứu lâm sàng sử dụng các vacxin peptit cụ thể để điều trị bệnh ung thư đã được thực hiện khá lâu ở Nhật Bản, và thành tựu đạt được của các nghiên cứu này dần dần trở nên rõ ràng. Trong những năm gần đây, phương pháp sử dụng nhiều peptit ung thư thay vì một loại peptit ung thư đã được thử

nghiệm, nhằm mục đích cải thiện kết quả điều trị. Ví dụ, typ HLA và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của bệnh nhân được xét nghiệm sớm, để thực hiện việc điều trị bệnh ung thư theo chế độ riêng sử dụng vacxin peptit bao gồm lựa chọn nhiều peptit thích hợp để sử dụng, và độ an toàn và tác dụng kháng u của nó đã được kiểm chứng. Cụ thể hơn, thông qua việc sử dụng vacxin peptit được bào chế một mình hoặc kết hợp với thuốc chống ung thư, hiệu quả lâm sàng và độ an toàn tuyệt vời đã đạt được đối với bệnh u não, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, và ung thư tụy (Terasaki, M. et al., J. Clin. Oncol., 2011, 29 (3): 337-44; Noguchi, M. et al., Cancer Immunol. Immunother., 2010, 59 (7): 1001-9; Yanagimoto, H. et al., Cancer Sci., 2007, 98 (4): 605-11).

Tính miễn dịch qua trung gian tế bào gồm lympho bào T gây độc tế bào (sau đây, được viết tắt là “CTL”) đặc hiệu epitop, mà được xem là tế bào tác động chính trong điều trị ung thư sử dụng vacxin peptit, bị giới hạn bởi HLA. Do đó, việc phát triển vacxin peptit để điều trị bệnh ung thư chủ yếu là dành cho các bệnh nhân có typ HLA cụ thể, đặc biệt là typ HLA-A2 hoặc HLA-A24, do số bệnh nhân mắc ung thư có typ HLA này rất lớn.

Tuy nhiên, số lượng người Nhật có hai typ HLA này lần lượt vào khoảng 40% và 60% (Sette, A. et al., Immunogenetics, 1999, 50 (3-4): 201-12). Không may là, bệnh nhân có typ HLA khác không thể điều trị được bằng vacxin peptit dùng cho bệnh ung thư. Ngoài ra, thời điểm bắt đầu điều trị sẽ bị chậm lại do phải tiến hành xác định typ HLA trước khi bắt đầu điều trị, điều này sẽ làm tăng gánh nặng cho bệnh nhân. Do đó, cần nghiên cứu và phát triển vacxin peptit dùng cho bệnh ung thư có khả năng áp dụng cho tất cả các bệnh nhân ung thư mà không cần xác định typ HLA.

Liên quan đến việc điều trị ung thư sử dụng vacxin peptit, ngoài việc hoạt hóa CTL dưới dạng là một thành phần của hệ thống miễn dịch qua trung gian tế bào, thì việc kích thích sản xuất globulin miễn dịch dưới dạng miễn dịch dịch thể cũng góp phần tạo ra các lợi ích liên quan đến khả năng sống (Noguchi, M. et al., Cancer Biol. Ther., 2011, 10 (12):1266-79).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất peptit kháng nguyên ung thư có thể được sử dụng làm vacxin peptit để điều trị bệnh ung thư cho nhiều bệnh nhân ung thư và có thể kích thích mạnh việc sản xuất các globulin miễn dịch, không phụ thuộc vào typ HLA của bệnh nhân.

Biện pháp đạt được các mục đích nêu trên

Các tác giả sáng chế đã thu được peptit có 4 CTL epitop liên kết bằng cách liên kết, thông qua các tác nhân liên kết, 4 peptit được chọn trong số các CTL epitop peptit đã được thông báo là có khả năng kích thích đáp ứng CTL được giới hạn bởi siêu typ HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, hoặc HLA-A3 hoặc nhiều đáp ứng CTL được giới hạn bởi HLA-A. Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu tập trung vào peptit có 4 CTL epitop liên kết như vậy để đạt được các mục đích trên đây. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng peptit có 4 CTL epitop liên kết cấu thành từ 13 loại peptit cụ thể được chọn trong số các CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u đã biết có thể được sử dụng cho nhiều bệnh nhân ung thư mà không cần xác định typ HLA và không phụ thuộc vào typ HLA của bệnh nhân. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng việc sử dụng peptit có 4 CTL epitop liên kết này có thể kích thích mạnh việc sản xuất các globulin miễn dịch, ngoài các CTL đặc hiệu cho các CTL epitop peptit cấu thành nên peptit này. Do đó, sáng chế đã được hoàn thành.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các đối tượng sau.

[1] Peptit có 4 epitop liên kết, trong đó 4 epitop peptit được chọn, tùy ý và có thể trùng nhau, từ nhóm bao gồm các CTL epitop peptit: peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 (PEP1); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 (PEP2); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 (PEP4); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 (PEP5); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 (PEP6); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 (PEP7); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 (PEP8); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 (PEP9); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 (PEP10); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 (PEP13); peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 (PEP15);

peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 (PEP17); và peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 (PEP18), liên kết với nhau thông qua các tác nhân liên kết, peptit có 4 epitop liên kết này tùy ý chứa các trình tự peptit khác gồm các axit amin ưa nước, và peptit có 4 epitop liên kết này có một hoặc nhiều dấu hiệu được chọn từ các dấu hiệu từ (1) đến (5) dưới đây:

(1) peptit này chứa PEP2 ở đầu tận C (ngoại trừ peptit chứa PEP7 và PEP8 ở đầu tận N được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết);

(2) peptit này chứa PEP4 ở đầu tận C;

(3) peptit này chứa PEP10 ở đầu tận C;

(4) peptit này chứa PEP6 và PEP5 ở đầu tận C được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết; và

(5) peptit này chứa PEP5, PEP6, PEP9, và PEP18.

[2] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm [1], chứa 4 peptit không giống nhau được chọn trong số PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18.

[3] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm [1] hoặc [2] có dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu được chọn từ các dấu hiệu từ (1) đến (5) dưới đây:

(1) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit được chọn trong số PEP1, PEP7, PEP8, và PEP13, và PEP2 được đặt ở đầu tận C của peptit này (ngoại trừ peptit bao gồm PEP7 và PEP8 ở đầu tận N được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết);

(2) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit, PEP5, PEP6, và PEP9, và PEP4 được đặt ở đầu tận C của peptit này;

(3) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit được chọn trong số PEP1, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18, và PEP10 được đặt ở đầu tận C của peptit này;

(4) peptit này chứa 2 CTL epitop peptit, PEP1 và PEP7, và PEP6 và PEP5 được đặt cạnh nhau ở đầu tận C theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết; và

(5) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit, PEP5, PEP6, và PEP18, và PEP9 được đặt ở đầu tận C của peptit này.

[4] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [3], trong đó peptit này chứa trình tự được chọn từ các trình tự sau, trong đó "-(L)-" biểu thị tác nhân liên kết:

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4;
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4;
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4;
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4;
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4;
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4;
- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2;

- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10;
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10;
- PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9;
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9;

- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5; và

- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5.

[5] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [4], trong đó tác nhân liên kết là tác nhân liên kết axit amin.

[6] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [5], trong đó tác nhân liên kết axit amin là arginin dime hoặc arginin trime gồm hai hoặc ba gốc arginin liên kết với nhau.

[7] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [6], trong đó trình tự peptit khác gồm các axit amin ưa nước được liên kết với đầu tận N.

[8] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [7], trong đó trình tự peptit khác gồm các axit amin ưa nước được cấu thành từ arginin trime hoặc arginin tetrame gồm ba hoặc bốn gốc arginin liên kết với nhau.

[9] Peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [8], gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, hoặc SEQ ID NO: 66.

[10] CTL thu được bằng cách kích thích lympho bào máu ngoại vi sử dụng peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [9].

[11] Dược phẩm chứa, làm hoạt chất, peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [9] hoặc CTL theo điểm [10].

[12] Dược phẩm chứa hai hoặc nhiều peptit được chọn trong số peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [9].

[13] Dược phẩm theo điểm [11] hoặc [12], trong đó dược phẩm này là tác nhân trị liệu miễn dịch.

[14] Phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm cho bệnh nhân ung thư dùng peptit có 4 epitop liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [9], CTL theo điểm [10], hoặc dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [11] đến [13].

Phần mô tả của sáng chế này bao gồm một phần hoặc toàn bộ nội dung như được bộc lộ trong phần mô tả và/hoặc hình vẽ của các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2013-218524 và 2014-155132 - là các đơn ưu tiên của đơn sáng chế này.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế có thể cung cấp peptit kháng nguyên ung thư dùng làm vacxin peptit dùng cho bệnh ung thư mà có thể được sử dụng cho nhiều bệnh nhân ung thư và có thể kích thích mạnh việc sản xuất các globulin miễn dịch, không phụ thuộc vào typ HLA của bệnh nhân.

Peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng cho nhiều bệnh nhân ung thư mà không cần xác định typ HLA. Ví dụ về bệnh nhân như vậy bao gồm các bệnh nhân dương tính với HLA-A2, bệnh nhân dương tính với HLA-A24, bệnh nhân dương tính với HLA-A26, và bệnh nhân dương tính với siêu typ HLA-A3. Peptit như được mô tả trên đây có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư hoặc các bệnh gây ra bởi ung thư ở các bệnh nhân này. Ngoài ra, sự biểu hiện của các kháng nguyên khối u cấu thành nên peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế được quan sát thấy ở nhiều loại bệnh ung thư. Do đó, peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng làm dược phẩm (và cụ thể hơn, làm tác nhân trị liệu miễn dịch) để điều trị và/hoặc ngăn ngừa

nhều bệnh ung thư khác nhau. Ngoài ra, thông qua việc sử dụng peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, các CTL đặc hiệu CTL epitop peptit và globulin miễn dịch có thể được kích thích mạnh hơn, so với việc sử dụng hỗn hợp chứa lượng tương đương của các CTL epitop peptit, và tính miễn dịch kháng khối u có thể được hoạt hóa một cách hiệu quả hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1-1 thể hiện kết quả HPLC đối với peptit có 4 epitop liên kết thu được trong Ví dụ 1 (TPV06, TPV10, TPV12, TPV21, TPV26, TPV30, TPV35, TPV37, TPV39, TPV40, TPV41, TPV43, và TPV45).

Fig. 1-2 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-1.

Fig. 1-3 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-2.

Fig. 1-4 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-3.

Fig. 1-5 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-4.

Fig. 1-6 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-5.

Fig. 1-7 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 1-6.

Fig. 2-1 thể hiện kết quả của phép đo khối phổ (MS) đối với peptit có 4 epitop liên kết thu được trong Ví dụ 1 (TPV39, TPV40, TPV41, TPV43, và TPV45).

Fig. 2-2 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 2-1.

Fig. 2-3 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 2-2.

Fig. 3-1 thể hiện kết quả của sự kích thích CTL đặc hiệu epitop ở chuột thử nghiệm được cho sử dụng peptit có 4 epitop liên kết (*: chưa được kiểm tra). Fig. 3-1 còn thể hiện kết quả đánh giá thu được bằng cách phân cắt peptit có 4 epitop liên kết bằng proteasom miễn dịch của người và kiểm tra sự phân cắt đầu tận C của epitop peptit PEP2 hoặc PEP10 đã được nhận diện.

Fig. 3-2 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 3-1.

Fig. 3-3 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 3-2.

Fig. 3-4 thể hiện kết quả của sự kích thích CTL đặc hiệu epitop ở chuột thử nghiệm được cho sử dụng peptit có 4 epitop liên kết bao gồm trình tự peptit của gốc arginin ở đầu tận N hoặc peptit có 4 epitop liên kết bao gồm arginin trime làm tác nhân liên kết peptit-peptit (*: chưa được kiểm tra). Fig. 3-4 còn thể hiện kết quả đánh giá thu được bằng cách phân cắt peptit có 4 epitop liên kết bằng proteasom miễn dịch của người và kiểm tra sự phân cắt đầu tận C của epitop peptit PEP2 hoặc PEP10 đã được nhận diện.

Fig. 4-1 thể hiện kết quả thử nghiệm đo hiệu giá của kháng thể IgG đặc hiệu epitop trong huyết thanh của chuột thử nghiệm được cho sử dụng peptit có 4 epitop liên kết này.

Fig. 4-2 là hình vẽ tiếp nối từ Fig. 4-1.

Fig. 4-3 thể hiện kết quả thử nghiệm hiệu giá của kháng thể IgG đặc hiệu epitop trong huyết thanh của chuột thử nghiệm được cho sử dụng peptit có 4 epitop liên kết bao gồm trình tự peptit của gốc arginin ở đầu tận N hoặc peptit có 4 epitop liên kết bao gồm arginin trime làm tác nhân liên kết peptit-peptit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả một cách chi tiết hơn.

1. Peptit có 4 CTL epitop liên kết

Theo sáng chế, "peptit có 4 CTL epitop liên kết" nghĩa là 4 peptit được chọn trong số các CTL epitop peptit có nguồn gốc từ các phân tử kháng nguyên khối u giống nhau hoặc khác nhau được liên kết tuyến tính thông qua các tác nhân liên kết dưới dạng phân tử đơn.

"CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u" là peptit thu được từ sự phân hủy kháng nguyên khối u trong các tế bào khối u, và nó được liên kết với phân tử HLA lớp I và được trình diện trên bề mặt tế bào. Do đó, nó được nhận biết bởi CTL đặc hiệu khối u và/hoặc nó có thể kích thích và/hoặc hoạt hóa CTL đặc hiệu khối u. "Sự kích thích CTL đặc hiệu khối u" chỉ sự biệt hóa

và/hoặc tăng sinh của các CTL nhận biết một cách đặc hiệu các CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u *in vitro* hoặc *in vivo*. Ngoài ra, "sự hoạt hóa CTL đặc hiệu khối u" chỉ sự sản xuất interferon- γ (IFN- γ) và/hoặc sự biểu lộ hoạt tính gây độc tế bào do sự giải phóng các chất gây độc tế bào hoặc các chất tương tự khi CTL nhận biết kháng nguyên được trình diện bởi phân tử HLA lớp I. "CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u" được sử dụng ở đây đôi khi được gọi là "CTL epitop peptit."

Để làm CTL epitop peptit có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u, đã biết các peptit như nêu dưới đây:

PEP1: KLVERLGAA (SEQ ID NO: 1 [WO 2001/011044]);

PEP2: ASLDSDPWV (SEQ ID NO: 2 [WO 2002/010369]);

PEP3: ALVEFEDVL (SEQ ID NO: 3 [WO 2002/010369]);

PEP4: LLQAEAPRL (SEQ ID NO: 4 [WO 2000/12701]);

PEP5: DYSARWNEI (SEQ ID NO: 5 [JP H11-318455 A (1999)]);

PEP6: VYDYNCHVDL (SEQ ID NO: 6 [WO 2000/12701]);

PEP7: LYAWEPSFL (SEQ ID NO: 7 [JP 2000-000270 A]);

PEP8: DYLRSVLEDF (SEQ ID NO: 8 [WO 2001/011044]);

PEP9: QIRPIFSNR (SEQ ID NO: 9 [WO 2008/007711]);

PEP10: ILEQSGEWWK (SEQ ID NO: 10 [WO 2009/022652]);

PEP11: VIQNLERGYR (SEQ ID NO: 11 [WO 2009/022652]);

PEP12: KLKHYGPGWV (SEQ ID NO: 12 [WO 1999/067288]);

PEP13: RLQEWCSVI (SEQ ID NO: 13 [WO 2002/010369]);

PEP14: ILGELREKV (SEQ ID NO: 14 [WO 2002/010369]);

PEP15: DYVREHKDNI (SEQ ID NO: 15 [WO 2005/071075]);

PEP16: HYTNASDGL (SEQ ID NO: 16 [WO 2001/011044]);

PEP17: NYSVRYRPGL (SEQ ID NO: 17 [JP 2000-000270 A]);

PEP18: RYLTQETNKV (SEQ ID NO: 18 [JP 2007-145715 A]); và

PEP19: TFDYLRSVL (SEQ ID NO: 19 [WO 2001/011044]).

PEP1, PEP2, PEP3, PEP4, PEP5, PEP8, PEP10, PEP12, PEP13, PEP14, và PEP15 được giới hạn bởi HLA-A2 và sau đó, các CTL có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. PEP2, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP12, PEP13, PEP15, PEP16, PEP17, PEP18, và PEP19 được giới hạn bởi HLA-A24 và sau đó, các CTL có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP9, PEP10, PEP11, PEP12, PEP13, PEP15, và PEP16 được giới hạn bởi siêu typ HLA-A3 và sau đó, các CTL có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. Ngoài ra, PEP2 và PEP6 được giới hạn bởi HLA-A26 và sau đó, các CTL có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. Sự biểu hiện của các gen mã hóa CTL epitop peptit này được quan sát thấy ở nhiều loại bệnh ung thư (Yang, D. et al., Cancer Res., 1999, 59: 4056-63; Harashima, N. et al., Eur. J. Immunol., 2001, 31 (2), 323-32).

Nhiều loại peptit có 4 CTL epitop liên kết thu được bằng cách liên kết tuyến tính 4 loại CTL epitop peptit được chọn trong số 13 loại CTL epitop peptit cụ thể được mô tả trên đây thông qua các tác nhân liên kết dưới dạng phân tử đơn có thể đóng vai trò làm "peptit có 4 CTL epitop liên kết" theo sáng chế. 3 trong số nhiều CTL đặc hiệu đối với các CTL epitop peptit liên quan có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. Peptit không thể đánh giá được trực tiếp khả năng kích thích đặc hiệu CTL epitop-peptit (tức là, PEP2 và PEP10) có thể được cho qua thử nghiệm phân cắt bằng proteasom miễn dịch (Ví dụ 3), để xác định sự xuất hiện của các kích thích CTL đặc hiệu epitop-peptit. Nhìn chung, đã biết rằng protein kháng nguyên khi kết hợp vào các tế bào trình diện kháng nguyên sẽ bị phân cắt bằng proteasom hoặc proteasom miễn dịch, và quy trình này được biết là không thể thiếu để protein kháng nguyên đã kết hợp trình diện kháng nguyên được điều tiết bởi HLA (ví dụ, Rock K.L., York, I.A., Goldberg, A.L., Nat. Immunol., 2004, 5(7): 670-677). Cần phải đảm bảo rằng các CTL epitop peptit sẽ bị phân cắt ở các vị trí thích hợp, để cho phép các epitop peptit này liên kết với các nhóm HLA. Cũng

cần phải xác định được các axit amin đầu tận C của các CTL epitop peptit là kết quả của việc phân cắt bằng proteasom hoặc proteasom miễn dịch (Rock K.L., York, I.A., Goldberg, A.L., Nat. Immunol., 2004, 5(7): 670-677). Cũng có giả định cho rằng các CTL epitop peptit sẽ được trình diện bởi các tế bào tua nhánh khi peptit có 4 epitop liên kết được sử dụng cho người. Trên cơ sở của giả định này, các mẫu phân cắt của peptit có 4 epitop liên kết được phân tích *in vitro* bằng cách sử dụng proteasom miễn dịch được biểu hiện trong các tế bào tua nhánh ở mức cao. Khi các CTL epitop peptit xuất hiện dưới dạng là kết quả của việc phân cắt bằng proteasom miễn dịch, thì có thể xác định được rằng các CTL đặc hiệu đối với các epitop peptit này đã được kích thích.

Trong phần mô tả này, 4 loại CTL epitop peptit được chọn trong số 13 loại CTL epitop peptit cụ thể được chọn, tùy ý và có thể trùng nhau, từ trong số peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 (PEP1), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 (PEP2), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 (PEP4), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 (PEP5), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 (PEP6), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 (PEP7), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 (PEP8), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 (PEP9), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 (PEP10), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 (PEP13), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 (PEP15), peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 (PEP17), và peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 (PEP18).

Theo sáng chế, peptit có trình tự axit amin có đoạn thay thế, cài xen, xóa bỏ, và/hoặc cộng thêm của một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin của PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, hoặc PEP18 và có khả năng kích thích CTL và khả năng kích thích sự sản xuất globulin miễn dịch tương đương với hoặc cao hơn so với khả năng của peptit gốc có thể được sử dụng làm "CTL epitop peptit." Thuật ngữ "nhiều" được sử dụng ở đây chỉ từ 1 đến 3, và tốt hơn là 1 hoặc 2. Ví dụ về peptit như vậy là peptit thu được bằng cách thay thế các axit amin có các tính chất tương tự với các tính chất của axit amin gốc (tức là, peptit thu được bằng cách thay thế axit amin bảo toàn).

Peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế bao gồm 4 epitop peptit được

chọn, tùy ý và có thể trùng nhau, từ trong số PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18 được liên kết tuyến tính thông qua các tác nhân liên kết.

Có thể sử dụng tác nhân liên kết bất kỳ, với điều kiện là nó được phân cắt trong quá trình sử dụng peptit có 4 CTL epitop liên kết cho sinh vật, và các CTL epitop peptit đã được liên kết có thể được tách riêng khỏi nhau. Ví dụ về tác nhân liên kết bao gồm liên kết este, liên kết ete, liên kết amit, tác nhân liên kết chuỗi đường, tác nhân liên kết polyetylen glycol, và tác nhân liên kết axit amin. Ví dụ về trình tự axit amin được sử dụng làm tác nhân liên kết axit amin bao gồm arginin dime, arginin trime, arginin tetrame, lysin dime, lysin trime, lysin tetrame, glyxin dime, glyxin trime, glyxin tetrame, glyxin pentame, glyxin hexame, alanin-alanin-tyrosin (AAY), isoleuxin-leuxin-alanin (ILA), và arginin-valin-lysin-arginin (RVKR), trong đó arginin dime hoặc trime là được ưu tiên.

Các CTL epitop peptit được chọn và cách sắp xếp của nó có thể được xác định bằng cách sử dụng peptit có 4 epitop liên kết thu được bằng cách tổng hợp epitop trong hỗn hợp đã cho và theo thứ tự đã cho cho chuột chuyển gen HLA-A của người và đánh giá sự xuất hiện kích thích CTL đặc hiệu CTL epitop peptit *in vivo*.

Tốt hơn là, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có một hoặc nhiều dấu hiệu được chọn từ các dấu hiệu từ (1) đến (5) dưới đây:

(1) peptit này chứa PEP2 ở đầu tận C (ngoại trừ peptit chứa PEP7 và PEP8 ở đầu tận N được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết);

(2) peptit này chứa PEP4 ở đầu tận C;

(3) peptit này chứa PEP10 ở đầu tận C;

(4) peptit này chứa PEP6 và PEP5 ở đầu tận C được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết; và

(5) peptit này chứa PEP5, PEP6, PEP9, và PEP18.

Tốt hơn nữa là, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có dấu hiệu được chọn từ các dấu hiệu từ (1) đến (5) dưới đây:

(1) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit được chọn trong số PEP1, PEP7, PEP8, và PEP13 và, ở đầu tận C, PEP2 (ngoại trừ peptit bao gồm PEP7 và PEP8 ở đầu tận N được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết);

(2) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit, PEP5, PEP6, và PEP9, và, ở đầu tận C, PEP4;

(3) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit được chọn trong số PEP1, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18 và, ở đầu tận C, PEP10;

(4) peptit này chứa 2 CTL epitop peptit, PEP1 và PEP7, và PEP6 và PEP5 ở đầu tận C được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết; và

(5) peptit này chứa 3 CTL epitop peptit, PEP5, PEP6, và PEP18, và, ở đầu tận C, PEP9.

Tốt hơn nữa, nếu peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế bao gồm hoặc gồm trình tự được chọn trong số các trình tự sau, trong đó "-(L)-" biểu thị tác nhân liên kết:

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4 (TPV01);
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4 (TPV02);
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4 (TPV03);
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4 (TPV04);
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4 (TPV05);
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4 (TPV06);
- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV07);

- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV08);
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV09);
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2 (TPV10);
- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV11);
- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV12);
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV13);
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV14);
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2 (TPV15);
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV16);
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV17);
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV18);
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV19);
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV20);
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV21);
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV22);
- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV23);
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV24);
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV25);
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10 (TPV26);
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV27);
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10 (TPV28);

- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV29);
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10 (TPV30);
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV31);
- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV32);
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV33);
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10 (TPV34);
- PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9 (TPV35);
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9 (TPV36);
- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5 (TPV37); và
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5 (TPV38).

Peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế có thể còn bao gồm trình tự peptit gồm các axit amin ưa nước. Trình tự peptit này có thể được bổ sung vào đầu tận N và/hoặc đầu tận C của peptit có 4 CTL epitop liên kết, và tốt hơn nữa là được bổ sung vào đầu tận N. Trình tự peptit này gồm từ 1 đến 15, tốt hơn là từ 2 đến 10, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 5 axit amin ưa nước được chọn từ nhóm bao gồm arginin, histidin, lysin, threonin, tyrosin, serin, asparagin, glutamin, axit aspartic, và axit glutamic. Ví dụ, arginin trime (RRR) hoặc arginin tetrame (RRRR) có thể được sử dụng làm trình tự peptit này. Ví dụ về peptit có 4 CTL epitop liên kết chứa trình tự peptit này bao gồm RRR-TPV06, RRRR-TPV06, TPV06-RRR, TPV06-RRRR, RRR-TPV10, RRRR-TPV10, TPV10-RRR, TPV10-RRRR, RRR-TPV12, RRRR-TPV12, TPV12-RRR, TPV12-RRRR, RRR-TPV21, RRRR-TPV21, TPV21-RRR, TPV21-RRRR, RRR-TPV26, RRRR-TPV26, TPV26-RRR, TPV26-RRRR, RRR-TPV30, RRRR-TPV30, TPV30-RRR, TPV30-RRRR, KKK-TPV06, KKKK-TPV06, TPV06-KKK, TPV06-KKKK, KKK-TPV10, KKKK-TPV10, TPV10-KKK, TPV10-KKKK, KKK-TPV12, KKKK-TPV12, TPV12-KKK, TPV12-KKKK, KKK-TPV21, KKKK-TPV21, TPV21-KKK, TPV21-KKKK, KKK-TPV26, KKKK-TPV26, TPV26-KKK, TPV26-KKKK, KKK-TPV30, KKKK-TPV30, TPV30-KKK, TPV30-

KKKK, HHH-TPV06, HHHH-TPV06, TPV06-HHH, TPV06-HHHH, HHH-TPV10, HHHH-TPV10, TPV10-HHH, TPV10-HHHH, HHH-TPV12, HHHH-TPV12, TPV12-HHH, TPV12-HHHH, HHH-TPV21, HHHH-TPV21, TPV21-HHH, TPV21-HHHH, HHH-TPV26, HHHH-TPV26, TPV26-HHH, TPV26-HHHH, HHH-TPV30, HHHH-TPV30, TPV30-HHH, TPV30-HHHH, RRKK-TPV12, RKRK-TPV12, RHRH-TPV12, RRHH-TPV12, KKHH-TPV12, và KHKH-TPV12, trong đó KKK-TPV06, KKKK-TPV06, KKK-TPV10, KKKK-TPV10, KKK-TPV12, KKKK-TPV12, KKK-TPV21, KKKK-TPV21, KKK-TPV26, KKKK-TPV26, KKK-TPV30, KKKK-TPV30, HHH-TPV06, HHHH-TPV06, HHH-TPV10, HHHH-TPV10, HHH-TPV12, HHHH-TPV12, HHH-TPV21, HHHH-TPV21, HHH-TPV26, HHHH-TPV26, HHH-TPV30, HHHH-TPV30, RRKK-TPV12, RKRK-TPV12, RHRH-TPV12, RRHH-TPV12, KKHH-TPV12, và KHKH-TPV12 là được ưu tiên, và RRR-TPV06, RRRR-TPV06, RRR-TPV10, RRRR-TPV10, RRR-TPV12, RRRR-TPV12, TRRR-TPV21, RRRR-TPV21, RRR-TPV26, RRRR-TPV26, RRR-TPV30, và RRRR-TPV30 được ưu tiên hơn. Đã biết là peptit chứa trình tự peptit này có độ hòa tan cải thiện trong dung môi gốc nước (Abdelkrim Alileche et al., *Peptides* 38, 2012, 302-311; JP 2006-188507 A). Nhờ việc bổ sung trình tự peptit này vào peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế, mức độ hòa tan của peptit có 4 CTL epitop liên kết trong dung môi gốc nước có thể được cải thiện.

Trong peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, CTL đặc hiệu CTL epitop peptit có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa trong ít nhất ba loại, và tốt hơn là bốn loại CTL epitop peptit của 4 loại CTL epitop peptit liên kết. Ngoài ra, sự sản xuất globulin miễn dịch đặc hiệu đối với mỗi CTL epitop peptit có thể được kích thích. Theo sáng chế, thuật ngữ "globulin miễn dịch" chỉ IgG, IgM, IgA, hoặc IgD.

Peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có thể là muối cộng axit hoặc muối cộng bazơ. Ví dụ về axit thường được sử dụng để tạo thành muối cộng axit bao gồm axit hữu cơ, như axit clohydric, axit bromhydric, axit hydriodic, axit oxalic, axit p-bromophenyl sulfonic, axit carboxylic, axit succinic, axit xitric, axit benzoic, axit axetic, và axit trifloaxetic. Ví dụ về muối cộng bazơ bao gồm muối được tạo ra từ bazơ vô cơ, như amoni hydroxit, hydroxit kim loại kiềm, hydroxit kim loại

kiềm thổ, cacbonat, và bicacbonat.

2. Sản xuất peptit có 4 CTL epitop liên kết

Peptit có 4 CTL epitop liên kết theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, tổng hợp peptit, như tổng hợp pha lỏng hoặc tổng hợp pha rắn, hoặc tổng hợp peptit sử dụng thiết bị tổng hợp peptit tự động (Kelley et al., *Genetics Engineering Principles and Methods*, Setlow, J. K. eds., Plenum Press NY., 1990, Vol. 12, pp. 1-19; Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 1989, W. H. Freeman Co.; Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1985, 82: p. 5132, "Shin Seikagaku Jikken Kouza (New Biochemical Experiment) 1, Protein IV, 1992, the Japanese Biochemical Society (ed.), Tokyo Kagaku Doujin). Tổng hợp peptit được thực hiện bằng cách điều chế các axit amin trong đó các nhóm chức khác với nhóm α -amino và nhóm α -carboxyl được liên kết của các axit amin này được bảo vệ và tạo thành liên kết peptit giữa nhóm α -amino và nhóm α -carboxyl của các axit amin này. Nhìn chung, nhóm carboxyl của gốc axit amin nằm ở đầu tận C của peptit được liên kết với pha rắn thông qua đoạn đệm hoặc tác nhân liên kết thích hợp. Nhóm bảo vệ ở đầu tận amino của dipeptit thu được trên đây được loại bỏ một cách chọn lọc và liên kết peptit được tạo thành giữa đầu tận amino và nhóm α -carboxyl của gốc axit amin tiếp theo. Quy trình này được tiếp tục để tạo ra peptit với nhóm bên được bảo vệ, và cuối cùng, tất cả các nhóm bảo vệ đều được loại bỏ và tách khỏi pha rắn. Các loại nhóm bảo vệ, phương pháp bảo vệ các nhóm này, và phương pháp liên kết peptit được mô tả chi tiết trong các tài liệu đã được đề cập trên đây.

Theo cách khác, peptit có thể được sản xuất thông qua kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc các kỹ thuật khác sử dụng axit nucleic mã hóa peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế.

Kỹ thuật tái tổ hợp di truyền bao gồm cài xen ADN mã hóa peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế vào vector biểu hiện thích hợp, đưa vector này vào tế bào chủ thích hợp, nuôi cấy tế bào này, và thu hồi peptit đích từ các tế bào này hoặc dịch lỏng ngoại bào. Ví dụ về vector bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vector plasmit, thể thực khuẩn, cosmid, phagemid, và virus. Vector được đưa vào tế bào chủ, như tế bào chủ vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *Bacillus subtilis*), tế bào nấm men, tế bào côn trùng,

tế bào động vật (ví dụ, tế bào động vật có vú), và tế bào thực vật. Biến nạp hoặc chuyển nhiễm vào các tế bào này được tiến hành thông qua, ví dụ, phương pháp canxi phosphat, đực lỗ điện, phương pháp thể mỡ, phương pháp súng bắn hạt, hoặc phương pháp PEG. Các tế bào đã được biến nạp được nuôi cấy theo kỹ thuật thông thường để nuôi cấy sinh vật chủ. Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc thu hồi peptit theo sáng chế, tốt hơn nếu peptit tạo ra thông qua sự biểu hiện được tiết ngoại bào. Để đạt được mục đích này, ADN mã hóa trình tự peptit mà làm cho peptit có thể được tiết ra khỏi tế bào được liên kết với phía đầu tận 5' của ADN mã hóa peptit đích. Theo cách khác, peptit đích tích lũy trong tế bào có thể được thu hồi. Trong trường hợp này, các tế bào được phá vỡ theo cách vật lý hoặc hóa học và peptit đích được thu hồi thông qua kỹ thuật tinh chế protein.

Peptit thu được theo cách như vậy có thể được thu hồi hoặc tinh chế bằng kỹ thuật thông thường, ví dụ, kỹ thuật sắc ký, như sắc ký lọc gel, sắc ký cột trao đổi ion, sắc ký ái lực, sắc ký cột pha đảo, hoặc HPLC, cắt phân đoạn với amoni sulfat, siêu lọc, hoặc hấp phụ miễn dịch.

3. Lympho bào T gây độc tế bào

Nhờ việc sử dụng peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, các CTL đặc hiệu CTL epitop peptit phá hủy tế bào ung thư có thể thu được *in vitro* và/hoặc *ex vivo*. Phương pháp kích thích CTL sử dụng CTL epitop peptit *in vitro* và/hoặc *ex vivo* đã được biết (ví dụ, JP 2006-14637 A), và kỹ thuật này có thể được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ, tế bào kết dính với đĩa trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) có nguồn gốc từ các cá thể khỏe mạnh hoặc bệnh nhân ung thư được nuôi cấy trong điều kiện có mặt xytokin, như GM-CSF hoặc IL-4, để kích thích các tế bào tua nhánh (DC). Sau khi các tế bào tua nhánh đã được tạo xung với peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, tia x được chiếu vào các tế bào này, để tạo ra tế bào trình diện kháng nguyên (tác nhân kích thích). Khi không thể sử dụng DC, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) có nguồn gốc từ các cá thể khỏe mạnh hoặc bệnh nhân ung thư giống như vậy có thể được tạo xung với peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, tia X có thể được áp dụng vào đó, và các tế bào thu được có thể được sử dụng. Tiếp theo, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) có nguồn gốc từ các cá thể khỏe mạnh hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) có nguồn gốc

từ bệnh nhân ung thư hoặc lympho bào trong các hạch bạch huyết liên quan (tức là, chất đáp ứng) được bổ sung và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện có mặt xytokin, như IL-2, IL-4, hoặc IL-7. Sau đó, các tế bào trình diện kháng nguyên thu được thông qua việc tạo xung như được mô tả trên đây lại được kích thích bằng cách bổ sung peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế và được nuôi cấy tiếp trong điều kiện có mặt xytokin, như IL-2.

Môi trường bất kỳ trong đó các lympho bào T có thể tồn tại có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy tế bào dùng để kích thích CTL. Ví dụ, có thể sử dụng môi trường được điều chế bằng cách bổ sung các xytokin khác nhau (ví dụ, IL-2) và huyết thanh bào thai bê (FCS) vào môi trường RHAMa (môi trường LAK được mô tả trong Kawai, K., Sasaki, T., Saijo-Kurita, K., Akaza, H., Koiso, K., và Ohno, T., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35, 225-229, 1992), môi trường AIMV (GIBCO BRL, Life Technologies, INC.), hoặc môi trường RPMI 1640.

Có thể tiến hành nuôi cấy trong các điều kiện đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ 33°C đến 41°C, và tốt hơn là 37°C. Không khí chứa khí trơ hoặc oxy có nồng độ thích hợp và cacbon dioxid có nồng độ thích hợp (ví dụ, 5% CO₂) để điều chỉnh độ pH của môi trường đến khoảng 7,4 có thể được sử dụng làm pha khí. Tốt hơn là tiến hành nuôi cấy trong khoảng thời gian từ 4 đến 10 ngày, và tốt hơn nữa là 7 ngày hoặc 8 ngày. Một số CTL được kích thích thông qua sự nuôi cấy như vậy là CTL epitop peptit đặc hiệu đối với mỗi trong số ít nhất ba loại, và tốt hơn là bốn loại CTL epitop peptit trong số bốn loại CTL epitop peptit cấu thành nên peptit có 4 epitop liên kết, và do đó chúng có thể phá hủy một cách đặc hiệu các tế bào ung thư.

4. Dược phẩm

Peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng làm hoạt chất của dược phẩm được sử dụng để trị liệu miễn dịch ung thư.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa, làm (các) hoạt chất, một hoặc nhiều peptit có 4 epitop liên kết. Bằng cách bao gồm nhiều peptit có 4 epitop liên kết, có thể tạo ra tác dụng mạnh hơn. Ngoài ra, dược phẩm thu được có thể có thể tạo ra tính đa năng cao hơn, sao cho nó có thể được sử dụng làm vacxin peptit để điều trị bệnh

ung thư cho nhiều bệnh nhân ung thư, không phụ thuộc vào typ HLA của bệnh nhân.

Đã quan sát thấy là gen mã hóa PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18 được bao gồm trong peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế được biểu hiện trong nhiều loại bệnh ung thư dạng rắn và ung thư máu. Ví dụ về bệnh ung thư dạng rắn bao gồm u não, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến giáp, ung thư cổ tử cung, ung thư thân tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, khối u mô đệm dạ dày-ruột non (GIST), ung thư tụy, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư hậu môn, ung thư thận, ung thư gan, ung thư đường mật, ung thư đầu và cổ, ung thư bàng quang, ung thư tuyến tiền liệt, u melanin ác tính, ung thư da, ung thư lưỡi, sacom xương, sacom sụn, sacom sợi, sacom mỡ, sacom mạch, u nguyên bào cơ vân, và sacom cơ trơn. Ví dụ về ung thư máu bao gồm bệnh bạch cầu, u lympho ác tính, và u tủy. Do đó, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế hữu ích để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh ung thư như vậy. Thuật ngữ "điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư" được sử dụng ở đây chỉ việc ngăn ngừa sự phát triển/sự tái phát của bệnh ung thư, ngăn chặn sự tiến triển/trầm trọng của bệnh ung thư, hoặc cải thiện tình trạng bệnh ung thư.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa nguyên liệu được dụng, như các chất mang vô cơ hoặc hữu cơ phổ biến khác nhau. Ví dụ về chất mang dùng trong dược phẩm có thể được sử dụng bao gồm chất làm ổn định, chất kháng khuẩn, chất đệm, chất tạo đẳng trương, chất chelat hóa, chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt động bề mặt, chất độn, chất làm đặc, chất kết dính, chất làm ẩm, chất làm phân rã, chất có hoạt tính bề mặt, chất làm trơn, chất làm êm dịu, chất pha loãng, và chất phụ gia thường được sử dụng theo dạng sử dụng của các chế phẩm dược có liên quan. Các chế phẩm dược tốt hơn là được điều chế ở dạng chế phẩm được bổ sung các chất mang này theo kỹ thuật thông thường.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa tá dược đã biết là được sử dụng tại thời điểm dùng vaccin. Ví dụ về tá dược bao gồm Tá dược Freund hoàn chỉnh (CFA), Tá dược Freund không hoàn chỉnh (IFA), phèn, lipid A, monophosphoryl lipid A, các chế phẩm vi khuẩn như BCG (*Bacillus-Calmette-Guerrin*), axit nucleic

như CpG-ADN và dsARN, chế phẩm chứa các thành phần vi khuẩn như tuberculin, polyme có trong tự nhiên, như hemoxyanin hà và mannan nấm men, muramyl-tripeptit, muramyl-dipeptit, hoặc dẫn xuất của nó, phen, copolyme khối không ion, và xytokin như intolokin 2 (IL-2), yếu tố kích thích tạo dòng bạch cầu hạt-đại thực bào (GM-CSF), interferon- α (IFN- α), và interferon- β (IFN- β). Các tá dược này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp hai hoặc nhiều tá dược. Tá dược có thể được sử dụng đồng thời với dược phẩm theo sáng chế ở dạng hỗn hợp hoặc dưới dạng nhũ tương.

Ngoài peptit có 4 epitop liên kết, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u, peptit chứa chúng, hoặc peptit chứa CTL epitop peptit liên kết với nhau (sau đây, được gọi là "CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u"). Ví dụ về CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u bao gồm, nhưng không giới hạn ở, WT-1 p126-134, (M236Y) WT-1 p235-243 cải biến, NY-ESO-1 p157-165, (T210M) gp100 p209-217 cải biến, survivin-2B p80-88, Her-2/neu p63-71, VEGFR2 p169-177, MART-1 p26-35, Glypican-3 p298-306, và SPARC p143-151. Trong trường hợp này, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế và CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u có thể được chuẩn bị ở dạng chế phẩm đơn chất. Theo cách khác, chế phẩm chứa, làm hoạt chất, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có thể được tách riêng với chế phẩm chứa, làm hoạt chất, CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u.

Dạng liều lượng của dược phẩm theo sáng chế có thể được chọn theo dạng sử dụng. Ví dụ đại diện về các dạng liều lượng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chế phẩm lỏng, nhũ tương, chế phẩm liposom, nhũ tương lipid, phức hợp bao gồm xyclodextrin, huyền phù, thuốc mỡ, kem, chất hấp thụ qua da, chất hấp thụ qua màng nhày, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, thuốc bột, hạt, hạt mịn, và xi rô. Theo đường dùng, các dạng liều lượng này được phân loại tiếp thành dạng, ví dụ, chế phẩm dùng qua đường miệng, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, chế phẩm dùng qua mũi, chế phẩm dùng qua đường âm đạo, thuốc đạn, chế phẩm dùng dưới lưỡi, chế phẩm dùng để xông hít, chế phẩm nhỏ mắt, hoặc chế phẩm nhỏ tai, và

các chế phẩm này có thể được kết hợp, đúc khuôn, hoặc điều chế theo các kỹ thuật thông thường. Ngoài việc áp dụng ở dạng chế phẩm lỏng, chế phẩm như vậy có thể được sấy đông khô nhanh, để bảo quản chế phẩm được. Khi chế phẩm được như vậy được sử dụng, nó có thể được hòa tan nhờ, ví dụ, chất đệm chứa nước và nước muối sinh lý, để điều chỉnh nồng độ của nó đến mức thích hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa, làm hoạt chất, CTL được kích thích *in vitro* và/hoặc *ex vivo* nhờ sử dụng peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế. Dược phẩm như vậy tốt hơn là ở dạng chất dùng ngoài đường tiêu hóa.

5. Phương pháp điều trị

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho nhiều bệnh nhân ung thư, như bệnh nhân dương tính đối với các typ HLA được chọn từ nhóm bao gồm siêu typ HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26, và HLA-A3, và có thể bắt đầu điều trị mà không cần tiến hành định typ HLA trước khi điều trị.

Khi dược phẩm theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân ung thư, CTL đặc hiệu đối với ít nhất ba, và tốt hơn là bốn loại CTL epitop peptit cấu thành nên peptit có 4 epitop liên kết làm hoạt chất của dược phẩm có thể được kích thích và/hoặc hoạt hóa. Ngoài ra, sự sản xuất globulin miễn dịch đặc hiệu đối với các CTL epitop peptit liên quan có thể được kích thích. Mức độ kích thích sự sản xuất globulin miễn dịch khi sử dụng peptit có 4 epitop liên kết làm hoạt chất cao hơn một cách đáng kể so với mức kích thích sự sản xuất globulin miễn dịch được quan sát thấy khi sử dụng hỗn hợp của các CTL epitop peptit chứa trong peptit có 4 epitop liên kết nhưng không liên kết với nhau. Do đó, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có thể điều trị và/hoặc ngăn ngừa một cách hiệu quả bệnh ung thư ở bệnh nhân ung thư.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng thông qua, ví dụ, đường dùng qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, dưới da, trong da, dưới lưỡi, trong màng bụng, trong trực tràng, qua da, qua màng nhày, qua mũi, qua âm đạo, qua mắt, hoặc hít. Khi chế phẩm chứa, làm hoạt chất, nhiều peptit có 4 epitop liên kết hoặc CTL epitop peptit đã biết có nguồn gốc từ phân tử kháng nguyên khối u được bào chế ở dạng các dược phẩm riêng rẽ, các dược phẩm này có thể được

sử dụng đồng thời hoặc không đồng thời thông qua cùng đường dùng hoặc thông qua các đường dùng riêng rẽ.

Liều lượng của dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chỉnh một cách thích hợp theo các yếu tố như tình trạng bệnh/mức độ trầm trọng của bệnh ung thư cần được điều trị, độ tuổi của bệnh nhân, hoặc thể trọng của bệnh nhân. Ví dụ, dược phẩm chứa peptit có 4 epitop liên kết với lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 mg đến 1000 mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001 mg đến 100 mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 mg đến 50 mg, có thể được sử dụng lặp đi lặp lại một lần mỗi vài ngày, vài tuần, hoặc vài tháng. Khi dược phẩm theo sáng chế chứa, làm hoạt chất, CTL được kích thích *in vitro* và/hoặc *ex vivo* nhờ sử dụng peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế, tốt hơn nếu từ 2×10^6 đến 2×10^8 CTL được sử dụng cho mỗi kg thể trọng mỗi ngày ở khoảng cách từ 1 đến 2 tuần.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân ung thư kết hợp với các sản phẩm dược thường được sử dụng đối với hóa trị liệu ung thư. Ví dụ về các sản phẩm dược này bao gồm: chất alkyl hóa, như xyclophosphamit, temozolomit, và bendamustin; chất chống chuyển hóa, như tegafur-uraxil, tegafur-gimeraxil-oteraxil kali, methotrexat, và gemxitabin; thuốc chứa platin, như cisplatin và oxaliplatin; chế phẩm alkaloit thực vật, như irinotecan, eribulin, paclitaxel, docetaxel, và vincristin; chất kháng sinh ức chế ung thư biểu mô, như doxorubixin, bleomyxin, và actinomycin D; thuốc nhắm đích phân tử, như imatinib, sunitinib, gefitinib, sorafenib, everolimus, trastuzumab, bevacizumab, rituximab, cetuximab, panitumumab, và mogamulizumab; chất trị liệu hormon, như bicalutamit, estramustin, và exemestan; và chất kích thích miễn dịch, như lenthinan, Picibanil, và Krestin. Các sản phẩm dược này có thể được sử dụng đồng thời hoặc không đồng thời với dược phẩm theo sáng chế thông qua cùng đường dùng hoặc thông qua các đường dùng riêng rẽ.

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ, mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng hợp và tinh chế peptit

Các CTL epitop peptit và peptit có 4 epitop liên kết được tổng hợp bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit có sẵn trên thị trường (Prelude, Protein Technologies, Inc.) bằng phương pháp tổng hợp pha rắn (Fmoc). Cụ thể, nhựa Alko-PEG được để cho hấp phụ axit amin với nhóm có hoạt tính đã được bảo vệ, dung dịch khử bảo vệ được bơm vào đó, để loại bỏ nhóm bảo vệ, axit amin với nhóm có hoạt tính được bảo vệ được bơm vào đó, và chúng được để cho phản ứng với nhau, để tổng hợp dipeptit. Bằng cách lặp lại quy trình này, peptit chứa trình tự quan tâm được tổng hợp. Nhóm bảo vệ peptit được loại bỏ bằng cách tiến hành phản ứng trong dung dịch khử bảo vệ chứa 2,5% triisopropylsilan, 2,5% nước, và 95% axit trifloaxetic trong 2 giờ. Nhờ bổ sung ete lạnh vào dịch lọc thu được, peptit được thu hồi ở dạng chất kết tủa. Các peptit tổng hợp khác nhau thu được được tinh chế bằng cách sử dụng cột YMC-Pack Pro C18 (YMC Co., Ltd.) và hệ HPLC (Gilson) với dung dịch gốc nước chứa TFA 0,1% và axetonitril làm pha động. Sau quy trình tinh chế cuối cùng, độ tinh khiết và khối lượng phân tử của peptit được phân tích bởi hệ thống LC-MS (Waters Acquity UPLC system, micromass ZQ). Peptit được làm đông khô nhanh, được bảo quản ở nhiệt độ lạnh trong bóng tối, và sau đó được cho qua các ví dụ được mô tả dưới đây. Các Bảng 1-1 đến 1-8 thể hiện số liệu phổ MS của peptit có 4 epitop liên kết (TPV01 đến TPV45). Fig. 1-1 đến 1-7 thể hiện số liệu LC của TPV06, TPV10, TPV12, TPV21, TPV26, TPV30, TPV35, TPV37, TPV39, TPV40, TPV41, TPV43, và TPV45. Fig. 2-1 đến 2-3 thể hiện số liệu MS của TPV39, TPV40, TPV41, TPV43, và TPV45.

Bảng 1-1 Số liệu MS

Peptit	Khối lượng phân tử	Theo tính toán		Đo được	
TPV01	5417,1	4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1355,8
		5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,9
		6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	904,1
		7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	678,3
TPV02		4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1355,5
		5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,3
		6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	904,1
		7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	775,2
		8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	ND
TPV03		4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1355,9
		5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,7
		6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	904,2
		7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	775,2
		8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	678,2
TPV04		4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1355,6
		5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,5
		6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	904,2
		7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	775,0
		8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	678,8
TPV05	4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1355,7	
	5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,7	
	6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	904,2	
	7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	775,1	
	8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	678,4	
TPV06	4H ⁺ ion	1355,5	4H ⁺ ion	1354,4	
	5H ⁺ ion	1084,4	5H ⁺ ion	1084,2	
	6H ⁺ ion	903,8	6H ⁺ ion	903,5	
	7H ⁺ ion	774,9	7H ⁺ ion	774,6	
	8H ⁺ ion	678,1	8H ⁺ ion	ND	

Bảng 1-2

TPV07	5209,9	4H ⁺ ion	1303,5	4H ⁺ ion	1304,3
		5H ⁺ ion	1043,0	5H ⁺ ion	1043,3
		6H ⁺ ion	869,3	6H ⁺ ion	869,8
		7H ⁺ ion	745,3	7H ⁺ ion	745,7
		8H ⁺ ion	652,2	8H ⁺ ion	652,5
TPV08		4H ⁺ ion	1303,5	4H ⁺ ion	1303,8
		5H ⁺ ion	1043,0	5H ⁺ ion	1043,5
		6H ⁺ ion	869,3	6H ⁺ ion	870,2
		7H ⁺ ion	745,3	7H ⁺ ion	745,2
		8H ⁺ ion	652,2	8H ⁺ ion	649,5
TPV09		4H ⁺ ion	1303,5	4H ⁺ ion	1304,1
		5H ⁺ ion	1043,0	5H ⁺ ion	1043,5
		6H ⁺ ion	869,3	6H ⁺ ion	869,8
		7H ⁺ ion	745,3	7H ⁺ ion	745,5
		8H ⁺ ion	652,2	8H ⁺ ion	652,7
TPV10		4H ⁺ ion	1303,5	4H ⁺ ion	1304,0
		5H ⁺ ion	1043,0	5H ⁺ ion	1043,4
		6H ⁺ ion	869,3	6H ⁺ ion	869,6
		7H ⁺ ion	745,3	7H ⁺ ion	745,7
		8H ⁺ ion	652,2	8H ⁺ ion	670,7
TPV11		4H ⁺ ion	1303,5	4H ⁺ ion	1304,1
		5H ⁺ ion	1043,0	5H ⁺ ion	1043,4
		6H ⁺ ion	869,3	6H ⁺ ion	869,7
		7H ⁺ ion	745,3	7H ⁺ ion	745,6
		8H ⁺ ion	652,2	8H ⁺ ion	652,6

Bảng 1-3

TPV12	5387,1	4H ⁺ ion	1347,8	4H ⁺ ion	1347,6
		5H ⁺ ion	1087,4	5H ⁺ ion	1078,1
		6H ⁺ ion	898,9	6H ⁺ ion	898,7
		7H ⁺ ion	770,6	7H ⁺ ion	770,2
		8H ⁺ ion	674,4	8H ⁺ ion	ND
TPV13		4H ⁺ ion	1347,8	4H ⁺ ion	1348,5
		5H ⁺ ion	1087,4	5H ⁺ ion	1079,1
		6H ⁺ ion	898,9	6H ⁺ ion	899,3
		7H ⁺ ion	770,6	7H ⁺ ion	771,6
		8H ⁺ ion	674,4	8H ⁺ ion	674,1
TPV14		4H ⁺ ion	1347,8	4H ⁺ ion	1348,5
		5H ⁺ ion	1087,4	5H ⁺ ion	1079,1
		6H ⁺ ion	898,9	6H ⁺ ion	899,5
		7H ⁺ ion	770,6	7H ⁺ ion	770,9
		8H ⁺ ion	674,4	8H ⁺ ion	674,7
TPV15		4H ⁺ ion	1347,8	4H ⁺ ion	1349,1
		5H ⁺ ion	1087,4	5H ⁺ ion	1079,0
		6H ⁺ ion	898,9	6H ⁺ ion	899,3
		7H ⁺ ion	770,6	7H ⁺ ion	771,2
		8H ⁺ ion	674,4	8H ⁺ ion	677,0
TPV16		4H ⁺ ion	1347,8	4H ⁺ ion	1348,6
		5H ⁺ ion	1087,4	5H ⁺ ion	1079,8
		6H ⁺ ion	898,9	6H ⁺ ion	899,7
		7H ⁺ ion	770,6	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	674,4	8H ⁺ ion	ND

Bảng 1-4

TPV17	5831,6	4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1168,1
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	973,9
		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	834,3
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	730,3
TPV18		4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1168,3
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	973,3
		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	722,6
TPV19		4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1167,8
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	973,4
		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	834,4
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	730,3
TPV20		4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1167,9
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	973,1
		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	834,2
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	730,2
TPV21		4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	-
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1167,8
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	973,3
		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	834,4
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	730,3
TPV22		4H ⁺ ion	1458,9	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1167,3	5H ⁺ ion	1168,0
		6H ⁺ ion	972,9	6H ⁺ ion	965,4

		7H ⁺ ion	834,1	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	730,0	8H ⁺ ion	719,4

Bảng 1-5

TPV23	5654,4	4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1132,7
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	944,0
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	809,2
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	708,8
TPV24		4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1132,5
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	944,8
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	809,4
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	ND
TPV25		4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1132,5
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	944,2
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	809,2
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	708,2
TPV26		4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1131,6
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	943,5
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	808,6
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	707,7
TPV27		4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1132,5
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	944,3
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	809,4
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	708,4

TPV28		4H ⁺ ion	1414,6	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1131,9	5H ⁺ ion	1133,1
		6H ⁺ ion	943,4	6H ⁺ ion	939,1
		7H ⁺ ion	808,8	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	707,8	8H ⁺ ion	ND

Bảng 1-6

TPV29	5804,6	4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1163,0
		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	969,1
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	837,0
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	ND
TPV30		4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1164,0
		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	968,9
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	825,3
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	ND
TPV31		4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1163,6
		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	969,1
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	830,7
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	ND
TPV32		4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1163,0
		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	969,2
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	830,5
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	727,0
TPV33		4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1162,7

TPV34		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	969,1
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	830,7
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	727,2
		4H ⁺ ion	1452,2	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1161,9	5H ⁺ ion	1171,8
		6H ⁺ ion	968,4	6H ⁺ ion	969,5
		7H ⁺ ion	830,2	7H ⁺ ion	ND
		8H ⁺ ion	726,6	8H ⁺ ion	726,8

Bảng 1-7

TPV35	5658,3	4H ⁺ ion	1415,6	4H ⁺ ion	ND	
		5H ⁺ ion	1132,7	5H ⁺ ion	1133,3	
		6H ⁺ ion	944,1	6H ⁺ ion	ND	
		7H ⁺ ion	809,3	7H ⁺ ion	808,6	
		8H ⁺ ion	708,3	8H ⁺ ion	ND	
TPV36		4H ⁺ ion	1415,6	4H ⁺ ion	ND	
		5H ⁺ ion	1132,7	5H ⁺ ion	1133,1	
		6H ⁺ ion	944,1	6H ⁺ ion	944,3	
		7H ⁺ ion	809,3	7H ⁺ ion	810,0	
		8H ⁺ ion	708,3	8H ⁺ ion	708,6	
TPV37		5358	4H ⁺ ion	1340,5	4H ⁺ ion	1340,8
			5H ⁺ ion	1072,6	5H ⁺ ion	1072,7
			6H ⁺ ion	894,0	6H ⁺ ion	ND
			7H ⁺ ion	766,4	7H ⁺ ion	766,4
			8H ⁺ ion	670,8	8H ⁺ ion	671,0
TPV38			4H ⁺ ion	1340,5	4H ⁺ ion	1340,7
			5H ⁺ ion	1072,6	5H ⁺ ion	1072,9
			6H ⁺ ion	894,0	6H ⁺ ion	894,1
			7H ⁺ ion	766,4	7H ⁺ ion	766,9

		8H ⁺ ion	670,8	8H ⁺ ion	670,7
TPV39	5855,6	4H ⁺ ion	1464,9	4H ⁺ ion	1465,7
		5H ⁺ ion	1172,1	5H ⁺ ion	1172,8
		6H ⁺ ion	976,9	6H ⁺ ion	977,5
		7H ⁺ ion	837,5	7H ⁺ ion	838,0
		8H ⁺ ion	733,0	8H ⁺ ion	733,4
TPV40	6011,8	4H ⁺ ion	1504,0	4H ⁺ ion	1504,7
		5H ⁺ ion	1203,4	5H ⁺ ion	1204,0
		6H ⁺ ion	1003,0	6H ⁺ ion	1003,5
		7H ⁺ ion	859,8	7H ⁺ ion	860,3
		8H ⁺ ion	752,5	8H ⁺ ion	752,8
TPV41	5855,6	4H ⁺ ion	1464,9	4H ⁺ ion	1465,4
		5H ⁺ ion	1172,1	5H ⁺ ion	1172,6
		6H ⁺ ion	976,9	6H ⁺ ion	977,3
		7H ⁺ ion	837,5	7H ⁺ ion	837,8
		8H ⁺ ion	733,0	8H ⁺ ion	733,2

Bảng 1-8

TPV42	5885,7	4H ⁺ ion	1472,4	4H ⁺ ion	1473,2
		5H ⁺ ion	1178,1	5H ⁺ ion	1178,8
		6H ⁺ ion	982,0	6H ⁺ ion	982,5
		7H ⁺ ion	841,8	7H ⁺ ion	842,3
		8H ⁺ ion	736,7	8H ⁺ ion	737,1
TPV43	6041,9	4H ⁺ ion	1511,5	4H ⁺ ion	ND
		5H ⁺ ion	1209,4	5H ⁺ ion	1210,0
		6H ⁺ ion	1008,0	6H ⁺ ion	1008,6
		7H ⁺ ion	864,1	7H ⁺ ion	864,6
		8H ⁺ ion	756,2	8H ⁺ ion	756,6
		4H ⁺ ion	1531,8	4H ⁺ ion	1532,5

TPV44	6123	5H ⁺ ion	1225,6	5H ⁺ ion	1226,3
		6H ⁺ ion	1021,5	6H ⁺ ion	1022,1
		7H ⁺ ion	875,7	7H ⁺ ion	876,2
		8H ⁺ ion	766,4	8H ⁺ ion	768,8
TPV45	6279,2	4H ⁺ ion	1570,8	4H ⁺ ion	1571,5
		5H ⁺ ion	1256,8	5H ⁺ ion	1257,5
		6H ⁺ ion	1047,5	6H ⁺ ion	1048,1
		7H ⁺ ion	898,0	7H ⁺ ion	898,5
		8H ⁺ ion	785,9	8H ⁺ ion	786,3

"ND" biểu thị "không phát hiện được"

Bảng 2 thể hiện trình tự axit amin của các CTL epitop peptit được tổng hợp, và Bảng 3 và 4 thể hiện trình tự axit amin của peptit có 4 epitop liên kết. Mỗi peptit có 4 epitop liên kết thể hiện trong Bảng 4 được điều chế, trong TPV12, TPV06, và TPV26 thể hiện trong Bảng 3, bằng cách bổ sung trình tự peptit gồm gốc arginin vào đầu tận N, và sử dụng arginin trime làm tác nhân liên kết giữa các peptit.

WT1 (SEQ ID NO: 20) được tổng hợp làm peptit đối chứng liên kết với HLA-A2 và Her2 (SEQ ID NO: 21) được tổng hợp làm peptit đối chứng liên kết với HLA-A24.

Bảng 2

Các CTL epitop peptit

Peptit	Nguồn gốc	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
PEP1	Lck-246	KLVERLGAA	SEQ ID NO: 1
PEP2	WHSC2-103	ASLDSDPWV	SEQ ID NO: 2
PEP4	SART3-302	LLQAEAPRL	SEQ ID NO: 4
PEP5	SART2-93	DYSARWNEI	SEQ ID NO: 5
PEP6	SART3-109	VYDYNCHVDL	SEQ ID NO: 6
PEP7	MRP3-503	LYAWEPSFL	SEQ ID NO: 7
PEP8	Lck-488	DYLRSVLEDF	SEQ ID NO: 8

PEP9	SART3-734	QIRPIFSNR	SEQ ID NO: 9
PEP10	Lck-90	ILEQSGEWWK	SEQ ID NO: 10
PEP13	UBE2V-43	RLQEWCSVI	SEQ ID NO: 13
PEP15	EGFR-800	DYVREHKDNI	SEQ ID NO: 15
PEP17	MRP3-1293	NYSVRYRPGL	SEQ ID NO: 17
PEP18	PTH-102	RYLTQETNKV	SEQ ID NO: 18
WT1	WT1-126	RMFPNAPYL	SEQ ID NO: 20
Her2	Her2-63	TYLPTNASL	SEQ ID NO: 21

Bảng 3

Peptit có 4 epitop liên kết

Peptit	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
TPV01	PEP5-RR-PEP6-RR-PEP9-RR-PEP4	SEQ ID NO: 22
TPV02	PEP9-RR-PEP5-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 23
TPV03	PEP6-RR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP4	SEQ ID NO: 24
TPV04	PEP6-RR-PEP9-RR-PEP5-RR-PEP4	SEQ ID NO: 25
TPV05	PEP9-RR-PEP6-RR-PEP5-RR-PEP4	SEQ ID NO: 26
TPV06	PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 27
TPV07	PEP1-RR-PEP7-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 28
TPV08	PEP1-RR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 29
TPV09	PEP7-RR-PEP1-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 30
TPV10	PEP8-RR-PEP7-RR-PEP1-RR-PEP2	SEQ ID NO: 31
TPV11	PEP8-RR-PEP1-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 32
TPV12	PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 33
TPV13	PEP8-RR-PEP13-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 34
TPV14	PEP13-RR-PEP7-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 35
TPV15	PEP8-RR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP2	SEQ ID NO: 36

TPV16	PEP13-RR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 37
TPV17	PEP13-RR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 38
TPV18	PEP13-RR-PEP18-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 39
TPV19	PEP15-RR-PEP13-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 40
TPV20	PEP15-RR-PEP18-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 41
TPV21	PEP18-RR-PEP13-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 42
TPV22	PEP18-RR-PEP15-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 43
TPV23	PEP1-RR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 44
TPV24	PEP1-RR-PEP18-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 45
TPV25	PEP15-RR-PEP1-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 46
TPV26	PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 47
TPV27	PEP18-RR-PEP1-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 48
TPV28	PEP18-RR-PEP15-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 49
TPV29	PEP15-RR-PEP17-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 50
TPV30	PEP15-RR-PEP13-RR-PEP17-RR-PEP10	SEQ ID NO: 51
TPV31	PEP17-RR-PEP15-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 52
TPV32	PEP17-RR-PEP13-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 53
TPV33	PEP13-RR-PEP17-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 54
TPV34	PEP13-RR-PEP15-RR-PEP17-RR-PEP10	SEQ ID NO: 55
TPV35	PEP6-RR-PEP18-RR-PEP5-RR-PEP9	SEQ ID NO: 56
TPV36	PEP6-RR-PEP5-RR-PEP18-RR-PEP9	SEQ ID NO: 57
TPV37	PEP1-RR-PEP7-RR-PEP6-RR-PEP5	SEQ ID NO: 58
TPV38	PEP7-RR-PEP1-RR-PEP6-RR-PEP5	SEQ ID NO: 59

"- RR-" biểu thị arginin dime.

Bảng 4

Peptit	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
TPV39	RRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 60
TPV40	RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 61
TPV41	PEP7-RRR-PEP13-RRR-PEP8-RRR-PEP2	SEQ ID NO: 62
TPV42	RRR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 63
TPV43	RRRR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 64
TPV44	RRR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 65
TPV45	RRRR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 66

"- RR-" biểu thị arginin dime.

"-RRR-" biểu thị arginin trime.

"RRR-" và "RRRR-" là trình tự peptit được bổ sung vào đầu tận N, tương ứng bao gồm 3 gốc arginin và 4 gốc arginin.

Ví dụ 2: Kích thích các CTL đặc hiệu epitop peptit ở chuột thử nghiệm và phát hiện các CTL bằng cách sử dụng ELISPOT

Peptit có 4 epitop liên kết được hòa tan trong nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) ở nồng độ 2 mg/mL hoặc nồng độ 4 mg/mL, và dung dịch thu được được nạp vào xy lanh B Braun Injekt. Sau khi lượng tương đương của Tá được Freund không hoàn chỉnh (IFA) được nạp vào xy lanh khác, các xy lanh này được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ nối xy lanh GP, và dung dịch chứa peptit có 4 epitop liên kết được trộn kỹ với IFA để tạo ra nhũ tương. Nhũ tương được sử dụng hằng tuần với lượng bằng 100 μ L mỗi lần cho chuột tại các vị trí thuộc vùng lân cận gốc đuôi của chuột (chuột chuyển gen HLA-A2.1 và chuột chuyển gen HLA-A24 (Taconic)), và sử dụng tổng cộng hai lần. Hạch bạch huyết bẹn được thu gom từ chuột 1 tuần sau lần sử dụng cuối. Huyền phù tế bào hạch bạch huyết được điều chỉnh đến 5×10^6 tế bào/mL sử dụng Môi trường hoàn chỉnh (RPMI-1640, FBS 10% được bất hoạt bằng nhiệt, penixilin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL, và 2-mercaptoetanol 50 μ M), CTL epitop peptit đích (nồng độ cuối

cùng: 10 $\mu\text{g/ml}$), IL-15 tái tổ hợp của chuột (nồng độ cuối cùng: 100 ng/mL), và IL-21 tái tổ hợp của chuột (nồng độ cuối cùng: 100ng/mL) được bổ sung, các tế bào này được gieo lên trên đĩa có 24 lỗ ở mật độ 1 ml/lỗ, và được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 8 ngày. Sau đó, các tế bào được thu gom và được gieo trên đĩa được cố định kháng thể kháng IFN- γ chứa trong bộ kit Murine IFN- γ ELISpot (GEN-PROBE) ở mật độ 1×10^5 tế bào/lỗ. Tiếp theo, tế bào lách thu được từ lách của chuột đồng gen và được chiếu xạ bằng 30-Gy tia X được dàn mỏng trên cùng đĩa ở mật độ 1×10^5 tế bào/lỗ làm các tế bào trình diện kháng nguyên, CTL epitop peptit đích hoặc peptit đối chứng âm (nồng độ cuối cùng: 10 $\mu\text{g/ml}$) được bổ sung, và được ủ trong thiết bị ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ qua đêm. Vào ngày hôm sau, các chấm biểu thị sự tồn tại của các tế bào sản xuất IFN- γ được nhuộm màu theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Số lượng chấm tế bào sản xuất IFN- γ được định lượng bằng cách sử dụng thiết bị phân tích ELISPOT (Immunospot S6, Cellular Technology Ltd.). Sự kích thích CTL đặc hiệu CTL epitop peptit được đánh giá là dương tính khi số lượng chấm tế bào sản xuất IFN- γ trong các lỗ được bổ sung CTL epitop peptit đích cao hơn một cách đáng kể so với số lượng quan sát thấy trong các lỗ được bổ sung peptit đối chứng âm (Kiểm định t Student, $p < 0,05$). WT1 hoặc Her2 được sử dụng làm peptit đối chứng âm. Để hiển thị hóa mức kích thích CTL, kết quả của phương trình sau được ký hiệu là " Δ " (số lượng các chấm tế bào sản xuất IFN- γ trung bình trong các lỗ được bổ sung CTL epitop peptit đích) - (số lượng các chấm tế bào sản xuất IFN- γ trung bình trong các lỗ được bổ sung peptit đối chứng âm). Các kết quả được thể hiện là dương tính trong trường hợp $10 \leq \Delta < 100$; dương tính mạnh trong trường hợp $100 \leq \Delta < 200$; và dương tính vừa phải trong trường hợp $200 \leq \Delta$.

Fig. 3-1 đến 3-4 thể hiện kết quả đánh giá sự kích thích CTL đặc hiệu CTL epitop peptit. Khi peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có một hoặc nhiều dấu hiệu được chọn trong số các dấu hiệu từ <1> đến <3> dưới đây, như được thể hiện trên Fig. 3-1 đến 3-4, ít nhất 3 loại CTL trong số 4 loại CTL epitop peptit liên kết được kích thích.

<1> Peptit chứa PEP4 ở đầu tận C.

<2> Peptit chứa PEP6 và PEP5 ở đầu tận C được đặt cạnh nhau theo thứ tự này từ đầu tận N thông qua tác nhân liên kết.

<3> Peptit chứa PEP5, PEP6, PEP9, và PEP18.

Khi trình tự peptit gồm các gốc arginin được bổ sung thêm vào đầu tận N hoặc khi tác nhân liên kết peptit-peptit là arginin trime, như được thể hiện trên Fig. 3-4, CTL được kích thích một cách thỏa đáng như được mô tả trên đây.

Tuy nhiên, trong trường hợp peptit có 4 epitop liên kết có thứ tự liên kết được thể hiện trong CPV01 đến CPV16, sự kích thích CTL không được quan sát thấy trong ba hoặc nhiều peptit, như được thể hiện trên các Fig. 3-1 đến 3-3.

Cụ thể, ngay cả nếu peptit có 4 CTL epitop liên kết bao gồm 4 loại epitop peptit được chọn từ 13 loại epitop peptit cụ thể (PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18) (tức là, CPV14, CPV15, và CPV16), sự kích thích CTL không được quan sát thấy trong ba hoặc nhiều peptit trong peptit có 4 CTL epitop liên kết.

Ví dụ 3: Dự đoán vị trí phân cắt peptit bằng proteasom miễn dịch 20S của người (i20S)

Các mẫu phân cắt của peptit có 4 epitop liên kết được chuẩn bị theo cách được mô tả dưới đây. Cụ thể, peptit có 4 epitop liên kết được pha loãng đến nồng độ 66,7 $\mu\text{g/mL}$ bằng chất đệm phản ứng (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,8, MgAc_2 2 mM, dithiothreitol 2 mM), và dung dịch thu được được phân phối vào ống phản ứng với lượng bằng 300 μL cho mỗi ống. Proteasom miễn dịch 20S của người (hệ R&D) được bổ sung vào đó với lượng bằng 2 μg cho mỗi ống, các hỗn hợp được khuấy, và sau đó hỗn hợp thu được được ủ có lắc ở nhiệt độ 37°C trong 1, 2, hoặc 4 giờ. Sau đó, axit axetic được bổ sung với lượng bằng 30 μL cho mỗi ống, để dừng phản ứng enzym, và các mẫu được làm đông khô nhanh ngay trong tủ đông ở nhiệt độ -80°C.

Tiếp theo, các mẫu phân cắt thu được của peptit có 4 epitop liên kết được cấp vào hệ thống LC/MS-MS (Acquity UPLC system, Waters; Synapt G2 HDMS, Waters), để tiến hành phân tích tổng hợp khối lượng phân tử của các mảnh peptit.

Nhờ sử dụng phần mềm phân tích (MassLynx, ver. 4.1, SCN712, Waters), các mẫu được phân tích, và các mảnh peptit được xác định. Peptit có 4 epitop liên kết được đánh giá là có khả năng phân cắt được trong quá trình phát triển peptit bất kỳ trong đó epitop peptit được phân cắt, peptit chứa các gốc arginin được bổ sung vào đầu tận N của epitop peptit, hoặc peptit chứa arginin dime được bổ sung vào đầu tận N của epitop peptit, do kết quả của việc phân cắt bằng proteasom miễn dịch.

Các kết quả phân tích được tiến hành nhờ sử dụng proteasom miễn dịch như được thể hiện trên Fig. 3-1 đến 3-4 chứng tỏ rằng hai loại CTL epitop peptit, PEP2 và PEP10, cần được đặt ở các vị trí gần nhất với đầu tận C của peptit có 4 epitop liên kết, để xác định các axit amin đầu tận C của CTL epitop peptit quan tâm. Do đó, tốt hơn nếu PEP2 hoặc PEP10 được liên kết với đầu tận C của peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế.

Ví dụ 4: Chuẩn bị các hạt được cố định CTL epitop peptit

Peptit được cố định bên trên các vi cầu xMAP Multi-Analyte COOH (Luminex Corporation; sau đây được gọi là "các hạt") theo cách được mô tả dưới đây. Các hạt này được rửa bằng chất đệm MES (0,1 M MES-NaOH; pH 7,0), và sau đó, dịch nổi bề mặt được loại bỏ bằng cách ly tâm. Quy trình rửa này được lặp lại hai lần và sau đó các hạt được tạo huyền phù trong 75 μ L chất đệm MES. Dung dịch CTL epitop peptit (100 μ L, 1 mg/mL) và 5 μ L EDC 10 mg/mL (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) được bổ sung vào huyền phù hạt, sau đó là trộn kỹ. Sau đó, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 30°C qua đêm trong bóng tối. Sau khi loại bỏ dịch nổi bề mặt bằng cách ly tâm vào ngày hôm sau, 125 μ L Tris-HCl 1 M được bổ sung, và tiến hành ủ ở nhiệt độ 30°C trong bóng tối trong 30 phút. Sau khi dịch nổi bề mặt được loại bỏ lần nữa, các hạt được rửa hai lần bằng chất đệm rửa (PBS(-), Tween 20 0,05%) và được tạo huyền phù trong Immunoblock (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Kết quả là, hoàn thành việc cố định CTL epitop peptit.

Ví dụ 5: Xác định hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu CTL-epitop

Peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế được hòa tan trong nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) ở nồng độ 2 mg/mL, và dung dịch thu được

được nạp vào xy lanh B Braun Injekt. Sau khi lượng tương đương của IFA được nạp vào xy lanh khác, các xy lanh này được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ nối xy lanh GP, và dung dịch chứa peptit có 4 epitop liên kết được trộn kỹ với IFA để điều chế nhũ tương. Nhũ tương được sử dụng hằng tuần với lượng bằng 100 μ L mỗi lần cho chuột tại các vị trí thuộc vùng lân cận gốc đuôi của chuột CBF1 (C57BL/6 $\times$ Balb/c F1), và sử dụng tổng cộng ba lần. Máu được thu gom từ chuột 1 tuần sau lần sử dụng cuối để thu được các mẫu huyết thanh. Để làm các mẫu đối chứng, nhũ tương được điều chế bằng cách sử dụng hỗn hợp của 4 loại peptit được chọn trong số PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, và PEP18 (1 mg/mL mỗi loại), và nhũ tương thu được được sử dụng theo cùng phác đồ như với peptit có 4 epitop liên kết (nhóm được sử dụng hỗn hợp).

Các hạt được cố định CTL epitop peptit đã được pha loãng bằng Immunoblock được phân phối vào các lỗ của đĩa lọc có 96 lỗ. Các hạt đã được phân phối được rửa bằng chất đệm rửa, và, tiếp theo, 100 μ L các mẫu huyết thanh của chuột đã được pha loãng 200 lần bằng Immunoblock được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ trong 90 phút ở nhiệt độ 30°C có trộn ở tốc độ 600 vòng/phút. Sau 3 lần rửa đĩa bằng chất đệm rửa, bổ sung 100 μ L kháng IgG của chuột được biotin hóa (H+L) (Vector Laboratories) đã được pha loãng 500 lần bằng Immunoblock vào mỗi lỗ, và đĩa được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ 30°C có trộn ở tốc độ 600 vòng/phút. Sau 3 lần rửa đĩa bằng chất đệm rửa, bổ sung 100 μ L thể liên hợp streptavidin-R-phycoerythrin (Invitrogen) đã được pha loãng 500 lần bằng Immunoblock vào mỗi lỗ, và đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 30°C có trộn ở tốc độ 600 vòng/phút. Sau 3 lần rửa đĩa bằng chất đệm rửa, 100 μ L chất đệm rửa được bổ sung vào mỗi lỗ để tạo huyền phù các hạt, và đo cường độ huỳnh quang trung bình của PE liên kết đặc hiệu với các hạt có liên quan bằng cách sử dụng hệ Bio-Plex Suspension Array (BIO-RAD).

Kết quả đo hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu CTL-epitop là như được thể hiện trên các Fig. 4-1 đến 4-3. Fig. 4-1 đến 4-3 thể hiện mức độ sản xuất kháng thể IgG đặc hiệu CTL epitop so với mức độ của chuột thuộc nhóm đối chứng âm (sau đây được viết tắt là "nhóm IFA"). Các kết quả thu được từ nhóm IFA được cho sử

dụng nhũ tương điều chế được bằng cách trộn các lượng tương đương của IFA và nước cất (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) được so sánh với kết quả thu được theo cùng phác đồ điều trị như phác đồ điều trị đối với hỗn hợp CTL epitop peptit hoặc peptit có 4 epitop liên kết.

Như được thể hiện trên các Fig. 4-1 đến 4-3, sự kích thích sản xuất kháng thể IgG đặc hiệu CTL epitop là yếu và tần suất của nó là thấp trong nhóm được sử dụng hỗn hợp. Trái lại, khi peptit có 4 epitop liên kết được sử dụng, sự kích thích sản xuất kháng thể IgG đặc hiệu CTL epitop mạnh được quan sát thấy thường xuyên. Ngoài ra, lượng sản xuất IgG được thấy là cao hơn đáng kể (ví dụ, cao hơn khoảng 10 lần đến vài trăm lần so với lượng được quan sát thấy trong nhóm IFA) tùy thuộc vào loại peptit có 4 epitop liên kết được sử dụng.

Các kết quả này chứng tỏ rằng việc sử dụng peptit có 4 epitop liên kết có thể hoạt hóa tính miễn dịch kháng khối u mạnh hơn so với việc sử dụng hỗn hợp các CTL epitop peptit cấu thành nên peptit có 4 epitop liên kết.

Đối với bệnh nhân ung thư được điều trị bằng vaccin peptit dùng cho bệnh ung thư, việc kích thích sản xuất IgG đặc hiệu CTL epitop peptit và việc kích thích CTL đặc hiệu epitop peptit đều cho tác dụng kéo dài sự sống. Do đó, tác dụng kéo dài sự sống thu được theo sáng chế tốt hơn so với tác dụng thu được bằng cách điều trị bệnh ung thư sử dụng vaccin peptit chứa các CTL epitop peptit đã biết hoặc hỗn hợp của chúng. Do đó, peptit có 4 epitop liên kết theo sáng chế có thể thích hợp để sử dụng làm chất trị liệu và/hoặc chất ngăn ngừa ung thư hoặc bệnh có liên quan đến ung thư và vaccin peptit dùng cho bệnh ung thư có thể tạo ra kết quả điều trị tốt hơn so với việc điều trị bệnh ung thư sử dụng vaccin peptit chứa các CTL epitop peptit đã biết hoặc hỗn hợp của chúng.

Tất cả tài liệu công bố, patent, và đơn yêu cầu cấp patent trích dẫn trong bản mô tả này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit có công thức chung: A-(L)-B-(L)-C-(L)-D trong đó (L) là tác nhân liên kết và trong đó A, B, C, và D gồm tổng cộng bốn CTL epitop peptit và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm:

PEP1 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1;

PEP2 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2;

PEP4 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4;

PEP5 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5;

PEP6 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 6;

PEP7 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7;

PEP8 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8;

PEP9 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9;

PEP10 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10;

PEP13 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

PEP15 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

PEP17 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 17; và

PEP18 như được biểu thị bởi SEQ ID NO: 18; và trong đó:

(a) peptit này chứa PEP2 ở đầu tận C ngoại trừ peptit chứa PEP7 ở đầu tận N sau đó là PEP8; hoặc

(b) peptit này chứa PEP4 ở đầu tận C; hoặc

(c) peptit này chứa PEP10 ở đầu tận C; hoặc

(d) peptit này chứa PEP5 ở đầu tận C trước đó là PEP6; hoặc

(e) peptit này gồm PEP5, PEP6, PEP9, và PEP18, và

trong đó peptit này tùy ý chứa các axit amin ưa nước ở đầu tận N hoặc đầu tận C để cải thiện độ hòa tan của peptit.

2. Peptit theo điểm 1, trong đó các CTL epitop peptit là 4 peptit không giống nhau được chọn từ nhóm bao gồm PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18.

3. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) peptit chứa PEP2 ở đầu tận C và cả 3 CTL epitop peptit được chọn từ nhóm bao gồm PEP1, PEP7, PEP5, và PEP13 ngoại trừ peptit chứa PEP7 ở đầu tận N sau đó là PEP8;

(ii) peptit gồm PEP4 ở đầu tận C và cả PEP5, PEP6, và PEP9;

(iii) peptit gồm PEP10 ở đầu tận C và cả 3 CTL epitop peptit được chọn từ nhóm bao gồm PEP1, PEP13, PEP15, PEP17, và PEP18;

(iv) peptit gồm PEP5 ở đầu tận C trước đó là PEP6, cả PEP1 và PEP7; và

(v) peptit gồm PEP9 ở đầu tận C và cả PEP5, PEP6, và PEP18.

4. Peptit theo điểm 1, trong đó thứ tự sắp xếp của peptit từ đầu tận N được chọn từ nhóm bao gồm:

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4;

- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4;

- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4;

- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4;

- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4;

- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4;

- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;

- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10;

- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10;
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;
- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10;
- PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9;
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9;
- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5; hoặc
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5.

5. Peptit theo điểm 1, trong đó tác nhân liên kết là tác nhân liên kết axit amin.

6. Peptit theo điểm 5, trong đó tác nhân liên kết axit amin là arginin dime hoặc arginin trime.

7. Peptit theo điểm 1, trong đó các axit amin ưa nước được đặt ở đầu tận N.

8. Peptit theo điểm 1, trong đó các axit amin ưa nước bao gồm arginin trime hoặc arginin tetrame.

9. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID

NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, hoặc SEQ ID NO: 66.

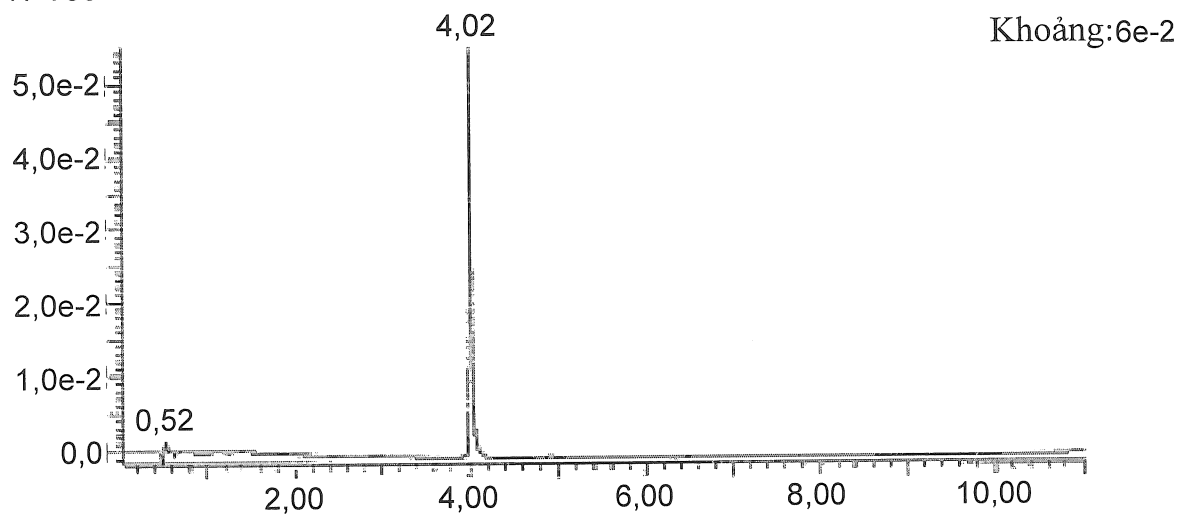
10. Phương pháp kích thích CTL bao gồm bước cho lympho bào máu ngoại vi tiếp xúc *in vitro* và/hoặc *ex vivo* với peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

11. Dược phẩm chứa peptit theo điểm 1 làm hoạt chất.

12. Dược phẩm chứa hai hoặc nhiều peptit khác biệt theo điểm 1.

Fig. 1-1

TPV06



TPV10

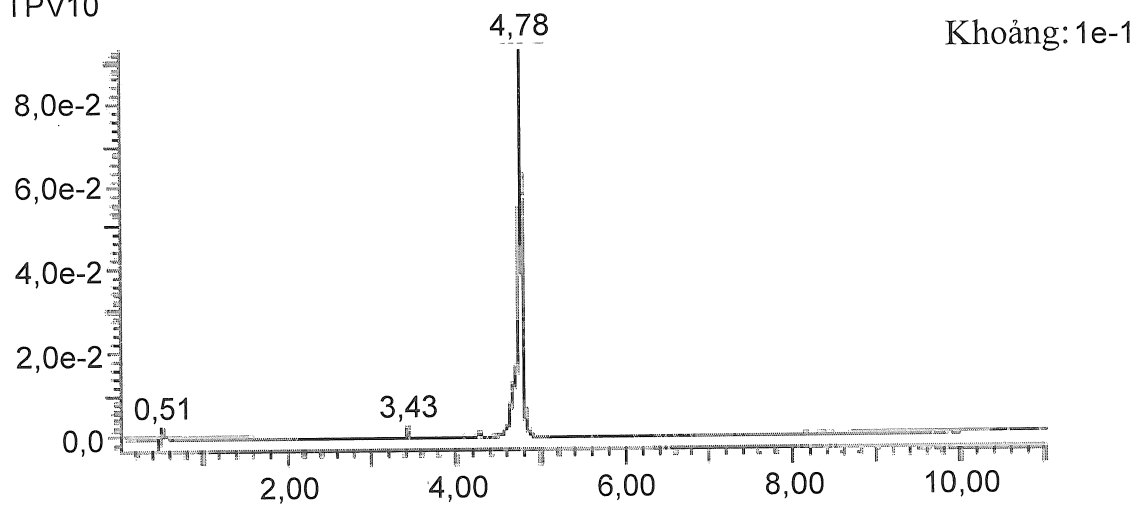
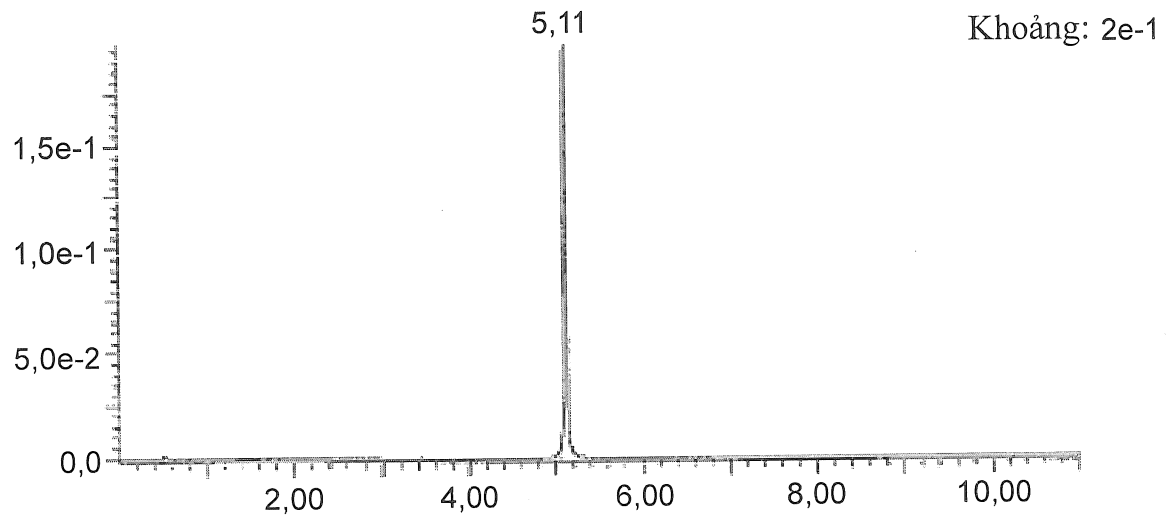


Fig. 1-2

TPV12



TPV21

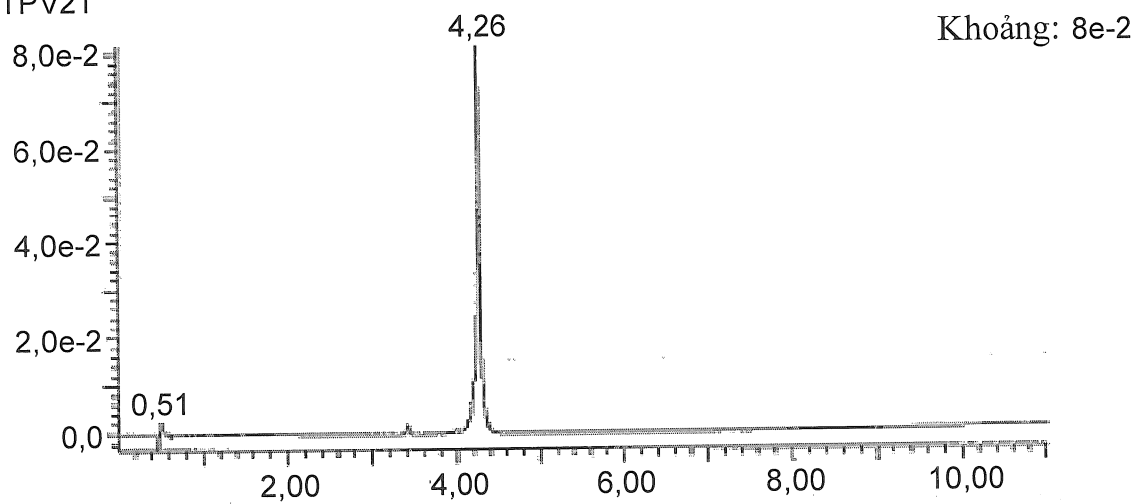
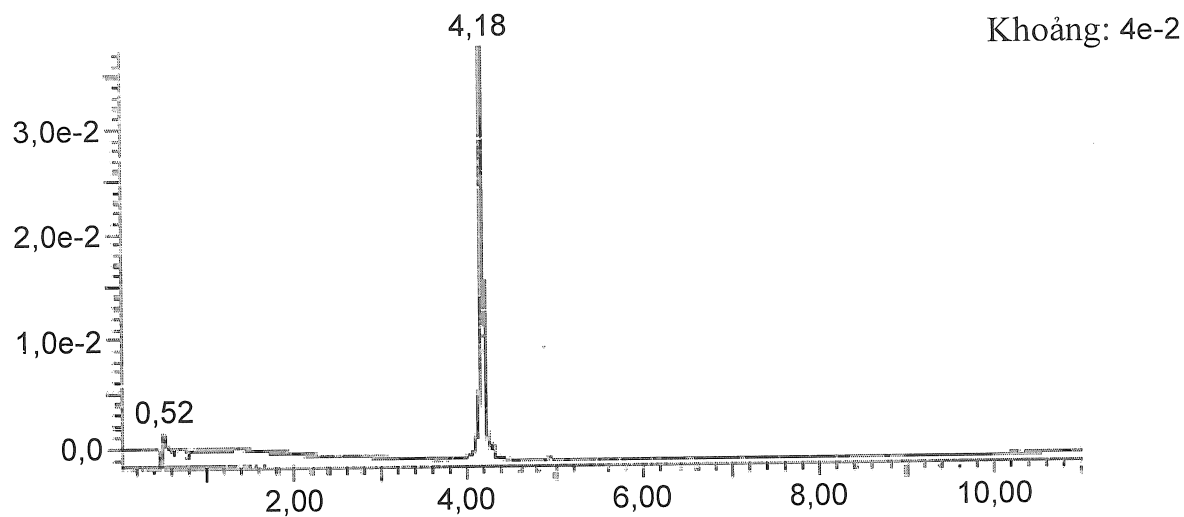


Fig. 1-3

TPV26



TPV30

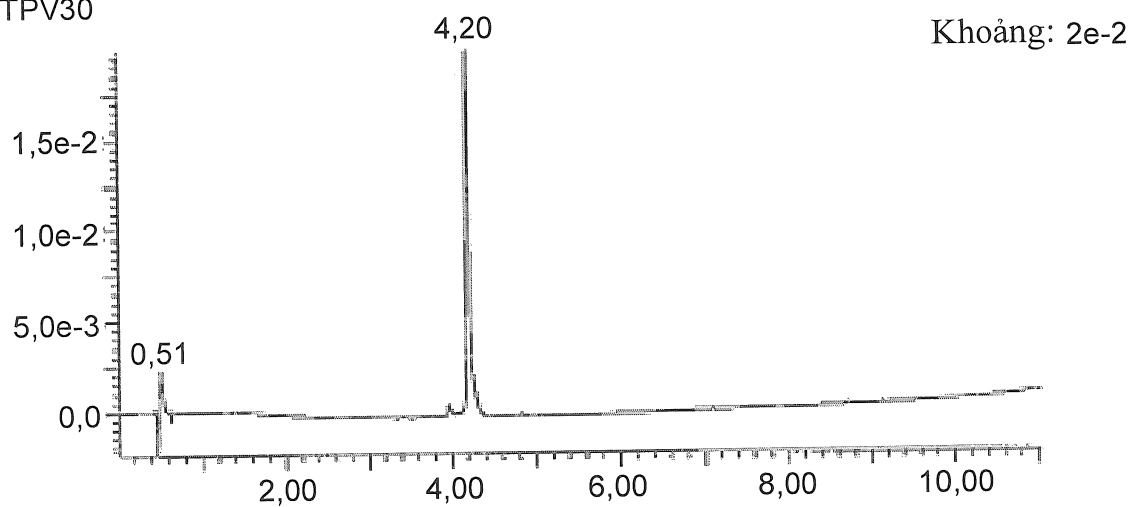
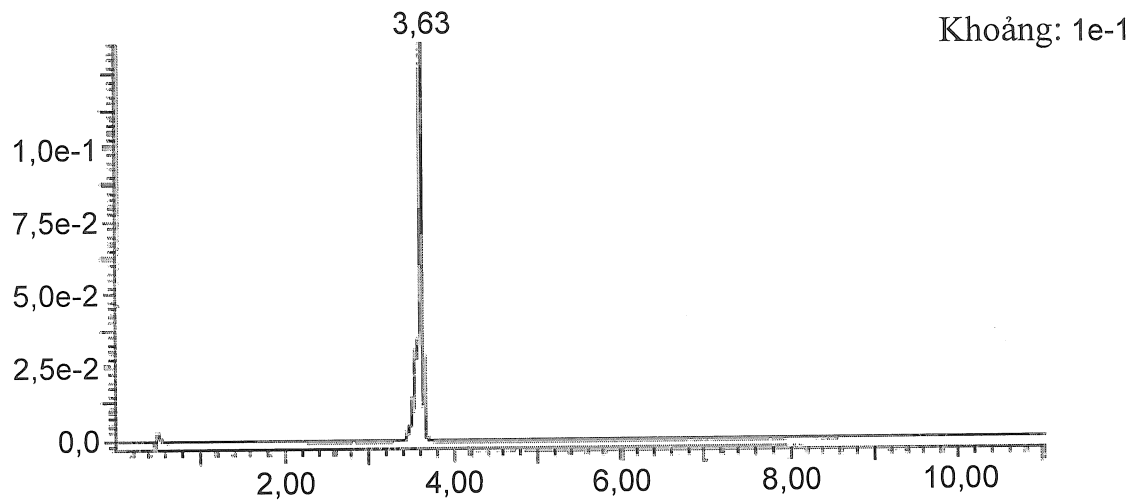


Fig. 1-4

TPV35



TPV37

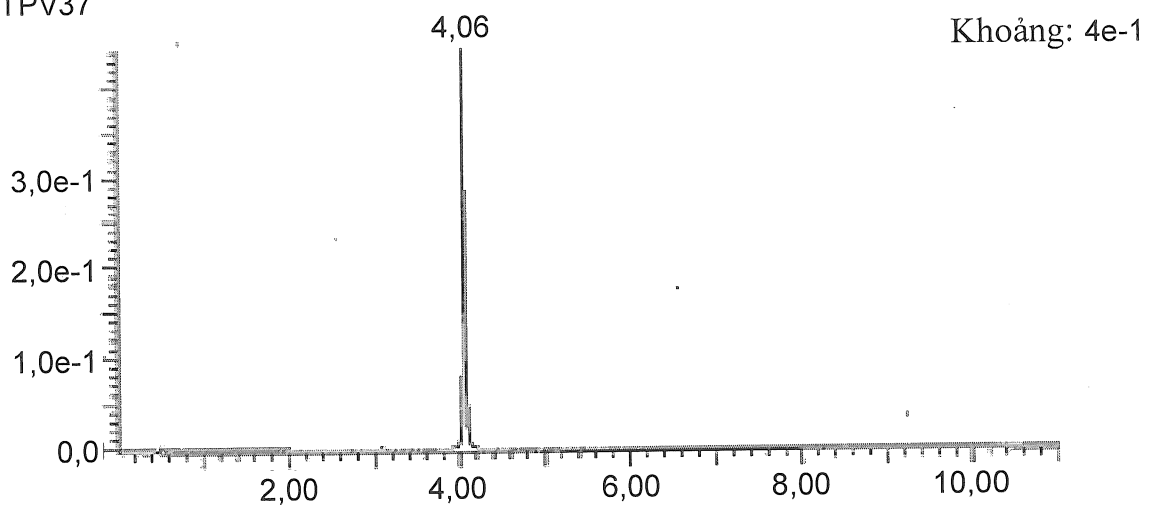
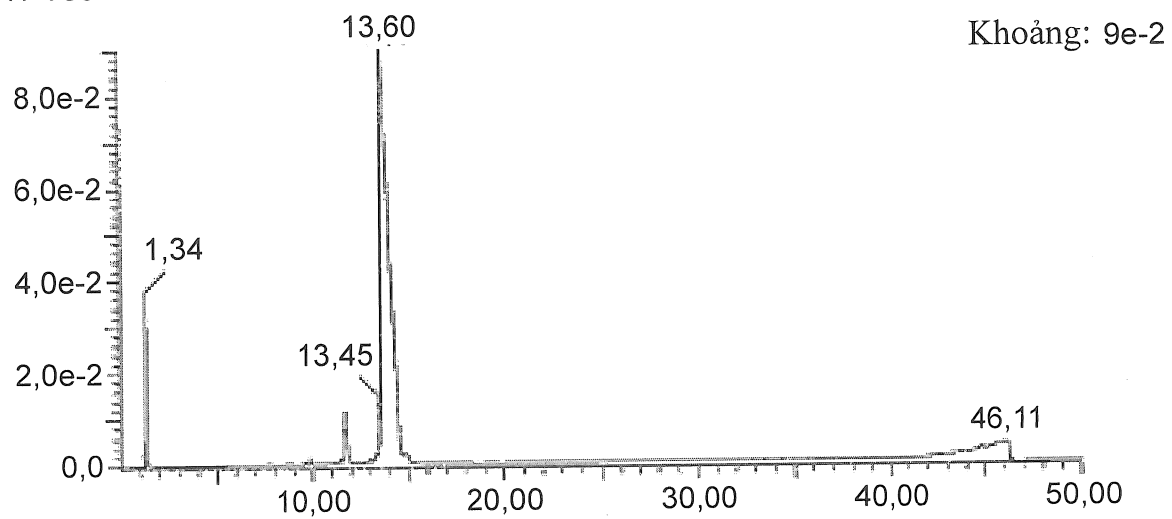


Fig. 1-5

TPV39



TPV40

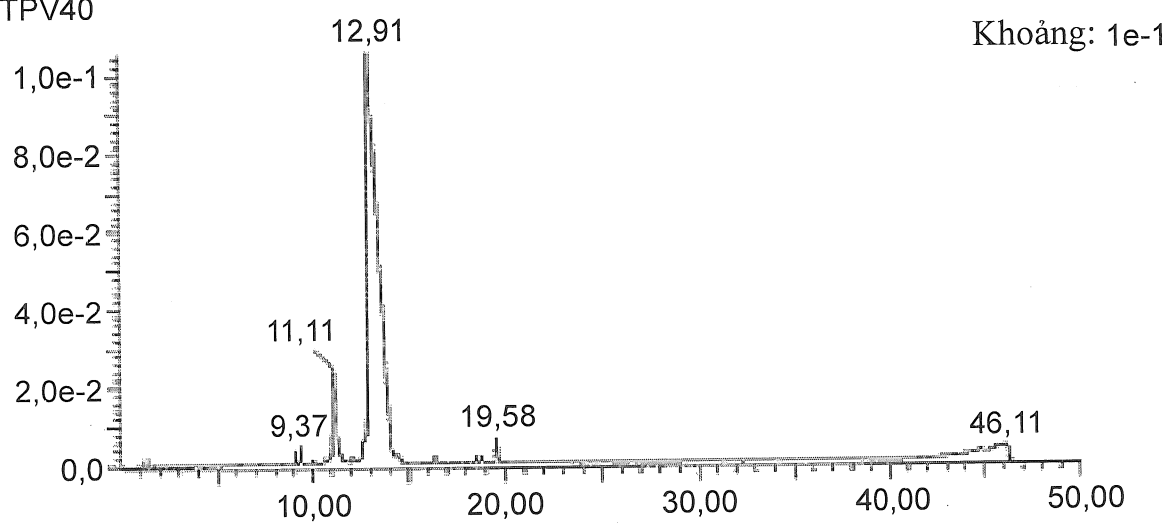
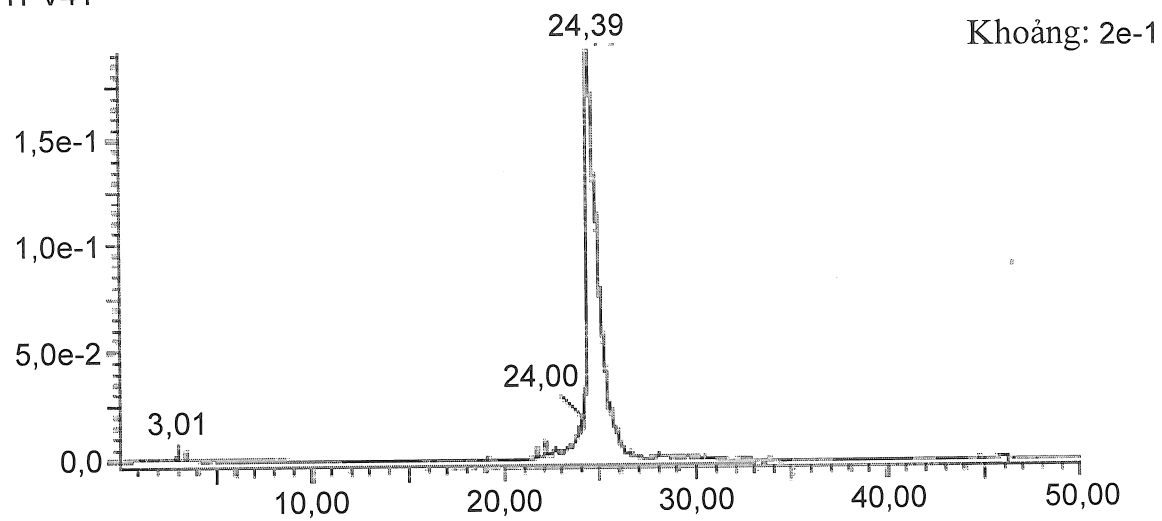


Fig. 1-6

TPV41



TPV43

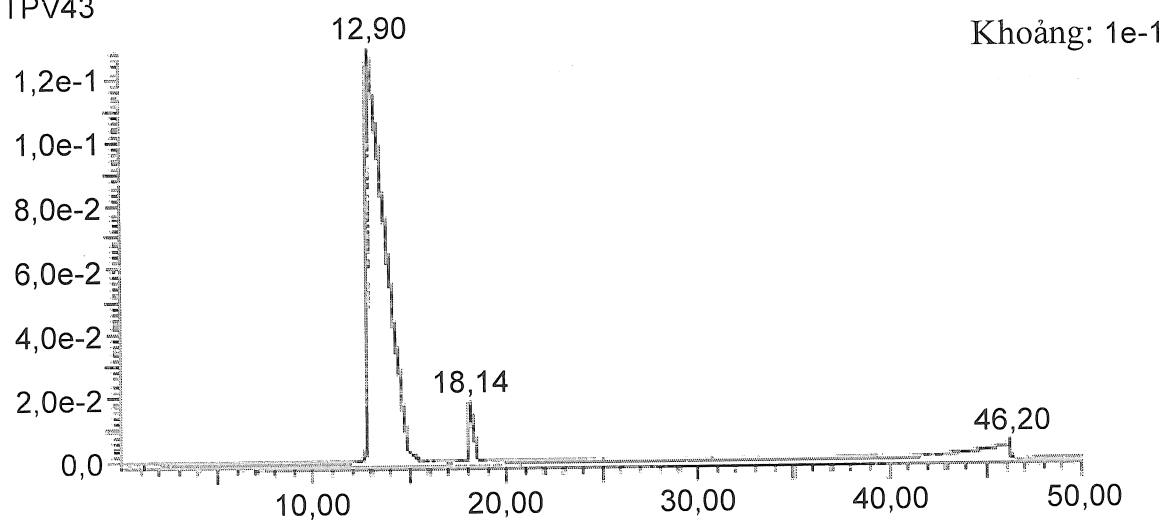


Fig. 1-7

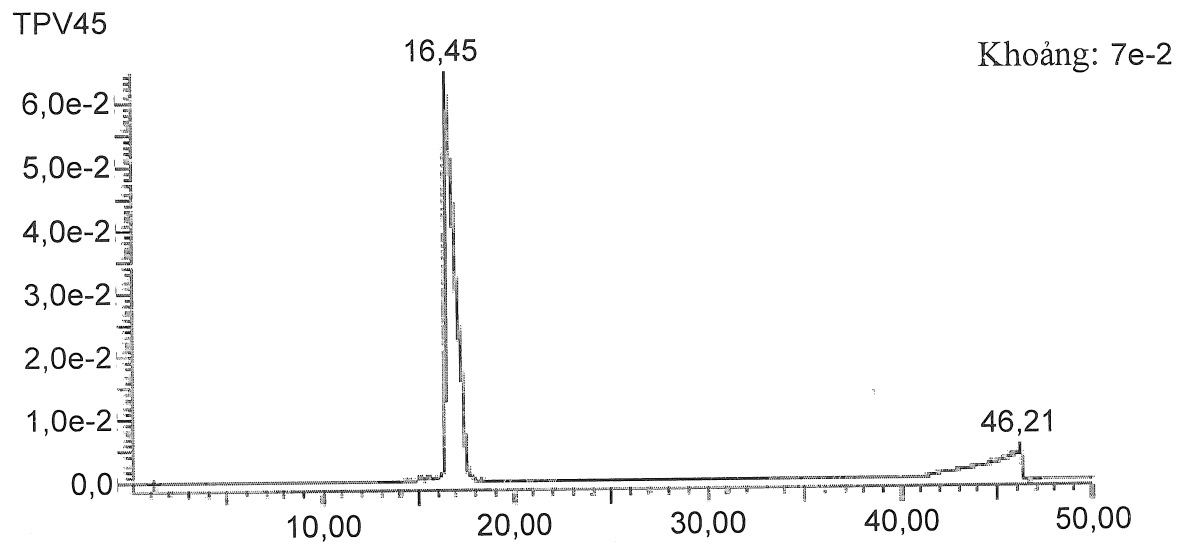


Fig. 2-1

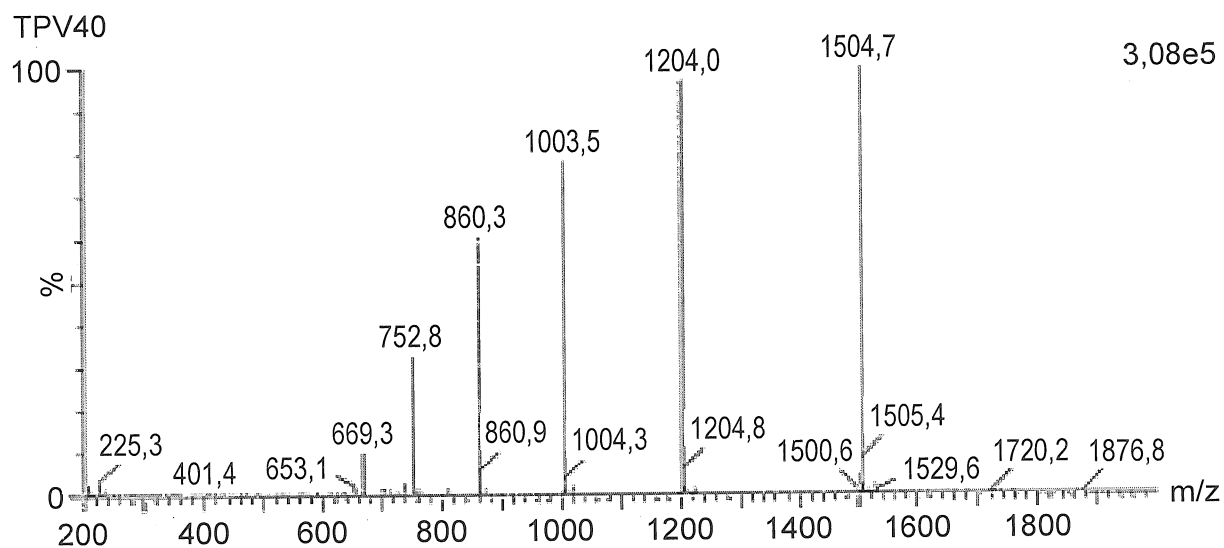
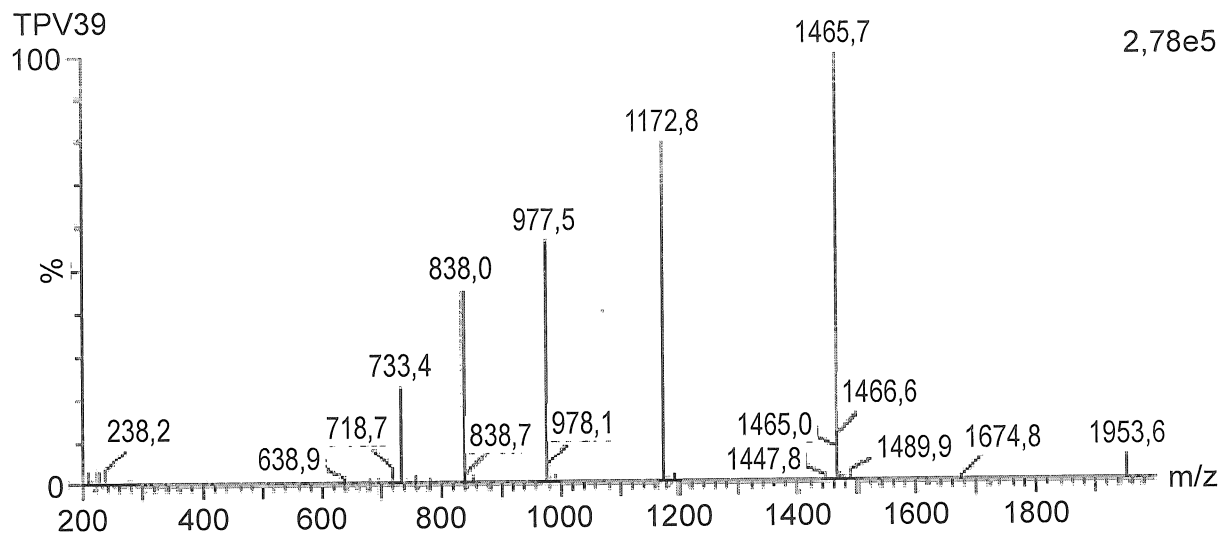


Fig. 2-2

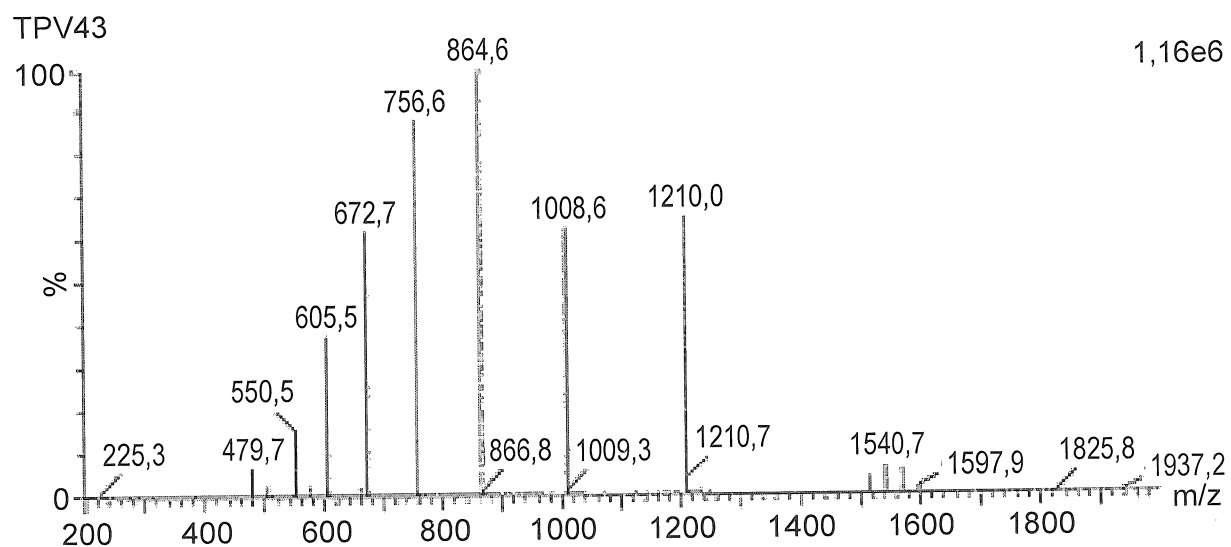
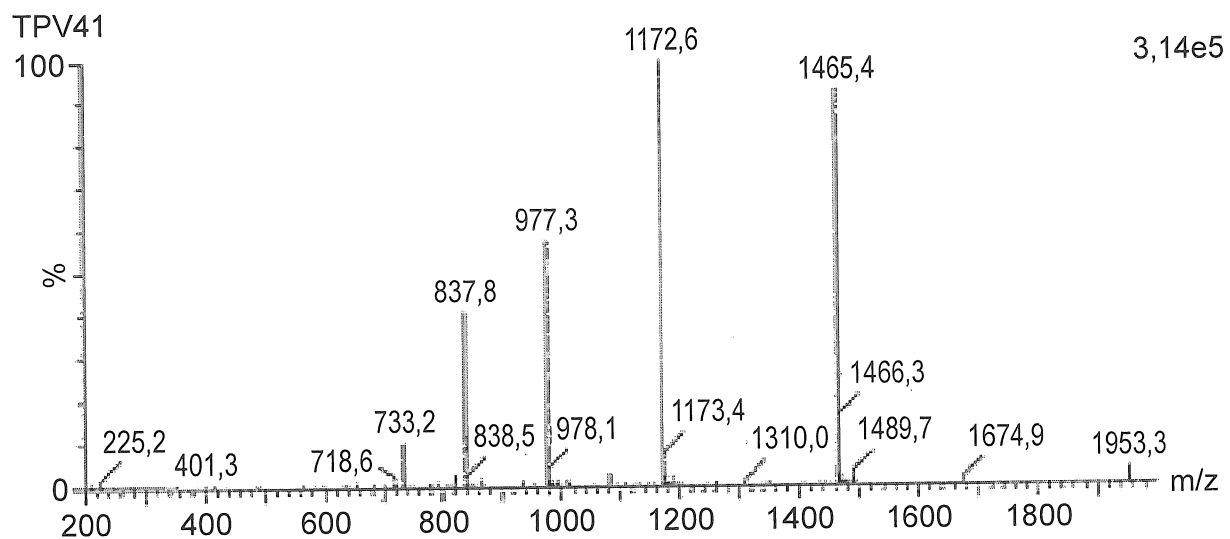


Fig. 2-3

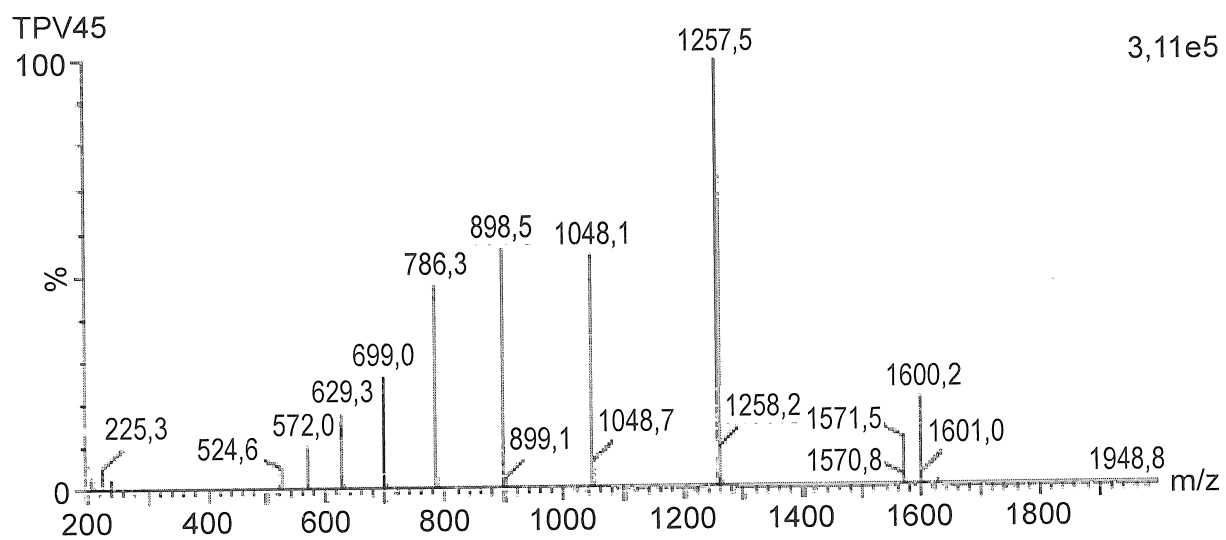


Fig. 3-1

	Sự kích thích CTL đặc hiệu epitop				PEP2 được phân cắt bằng i20S	PEP10được phân cắt bằng i20S
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C			
TPV01	PEP5	PEP6	PEP9*	PEP4		
TPV02	PEP9*	PEP5	PEP6	PEP4		
TPV03	PEP6	PEP5	PEP9*	PEP4		
TPV04	PEP6	PEP9*	PEP5	PEP4		
TPV05	PEP9*	PEP6	PEP5	PEP4		
TPV06	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV07	PEP1	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV08	PEP1	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV09	PEP7	PEP1	PEP8*	PEP2*	○	
TPV10	PEP8*	PEP7	PEP1	PEP2*	○	
TPV11	PEP8*	PEP1	PEP7	PEP2*	○	
TPV12	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV13	PEP8*	PEP13	PEP7	PEP2*	○	
TPV14	PEP13	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV15	PEP8*	PEP7	PEP13	PEP2*	○	
TPV16	PEP13	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV17	PEP13	PEP15	PEP18	PEP10*		○
TPV18	PEP13	PEP18	PEP15	PEP10*		○
TPV19	PEP15	PEP13	PEP18	PEP10*		○

Fig. 3-2

	Sự kích thích CTL đặc hiệu epitop				PEP2 được phân cắt bằng i20S	PEP10được phân cắt bằng i20S
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C			
TPV20	PEP15	PEP18	PEP13	PEP10*		○
TPV21	PEP18	PEP13	PEP15	PEP10*		○
TPV22	PEP18	PEP15	PEP13	PEP10*		○
TPV23	PEP1	PEP15	PEP18	PEP10*		○
TPV24	PEP1	PEP18	PEP15	PEP10*		○
TPV25	PEP15	PEP1	PEP18	PEP10*		○
TPV26	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		○
TPV27	PEP18	PEP1	PEP15	PEP10*		○
TPV28	PEP18	PEP15	PEP1	PEP10*		○
TPV29	PEP15	PEP17	PEP13	PEP10*		*
TPV30	PEP15	PEP13	PEP17	PEP10*		*
TPV31	PEP17	PEP15	PEP13	PEP10*		*
TPV32	PEP17	PEP13	PEP15	PEP10*		*
TPV33	PEP13	PEP17	PEP15	PEP10*		*
TPV34	PEP13	PEP15	PEP17	PEP10*		*
TPV37	PEP1	PEP7	PEP6	PEP5		
TPV38	PEP7	PEP1	PEP6	PEP5		
TPV35	PEP6	PEP18	PEP5	PEP9*		
TPV36	PEP6	PEP5	PEP18	PEP9*		

Fig. 3-3

	Sự kích thích CTL đặc hiệu epitop				PEP2 được phân cắt bằng	PEP10được phân cắt bằng i20S
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C			
CPV01	PEP18	PEP17	PEP14	PEP12*		
CPV02	PEP11*	PEP15	PEP19	PEP16		
CPV03	PEP11*	PEP16	PEP15	PEP19		
CPV04	PEP11*	PEP19	PEP15	PEP16		
CPV05	PEP15	PEP11*	PEP16	PEP19		
CPV06	PEP14	PEP12*	PEP13	PEP17		
CPV07	PEP17	PEP14	PEP13	PEP12*		
CPV08	PEP17	PEP13	PEP18	PEP14		
CPV09	PEP13	PEP12*	PEP14	PEP18		
CPV10	PEP17	PEP12*	PEP14	PEP18		
CPV11	PEP17	PEP13	PEP12*	PEP14		
CPV12	PEP17	PEP18	PEP14	PEP12*		
CPV13	PEP17	PEP18	PEP14	PEP13		
CPV14	PEP7	PEP8*	PEP1	PEP2*	○	
CPV15	PEP7	PEP8*	PEP13	PEP2*	*	
CPV16	PEP2*	PEP9*	PEP4	PEP5	*	

p>0,05	
p<0,05, 10≤Δ<100	
p<0,05, 100≤Δ<200	
p<0,05, 200≤Δ	

Không thể phân cắt được	
Phân cắt được	○
Không được kiểm tra	*

Fig. 3-4

	Sự kích thích CTL đặc hiệu epitop				PEP2 được phân cắt bằng	PEP10được phân cắt bằng i20S
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C			
TPV39	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV40	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV41	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*		
TPV42	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV43	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV44	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		
TPV45	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		

$p > 0,05$	
$p < 0,05, 10 \leq \Delta < 100$	
$p < 0,05, 100 \leq \Delta < 200$	
$p < 0,05, 200 \leq \Delta$	

Không thể phân cắt được	
Phân cắt được	○
Không được kiểm tra	*

Fig. 4-1

	IgG đặc hiệu epitop (số lần kích thích so với IFA)			
hỗn hợp 1	PEP10	PEP13	PEP15	PEP18
hỗn hợp 2	PEP4	PEP5	PEP6	PEP9
hỗn hợp 3	PEP1	PEP2	PEP7	PEP8
hỗn hợp 4	PEP1	PEP10	PEP15	PEP18
Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C	
TPV01	PEP5	PEP6	PEP9	PEP4
TPV02	PEP9	PEP5	PEP6	PEP4
TPV03	PEP6	PEP5	PEP9	PEP4
TPV04	PEP6	PEP9	PEP5	PEP4
TPV05	PEP9	PEP6	PEP5	PEP4
TPV06	PEP5	PEP9	PEP6	PEP4
TPV07	PEP1	PEP7	PEP8	PEP2
TPV08	PEP1	PEP8	PEP7	PEP2
TPV09	PEP7	PEP1	PEP8	PEP2
TPV10	PEP8	PEP7	PEP1	PEP2
TPV11	PEP8	PEP1	PEP7	PEP2
TPV12	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV13	PEP8	PEP13	PEP7	PEP2
TPV14	PEP13	PEP7	PEP8	PEP2
TPV15	PEP8	PEP7	PEP13	PEP2
TPV16	PEP13	PEP8	PEP7	PEP2
TPV17	PEP13	PEP15	PEP18	PEP10
TPV18	PEP13	PEP18	PEP15	PEP10
TPV19	PEP15	PEP13	PEP18	PEP10

Fig. 4-2

Thẻ liên hợp được sử dụng	Đầu tận N			Đầu tận C
TPV20	PEP15	PEP18	PEP13	PEP10
TPV21	PEP18	PEP13	PEP15	PEP10
TPV22	PEP18	PEP15	PEP13	PEP10
TPV23	PEP1	PEP15	PEP18	PEP10
TPV24	PEP1	PEP18	PEP15	PEP10
TPV25	PEP15	PEP1	PEP18	PEP10
TPV26	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10
TPV27	PEP18	PEP1	PEP15	PEP10
TPV28	PEP18	PEP15	PEP1	PEP10
TPV29	PEP15	PEP17	PEP13	PEP10
TPV30	PEP15	PEP13	PEP17	PEP10
TPV31	PEP17	PEP15	PEP13	PEP10
TPV32	PEP17	PEP13	PEP15	PEP10
TPV33	PEP13	PEP17	PEP15	PEP10
TPV34	PEP13	PEP15	PEP17	PEP10
TPV37	PEP1	PEP7	PEP6	PEP5
TPV38	PEP7	PEP1	PEP6	PEP5

số lần gấp < 2	
2 < số lần gấp < 10	
10 < số lần gấp < 100	
100 < số lần gấp	

Fig. 4-3

	IgG đặc hiệu epitop (số lần kích thích so với IFA)			
Thế liên hợp được sử dụng	Đầu tận N		Đầu tận C	
TPV39	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV40	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV41	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2

số lần gấp < 2	
2 < số lần gấp < 10	
10 < số lần gấp < 100	
100 < số lần gấp	

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Peptit có bốn epitop lympho bào T gây độc tế bào liên kết với nhau và được phẩm chứa peptit này

<130> PH-5981-PCT

<150> JP 2013-218524

<151> 2013-10-21

<150> JP 2014-155132

<151> 2014-07-30

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Val Glu Phe Glu Asp Val Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu

1 5 10

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
 1 5 10

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
 1 5

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Val Ile Gln Asn Leu Glu Arg Gly Tyr Arg
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Leu Gly Glu Leu Arg Glu Lys Val

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu

1 5

<210> 22

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 22

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn
1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 23

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 23

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg
1 5 10 15

Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 24

<211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 24

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala
 1 5 10 15

Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
 35 40

<210> 25
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 25

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro
 1 5 10 15

Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
 35 40

<210> 26
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 26

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn
 1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
 35 40

<210> 27
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 27

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile
 1 5 10 15

Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu

35

40

<210> 28

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 28

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu
 1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 29

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 29

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 30
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 30

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 31
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 31

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp
 1 5 10 15

Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala

20

25

30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 32

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 32

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Lys Leu Val Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 33

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 33

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp
 1 5 10 15

Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 34
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 34

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Arg Leu Gln Glu
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 35
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 35

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu

1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe
20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40

<210> 36
<211> 43
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit tổng hợp

<400> 36

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp
1 5 10 15

Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile
20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40

<210> 37
<211> 43
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit tổng hợp

<400> 37

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40

<210> 38

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 38

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu
 1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 39

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 39

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 40

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 40

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 41

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 41

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 42

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 42

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Arg Leu Gln Glu
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 43

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> peptit tổng hợp

<400> 43

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg
1 5 10 15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 44

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> peptit tổng hợp

<400> 44

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu
1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 45

<211> 45
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 45

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 46
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 46

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 47
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 47

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala
 20 25 30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 48
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 48

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 49

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 49

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg

1

5

10

15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala

20

25

30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 50

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 50

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val

1

5

10

15

Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val

20

25

30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 51

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 51

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu

1

5

10

15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly

20

25

30

Leu Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 52

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 52

Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Asp Tyr Val Arg

1

5

10

15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val

20

25

30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 53

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 53

Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu

1

5

10

15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn

20

25

30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35

40

45

<210> 54

<211> 45

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 54

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg

1

5

10

15

Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 55
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 55

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu
 1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly
 20 25 30

Leu Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
 35 40 45

<210> 56
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 56

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Arg Tyr Leu Thr

1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu
20 25 30

Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
35 40

<210> 57

<211> 44

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 57

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
20 25 30

Val Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
35 40

<210> 58

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 58

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu
 1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
 20 25 30

Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
 35 40

<210> 59

<211> 43

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 59

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
 20 25 30

Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
 35 40

<210> 60

<211> 46

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 60

Arg Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu
 1 5 10 15

Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu
 20 25 30

Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40 45

<210> 61

<211> 47

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 61

Arg Arg Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val
 20 25 30

Leu Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40 45

<210> 62

<211> 46

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 62

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Glu
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu
 20 25 30

Asp Phe Arg Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
 35 40 45

<210> 63

<211> 46

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 63

Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His
 20 25 30

Val Asp Leu Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
 35 40 45

<210> 64

<211> 47

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 64

Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ser	Ala	Arg	Trp	Asn	Glu	Ile	Arg	Arg	Gln
1				5						10					15

Ile	Arg	Pro	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Cys
				20						25					30

His	Val	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Glu	Ala	Pro	Arg	Leu
			35					40					45	

<210> 65

<211> 48

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit tổng hợp

<400> 65

Arg	Arg	Arg	Asp	Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Arg	Arg	Arg
1				5							10				15

Tyr	Leu	Thr	Gln	Glu	Thr	Asn	Lys	Val	Arg	Arg	Lys	Leu	Val	Glu	Arg
			20								25				30

Leu	Gly	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Glu	Trp	Trp	Lys
			35						40					45	

<210> 66

<211> 49
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> peptit tổng hợp

<400> 66

Arg Arg Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu
 20 25 30

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp
 35 40 45

Lys