



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

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

(11)



1-0033301

(51)⁷ C12N 15/09; A61K 31/713; A61K 39/02; A61K 39/12; A61K 39/39; A61P 31/04; A61P 33/00; A61P 35/00; A61P 37/04; A61P 37/08; A61P 43/00; C07H 21/04; A61K 31/7125; A61P 31/12 (13) B

(21) 1-2016-01414

(22) 19/09/2014

(86) PCT/JP2014/074835 19/09/2014

(87) WO 2015/041318 A1 26/03/2015

(30) 2013-196206 20/09/2013 JP

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/08/2016 341A

(73) 1. NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION (JP)

7-6-8, Saito-Asagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085 Japan

2. DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)

3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japan

(72) ISHII, Ken (JP); KOBIYAMA, Kouji (JP); AOSHI, Taiki (JP); TAKESHITA, Fumihiko (JP); KASUYA, Yuji (JP); NIWA, Takako (JP); KOIZUMI, Makoto (JP).

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

(54) PHỨC CHẤT CHỨA OLIGONUCLEOTIT CÓ HOẠT TÍNH KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit chứa oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người và poly deoxyadenylat, trong đó poly deoxyadenylat được đặt ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phức chất chứa oligodeoxynucleotit và β -1,3-glucan nêu trên. Sáng chế hơn nữa còn đề cập đến dược phẩm và thuốc phòng ngừa hoặc điều trị chứa oligodeoxynucleotit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phức chất chứa oligonucleotit có hoạt tính kích thích miễn dịch, và sử dụng nó. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phức chất chứa oligodeoxynucleotit CpG (ODN) có hoạt tính kích thích miễn dịch, β -glucan, và sử dụng của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Oligodeoxynucleotit CpG (ODN CpG) là ngắn (khoảng 20 cặp bazơ), đoạn ADN tổng hợp sợi đơn chứa mô-típ CpG kích thích miễn dịch, chất chủ vận tiềm tàng cho thụ thể giống Toll 9 (TLR9), hoạt hóa các tế bào đuôi gai (DC) và các tế bào B để sản xuất các interferon (IFN) typ I và các xytokin gây viêm (các tài liệu phi sáng chế 1, 2), và đóng vai trò là tá dược đối với cả các phản ứng dịch thể typ Th1 và miễn dịch tế bào bao gồm các phản ứng lympho bào T gây độc tế bào (CTL) (các tài liệu phi sáng chế 3, 4). Do đó, ODN CpG được cho là thuốc có khả năng điều trị miễn dịch chống lại các bệnh lây nhiễm, bệnh ung thư, bệnh hen suyễn, và chứng hen suyễn do phản hoa (các tài liệu phi sáng chế 2, 5)

Có ít nhất 4 loại ODN CpG, mỗi loại có cấu trúc chính, trình tự, và các đặc tính kích thích miễn dịch khác nhau (tài liệu phi sáng chế 6). ODN CpG typ D (còn được gọi là A), thường chứa một mô-típ CpG đối xứng với cấu trúc chính phosphodiester (PO) và đoạn cuối phosphothioat (PS) poly G, mà hoạt hóa các tế bào đuôi gai dạng tương bào (các pDC) để sản xuất lượng lớn IFN- α , nhưng không kích thích sự trưởng thành pDC và sự hoạt hóa tế bào B (các tài liệu phi sáng chế 7, 8). Ba typ khác của ODN có cấu trúc chính PS. ODN CpG typ K (còn được gọi là B) chứa nhiều mô-típ CpG bất đối xứng, và hoạt hóa mạnh các tế bào B để sản xuất IL-6 và các pDC đến lúc trưởng thành, nhưng hầu như không sản xuất IFN- α (các tài liệu phi sáng chế 8, 9). Gần đây, ODN CpG loại C và P đã được phát triển; các loại này tương ứng chứa một và hai trình tự CpG đối xứng, cả hai loại đều có thể hoạt hóa các tế bào B giống typ K và các pDC giống typ D, mặc dù ODN CpG loại C gây ra sự sản xuất IFN- α yếu hơn so với ODN CpG typ K (các tài liệu phi sáng chế từ 10 đến 12).

Nhiều ODN CpG typ K vượt trội được mô tả ở tài liệu sáng chế 1.

ODN CpG typ D và P được thể hiện dưới dạng các cấu trúc bậc cao, sự ghép cặp bazơ Hoogsteen để tạo thành các cấu trúc có bốn gen trội song song được gọi là các bộ bốn G, và sự ghép cặp bazơ Watson–Crick tương ứng giữa các phần tái nhiễm *cis*- và *trans*-, mà cần cho việc sản sinh IFN- α mạnh mẽ bởi các pDC (các tài liệu phi sáng chế 12-14). Mặc dù các cấu trúc bậc cao này có vẻ là cần thiết cho sự khu trú ở các thể nội bào sớm và sự truyền tín hiệu qua TLR9, chúng trải qua các hiện tượng đa hình sản phẩm, sự kết tụ và kết tủa, do đó gây cản trở các ứng dụng lâm sàng của chúng (tài liệu phi sáng chế 15). Do đó, chỉ có ODN CpG typ K và C thường có sẵn là các thuốc điều trị miễn dịch và các tá dược của vacxin để sử dụng ở người (tài liệu phi sáng chế 16 và 17). Trong khi ODN CpG typ K tăng cường tính gây miễn dịch của các vacxin có mục tiêu là các bệnh lây nhiễm và các bệnh ung thư ở các thử nghiệm lâm sàng ở người (các tài liệu phi sáng chế 6, 16), liên kết hóa học hoặc vật lý giữa kháng nguyên và ODN CpG typ K là cần thiết cho các hiệu quả tá dược tối ưu. Các kết quả này chỉ ra rằng bốn typ này (K, D, P, và C) của ODN CpG có các ưu điểm và nhược điểm, tuy nhiên sự phát triển ODN CpG “tất cả trong một” hoạt hoá cả các tế bào B và các pDC mà không gây kết tụ vẫn chưa được hoàn thành.

Schizophyllan (SPG), β -1,3-glucan hòa tan được dẫn xuất từ *Schizophyllum commune*, là thuốc đã được phê duyệt ở Nhật Bản làm chất tăng cường phép trị liệu bằng tia X ở các bệnh nhân ung thư biểu mô cổ tử cung, trong ba thập kỷ gần đây (tài liệu phi sáng chế 18). Tương tự, lentinan (LNT), β -1,3-glucan tan được dẫn xuất từ nấm đông cô, là thuốc được phê duyệt năm 1985, và được sử dụng kết hợp với thuốc fluoropyrimidin cho các bệnh nhân mắc bệnh ung thư dạ dày tái phát và không phẫu thuật được (các tài liệu phi sáng chế 19, 20). β -1,3-Glucan thể hiện sự tạo thành phức chất với poly deoxyadenylat (dA) ở dạng cấu trúc chuỗi xoắn ba (tài liệu phi sáng chế 21).

Các tài liệu sáng chế từ 2 đến 4 bộc lộ sử dụng phức chất hòa tan trong nước của β -1,3-glucan bao gồm schizophyllan và axit nucleic (gen) làm chất mang gen. Các tài liệu này mô tả rằng sự hình thành phức chất tăng cường hoạt động đối nghĩa của gen và hoạt động kháng nucleaza của nó.

Tài liệu sáng chế 5 bộc lộ sử dụng các polysaccharit có liên kết β -1,3 làm chất

mang (chất chuyển nạp) tăng cường hoạt động của oligonucleotit kích thích miễn dịch có trình tự CpG, trong đó liên kết phosphodiester được thế bằng liên kết phosphothioat hoặc liên kết phosphodithioat.

Tài liệu sáng chế 6 bộc lộ phức chất kích thích miễn dịch gồm có nucleotit kích thích miễn dịch và β -1,3-glucan có chuỗi bên liên kết β -1,6-glucosyl dài.

Trước đây, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng chuột và ODN CpG được làm giống như của người liên kết với poly dA có liên kết phosphodiester ở đầu 5' được tạo phức với SPG để tăng cường sự sản xuất xytokin và đóng vai trò làm tá dược của vacxin cúm và thuốc phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh liên quan đến tế bào Th2 (các tài liệu phi sáng chế 22, 23, tài liệu sáng chế 7). Khi poly(dA) được thêm vào đầu 5' của CpG của mỗi typ K và typ D để tạo thành phức chất với SPG thì cả hai đều thể hiện hoạt tính đã được tăng cường trong khi đó vẫn duy trì được đặc tính của typ K và typ D. Tuy nhiên, khó để đạt được các hiệu suất cao của phức chất CpG-SPG theo hướng hiệu quả của nó cao hơn và hiệu quả chi phí tiền lâm sàng cũng như phát triển lâm sàng. Gần đây, khi poly(dA) có liên kết phosphothioat liên kết với ODN CpG, thì hiệu quả của sự hình thành phức chất đã được nâng cao lên gần 100% (tài liệu phi sáng chế 24). Tuy nhiên, khảo sát toàn diện chưa được tiến hành để xác định trình tự CpG được làm giống như của người tốt nhất và sự tối ưu hóa các yếu tố để đạt được các hoạt tính “tất cả trong một” cho bốn typ của ODN CpG.

Tài liệu sáng chế 8 bộc lộ phương pháp sản xuất phức chất loại tam phân kháng nguyên/ CpG oligonucleotit/ β -1,3-glucan.

Danh sách tài liệu

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: US 8,030,285 B2

Tài liệu sáng chế 2: WO 01/034207 A1

Tài liệu sáng chế 3: WO 02/072152 A1

Tài liệu sáng chế 4: JP-A-2004-107272

Tài liệu sáng chế 5: WO 2004/100965 A1

Tài liệu sáng chế 6: JP-A-2007-70307

Tài liệu sáng chế 7: JP-A-2008-100919

Tài liệu sáng chế 8: JP-A-2010-174107

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Hemmi, H., et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745 (2000).

Tài liệu phi sáng chế 2: Krieg, A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 471-484 (2006).

Tài liệu phi sáng chế 3: Brazolot Millan, C.L., Weeratna, R., Krieg, A.M., Siegrist, C.A. & Davis, H.L. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15553-15558 (1998).

Tài liệu phi sáng chế 4: Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V. & Harding, C.V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of experimental medicine* 186, 1623-1631 (1997).

Tài liệu phi sáng chế 5: Klinman, D.M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature reviews. Immunology* 4, 249-258 (2004).

Tài liệu phi sáng chế 6: Vollmer, J. & Krieg, A.M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced drug delivery reviews* 61, 195-204 (2009).

Tài liệu phi sáng chế 7: Krug, A., et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 2154-2163 (2001).

Tài liệu phi sáng chế 8: Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. & Klinman, D.M. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *Journal of immunology* 166, 2372-2377 (2001).

Tài liệu phi sáng chế 9: Hartmann, G. & Krieg, A.M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of immunology* 164, 944-953 (2000).

Tài liệu phi sáng chế 10: Hartmann, G., et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in

- plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 33, 1633-1641 (2003).
- Tài liệu phi sáng chế 11: Marshall, J.D., et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *Journal of leukocyte biology* 73, 781-792 (2003).
- Tài liệu phi sáng chế 12: Samulowicz, U., et al. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* 20, 93-101 (2010).
- Tài liệu phi sáng chế 13: Kerkmann, M., et al. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 8086-8093 (2005).
- Tài liệu phi sáng chế 14: Klein, D.C., Latz, E., Espevik, T. & Stokke, B.T. Higher order structure of short immunostimulatory oligonucleotides studied by atomicforce microscopy. *Ultramicroscopy* 110, 689-693 (2010).
- Tài liệu phi sáng chế 15: Puig, M., et al. Use of thermolytic protective groups to prevent G-tetrad formation in ODN CpG D type: structural studies and immunomodulatory activity in primates. *Nucleic acids research* 34, 6488-6495 (2006).
- Tài liệu phi sáng chế 16: Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 10, 499-511 (2011).
- Tài liệu phi sáng chế 17: McHutchison, J.G., et al. Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 46, 1341-1349 (2007).
- Tài liệu phi sáng chế 18: Okamura, K., et al. Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study. *Cancer* 58, 865-872 (1986).
- Tài liệu phi sáng chế 19: Oba, K.; Kobayashi, M.; Matsui, T.; Koder, Y.; Sakamoto, J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Res.*, 2009, 29, 2739-2746.
- Tài liệu phi sáng chế 20: Nakano, H.; Namatame, K.; Nemoto, H.; Motohashi, H.; Nishiyama, K.; Kumada, K. A multi-institutional prospective study of lentinan in

advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: Effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepato-Gastroenterol.*, 1999, 46, 2662-2668.

Tài liệu phi sáng chế 21: Sakurai, K., Mizu, M. & Shinkai, S. Polysaccharide-polynucleotide complexes. 2. Complementary polynucleotide mimic behavior of the natural polysaccharide schizophyllan in the macromolecular complex with single-stranded RNA and DNA. *Biomacromolecules* 2, 641-650 (2001).

Tài liệu phi sáng chế 22: Shimada, N., et al. A polysaccharide carrier to effectively deliver native phosphodiester CpG DNA to antigen-presenting cells. *Bioconjugate chemistry* 18, 1280-1286 (2007).

Tài liệu phi sáng chế 23: Koyama, S., et al. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Science translational medicine* 2, 25ra24 (2010).

Tài liệu phi sáng chế 24: Minari, J., et al. Enhanced cytokine secretion from primary macrophages due to Dectin-1 mediated uptake of CpG DNA/beta-1,3-glucan complex. *Bioconjugate chemistry* 22, 9-15 (2011).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần được giải quyết

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế là tạo ra thuốc kích thích miễn dịch có hoạt tính mạnh hơn các phức chất CpG-SPG thông thường.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu và nhận thấy rằng phức chất mới chứa ODN CpG typ K (K3) (SEQ ID NO: 2) có đoạn cuối poly(dA) ở đầu 3' và SPG, cụ thể là K3-SPG. Nó tạo thành hạt nano bậc cao mà có thể được hòa tan hoàn toàn. Tương tự, các tác giả sáng chế cũng thành công trong việc sản xuất phức chất K3-LNT mới chứa ODN CpG typ K nêu trên và lentinan (LNT). Mặc dù K3-SPG và K3-LNT không có trình tự ODN CpG typ D, nhưng đồng thời có hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có riêng ở ODN CpG typ K (ví dụ như, hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B ở người) để sản xuất IL-6), và hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có riêng ở ODN CpG typ D (ví dụ

như, hoạt tính để hoạt hóa tế bào plasma giống các tế bào đuôi gai để sản xuất IFN- α). Ngoài ra, K3-LNT và K3-SPG có hoạt tính tá được của vacxin tiềm tàng và, khi được tiêm chủng cùng với kháng nguyên để gây miễn dịch, chúng gây ra cả miễn dịch đặc hiệu của kháng nguyên và miễn dịch tế bào, và đã thực sự thể hiện hiệu quả bảo vệ khỏi sự lây nhiễm virút RSV và virút cúm một cách rất tiềm năng. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu dựa trên các phát hiện này và hoàn thành sáng chế.

Theo đó, sáng chế đề cập đến các vấn đề sau.

[1] Oligodeoxynucleotit chứa oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người và poly deoxyadenylat, trong đó poly deoxyadenylat được đặt ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người.

[2] Oligodeoxynucleotit theo [1], trong đó oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người có chiều dài không dưới 10 nucleotit, và có trình tự nucleotit được thể hiện bằng công thức sau:



trong đó mô típ CpG ở trung tâm không được metyl hóa, W là A hoặc T, và N_1 , N_2 , N_3 , N_4 , N_5 và N_6 có thể là các nucleotit bất kỳ.

[3] Oligodeoxynucleotit theo [1] hoặc [2], trong đó oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1.

[4] Oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [3], trong đó các liên kết phosphodiester trong oligodeoxynucleotit được thể một phần hoặc toàn bộ bằng các liên kết phosphothioat.

[5] Oligodeoxynucleotit theo [4], trong đó các liên kết phosphodiester trong oligodeoxynucleotit được thể toàn bộ bằng các liên kết phosphothioat.

[6] Oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [5], trong đó poly deoxyadenylat có chiều dài từ 20 đến 60 nucleotit.

[7] Phức chất chứa oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6] và β -1,3-glucan.

[8] Phức chất theo [7], trong đó β -1,3-glucan là lentinan, schizophyllan, scleroglucan, curdlan, pachyman, grifolan, hoặc laminaran.

[9] Phức chất theo [8], trong đó β -1,3-glucan là lentinan, schizophyllan hoặc scleroglucan.

[10] Phức chất bao gồm oligodeoxynucleotit được mô tả ở mục (i), và β -1,3-glucan được mô tả ở mục (ii) sau đây:

(i) Oligodeoxynucleotit trong đó poly deoxyadenylat dài từ 20 đến 60 được liên kết ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, và tất cả liên kết phosphodiester được thể bằng các liên kết phosphothioat

(ii) lentinan hoặc schizophyllan.

[11] Phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [10], có cấu trúc chuỗi xoắn ba.

[12] Phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [11], có hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B để sản xuất IL-6, và hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai để sản xuất IFN- α .

[13] Dược phẩm chứa oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12].

[14] Dược phẩm theo mục [13] dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn.

[15] Dược phẩm theo mục [14] dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus.

[16] Dược phẩm theo mục [15], trong đó bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus RS hoặc virus cúm.

[17] Thuốc kích thích sự sản sinh interferon typ I và/ hoặc typ II, chứa phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12].

[18] Thuốc kích thích miễn dịch chứa oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12].

[19] Thuốc kích thích miễn dịch theo mục [18] mà là tá dược của vaccin.

[20] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn chứa oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất

kỳ từ [7] đến [12].

[21] Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị theo mục [20], trong đó bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus RS hoặc virus cúm.

[22] Sử dụng oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12] trong sản xuất dược phẩm.

[23] Sử dụng theo mục [22], trong đó dược phẩm là dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn.

[24] Sử dụng theo mục [23], trong đó bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus RS hoặc virus cúm.

[25] Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở động vật máu nóng bao gồm cho động vật máu nóng sử dụng lượng dược lý hiệu quả oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12].

[26] Phương pháp theo mục [25], trong đó bệnh là bệnh nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn.

[27] Phương pháp theo mục [26], trong đó bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus RS hoặc virus cúm.

[28] Phương pháp theo mục bất kỳ từ [25] đến [27], trong đó động vật máu nóng là người.

[29] Phương pháp kích thích phản ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật máu nóng bao gồm cho động vật máu nóng sử dụng lượng dược lý hiệu quả oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12].

[30] Oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12] để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn.

[31] Oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo mục [30], trong đó bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus RS hoặc virus cúm.

[32] Dược phẩm chứa

(a) oligodeoxynucleotit theo mục bất kỳ từ [1] đến [6], hoặc phức chất theo mục bất kỳ từ [7] đến [12], và

(b) kháng nguyên.

[33] Dược phẩm theo mục [32] mà dùng để kích thích phản ứng miễn dịch với kháng nguyên.

[34] Dược phẩm theo mục [33], trong đó kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh.

[35] Dược phẩm theo mục [34], mà dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm tác nhân gây bệnh.

[36] Dược phẩm theo mục [35], trong đó tác nhân gây bệnh là virus.

[37] Dược phẩm theo mục [36], trong đó virus là virus RS hoặc virus cúm.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất oligodeoxynucleotit có hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội và phức chất chứa oligodeoxynucleotit này. Cụ thể là, phức chất theo sáng chế có đồng thời cả hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có riêng ở ODN CpG typ K, và hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có riêng ở ODN CpG typ D. Ngoài ra, do phức chất theo sáng chế có hoạt tính tá dược của vacxin mạnh, nên khi sự gây miễn dịch bằng phức chất theo sáng chế cùng với kháng nguyên được thực hiện, cả miễn dịch đặc hiệu của kháng nguyên và miễn dịch tế bào đều được kích thích để tạo ra hiệu quả bảo vệ khỏi sự lây nhiễm một cách mạnh mẽ. Do đó, phức chất theo sáng chế là hữu ích làm thuốc kích thích miễn dịch hoặc tá dược của vacxin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện phương pháp tạo phức của ODN CpG và LNT hoặc SPG.

Fig.2 thể hiện sự sản sinh mọi IFN- α bằng các PBMC.

Fig.3 thể hiện profin của xytokin được sản xuất từ các PBMC người kích thích K3, K3-dA40 hoặc K3-SPG.

Fig.4 thể hiện hình ảnh quét của K3-SPG qua kính hiển vi điện tử.

Fig.5 thể hiện các cỡ hạt K3-SPG, SPG và D35 được phân tích bằng tán xạ ánh sáng động.

Fig.6 thể hiện sự sản sinh mọi IFN- α , IFN- α 2, và IFN- γ bằng các PBMC được gây ra bởi sự kích thích với K3, K3-SPG hoặc D35.

Fig.7 thể hiện sự sản sinh mọi IFN- α và IL-6 bằng các PBMC người, mà được gây ra bằng sự kích thích với K3, K3-dA40, K3-SPG, CpG21798 (ODN CpG typ P), CpG21889(P), CpG2395(C) hoặc M362(C) (0,74, 2,2, 6,6 hoặc 20 μ g/ml).

Fig.8 thể hiện sự cùng khu trú của K3-SPG với ODN CpG thể nội bào chứa ODN CpG typ K. Thang đo thể hiện 10 μ M. Các kết quả là đại diện của ít nhất hai thí nghiệm độc lập.

Fig.9 thể hiện sự cùng khu trú của K3-SPG với thể nội bào chứa ODN CpG typ D. Thang đo thể hiện 10 μ M.

Fig.10 thể hiện các chuẩn độ đo kháng thể huyết thanh đặc hiệu kháng nguyên của chuột được miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, hoặc OVA+K3-SPG. *p < 0,05 (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.11 thể hiện sự sản sinh IFN γ từ các tế bào lá lách của chuột được miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, hoặc OVA+K3-SPG, mà được gây ra bằng cách tái kích thích với kháng nguyên.

Fig.12 thể hiện tỷ lệ của các tế bào CD8 T đặc hiệu OVA bằng cách miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, hoặc OVA+K3-SPG. *p < 0,05 (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.13 thể hiện các hoạt tính CTL đặc hiệu OVA in vivo được gây ra bởi sự miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, OVA+K3-dA40 hoặc OVA+K3-SPG. *p < 0,05 (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.14 thể hiện hiệu quả tá được peptit của vacxin của K3-SPG.

Fig.15 thể hiện hiệu quả tá được phụ thuộc liều của K3-SPG.

Fig.16 thể hiện các chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu với kháng nguyên của chuột được miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, hoặc OVA+K3-SPG. Liều lượng OVA ở thời điểm miễn dịch được thể hiện trên mỗi biểu đồ. *p < 0,05 (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.17 thể hiện sự sản sinh IFN γ từ các tế bào lá lách của chuột được miễn dịch với OVA riêng rẽ, OVA+K3, hoặc OVA+K3-SPG, mà được gây ra bởi sự tái

kích thích với kháng nguyên. Liều lượng OVA ở thời điểm miễn dịch được thể hiện trên mỗi biểu đồ.

Fig.18 thể hiện liên kết của SPG với mẫu trống (vector), chất chuyển nhiễm Dectin-1, hoặc Dectin-2.

Fig.19 thể hiện liên kết của K3 hoặc K3-SPG với trống (vector), chất chuyển nhiễm Dectin-1, hoặc Dectin-2.

Fig.20 thể hiện sự sản sinh TNF- α từ các tế bào lá lách của chuột C57BL/6J hoặc chuột thiếu hụt Dectin-1 gây ra bởi sự kích thích loại bỏ Zymosan.

Fig.21 thể hiện sự sản sinh TNF- α từ các tế bào lá lách của chuột C57BL/6J hoặc chuột thiếu hụt Dectin-1 gây ra bởi sự kích thích SPG.

Fig.22 thể hiện hiệu quả của Zymosan đã loại bỏ từ sự sản sinh IFN- α từ các tế bào lá lách của chuột C57BL/6J hoặc chuột thiếu hụt Dectin-1 gây ra bởi sự kích thích ODN CpG. * $p < 0,05$ (thử nghiệm t).

Fig.23 thể hiện hiệu quả của SPG đối với sự sản sinh IFN- α từ các tế bào lá lách của chuột C57BL/6J, mà được gây ra bởi sự kích thích ODN CpG.

Fig.24 thể hiện sự sản sinh cytokin gây ra bởi K3-SPG phụ thuộc TLR9. a) sự sản sinh IFN- α bởi các FL-DC, b) sự sản sinh IL-6 và IL-12 p40 từ các tế bào lá lách, c) sự sản sinh IFN- α từ các FL-DC, d) sự sản sinh IL-6 và IL-12 p40 từ các tế bào lá lách.

Fig.25 thể hiện các chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu với kháng nguyên của chuột Tlr9+/+ hoặc Tlr9-/- được miễn dịch với OVA+K3-SPG. * $p < 0,05$ (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.26 thể hiện sự sản sinh IFN- γ từ các tế bào lá lách của chuột Tlr9+/+ hoặc Tlr9-/- được miễn dịch với OVA+K3-SPG gây ra bởi sự tái kích thích với kháng nguyên. * $p < 0,05$ (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.27 thể hiện tỷ lệ của các tế bào CD8 T đặc hiệu OVA gây ra bởi sự miễn dịch của chuột Tlr9+/+ hoặc Tlr9-/- với OVA+K3-SPG. * $p < 0,05$ (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.28 thể hiện hiệu quả tá dược của K3-SPG không phụ thuộc Dectin-1. a) Chuẩn độ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh. b) Sự sản sinh IFN-

γ từ tế bào lá lách do sự tái kích thích kháng nguyên. c) Tỷ lệ của các tế bào CD8 T đặc hiệu kháng nguyên được gây ra in vivo.

Fig.29 thể hiện các chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu với kháng nguyên của chuột Dectin-1+/- hoặc Dectin-1-/- được miễn dịch với OVA+K3-SPG.

Fig.30 thể hiện sự sản sinh IFN γ từ các tế bào lá lách của chuột Dectin-1+/- hoặc Dectin-1-/- được miễn dịch với OVA+K3-SPG gây ra bởi sự kích thích tái kích thích với kháng nguyên.

Fig.31 thể hiện tỷ lệ của các tế bào CD8 T đặc hiệu OVA gây ra bởi sự miễn dịch của chuột Dectin-1+/- hoặc Dectin-1-/- với OVA+K3-SPG. * $p < 0,05$ (Thử nghiệm Mann-Whitney U).

Fig.32 thể hiện sự khu trú của K3-SPG trên bề mặt các iLN 1 giờ sau khi sử dụng 488-K3-SPG.

Fig.33 thể hiện sự khu trú của OVA, các tế bào MARCO⁺, và các tế bào Siglec-1⁺ trong các iLN 1 giờ sau khi sử dụng DQ-OVA.

Fig.34 thể hiện các kết quả phân tích, bởi Volocity, của sự cùng khu trú của OVA với các tế bào MARCO⁺ hoặc các tế bào Siglec-1⁺ ở Fig.33. * $p < 0,05$ (thử nghiệm t).

Fig.35 thể hiện sự khu trú của K3, K3-SPG, và các tế bào MARCO⁺ trong các iLN 1 giờ sau khi sử dụng Alexa 488-K3 hoặc Alexa 488-K3-SPG.

Fig.36 thể hiện các kết quả phân tích bằng Volocity, sự cùng khu trú của K3 hoặc K3-SPG với các tế bào MARCO⁺ ở Fig.35. * $p < 0,05$ (thử nghiệm t).

Fig.37 thể hiện cách thức thí nghiệm loại bỏ bằng liposom clodronat (bảng phía trên), chuẩn độ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh (phía dưới bên trái), và sự sản sinh xytokin bằng sự kích thích kháng nguyên. * $p < 0,05$ (thử nghiệm t).

Fig.38 thể hiện biểu hiện CD40 ở các DC của chuột C57BL/6J hoặc Tlr9-/- được sử dụng với K3 hoặc K3-SPG.

Fig.39 thể hiện chuẩn độ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh ở chuột được gây miễn dịch bằng SV, WIV hoặc SV+K3-SPG.

Fig.40 thể hiện các thay đổi theo thời gian của trọng lượng cơ thể (trái) và

đường cong sống sót (phải) khi được gây miễn dịch bằng SV, WIV hoặc SV+K3-SPG, sau đó được thử với virus cúm A/P/R8(H1N1).

Fig.41 thể hiện các thay đổi theo thời gian của chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh của khỉ *Macaca fascicularis* được gây miễn dịch bằng SV+ K3 hoặc SV+K3-SPG. * $p < 0,05$ (thử nghiệm t).

Fig.42 thể hiện chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu kháng nguyên trong huyết thanh của khỉ *Macaca fascicularis* được gây miễn dịch bằng SV+ K3 hoặc SV+K3-SPG (ở tuần 110).

Fig.43 thể hiện sự so sánh hiệu quả tá dược của vacxin giữa K3 và K3-SPG.

Fig.44 thể hiện sự sản sinh mọi IFN- α và sự sản sinh IL-6 bằng K3, K3-LNT hoặc K3-SPG.

Fig.45 thể hiện các chuẩn độ kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên RSV F trong huyết thanh của chuột được tiêm với K3-, vacxin tiểu đơn vị được thêm K3-LNT hoặc K3-SPG.

Fig.46 thể hiện sự sản sinh xytokin cụ thể được gây ra bởi sự kích thích kháng nguyên RSV F ở chuột được tiêm vacxin tiểu đơn vị được thêm K3 hoặc K3-LNT hoặc K3-SPG.

Fig.47 thể hiện hiệu quả bảo vệ sự nhiễm RSV ở chuột cotton được tiêm vacxin tiểu đơn vị được thêm K3 hoặc K3-LNT hoặc K3-SPG.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Oligodeoxynucleotit

Sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit chứa oligodeoxynucleotit CpG typ K và poly deoxyadenylat (dA) (sau đây còn được gọi là oligodeoxynucleotit theo sáng chế).

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa một oligodeoxynucleotit trong đó các liên kết phosphodiester được biến đổi (ví dụ như, một phần hoặc tất cả các liên kết phosphodiester được thế bằng liên kết phosphothioat).

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế bao gồm các muối được dụng.

Theo bản mô tả này, oligodeoxynucleotit và ODN là một. Ngoài ra,

“oligodeoxynucleotit CpG (ODN CpG) typ K được làm giống như của người” và “gốc oligodeoxynucleotit CpG (ODN CpG) typ K được làm giống như của người” là như nhau bất kể là có hay không có thuật ngữ “gốc” ở đầu, và được sử dụng thay thế cho nhau. Ngoài ra, poly deoxyadenylat và axit poly deoxyadenosin (gốc) là như nhau. Thuật ngữ “gốc” nghĩa là cấu trúc một phần của hợp chất có trọng lượng phân tử cao. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng hiểu rằng trong ngữ cảnh “oligodeoxynucleotit CpG (ODN CpG) typ K được làm giống như của người” là phân tử độc lập, hoặc cấu trúc một phần của hợp chất có trọng lượng phân tử cao trong bản mô tả sáng chế này. Áp dụng tương tự cho các thuật ngữ liên quan đến các cấu trúc một phần khác trong oligodeoxynucleotit theo sáng chế, như là “poly deoxyadenylat” và tương tự.

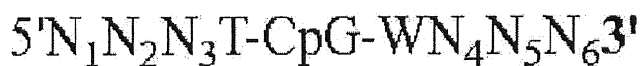
Oligodeoxynucleotit CpG (ODN CpG) là ADN sợi đơn chứa mô-típ CpG không metyl hóa kích thích miễn dịch, và là chất chủ vận TLR9. ODN CpG chứa 4 typ là typ K (còn được gọi là typ B), typ D (còn được gọi là typ A), typ C và typ P, mà khác nhau về cấu trúc chính, trình tự và đặc tính kích thích miễn dịch (Advanced drug delivery reviews 61, 195-204 (2009)). Trong số này, oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa ODN CpG typ K.

ODN CpG typ K là ODN CpG có các đặc tính cấu trúc và chức năng mà nó thường chứa các mô-típ CpG không metyl hóa bất đối xứng, hoạt hóa các tế bào B để sản sinh IL-6, nhưng hầu như không gây ra sự sản sinh IFN- α của các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma (các pDC). Mô-típ CpG không metyl hóa là trình tự nucleotit ngắn chứa ít nhất một trình tự xytosin(C)-guanin (G), trong đó vị trí 5 của xytosin trong trình tự xytosin-guanin không được metyl hóa. Theo sự giải thích sau đây, CpG nghĩa là CpG không metyl hóa, trừ khi được chỉ dẫn cụ thể. Do đó, oligodeoxynucleotit theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K (ví dụ như, hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B ở người) để sản sinh IL-6) bằng cách chứa ODN CpG typ K. Nhiều ODN CpG typ K được làm giống như của người được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan (Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001); Journal of immunology 164, 944-953 (2000); US 8, 030, 285 B2).

ODN CpG typ K chứa trong oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là

được làm giống như của người. Thuật ngữ “được làm giống như của người” nghĩa là nó có hoạt tính chất chủ vận với TLR9 người. Do đó, oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa ODN CpG typ K được làm giống như của người có hoạt tính kích thích miễn dịch cho người, mà chỉ có ở ODN CpG typ K (ví dụ như, hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B ở người để sản sinh IL-6).

ODN CpG typ K được sử dụng theo sáng chế tốt hơn là có chiều dài không dưới 10 nucleotit và có trình tự nucleotit được thể hiện bằng công thức:



trong đó mô-típ CpG ở trung tâm không được metyl hóa, W là A hoặc T, và N_1 , N_2 , N_3 , N_4 , N_5 và N_6 có thể là nucleotit bất kỳ.

Theo một phương án, ODN CpG typ K theo sáng chế có chiều dài không dưới 10 nucleotit và có trình tự nucleotit được thể hiện bằng công thức nêu trên. Theo công thức nêu trên, mô-típ CpG của 4 bazơ (TCpGW) ở trung tâm chỉ cần có trong 10 nucleotit, và không cần được đặt giữa N_3 và N_4 theo công thức nêu trên. Ngoài ra, N_1 , N_2 , N_3 , N_4 , N_5 và N_6 theo công thức nêu trên có thể là nucleotit bất kỳ, và sự kết hợp của ít nhất một (tốt hơn là một) trong số N_1 và N_2 , N_2 và N_3 , N_3 và N_4 , N_4 và N_5 , và N_5 và N_6 có thể tạo thành mô-típ CpG hai bazơ. Khi mô-típ CpG với 4 bazơ nêu trên không được đặt giữa N_3 và N_4 , thì 2 bazơ liên tiếp bất kỳ trong số 4 bazơ ở trung tâm (từ bazơ số 4 đến bazơ số 7) của công thức nêu trên là mô-típ CpG, và 2 bazơ khác có thể là nucleotit bất kỳ.

ODN CpG typ K được sử dụng theo sáng chế tốt hơn nữa là chứa cấu trúc bất đối xứng chứa một hoặc nhiều mô-típ CpG. Ngoài ra, ODN CpG typ K được sử dụng theo sáng chế còn tốt hơn nữa là gồm cấu trúc bất đối xứng chứa một hoặc nhiều mô-típ CpG.

ODN CpG typ K được làm giống như của người thường được đặc trưng bởi mô-típ CpG chứa 4 bazơ của TCGA hoặc TCGT. Trong nhiều trường hợp, 2 hoặc 3 của mô-típ CpG 4 bazơ này được chứa trong một ODN CpG typ K được làm giống như của người. Do đó, theo phương án ưu tiên, ODN CpG typ K có trong oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa ít nhất một, tốt hơn nữa là hai hoặc

nhiều hơn, ngoài ra tốt hơn là 2 hoặc 3, của các mô-típ CpG 4 bazơ chứa TCGA hoặc TCGT. Khi ODN CpG typ K có 2 hoặc 3 của các mô-típ CpG 4 bazơ, các mô-típ CpG 4 bazơ này có thể giống nhau hoặc khác nhau, và không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có hoạt tính chủ vận trên TLR9 người.

ODN CpG typ K chứa trong oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn nữa là có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1.

Chiều dài của ODN CpG typ K không bị giới hạn cụ thể miễn là oligodeoxynucleotit theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch (ví dụ như, hoạt tính mà hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B người) để sản sinh IL-6), thì tốt hơn là nó không dài hơn 100 nucleotit (ví dụ như chiều dài từ 10 đến 75 nucleotit). Chiều dài của ODN CpG typ K tốt hơn nữa là không dài hơn 50 nucleotit (ví dụ như chiều dài từ 10 đến 40 nucleotit). Chiều dài của ODN CpG typ K tốt hơn nữa là không dài hơn 30 nucleotit (ví dụ như chiều dài từ 10 đến 25 nucleotit). Chiều dài của ODN CpG typ K tốt hơn nữa là chiều dài từ 12 đến 25 nucleotit.

Chiều dài của poly deoxyadenylat (dA) không bị giới hạn cụ thể miễn là nó đủ để tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba với chuỗi β -1,3-glucan (tốt hơn là, lentinan, hoặc schizophyllan), từ các khía cạnh tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba ổn định, chiều dài thường là không dưới 20 nucleotit, chiều dài tốt hơn là không dưới 40 nucleotit, chiều dài tốt hơn nữa là không dưới 60 nucleotit. Theo lý thuyết, poly dA không có giới hạn trên về chiều dài, vì poly dA dài hơn tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba với β -1,3-glucan ổn định hơn. Tuy nhiên, khi nó quá dài thì chiều dài của oligodeoxynucleotit thay đổi khi tổng hợp. Do đó, chiều dài thường là không nhiều hơn 100 nucleotit, tốt hơn là không nhiều hơn 80 nucleotit. Mặt khác, từ các khía cạnh của sự tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba ổn định nêu trên, cũng như lượng tăng lên oligodeoxynucleotit theo sáng chế mà liên kết với mỗi lượng đơn vị của β -1,3-glucan, tránh được sự thay đổi chiều dài khi tổng hợp của oligodeoxynucleotit, và hiệu quả tạo phức, chiều dài của poly dA tốt hơn là chiều dài của 20 đến 60 nucleotit (cụ thể là, chiều dài của 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 hoặc 60 nucleotit), tốt hơn nữa là chiều dài của 30 đến 50

nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleotit), tốt nhất là chiều dài của 30 đến 45 nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 nucleotit). Cụ thể là, khi chiều dài không dưới 30 nucleotit thì đạt được hiệu quả tạo phức tốt. Oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa poly dA có hoạt tính để tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba với hai chuỗi schizophyllan. Lưu ý rằng, đôi khi poly deoxyadenylat được quy định là “poly(dA)” hoặc “poly(dA)”.

Khi một phân tử của oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể chứa nhiều ODN CpG typ K và/hoặc nhiều poly dA, nó tốt hơn là chứa một trong các ODN CpG typ K và poly dA, tốt nhất là gồm một ODN CpG typ K và poly dA.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ poly dA được đặt ở đầu 3' của ODN CpG typ K. Theo sự sắp xếp này, phức chất theo sáng chế (chi tiết được mô tả dưới đây) có hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K cũng như hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D.

ODN CpG typ K và poly dA có thể được liên kết trực tiếp bằng liên kết cộng hóa trị, hoặc được liên kết qua trình tự đoạn đệm. Trình tự đoạn đệm nghĩa là trình tự nucleotit có một hoặc nhiều nucleotit được chèn giữa hai nguyên tố cấu tạo liền kề. Chiều dài của trình tự đoạn đệm không bị giới hạn cụ thể miễn là phức chất theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch (tốt hơn là hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B để sản sinh IL-6, và hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai để sản sinh IFN- α), chiều dài thường là từ 1 đến 10 nucleotit, chiều dài tốt hơn là từ 1 đến 5 nucleotit, chiều dài tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 nucleotit. Tốt nhất là, ODN CpG typ K và poly dA được liên kết trực tiếp bằng liên kết cộng hóa trị.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế tùy ý có trình tự nucleotit bổ sung ở đầu 5' và/hoặc đầu 3' của nó, ngoài ODN CpG typ K, poly dA và trình tự đoạn đệm tùy ý. Chiều dài của trình tự nucleotit bổ sung không bị giới hạn cụ thể miễn là phức chất theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch (tốt hơn là hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B để sản sinh IL-6, và hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai để sản sinh IFN- α), chiều dài thường là từ 1 đến 10 nucleotit, chiều dài tốt hơn là từ 1 đến 5 nucleotit, chiều dài tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 nucleotit.

Theo phương án ưu tiên, oligodeoxynucleotit theo sáng chế không chứa

trình tự nucleotit bổ sung này ở đầu 5' và/hoặc đầu 3'. Tức là, oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là chứa ODN CpG typ K, poly dA và trình tự đoạn đệm tùy ý, tốt hơn nữa là gồm ODN CpG typ K và poly dA.

Theo phương án ưu tiên nhất của sáng chế, oligodeoxynucleotit theo sáng chế gồm ODN CpG typ K (cụ thể là, ví dụ như, oligodeoxynucleotit chứa trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1) và poly dA, trong đó ODN CpG typ K có mặt ở đầu 5' của oligodeoxynucleotit và poly dA có mặt ở đầu 3' của nó. Cụ thể là, nó là oligodeoxynucleotit trong đó poly dA là chiều dài của 20 – 60 nucleotit (tốt hơn nữa là chiều dài của 30 đến 50 nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleotit), tốt nhất là chiều dài của 30 – 45 nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 nucleotit)) được nối ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit chứa trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, ví dụ như, oligodeoxynucleotit gồm có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2, hoặc 9 đến 12.

Chiều dài đầy đủ của oligodeoxynucleotit theo sáng chế thường là chiều dài của 30 đến 200 nucleotit, tốt hơn là chiều dài của 35 đến 100 nucleotit, tốt hơn nữa là chiều dài của 40 đến 80 nucleotit (cụ thể là chiều dài của 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 hoặc 80 nucleotit), tốt hơn nữa là chiều dài của 50 đến 70 nucleotit (cụ thể là chiều dài của 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 nucleotit), tốt nhất là chiều dài của 50 đến 65 nucleotit (cụ thể là chiều dài của 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 nucleotit).

Tốt hơn là, oligodeoxynucleotit theo sáng chế bao gồm biến thể của liên kết phosphodiester, tốt hơn nữa là, biến thể của liên kết phosphodiester là liên kết phosphothioat (tức là, như được mô tả ở WO 95/26204, một trong các nguyên tử oxy không có liên kết ngang được thế bởi nguyên tử sulfua). Tức là, một phần hoặc tất cả các liên kết phosphodiester ở oligodeoxynucleotit theo sáng chế được thế bởi liên kết phosphothioat.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là chứa biến thể bởi liên kết

phosphothioat hoặc liên kết phosphodithioat ở ODN CpG typ K, tốt hơn nữa là, tất cả các liên kết phosphodiester ở ODN CpG typ K được thế bởi các liên kết phosphothioat. Cũng như vậy, oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là chứa liên kết phosphothioat hoặc liên kết phosphodithioat ở poly dA, tốt hơn nữa là, tất cả các liên kết phosphodiester ở poly dA được thế bởi các liên kết phosphothioat. Tốt hơn nữa là, tất cả các liên kết phosphodiester ở oligodeoxynucleotit theo sáng chế chứa CpG oligodeoxynucleotit typ K được làm giống như của người và poly deoxyadenylat được thế bởi các liên kết phosphothioat. Tốt nhất là, oligodeoxynucleotit theo sáng chế là oligodeoxynucleotit trong đó poly dA của chiều dài của 20 đến 60 nucleotit (tốt hơn nữa là, chiều dài của 30 đến 50 nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleotit), tốt nhất là, chiều dài của 30 đến 45 nucleotit (chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 nucleotit)) được nối đến đầu 3' của CpG oligodeoxynucleotit typ K được làm giống như của người (ví dụ như, SEQ ID NO: 1), và tất cả các liên kết phosphodiester có trong oligodeoxynucleotit được thế bằng các liên kết phosphothioat. Do liên kết phosphothioat, oligodeoxynucleotit theo sáng chế được mong chờ không chỉ thể hiện tính kháng sự thoái biến mà còn thể hiện sự tăng cường hoạt tính kích thích miễn dịch (ví dụ như, hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B để sản sinh IL-6), và hiệu suất cao của phức chất CpG- β -1,3-glucan. Theo bản mô tả sáng chế này, liên kết phosphothioat giống như là cấu trúc chính phosphothioat, và liên kết phosphodiester giống như là cấu trúc chính phosphat.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế bao gồm các muối được dụng, este và các muối của este của oligodeoxynucleotit nêu trên.

Các ví dụ ưu tiên của các muối được dụng của oligodeoxynucleotit theo sáng chế bao gồm các muối kim loại như các muối của kim loại kiềm (như muối natri, muối kali, và muối liti), các muối của kim loại kiềm thổ (như muối canxi, và muối magie), muối nhôm, muối sắt, muối kẽm, muối đồng, muối niken, muối coban và tương tự; các muối amin như các muối vô cơ (như muối amoni), và các muối hữu cơ (như muối t-octylamin, muối dibenzylamin, muối morpholin, muối glucosamin, muối alkyleste phenylglyxin, muối etylendiamin, muối N-

metylglucamin, muối guanidin, muối diethylamin, muối triethylamin, muối dicyclohexylamin, muối N,N'-dibenzyletylendiamin, muối cloprocain, muối procain, muối dietanolamin, muối N-benzyl-phenetylamin, muối piperazin, muối tetrametylamoni, muối tris(hydroxymetyl)aminometan) và tương tự; các muối của axit vô cơ như các muối hydraxit được halogen hoá (như hydroflorua, hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua), muối nitrat, perchlorat, sulfat, phosphat và tương tự; các muối của axit hữu cơ như các alkansulfonat thấp (ví dụ như, metansulfonat, triflometansulfonat, etansulfonat), các arylsulfonat (ví dụ như, benzensulfonat, p-toluensulfonat), axetat, malat, fumarat, succinat, xitrat, tartrat, oxalat, maleat và tương tự; và các muối của amino axit như muối glyxin, muối lysin, muối arginin, muối ornithin, glutamat và aspartat.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể ở bất kỳ dạng sợi đơn, sợi đôi, và sợi ba, nhưng tốt hơn là sợi đơn.

Oligodeoxynucleotit theo sáng chế tốt hơn là được phân tách. Thuật ngữ “được phân tách” nghĩa là thao tác để loại bỏ các nhân tố ngoài các thành phần theo sáng chế được thực hiện, và oligodeoxynucleotit không ở trong trạng thái tồn tại trong tự nhiên. Độ tinh khiết của “oligodeoxynucleotit được phân tách” (phần trăm trọng lượng của oligodeoxynucleotit theo sáng chế tính theo tổng khối lượng của sản phẩm đích dùng để đánh giá) thường không nhỏ hơn 70%, tốt hơn là không nhỏ hơn 80%, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 99%.

Do oligodeoxynucleotit theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B người) để sản sinh IL-6), nó hữu dụng để làm chất kích thích miễn dịch và tương tự. Ngoài ra, do oligodeoxynucleotit theo sáng chế có tính chất để tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba với hai β -1,3-glucan (tốt hơn là, lentinan, schizophyllan, hoặc scleroglucan), nó hữu dụng để điều chế phức chất theo sáng chế nêu trên.

2. Phức chất

Sáng chế đề cập đến phức chất chứa oligodeoxynucleotit theo sáng chế nêu trên và β -1,3-glucan (sau đây được gọi là phức chất theo sáng chế).

Do oligodeoxynucleotit theo sáng chế nêu trên chứa ODN CpG typ K, chính nó thể hiện hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B người) để sản sinh IL-6), và không đủ hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma để sản sinh IFN- α). Tuy nhiên bất ngờ là nó lại đạt được hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma để sản sinh IFN- α) bằng cách tạo phức chất với β -1,3-glucan (tốt hơn là, lentinan, hoặc schizophyllan), mà không cần trình tự ODN CpG typ D. Tức là, phức chất theo sáng chế có cả hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B người) để sản sinh IL-6), và hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma (tốt hơn là người các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma) để sản sinh IFN- α).

Các ví dụ về β -1,3-glucan được sử dụng theo sáng chế bao gồm lentinan, schizophyllan, scleroglucan, curdlan, pachyman, grifolan, laminaran và tương tự. β -1,3-glucan tốt hơn là chứa nhiều mạch 1,6-glucopyranosit (tỷ lệ chuỗi bên là 33 đến 40%) như lentinan, schizophyllan và scleroglucan, tốt hơn nữa là lentinan, hoặc schizophyllan, tốt nhất là lentinan.

Lentinan (LNT) là β -1,3-1,6-glucan có nguồn gốc từ nấm đông cô đã biết và có công thức phân tử là $(C_6H_{10}O_5)_n$, và trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 300.000 đến 700.000. Mặc dù, nó hầu như không tan trong nước, metanol, etanol(95) và axeton, nhưng nó tan trong các dung dịch hữu cơ phân cực (DMSO) và dung dịch natri hydroxit chứa nước.

Lentinan có hoạt tính để tăng cường đại thực bào được hoạt hóa, các tế bào T tiêu diệt, các tế bào tiêu diệt tự nhiên và hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian đại thực bào phụ thuộc kháng thể (ADMC) (Hamuro, J., et al.: Immunology, 39, 551-559, 1980, Hamuro, J., et al.: Int. J. Immunopharmacol., 2, 171, 1980, Herlyn, D., et al.: Gann, 76, 37-42, 1985). Trong các thử nghiệm trên động vật, việc sử dụng kết hợp cùng với chất hóa trị liệu thể hiện tác dụng ngăn ngừa sự phát triển của khối u và hiệu quả đồng vận kéo dài sự sống trên khối u và khối u tự ghép.

Cũng như vậy, việc sử dụng lentinan riêng thể hiện tác dụng ngăn ngừa sự phát triển của khối u và hiệu quả kéo dài sự sống. Trong các thử nghiệm lâm sàng, sử dụng kết hợp cùng với sử dụng tegafur qua đường miệng đã kéo dài thời gian sống của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư dạ dày tái phát hoặc không phẫu thuật được (dạng được phẩm sẵn có “thuốc tiêm tĩnh mạch lentinan 1mg” Ajinomoto Co., Inc.), và đã được phê duyệt ở Nhật Bản. Hiệu quả của sử dụng lentinan riêng cho đến nay vẫn chưa được xác nhận.

Schizophyllan (SPG) là β -glucan hòa tan có nguồn gốc từ nấm chân chim (*Schizophyllum commune*) đã biết. SPG chứa chuỗi chính β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan, và một chuỗi bên β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosyl trên 3 glucoza (Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. và Misaki A., “Carbohydr. Res.”, 1981, 89, 1, p.121-135). SPG đã được sử dụng thực tế trong 20 năm hoặc lâu hơn làm thuốc lâm sàng dạng điều chế để tiêm bắp cho trị liệu hỗ trợ miễn dịch của bệnh ung thư phụ khoa (Shimizu, Chin, Hasumi, Masubuchi, “Biotherapy”, 1990, 4, p.1390 Hasegawa, “Oncology and Chemotherapy”, 1992, 8, p.225), và an toàn in vivo đã được xác nhận (Theresa, M. McIntire và David, A. Brant, “J. Am. Chem. Soc.”, 1998, 120, p.6909).

Theo bản mô tả sáng chế này, “phức chất” nghĩa là sản phẩm thu được từ sự liên kết của nhiều phân tử thông qua liên kết không phải liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết cộng hóa trị như liên kết tĩnh điện, liên kết Van der Waals, liên kết hydro, tương tác kỵ nước và tương tự.

Phức chất theo sáng chế tốt hơn là thể hiện cấu trúc chuỗi xoắn ba. Theo phương án ưu tiên, trong ba chuỗi tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba, hai chuỗi là chuỗi β -1,3-glucan, và một chuỗi là chuỗi poly deoxyadenylat theo oligodeoxynucleotit theo sáng chế nêu trên. Phức chất có thể chứa phần không tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba.

Tỷ lệ thành phần của oligodeoxynucleotit và β -1,3-glucan trong phức chất theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào chiều dài chuỗi poly deoxyadenylat trong oligodeoxynucleotit, chiều dài của β -1,3-glucan và tương tự. Ví dụ như, khi chiều dài của chuỗi β -1,3-glucan và chuỗi poly deoxyadenylat là tương đương, thì hai chuỗi β -1,3-glucan và một oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể được kết hợp để tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba. Thông thường, do chiều dài chuỗi poly

deoxyadenylat ngắn hơn chiều dài của chuỗi β -1,3-glucan, nên nhiều oligodeoxynucleotit theo sáng chế có thể được kết hợp với hai chuỗi β -1,3-glucan thông qua poly deoxyadenylat để tạo thành cấu trúc chuỗi xoắn ba (xem Fig.1).

Phức chất theo sáng chế là phức chất chứa ODN CpG được làm giống như của người typ K và β -1,3-glucan (ví dụ như, lentinan, schizophyllan, scleroglucan, curdlan, pachyman, grifolan, laminaran), tốt hơn là phức chất chứa ODN CpG được làm giống như của người typ K và β -1,3-glucan (ví dụ như, lentinan, schizophyllan, scleroglucan). Tốt hơn nữa là, nó là phức chất chứa oligodeoxynucleotit trong đó poly deoxyadenylat có chiều dài 20 đến 60 nucleotit (cụ thể là chiều dài của 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 hoặc 60 nucleotit) được nối với phía 3' của oligodeoxynucleotit chứa trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, và tất cả các liên kết phosphodiester được thế bởi các liên kết phosphothioat, và β -1,3-glucan (ví dụ như, lentinan, schizophyllan) (ví dụ như, K3-dA20-60-LNT, K3-dA20-60-SPG), tốt hơn nữa là, nó là phức chất chứa oligodeoxynucleotit trong đó poly deoxyadenylat có chiều dài 30 đến 50 nucleotit (cụ thể là chiều dài của 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleotit) được nối với đầu 3' của oligodeoxynucleotit có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, và tất cả các liên kết phosphodiester được thế bằng các liên kết phosphothioat, và β -1,3-glucan (ví dụ như, lentinan, schizophyllan) (ví dụ như, K3-dA30-50-LNT, K3-dA30-50-SPG), tốt nhất là, nó là phức chất chứa oligodeoxynucleotit trong đó poly deoxyadenylat có chiều dài 30 đến 45 nucleotit (cụ thể là chiều dài 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 nucleotit) được nối với đầu 3' của oligodeoxynucleotit gồm trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, và tất cả các liên kết phosphodiester được thế bằng các liên kết phosphothioat, và β -1,3-glucan (ví dụ như, lentinan, schizophyllan) (K3-dA30-45-LNT, K3-dA30-45-SPG).

Phương pháp điều chế phức chất theo sáng chế có thể được thực hiện ở các điều kiện tương tự như các điều kiện được mô tả ở các tài liệu phi sáng chế 21 - 24, và JP-A-2008-100919. Đó là, β -1,3-glucan mà sẵn có trong tự nhiên là cấu trúc

chuỗi xoắn ba được hòa tan trong dung môi hữu cơ phân cực aprotic (dimetyl sulfoxit (DMSO), axetonitril, axeton, v.v.) hoặc dung dịch kiềm chứa nước (natri hydroxit, kali hydroxit, amoniac, canxi hydroxit, v.v.) để được sợi lỏng thành sợi đơn. Dung dịch của β -1,3-glucan sợi đơn thu được từ đó và dung dịch của oligodeoxynucleotit theo sáng chế được trộn với nhau (dung dịch chứa nước, dung dịch đệm chứa nước có độ pH gần trung tính, hoặc dung dịch đệm có tính axit chứa nước, tốt hơn là, dung dịch chứa nước hoặc dung dịch đệm chứa nước có độ pH gần trung tính), độ pH được điều chỉnh đến độ pH gần trung tính khi cần, và hỗn hợp này được duy trì trong thời gian thích hợp, ví dụ như, qua đêm ở 5°C. Kết quả là, hai chuỗi β -1,3-glucan và một chuỗi poly dA trong oligodeoxynucleotit tạo cấu trúc chuỗi xoắn ba, theo đó phức chất theo sáng chế có thể được tạo thành. Phức chất thu được có thể phải trải qua sự tinh chế bằng sắc ký không kị nước, sự siêu lọc, sự thẩm tách và tương tự để loại bỏ oligodeoxynucleotit không tạo thành phức chất. Ngoài ra, phức chất thu được có thể phải trải qua sự tinh chế bởi sắc ký trao đổi anion để loại bỏ β -1,3-glucan không tạo thành phức chất. Phức chất có thể được tinh chế thích hợp bằng các phương pháp nêu trên.

Sự tạo thành phức chất theo sáng chế có thể được xác nhận bằng, ví dụ như cách đo lường sự thay đổi hình dạng bằng phổ CD (phổ ánh sáng phân cực vòng), dịch chuyển hấp thụ tử ngoại bởi sắc ký không kị nước, điện di trên gel, điện di vi mạch, điện di mao quản, dù vậy phương pháp này không bị giới hạn ở đó.

Khi tỷ lệ trộn của oligodeoxynucleotit theo sáng chế và β -1,3-glucan có thể được xác định thích hợp khi xét đến chiều dài của chuỗi poly dA và tương tự, thì tỷ lệ phân tử (SPG/ODN) thường là 0,02 đến 2,0, tốt hơn là 0,1 đến 0,5. Theo phương án khác, tỷ lệ phân tử (β -1,3-glucan (LNT, v.v.)/ODN) là, ví dụ như, 0,005 đến 1,0, tốt hơn là 0,020 đến 0,25.

Phương pháp điều chế phức chất theo sáng chế được giải thích bằng cách lấy phức chất CpG-ODN và LNT làm ví dụ. Hòa tan LNT trong dung dịch kiềm chứa nước 0,05 - 2N, tốt hơn là 0,1 - 1,5N (như dung dịch natri hydroxit chứa nước 0,25N), và hỗn hợp này được để yên ở 1°C - 40°C trong 10 giờ đến 4 ngày (ví dụ như, để yên qua đêm ở nhiệt độ trong phòng) để điều chế dung dịch sợi đơn LNT chứa nước (ví dụ như, 50mg/ml dung dịch LNT chứa nước). Dung dịch LNT

chứa nước nêu trên và dung dịch CpG chứa nước (ví dụ như, dung dịch CpG chứa nước 100 μ M) đã điều chế riêng được trộn với nhau theo tỷ lệ phân tử (LNT/ODN) là 0,005 – 1,0, sau đó dung dịch LNT chứa nước nêu trên được trung hòa với dung dịch đệm chứa axit chứa nước (ví dụ như, NaH₂PO₄) và được duy trì ở 1 - 40°C trong 6 giờ đến 4 ngày (ví dụ như, qua đêm ở 4°C) để hoàn thành sự tạo phức. Dung dịch LNT chứa nước có thể được bổ sung sau cùng và được trộn vào sự tạo phức nêu trên. Sự hình thành phức chất có thể được xác nhận bằng cách, ví dụ như, dịch chuyển ODN CpG về phía trọng lượng phân tử cao bằng sắc ký không kể cỡ, trong khi theo dõi sự hấp thụ ở 240 – 280nm (ví dụ như, 260nm).

Theo một phương án, phức chất theo sáng chế thể hiện dạng các hạt hình que. Cỡ hạt tương đương với cỡ hạt được tạo thành tự nhiên bởi β -1,3-glucan (ví dụ như, schizophyllan), được sử dụng làm nguyên liệu, bằng cách thể hiện cấu trúc chuỗi xoắn ba. Cỡ hạt trung bình thường là từ 10 đến 100nm, tốt hơn là 20 đến 50nm. Cỡ hạt có thể được đo bằng cách hòa tan phức chất trong nước, và cho dung dịch này tham gia phương pháp tán xạ ánh sáng động ở 80°C bằng cách sử dụng Malvern Instruments Zeta Sizer.

Phức chất theo sáng chế tốt hơn là được phân tách. Độ tinh khiết của “phức chất được phân tách” (phần trăm trọng lượng của phức chất theo sáng chế so với trọng lượng của các sản phẩm đích dùng để đánh giá) thường không nhỏ hơn 70%, tốt hơn là không nhỏ hơn 80%, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 99%.

Do phức chất theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội và có cả hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K (như hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B (tốt hơn là, các tế bào B người) để sản sinh IL-6), và hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D (ví dụ như, hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma (tốt hơn là các tế bào đuôi gai giống tế bào plasma người) để sản sinh IFN- α , nó hữu dụng làm chất kích thích miễn dịch và tương tự. Ví dụ như, phức chất chứa ODN CpG typ K (ví dụ như, SEQ ID NO: 2, 11, 12) và LNT (K3-LNT) và phức chất chứa ODN CpG typ K (ví dụ như, SEQ ID NO: 2) và SPG (K3-SPG) có khả năng gây ra phản ứng viêm (mọi IFN-a, IL-6, v.v.), hoạt tính để tăng cường độ chuẩn kháng thể IgG đặc hiệu của kháng nguyên

(tổng IgG, IgG2c, v.v.) trong huyết thanh của cá thể được tiêm virus, có khả năng sản xuất xytokin đặc hiệu của (IFN- γ , IL2, v.v.) ở cá thể được tiêm virus, và hiệu quả bảo vệ viêm chống lại các virus. K3-LNT cũng có khả năng tăng cường sự sản xuất xytokin Th2 (IL-13, v.v.) ở cá thể được tiêm virus. Do đó, chúng hữu dụng làm đối tượng mục tiêu tá được mới của vaccin.

3. Dược phẩm

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa oligodeoxynucleotit theo sáng chế nêu trên hoặc phức chất theo sáng chế nêu trên. Dược phẩm theo sáng chế có thể thu được bằng cách bào chế oligodeoxynucleotit theo sáng chế nêu trên hoặc phức chất theo sáng chế nêu trên theo các cách thông thường. Dược phẩm theo sáng chế chứa oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế và chất mang dược dụng. Cũng như vậy, dược phẩm còn có thể chứa kháng nguyên. Chế phẩm này được đề xuất ở dạng liều lượng thích hợp dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa.

Với chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, như tiêm, đặt và tương tự được sử dụng, và chế phẩm tiêm có thể bao gồm các dạng liều lượng như tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong da, tiêm bắp, tiêm nhỏ giọt và tương tự. Chế phẩm tiêm này có thể được bào chế theo phương pháp đã biết. Phương pháp bào chế chế phẩm tiêm bao gồm hòa tan hoặc huyền phù oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế nêu trên trong dung dịch chứa nước vô trùng thường được sử dụng để tiêm. Với dung dịch chứa nước dùng để tiêm như nước cất; nước muối sinh lý; các dung dịch đệm như dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm carbonat, dung dịch đệm tris, dung dịch đệm axetat và tương tự; và tương tự có thể được sử dụng. Độ pH của dung dịch chứa nước này là, ví dụ như, 5 - 10, tốt hơn là 6 - 8. Chế phẩm tiêm đã bào chế tốt hơn là được nạp vào ống thuốc tiêm phù hợp.

Cũng có thể bào chế chế phẩm dạng bột của oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế bằng cách cho hỗn dịch của oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế tham gia quá trình xử lý như làm khô trong chân không, làm khô lạnh và tương tự. Oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách bảo quản tương tự ở trạng thái bột, và phân tán bột trong dung dịch chứa nước để tiêm khi sử dụng.

Hàm lượng oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế trong dược phẩm thường nằm trong khoảng 0,1 - 100% trọng lượng, tốt hơn là khoảng 1 - 99% trọng lượng, tốt hơn nữa là khoảng 10 - 90% trọng lượng, của toàn bộ dược phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa, làm thành phần hoạt tính, oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế riêng hoặc sự kết hợp của oligodeoxynucleotit hoặc phức chất theo sáng chế và thành phần hoạt tính khác.

4. Sử dụng dược

Do oligodeoxynucleotit và phức chất theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội, nên oligodeoxynucleotit, phức chất và dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm các chất kích thích miễn dịch. Sử dụng oligodeoxynucleotit, phức chất hoặc dược phẩm theo sáng chế ở động vật có vú (các loài linh trưởng như người và tương tự, các loài gặm nhấm như chuột và tương tự, v.v.) có thể gây ra phản ứng miễn dịch ở động vật có vú. Cụ thể là, do phức chất theo sáng chế có tính chất hoạt hóa ODN CpG typ D, và kích thích các tế bào đơn nhân máu ngoại vi để sản sinh lượng lớn interferon typ I (mọi IFN- α , IFN- α 2, v.v.) và interferon typ II (IFN- γ), nó hữu ích làm thuốc kích thích sự sản sinh interferon typ I, thuốc kích thích sự sản sinh interferon typ II, và thuốc kích thích sự sản sinh interferon typ I hoặc typ II. Do phức chất theo sáng chế và dược phẩm chứa tương tự kích thích sự sản sinh cả interferon typ I và typ II, nên chúng hữu ích để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh mà một trong hai hoặc cả hai interferon typ I và typ II có hiệu quả với. Các ví dụ về bệnh mà interferon typ I có hiệu quả bao gồm bệnh nhiễm virus (ví dụ như, virus viêm gan C (HCV), virus herpes, virus u nhú, virus RS, virus cúm, v.v.), bệnh ung thư và tương tự. Các ví dụ về bệnh mà typ II interferon có hiệu quả bao gồm bệnh dị ứng, bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào (*Leishmania*, v.v.), vi khuẩn (*Listeria*, *Mycovi* khuẩn tuberculosis, v.v.) và tương tự, và tương tự. Với bệnh nhiễm virus cấp tính với virus RS, virus cúm và tương tự, do cả interferon typ I và interferon typ II tăng cường các phản ứng miễn dịch liên quan đến trừ khử virus, phức chất và dược phẩm chứa chúng theo sáng chế được mong chờ là có hiệu quả với các bệnh nhiễm virus cấp tính.

Ngoài ra, oligodeoxynucleotit và phức chất theo sáng chế, cụ thể là, phức

chất theo sáng chế, có hoạt tính tá dược của vacxin mạnh, và sử dụng oligodeoxynucleotit và phức chất theo sáng chế cùng với kháng nguyên ở động vật có vú có thể gây ra phản ứng miễn dịch mạnh đối với kháng nguyên. Do đó, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm để kích thích phản ứng miễn dịch với kháng nguyên, mà chứa (a) oligodeoxynucleotit theo sáng chế, hoặc phức chất theo sáng chế, và (b) kháng nguyên. Cụ thể là, phức chất theo sáng chế kích thích mạnh mẽ cả phản ứng miễn dịch dịch thể đối với kháng nguyên (sản xuất kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên) và phản ứng miễn dịch tế bào (gây ra CTL đặc hiệu của kháng nguyên). Do đó, oligodeoxynucleotit, phức chất, và dược phẩm theo sáng chế, cụ thể là phức chất theo sáng chế và dược phẩm chứa oligodeoxynucleotit là hữu ích làm các tá dược của vacxin.

Theo bản mô tả sáng chế này, tá dược là chất trợ dược mà thúc đẩy các phản ứng miễn dịch, là chất không đặc hiệu giúp tăng cường các phản ứng miễn dịch với kháng nguyên khi được sử dụng với kháng nguyên ở cơ thể sống.

Kháng nguyên không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có tính kháng nguyên ở động vật có vú (các loài linh trưởng như người và tương tự, các loài gặm nhấm như chuột và tương tự, v.v.) là đối tượng sử dụng, và có thể được ghi nhận là kháng nguyên bởi kháng thể hoặc lympho bào T gây độc tế bào (CTL, các tế bào $CD8^+$ T). Chất bất kỳ trở thành kháng nguyên (protein, peptit, axit nucleic, lipit, các carbohydrat, và biến thể của chất nêu trên (ví dụ như, biến thể gây ra sự loại bỏ, sự thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều amino axit (sau đây là sự đột biến, v.v.) và tương tự) có thể được sử dụng. Với kháng nguyên, kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh như động vật nguyên sinh, nấm, vi khuẩn, virus và tương tự, và kháng nguyên liên quan đến bệnh ung thư hoặc bệnh cụ thể cũng có thể được sử dụng.

Theo bản mô tả sáng chế này, “kháng nguyên A có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh X” nghĩa là kháng nguyên A được chứa làm yếu tố cấu thành nên tác nhân gây bệnh X. Ví dụ như, khi kháng nguyên A là polypeptit nghĩa là trình tự amino axit của polypeptit được thể hiện ở trình tự amino axit của protein được mã hóa bởi bộ gen của tác nhân gây bệnh X.

Các ví dụ về kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh bao gồm

chính tác nhân gây bệnh hoặc một phần của nó, chính tác nhân gây bệnh được bất hoạt hoặc bị làm suy yếu hoặc một phần của nó, hoặc biến thể gây ra sự đột biến và tương tự, và tương tự.

Khi kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh được sử dụng làm kháng nguyên, phản ứng miễn dịch với kháng nguyên được gây ra, và cơ chế để loại bỏ miễn dịch tác nhân gây bệnh chứa kháng nguyên từ cơ thể được xây dựng. Do đó, chế phẩm chứa (a) oligodeoxynucleotit theo sáng chế, hoặc phức chất theo sáng chế, và (b) kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh, để gây ra phản ứng miễn dịch với kháng nguyên, là hữu ích để phòng ngừa hoặc điều trị tác nhân gây bệnh.

Phức chất theo sáng chế gây ra mạnh mẽ cả phản ứng miễn dịch dịch thể (sản xuất kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên), và phản ứng miễn dịch tế bào (gây ra CTL đặc hiệu của kháng nguyên) với kháng nguyên. Do đó, kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh lây nhiễm trong tế bào (virus, động vật nguyên sinh, nấm, vi khuẩn, v.v.) đã biết được ghi nhận bởi các lympho bào T gây độc tế bào, kháng nguyên liên quan đến các tế bào ung thư (như kháng nguyên u) và tương tự tốt hơn là được sử dụng làm kháng nguyên.

Khi virus lây nhiễm trong tế bào không bị giới hạn cụ thể, các ví dụ của nó bao gồm virus RS, virus cúm, virus á cúm, virus viêm gan C (HCV), virus viêm gan A (HAV), virus viêm gan B (HBV), virus Ebola, virus cự bào, virus adeno, virus polio, virus viêm não Nhật Bản, virus sởi, virus quai bị, virus rubella, virus bệnh dại, virus sốt vàng, virus herpes gây bệnh thủy đậu và zona, virus hanta, virus dengue, virus noro, virus rota, virus parvo, virus corona, virus gây bệnh Carrê ở chó, virus bạch cầu tế bào T ở người lớn (HTLV-1), virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus herpes, virus papilloma và tương tự. Các ví dụ về vi khuẩn lây nhiễm trong tế bào bao gồm mycoplasma và tương tự. Các ví dụ về động vật nguyên sinh lây nhiễm trong tế bào bao gồm ký sinh trùng sốt rét, sán máng và tương tự. Tác nhân gây bệnh lây nhiễm trong tế bào tốt hơn là virus (cụ thể là virus RS, hoặc virus cúm, v.v.).

Các ví dụ về kháng nguyên liên quan đến các tế bào bệnh ung thư bao gồm protein, chuỗi đường, peptit mà được thể hiện cụ thể bởi các tế bào bệnh ung thư,

biến thể của các chất nói trên (được loại bỏ, được thế, và/hoặc được bổ sung) hoặc biến thể của nó và tương tự.

Do phức chất theo sáng chế kích thích mạnh mẽ cả interferon typ I và typ II, theo một sáng chế, virus (như virus RS, virus cúm) mà gây ra bệnh nhiễm virus cấp tính, mà cả hai interferon typ I và typ II interferon có hiệu quả, được lựa chọn làm virus.

Ví dụ như, chế phẩm chứa (a) oligodeoxynucleotit theo sáng chế, hoặc phức chất theo sáng chế, và (b) kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh hoặc bệnh ung thư, để kích thích phản ứng miễn dịch với kháng nguyên, được sử dụng cho bệnh nhân có sự lây nhiễm tác nhân gây bệnh hoặc bệnh ung thư hoặc người có khả năng bị ảnh hưởng với sự lây nhiễm tác nhân gây bệnh hoặc bệnh ung thư, để hoạt tính kháng nguyên đặc hiệu các lympho bào T gây độc tế bào (các CTL) ở đối tượng được tiếp nhận sử dụng, gây ra sản xuất kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên, tức là, gây ra phản ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật máu nóng (tốt hơn là người), theo đó sự lây nhiễm và bệnh ung thư có thể được phòng ngừa hoặc điều trị. Theo đó, chế phẩm hữu ích làm vacxin để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nêu trên như bệnh lây nhiễm, bệnh ung thư và tương tự.

Ngoài ra, do phức chất theo sáng chế có thể kích thích mạnh mẽ cả phản ứng miễn dịch dịch thể (sản xuất kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên) và phản ứng miễn dịch tế bào (gây ra CTL đặc hiệu của kháng nguyên) với kháng nguyên, kháng nguyên bề mặt và kháng nguyên bên trong bất kỳ của tác nhân gây bệnh và tế bào bệnh ung thư có thể được sử dụng làm kháng nguyên, và sử dụng hỗn hợp của kháng nguyên bề mặt và kháng nguyên bên trong cũng được mong muốn.

Chế phẩm chứa (a) oligodeoxynucleotit theo sáng chế, hoặc phức chất theo sáng chế, và (b) kháng nguyên, để kích thích phản ứng miễn dịch với kháng nguyên, có thể được điều chế theo được phẩm nêu trên theo sáng chế.

Các hàm lượng được bộc lộ ở bất kỳ tài liệu nào được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm các bằng sáng chế và các đơn sáng chế, được kết hợp ở đây một cách tổng thể để viện dẫn theo như chúng được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết hơn sau đây bằng cách đề cập đến các ví dụ, mà không nên hiểu là làm giới hạn sáng chế.

Phương pháp Các động vật và các thuốc thử

Thế hệ chuột thiếu hụt *Tlr9* và thiếu hụt *Dectin-1* được mô tả ở tài liệu (Koyama, S., et al., Science translational medicine 2, 25ra24 (2010); Saijo, S., et al., Nature immunology 8, 39-46 (2007)). Chuột C57BL/6J được mua từ NIHON CLEA. Tất cả các thử nghiệm trên động vật được tiến hành theo các hướng dẫn có hệ thống của National Institute of Biomedical Innovation, và của bộ phận nghiên cứu động vật của Osaka University. Các ODN CpG được tổng hợp bằng GenDesign, Inc.

(dầu gạch chân quy định các liên kết phosphothioat).

Bảng 1

K3 (5'-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-3') (SEQ ID NO: 1);

K3-dA₄₀ (5'-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-40mer A-3') (SEQ ID NO: 2);

dA₄₀-K3 (5'-40mer A-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-3') (SEQ ID NO: 3);

D35 (5'-GGT GCA TCG ATG CAG GGG GG-3') (SEQ ID NO: 4);

CpG21798 (5'-TCG TCG ACG ATC GGC GCG CGC CG-3') (SEQ ID NO: 5);

CpG21889 (5'-TCG TCG ACG ATC GGC GCG CGC CG-3') (SEQ ID NO: 6);

CpG2395 (5'-TCG TCG TTT TCG GCG CGC GCC G-3') (SEQ ID NO: 7);

M362 (5'-TCG TCG TCG TTC GAA CGA CGT TGA T-3') (SEQ ID NO: 8);

K3 được đánh dấu Alexa 488;

K3-dA₄₀ được đánh dấu Alexa 488;

K3 được đánh dấu Alexa 647;

K3-dA₄₀ được đánh dấu Alexa 647

Cụ thể là, sự tổng hợp K3-dA₃₅ (SEQ ID NO: 12), K3-dA₃₀ (SEQ ID NO: 11), K3-dA₂₅ (SEQ ID NO: 10) và K3-dA₂₀ (SEQ ID NO: 9), ngoài K3-dA₄₀ (SEQ ID NO: 2) nêu trên, được mô tả (bảng 2).

Bảng 2

K3-dA₄₀:

AsTsCsGsAsCsTsCsTsCsGsAsGsCsGsTsTsCsTsCsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA

sA

(Danh mục trình tự, SEQ ID NO: 2)

K3-dA35:

AsTsCsGsAsCsTsCsTsCsGsAsGsCsGsTsTsCsTsCsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA
sA (Danh mục

trình tự, SEQ ID NO: 12)

K3-dA30:

AsTsCsGsAsCsTsCsTsCsGsAsGsCsGsTsTsCsTsCsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA
sA (Danh mục trình tự, SEQ ID

NO: 11)

K3-dA25:

AsTsCsGsAsCsTsCsTsCsGsAsGsCsGsTsTsCsTsCsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA
sAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA (Danh mục trình tự, SEQ ID NO: 10)

K3-dA20:

AsTsCsGsAsCsTsCsTsCsGsAsGsCsGsTsTsCsTsCsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsAsA
sAsAsAsAsAsAsAsAsA (Danh mục trình tự, SEQ ID NO: 9)

(Theo các trình tự nêu trên, s thể hiện rằng liên kết phosphodiester giữa các nucleozit được thể bằng liên kết phosphothioat.)

Các oligodeoxynucleotit được tổng hợp bằng phương pháp thông thường, phương pháp phosphoramidit pha rắn (Acid nucleics in Chemistry and Biology, 3. Chemical synthesis (1990) ed. G. Michael Blackburn and Michael J. Gait. Oxford University Press).

Bảng 3 thể hiện trọng lượng phân tử của các ODN CpG được mô tả ở bảng 2, và thời gian lưu được phân tích bởi HPLC pha đảo trong các điều kiện sau (cột: nước, X-Bridge C18 2,5 μ M, 4,6x75mm, dung dịch A: 100mM hexafloroisopropanol, 8mM triethylamin, dung dịch B: metanol, B%: 5%→30% (20 phút, độ dốc tuyến tính); 60°C; 1ml/phút; 260nm).

Bảng 3

Hợp chất	Thời gian lưu giá trị đã đo giá trị đã tính (phút)
----------	--

K3-dA40	19520,3	19519,0	14,9
K3-dA35	17873,9	17872,8	15,0
K3-dA30	16227,5	16225,7	14,9
K3-dA25	14581,1	14580,5	14,7
K3-dA20	12934,8	12933,3	14,6

Ovalbumin (OVA) được mua từ Seikagaku Kogyo. DQ-OVA, Alexa488-OVA, CFSE, và Lipofectamin 2000 được mua từ Invitrogen. Hoechst33258, Zymosan, và Curdlan được mua từ SIGMA. Zymosan đã rút ra được mua từ Invivogen. Clodronat liposom được mua từ FormuMax. Vacxin sản phẩm phân loại theo cúm, toàn bộ virus bất hoạt bởi formalin (WIV), và các virus cúm đã tinh lọc (H1N1) được điều chế như được mô tả nêu trên (Koyama, S., et al., Science translational medicine 2, 25ra24 (2010)).

Sự tạo phức của ODN CpG và SPG (Fig.1)

Hòa tan 7,22mg K3-dA40 trong nước (3,7mL). Hòa tan SPG (15mg, Mitsui Sugar Co., Ltd.) trong NaOH 0,25N (1mL). Bổ sung 1mL thể tích của 330mM NaH₂PO₄ vào dung dịch ADN, sau đó bổ sung dung dịch SPG vào dung dịch DNA/NaH₂PO₄ và giữ ở 4°C qua đêm để hoàn thành sự tạo phức. Tỷ lệ phân tử (MSPG/MDNA) được cố định là 0,27. Sự hình thành của phức chất được xác nhận bằng thiết bị điện di vi mạch (SHIMADZU: MultiNA).

Sự tạo phức của ODN CpG và LNT (Fig.1)

Hòa tan lentinan (LNT: Ajinomoto Co., Inc., lot No.: 2D8X1) trong dung dịch NaOH 0,25N cho đến khi đạt 50mg/ml, và để yên hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hòa tan nhiều ODN CpG (các bảng 2, 3) trong nước đến 100mM để tiêm. Trộn dung dịch LNT chứa nước và nhiều dung dịch CpG chứa nước (K3-dA20 (SEQ ID NO: 9), K3-dA25 (SEQ ID NO: 10), K3-dA30 (SEQ ID NO: 11), K3-dA35 (SEQ ID NO: 12), K3-dA40 (SEQ ID NO: 2)) theo các tỷ lệ được thể hiện ở bảng 4, sau đó bổ sung dung tích tương tự của NaH₂PO₄ 330mM như LNT, và duy trì hỗn hợp ở 4°C qua đêm để hoàn thành sự tạo phức. Sự tạo thành phức chất được xác nhận bằng cách dịch chuyển ODN CpG về phía trọng

lượng phân tử cao hơn bởi sắc ký loại trừ kích thước, khi theo dõi độ hấp thụ ở 260nm. (hệ thống: Agilent 1100 series, cột: Asahipak GF7 M-HQ (Shodex), hai cột được kết nối, lưu lượng: 0,8mL/phút, dung dịch đệm: EDTA PBS 10mM, độ pH 7,4, nhiệt độ: 40°C).

Bảng 4

CpG-LNT	ODN CpG		LNT	
	typ	(μg)	(μg)	
K3-dA20-LNT	K3-dA20	69	113	
K3-dA20-LNT	K3-dA20	138	136	
K3-dA25-LNT	K3-dA25	78	85	
K3-dA30-LNT #1	K3-dA30	433	425	Các kết quả 9)
K3-dA30-LNT #2	K3-dA30	433	510	Các kết quả 9), 10), 11)
K3-dA35-LNT #1	K3-dA35	477	496	Các kết quả 9)
K3-dA35-LNT #2	K3-dA35	477	595	Các kết quả 9), 10), 11)
K3-dA40-LNT #1	K3-dA40	521	567	Các kết quả 9)
K3-dA40-LNT #2	K3-dA40	521	680	Các kết quả 9), 10), 11)
K3-dA35-LNT	K3-dA35	1527	1524	Các kết quả 12)
K3-dA40-LNT	K3-dA40	1667	1741	Các kết quả 12)

Sự điều chế và kích thích các PBMC ở người (các Fig.2, 3, 6 và 7)

Thu được các PBMC từ ba tình nguyện viên là nam giới trưởng thành khỏe mạnh (30 đến 40 tuổi). Các thí nghiệm sử dụng các PBMC ở người đã được phê duyệt bởi Institutional Review Board of the National Institute of Biomedical Innovation. Sau khi điều chế các PBMC bằng cách sử dụng Ficoll, chúng được cấy ở nồng độ 1×10^7 tế bào/mL. Các PBMC được duy trì hoàn toàn trong RPMI (RPMI 1640 được bổ sung FCS 10%, penixilin, và streptomycin). Các PBMC được kích thích với K3 (0,24, 0,74, 2,2, 6,6, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), K3-dA40, K3-SPG (phức chất K3-dA40), dA40-K3, SPG-K3

(phức chất dA40-K3), D35, CpG21798, CpG21889, CpG2395, hoặc M362 trong 24 giờ. Các phần dịch nổi được cho tham gia ELISA cho mọi IFN- α (Mabtech), IL-6 (R&D), và Milliplex (Millipore).

Phân tích hiển vi điện tử (Fig.4)

Trước khi nhuộm, các mẫu được nhỏ trên các lưới tọa độ được phủ formvar-cacbon. Đối với nhuộm âm, giọt uranyl axetat 2% (pH 4,0) được đặt trên lưới tọa độ và để ở không khí khô. Các lưới tọa độ được kiểm tra với độ phóng đại $\times 40.000$ trên kính hiển vi điện tử (Hitachi H-7650).

Tán xạ ánh sáng động (Fig.5)

Các cỡ hạt nano trung bình trong dung dịch chứa nước ở 80°C được đo bằng cách sử dụng tán xạ ánh sáng động trên Malvern Instruments Zeta Sizer.

Các môi trường nuôi cấy tế bào lá lách và tế bào đuôi gai (các Fig.8 và 9)

Các lá lách chuột được thu gom từ chuột C57BL/6J, thiếu hụt Tlr9, và thiếu hụt Dectin-1 6 tuần tuổi. Sau khi hỗn dịch của các tế bào lá lách, các tế bào máu đỏ (các RBC) được dung giải với dung dịch đệm phân giải ACK và các tế bào được duy trì hoàn toàn trong RPMI. Các tế bào được nuôi cấy với 1×10^7 tế bào/mL. Các DC có nguồn gốc từ tủy xương được sản sinh bằng cách nuôi cấy trong 7 ngày với người Flt3L (Peprotech) (100ng/mL). Các tế bào được nuôi cấy ở nồng độ 1×10^7 tế bào/mL. Các BMDM được sản sinh bằng cách nuôi cấy trong 7 ngày với chuột M-CSF (Peprotech) (20 ng/mL). Các tế bào này được duy trì hoàn toàn trong RPMI.

Sự phân bố nội bào (các Fig.8 và 9)

Các BMDM được nuôi cấy ở 5×10^7 tế bào/mL và được kích thích với Alexa 488-K3 (1 μ M) thêm Alexa 647-K3-SPG (1 μ M), hoặc Alexa 488-D35 (1 μ M) thêm Alexa 647-K3-SPG (1 μ M) trong 3 giờ. Các tế bào được nhuộm với Hoechst33258 trong 30 phút để quan sát các hạt nhân, sau đó các tế bào được cố định và được phân tích bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang.

Miễn dịch

Chuột C57BL/6J, thiếu hụt Tlr9, và thiếu hụt Dectin-1 6 tuần tuổi được sử dụng với

OVA (0,1; 1; 10; hoặc 100 μ g);

OVA (0,37; 1,1; 3,3; hoặc 10 μ g) và K3(538pmol);

OVA (0,37; 1,1; 3,3; hoặc 10 μ g) và K3-dA40 (538pmol); hoặc

OVA (0,37; 1,1; 3,3; hoặc 10 μ g) và K3-SPG (538pmol)

ở gốc đuôi vào các ngày 0 và 10. Đối với các thử nghiệm khác, chuột C57BL/6J được sử dụng với

vacxin phân chia (0,1 μ g) riêng rẽ;

vacxin phân chia thêm K3 (538pmol); hoặc

vacxin phân chia thêm K3-SPG (538pmol)

vào các ngày 0 và 10 ở gốc đuôi. Máu được rút ra vào ngày 17 và các chuẩn độ kháng thể huyết thanh đặc hiệu của kháng nguyên được đo bởi ELISA (các Fig.10, 15a, 16, 25, 28a, 29 và 43a). Các lá lách chuột được thu gom vào ngày 17 và các tế bào lá lách được bào chế bằng phương pháp nêu trên. Các tế bào được tái kích thích với

OVA257-264 (OVA257):SIINFEEKL (10 μ g/ml);

OVA323-339 (OVA323):ISQAVHAAHAEINEAGR (10 μ g/ml);

Toàn bộ OVA protein (OVA) (10 μ g/ml);

NP260-283 (NP260):ARSALILRGSVAHKSCLPACVYGP (10 μ g/ml); hoặc

vacxin phân chia (10 μ g/ml)

trong 24 hoặc 48 giờ. Các phân dịch nổi được cho qua ELISA cho chuột IFN- γ (các Fig.11, 15b, 17, 26, 28b, 30 và 43b). Đối với thử nghiệm tetramer, các tế bào lá lách được nhuộm bằng tetramer H-2Kb OVA (MBL), các kháng thể kháng CD8 α (KT15), kháng TCR β (H57-597), kháng CD62L (MEL-14), và kháng CD44 (IM7), và 7-AAD. Số lượng tế bào OVA tetramer⁺ CD44⁺ CD8 α ⁺ TCR β ⁺ được xác định bằng FACS (các Fig.12, 15c, 27, 28c và 31).

Thử nghiệm CTL in vitro CTL (Fig.13)

Chuột C57BL/6J 6 tuần tuổi được sử dụng với

OVA (100 μ g);

OVA thêm K3 (3,3 μ g);

OVA thêm K3-dA40 (3,3 μ g); hoặc

OVA with K3-SPG (3,3 μ g)

ở gốc đuôi vào ngày 0. 7 ngày sau khi tiêm chủng, các tế bào lá lách naïve C57BL/6J được đánh dấu với nồng độ khác nhau của CFSE (5 hoặc 0,5 μ M) trong 10 phút ở 37°C. Các tế bào đã nhuộm ở các nồng độ cao được dao động với OVA257 (10 μ g/ml) trong 90 phút ở 37°C. Sau khi rửa hai lần bằng dung môi, các tế bào đã đánh dấu được trộn và được truyền đến chuột đã miễn dịch theo đường tiêm tĩnh mạch. 24 giờ sau khi truyền, các tế bào lá lách được thu gom và phân trăm các tế bào đã đánh dấu CFSE được đo bằng FACS.

Sự gây miễn dịch peptit

Chuột C57BL/6J được gây miễn dịch với

OVA257 (10 μ g);

OVA257 thêm K3 (10 μ g);

OVA257 thêm K3-dA40 (10 μ g); hoặc

OVA257 thêm K3-SPG (10 μ g).

Bảy ngày sau khi gây miễn dịch, các tế bào lá lách được chuẩn bị và được nhuộm với các kháng thể H-2Kb OVA tetramer, các kháng thể kháng CD8 α , kháng TCR β , kháng CD62L, và kháng CD44. Số lượng các tế bào OVA tetramer⁺ CD44⁺ CD8 α ⁺ TCR β ⁺ được phân tích bằng FACS (Fig.14 trái). Các tế bào lá lách đã chuẩn bị được tái kích thích in vitro với OVA257 (10 μ g/ml) thêm Golgi Plug trong 4 giờ. Các tế bào được nhuộm với các kháng thể kháng IFN- γ , kháng CD8 α , và kháng CD3e, và số lượng tế bào IFN- γ ⁺ CD8 α ⁺ CD3e⁺ được xác định bằng FACS (Fig.14 phải).

Sự chuyển nạp và thử nghiệm liên kết Dectin-1 (các Fig.18 và 19)

Các tế bào HEK293 được chuyển nạp trống, các plasmit biểu hiện Dectin-1, hoặc Dectin-2 bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000. 48 giờ sau khi chuyển nạp, các tế bào được xử lý với FITC-SPG (0,5 μ M), K3-dA40 được đánh dấu Alexa 488 (0,5 μ M), hoặc K3-SPG được đánh dấu Alexa 488 (0,5 μ M) trong 60 phút ở 37°C. Sau khi xử lý, các tế bào được thu hoạch và SPG hoặc các tế bào tích cực ODN CpG được phân tích bởi FACS.

Sự kích thích của các tế bào miễn dịch (các Fig.20, 21, 22, 23 và 24)

Các tế bào lá lách và các FL-DC từ chuột C57BL/6J, thiếu hụt *Tlr9*, hoặc thiếu hụt *Dectin-1* được kích thích với K3-SPG (0,014; 0,03; 0,04; 0,08; 0,12; 0,25; 0,37; 0,74; 1,1; 2,2; 3,3; 6,7; 10, hoặc 20µg/ml), Zymosan (3,7; 11,1; 33,3; hoặc 100µg/ml), Curdlan, Zymosan đã loại bỏ, hoặc SPG trong 24 giờ. Ở các thử nghiệm khác, các tế bào lá lách từ chuột C57BL/6J hoặc thiếu hụt *Dectin-1* được kích thích với Zymosan- đã loại bỏ (100; 33,3; hoặc 11,1µg/ml) hoặc SPG (100, 33,3; hoặc 11,1µg/ml), có hoặc không có D35 (1µM) trong 24 giờ. Các phân dịch nổi được cho qua ELISA đối với IFN- α (PBL), IL-6 (R&D), IL-12 p40 (R&D), IL-12 p70 (R&D), và Bioplex (BIO-RAD).

Hóa mô miễn dịch (Fig.32)

Chuột C57BL/6J được sử dụng với

DQ-OVA (10µg);

Alexa 488-K3-SPG (10µg);

Alexa 647-K3-SPG (10µg); hoặc

DQ-OVA thêm Alexa647-K3-SPG (10µg)

ở gốc đuôi. Sau khi thu gom iLN, các phần đông lạnh được bào chế bằng cách sử dụng cryostat. Các phần đông lạnh được cố định bởi 4% paraformaldehyt trong 10 phút và được ủ với các kháng thể kháng Siglec-1 (MOMA-1), kháng MARCO (ED31), kháng CD3e (145-2C11), hoặc kháng CD11c (N418). Các kết quả hình ảnh được phân tích bằng ImageJ.

Kính hiển vi hai photon (các Fig.33 và 35)

Chuột C57BL/6J, thiếu hụt *Tlr9*, hoặc thiếu hụt *Dectin-1* được sử dụng với DQ-OVA (10µg), Alexa 488-K3 (10µg), hoặc Alexa 488-K3-SPG (10µg) ở gốc đuôi. 30 phút trước khi thu gom iLN, chuột được sử dụng với các kháng thể kháng PE-MARCO, hoặc kháng PE-Siglec-1 ở gốc đuôi. 1 giờ sau khi sử dụng kháng nguyên hoặc tá được, các iLN được thu gom và được bào chế cho sự phân tích hình ảnh sử dụng kính hiển vi hai photon (Olympus). Hệ số tương quan Pearson được tính bằng cách sử dụng phân tích sự cùng khu trú Volocity.

Sự phân bố của kháng nguyên và tá được In vivo (các Fig.34 và 36)

Chuột C57BL/6J được sử dụng với

Alexa 647-K3 (538pmol);

Alexa 647-K3-SPG (538pmol);

Alexa 488-OVA (10 μ g);

Alexa 488-OVA thêm K3 (10 μ g);

Alexa 488-OVA thêm K3-SPG (10 μ g);

DQ-OVA (10 μ g);

DQ-OVA thêm Alexa 647-K3 (538pmol); hoặc

DQ-OVA thêm Alexa 647-K3-SPG (538pmol)

ở gốc đuôi. 24 giờ sau khi sử dụng, các iLN được thu gom. Để bào chế các hỗn dịch tế bào đơn, các iLN được ủ với collagenaza D (1mg/mL) và DNase I (0,1mg/mL) trong 30 phút ở 37°C. Các tế bào đã bào chế được ủ với các kháng thể kháng B220 (RA3-6B2), kháng CD8 α (56-6,7), và kháng CD11c để phân tách các tập hợp DC khác nhau. Tế bào hấp thu OVA và các ODN CpG được phân tích bằng FACS.

Chế phẩm tiêm clodronat liposom (Fig.37)

Chuột C57BL/6J 6 tuần tuổi được sử dụng clodronat liposom ở gốc đuôi trong 5 hoặc 2 ngày trước khi miễn dịch. Chuột được miễn dịch ở gốc đuôi với OVA thêm K3-SPG ở ngày 0. Máu và lá lách được thu gom vào ngày 8, và các chuẩn độ kháng huyết thanh và các phản ứng tế bào T được đo bởi ELISA.

Khảo sát sự hoạt hóa DC in vivo (Fig.38)

Chuột C57BL/6J hoặc thiếu hụt Tlr9 được sử dụng với K3 (10 μ g) hoặc K3-SPG (10 μ g) ở gốc đuôi. 24 giờ sau khi sử dụng, các iLN được bào chế bởi các phương pháp nêu trên. Các tế bào được ủ với các kháng thể kháng CD11c, kháng mPDCA-1 (JF05-1C2.4.1), kháng CD8 α , và kháng CD40 (3/23), sau đó được phân tích bằng FACS.

Khảo sát phản ứng phòng vệ chống bệnh nhiễm virus cúm

Chuột C57BL/6J 6 tuần tuổi được sử dụng với

vacxin phân chia (0,1 μ g);

vacxin phân chia thêm K3-SPG (10 μ g); hoặc

WIV (0,2 μ g)

vào ngày 0 và 14. Hai tuần sau khi tạo miễn dịch, các chuẩn độ kháng thể huyết thanh được đo bằng ELISA (Fig.39) và chuột được thử qua đường mũi bằng $2,3 \times 10^3$ pfu (10 LD₅₀) của virut cúm A/PR/8/34. Sự thay đổi trọng lượng cơ thể và tỷ lệ tử vong của chuột đã thử được theo dõi trong 20 ngày (Fig.40).

Mô hình vacxin của khi đuôi dài (các Fig.41 và 42)

Các khi đuôi dài được tiêm dưới da với

vacxin phân chia cúm (5 μ g) thêm K3(5nmol), hoặc

vacxin phân chia và K3-SPG (5nmol)

ở ngày 0 và 14. Các mẫu máu được thu gom ở các tuần -2, 2, 4, 6, 8, và 110, và các chuẩn độ kháng thể huyết thanh được đo bằng ELISA.

Phân tích thống kê

Độ tin cậy mang tính thống kê ($P < 0,05$) giữa các nhóm được xác định bằng cách sử dụng phép thử t của Student hoặc thử nghiệm Mann-Whitney U.

Các kết quả 1) Hạt cỡ nano hình que của K3-SPG đạt được các đặc tính gấp đôi của ODN CpG typ K và D.

Hiệu quả tạo phức tốt hơn giữa ODN CpG và SPG yêu cầu các trình tự bổ sung của cấu trúc chính PS cho poly-dA40 ở các đầu 5' hoặc 3' thông qua các quy trình biến tính-phục hồi được thể hiện ở Fig.1 (Shimada, N., et al., Bioconjugate chemistry 18, 1280-1286 (2007); Minari, J., et al., Bioconjugate chemistry 22, 9-15 (2011)). Trong khi tối ưu hóa sự hình thành phức chất bởi ODN CpG được làm giống như của người, các tác giả sáng chế đã kiểm tra các ảnh hưởng kích thích miễn dịch của các đầu 5' và 3' của ODN CpG. 5'-K3-dA40-3', không phải 5'-dA40-K3-3', được tạo phức chất với SPG đã hoạt hóa các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người (các PBMC) để sản xuất lượng mạnh IFN- α , mặc dù các hiệu quả tạo phức có thể so sánh được (các Fig.2 và 3). K3, K3-dA40, và dA40-K3, mà có thể hoạt hóa các PBMC người để sản xuất các xytokin khác, như IL-6, đã thất bại để sản xuất IFN- α (các Fig.2 và 3). Các kết quả này chỉ ra rằng 5'-CpG được mong chờ hơn 3'-CpG để làm chất chủ vận TLR9 mới.

Chất lượng và số lượng K3-SPG được tiến hành bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) và tán xạ ánh sáng động (DLS). K3-SPG có cấu trúc giống hình que, phù hợp với sự nhìn thấy ở báo cáo trước đó (Bae, A.H., et al., Carbohydrate research 339, 251-258 (2004)) (Fig.4). Nó có vẻ là hạt monome nano tan với đường kính trung bình là 30nm, có thể so sánh với chính SPG và nhỏ hơn ODN CpG typ D (D35) (Fig.5) (Klein, D.C. et al., Ultramicroscopy 110, 689-693 (2010); Costa, L.T., et al., Biochemical and biophysical research communications 313, 1065-1072 (2004)).

Giả định là K3-SPG tạo thành hạt nano, các hoạt tính kích thích miễn dịch của K3-SPG được so sánh với ODN CpG typ C, D và P. Các PBMC được kích thích với K3-SPG đã sản xuất lượng IFN- α và IFN- γ lớn hơn, và thêm nữa các nồng độ thấp hơn các PBMC được sản xuất bằng D35 (Fig.6), ODN CpG typ P và C (Fig.7). Các kết quả này gợi ý rằng K3-SPG làm tăng đặc tính của ODN CpG typ D, mà không làm mất đặc tính của typ K, bởi vì các IFN này được biết đến là các xytokin đặc hiệu typ D (Krug, A., et al., European journal of immunology 31, 2154-2163 (2001); Verthelyi, D. et al., Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001); Gursel, M. et al., Journal of leukocyte biology 71, 813-820 (2002)). Để hiểu các chức năng đôi của ODN CpG typ K và D, các tác giả sáng chế đã phân tích sự khu trú bên trong tế bào của K3-SPG ở các đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương. K3-SPG được cùng khu trú với không chỉ các thể nội bào chứa ODN CpG typ K mà còn với các thể nội bào chứa ODN CpG typ D (các Fig.8 và 9) giống ODN CpG typ C (Guiducci, C., et al., The Journal of experimental medicine 203, 1999-2008 (2006)), gợi ý rằng K3-SPG có thể chuyển đổi các đường tín hiệu miễn dịch bẩm sinh trong môi trường thể nội bào bằng ODN CpG typ K và D. Các kết quả này thể hiện rằng K3-SPG tạo ra hạt cỡ nano bậc cao và tan hoàn toàn và phát hiện thấy rằng K3-SPG “tất cả trong một” này thể hiện nhiều hoạt tính tiềm tàng hơn so với và đặc tính khác với các ODN CpG bất kỳ khác và phức chất CpG-SPG đã biết trước đây.

2) K3-SPG là tá dược nổi bật của vacxin mà gây ra các phản ứng CTL có hiệu lực với kháng nguyên protein mà không liên kết.

Các tác giả sáng chế đã so sánh các hiệu quả tá dược của K3, K3-dA40, và K3-SPG trong mô hình miễn dịch ở chuột. Khi chuột typ hoang dã được miễn dịch với OVA riêng, hoặc OVA với từng tá dược có nguồn gốc K3, K3-SPG đã gây ra các

phản ứng miễn dịch dịch thể cao hơn đáng kể (Fig.10), và các phản ứng tế bào T mạnh hơn là được gây ra bởi K3 (Fig.11). Lưu ý rằng, các thử nghiệm tetramer đã bộc lộ số lượng tế bào CD8 T đặc hiệu OVA (Fig.12). Hoạt tính CTL *in vivo* chống lại các kháng nguyên protein cùng đường sử dụng mà cũng không quan sát thấy bất kỳ liên kết cộng hóa trị nào (Fig.13). Sự kích thích CTL mạnh này bởi K3-SPG được tái sản sinh bằng sự tiêm chủng peptit (Fig.14), và phụ thuộc vào liều (Fig.15). Khả năng tiết kiệm kháng nguyên của K3-SPG cũng rất hiệu lực mà có thể so sánh kháng thể và các phản ứng tế bào CD4 T đã đạt được bằng cách sử dụng một trăm lần lượng kháng nguyên OVA (các Fig.16 và 17). Các kết quả này cho thấy rõ ràng rằng K3-SPG là tá được nổi bật hơn K3 riêng rẽ.

3) SPG là phối tử Dectin-1 tan, nhưng không phải chất chủ vận Dectin-1.

Vai trò của Dectin-1 trong sự hấp thụ tế bào của, và sự hoạt hóa sau đây bởi, SPG và K3-SPG đã được kiểm tra, với Dectin-1 đã được biết đến là thụ thể cho các β -glucan như Zymosan (Herre, J., et al., Blood 104, 4038-4045 (2004)). Bằng cách sử dụng phương pháp đo tế bào theo dòng chảy, đã phát hiện thấy rằng các tế bào HEK293 thể hiện Dectin-1 nhưng không thể hiện Dectin-2 hoặc vector kiểm soát, đã tăng sự hấp thụ của SPG hoặc K3-SPG *in vitro* bất kể sự có mặt của ODN (các Fig. 18 và 19). Vừa được báo cáo rằng dạng tan của β -glucan không hoạt hóa sự phát tín hiệu Dectin-1 (Goodridge, H.S., et al., Nature 472, 471-475 (2011)). Ngoài ra, sự phát tín hiệu Dectin-1 thể hiện sự sản xuất xytokin trong môi trường TLR9 thông qua sự gây ra hoạt động ức chế tín hiệu của xytokin của protein 1 (SOCS1) (Eberle, M.E. & Dalpke, A.H., Journal of immunology 188, 5644-5654 (2012)). Do đó, hoạt tính chủ vận của SPG đã được kiểm tra. Khi các tế bào lá lách được kích thích với Zymosan đã rút ra mà không phải SPG, liều và TNF- α phụ thuộc Dectin-1- và các sự sản xuất xytokin khác được quan sát thấy (Fig.20) (Fig.21). Sự sản xuất xytokin bởi Zymosan và Curdlan là không phụ thuộc Dectin-1. Zymosan đã rút ra đã ức chế ODN CpG sản xuất IFN- α , với sự ức chế này được giảm bớt bởi sự thiếu hụt Dectin-1 (Fig.22). Ngược lại, SPG không ức chế sự sản xuất IFN- α đã được cảm ứng ODN CpG (Fig.23). Các kết quả này cho thấy rằng SPG là phối tử chứ không phải chất chủ vận của Dectin-1; do đó SPG không gây trở ngại cho sự sản xuất IFN- α trong môi trường TLR9.

4) Các hiệu quả tá dược của K3-SPG phụ thuộc vào TLR9 và phụ thuộc một phần vào Dectin-1.

Do K3-SPG là phức chất của ODN CpG và β -glucan, nên vai trò của TLR9 (Hemmi, H., et al., Nature 408, 740-745 (2000)) và Dectin-1 (Saijo, S., et al., Nature immunology 8, 39-46 (2007)) đã được kiểm tra bằng cách sử dụng chuột được tách thụ thể. Khi các tế bào lá lách và các DC có nguồn gốc từ tủy xương được sản xuất từ phôi tử Flt3 (các FL-DC) từ chuột thiếu hụt *Tlr9* và thiếu hụt *Dectin-1* được kích thích với K3-SPG, sự sản sinh xytokin phụ thuộc hoàn toàn vào TLR9 chứ không phải Dectin-1 (Fig.24). Phù hợp với các kết quả *in vitro*, sự kích thích ở chuột thiếu hụt *Tlr9* với K3-SPG thêm OVA dẫn đến dịch thể bị giảm và các phản ứng tế bào T (các Fig.25-27). Chuột thiếu hụt *Dectin-1* đã thể hiện các phản ứng miễn dịch có thể so sánh với chuột typ hoang dã khi chuột được kích thích với OVA thêm 10 μ g của K3-SPG (Fig.28). Khi chuột thiếu hụt *Dectin-1* được kích thích với OVA thêm 1 μ g của K3-SPG, chuột thể hiện phản ứng tế bào CD8 T giảm theo các thử nghiệm tetramer (Fig.31), mà không có sự thay đổi đáng kể nào sự sản xuất kháng thể và xytokin từ các tế bào T (các Fig.29 và 30). Các kết quả này gợi ý rằng hiệu quả tá dược của K3-SPG phụ thuộc vào sự phát tín hiệu TLR9. Mặc dù SPG và K3-SPG không kích thích sự phát tín hiệu Dectin-1, nhưng hiệu quả của K3-SPG vẫn phụ thuộc một phần vào Dectin-1 *in vivo*.

5) Các đại thực bào MARCO⁺, không phải Siglec-1⁺ ở các hạch bạch huyết thoát nước chiếm được K3-SPG trội với kháng nguyên.

Được cho rằng K3-SPG cung cấp các hiệu quả tá dược mạnh *in vivo* thông qua sự kích thích với hỗn hợp kháng nguyên đơn giản, được đưa ra giả thuyết rằng các tế bào mà chiếm được cả kháng nguyên và K3-SPG nên đóng vai trò quyết định trong việc làm môi trường của các hiệu quả tá dược. Để kiểm tra sự phân bố của OVA và K3-SPG được đánh dấu huỳnh quang *in vivo*, kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi hai photon được sử dụng. Sau khi tiêm ở gốc đuôi, cả kháng nguyên và tá dược đã đạt tới bề mặt của các hạch bạch huyết thoát nước ở bẹn (các iLN) trong vòng 1 giờ (các Fig.32, 33 và 35). Sau 24 giờ, một số K3-SPG được di chuyển tới vùng tế bào CD3e⁺ T và được cùng khu trú với DQ-OVA. Các tế bào mà chứa cả K3-SPG và DQ-OVA trong vùng tế bào T của iLN là các CD11c⁺ DC.

Thú vị là, phần lớn các tín hiệu huỳnh quang vẫn còn nguyên trên bề mặt của iLN (Fig.32), thúc đẩy các tác giả sáng chế tập trung vào hai typ của các đại thực bào đã biết để được phân bố trên bề mặt LN, các đại thực bào Siglec-1 (cũng được gọi là CD169 hoặc MOMA-1)⁺ (cũng được biết đến là các đại thực bào xoang dưới vỏ) và các đại thực bào MARCO⁺ (Martinez-Pomares, L. & Gordon, S., Trends in immunology 33, 66-70 (2012)). Phân tích mô học bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang thông thường không phát hiện phù hợp toàn bộ bề mặt iLN; hơn nữa, các đại thực bào này quá khó để được phân tách cho sự phân tích đo tế bào theo dòng chảy (Aoshi, T., et al., European journal of immunology 39, 417-425 (2009); Gray, E.E. & Cyster, J.G., Journal of innate immunity 4, 424-436 (2012)). Do đó, phân tích hình ảnh bằng kính hiển vi hai photon được sử dụng để làm rõ ràng sự phân bố kháng nguyên và K3-SPG *ex vivo*. Sau khi tiêm các kháng thể kháng MARCO và kháng Siglec-1, các đại thực bào cụ thể được hiển thị hóa. Khi bề mặt iLN được theo dõi bằng kính hiển vi hai photon sau khi tiêm 1 giờ, thì OVA và K3-SPG được cùng khu trú với các đại thực bào MARCO⁺ không phải Siglec-1⁺ (các Fig.33 và 35). Các báo cáo trước gợi ý phức chất miễn dịch và virus cúm bất hoạt đã bị chiếm bởi các đại thực bào Siglec-1⁺ để gây ra các phản ứng miễn dịch dịch thể (Gonzalez, S.F., et al., Nature immunology 11, 427-434 (2010); Suzuki, K. et al., The Journal of experimental medicine 206, 1485-1493 (2009)). Mô hình phân bố hoàn toàn phù hợp với các đại thực bào MARCO⁺ ở các iLN, và không cùng khu trú với các đại thực bào Siglec-1⁺ được xác nhận bởi phân tích sự cùng khu trú Velocity (các Fig.34 và 36). Ngược lại, K3 bị phân phối rườm rà hơn giữa các vùng MARCO⁺ và Siglec-1⁺ được so sánh với K3-SPG (các Fig.35 và 36). Ngoài ra, cả chuột thiếu hụt *Thr9* và thiếu hụt *Dectin-1* đều thể hiện sự khu trú có thể so sánh của K3-SPG. Để xác định sự đóng góp của các đại thực bào này theo hướng các hiệu quả tá được của K3-SPG, các động lực học phục hồi khác nhau của các đại thực bào và các DC tiếp sau khi tiêm clodronat liposom ở gốc đuôi đã được kiểm tra. Sau khi tiêm, các đại thực bào được rút ra hoàn toàn trong ngày 2. Các tế bào này không phục hồi trong ít nhất một tuần, trong khi các DC hầu như được phục hồi vào ngày 5, như được báo cáo trước đây (Aoshi, T., et al., Immunity 29, 476-486 (2008)). Khi cả các đại thực bào và các DC bị rút ra, các phản ứng miễn dịch bị ngăn chặn đáng kể (Fig.37; Clo -d2). Chỉ có các

đại thực bào, không phải các DC, bị rút ra và các phản ứng miễn dịch có thể so sánh với chuột không được điều trị (Fig.37; Clo-d5). Điều này sẽ gợi ý rằng mặc dù cả OVA và K3-SPG đều chủ yếu bị chiếm bởi các đại thực bào MARCO+ trong các iLN sau khi tiêm, nhưng các đại thực bào đã gây ra các phản ứng miễn dịch có khả năng thích nghi. Mặt khác, hiệu quả tá dược của K3-SPG phụ thuộc nhiều vào tập hợp DC.

6) K3-SPG nhắm đến và hoạt hóa mạnh tập hợp DC mang kháng nguyên *in vivo*.

Sự phát hiện của các tác giả sáng chế gợi ý rằng mặc dù một phần lớn của K3-SPG dạng hạt nano được hấp thụ bởi các đại thực bào MARCO+ trong các iLN sau khi tiêm, nhưng các hiệu quả tá dược xuất hiện để được kiểm soát bởi các DC. Kháng nguyên và tá dược hấp thụ bởi tập hợp DC trong các iLN được hội tụ. 24 giờ sau khi tiêm, sự hấp thụ kháng nguyên và các tá dược bởi tập hợp DC được phân tích bởi phương pháp đo tế bào dòng chảy. Tần số của mẫu dương CpG trong ba tập hợp con DC (các pDC, các CD8 α ⁺ DC, và các CD8 α ⁻DC) được tăng lên đáng kể sau khi tiêm K3-SPG với K3. Ngược lại, tần số của các DC dương tính với OVA có thể so sánh sau khi tiêm K3 và K3-SPG. Khi tập trung các DC dương tính với cả kháng nguyên và tá dược, có sự tăng cường đáng kể cho K3-SPG hơn K3. Cả các pDC và các CD8 α ⁺ DC trong các iLN được hoạt hóa mạnh bởi K3-SPG nhưng không bởi K3 24 giờ sau khi tiêm, và điều này phụ thuộc hoàn toàn vào TLR9 (Fig.38). Các kết quả này gợi ý rằng các pDC và các CD8 α ⁺ DC ưu tiên chiếm K3-SPG hạt nano hơn là K3 không phải hạt cho sự trưởng thành, và để phát huy các hiệu quả tá dược.

7) K3-SPG là tá dược mạnh cho vacxin cúm ở chuột và các mô hình động vật linh trưởng không phải người.

Hiệu quả tá dược của K3-SPG được kiểm tra bằng cách sử dụng nhiều hơn các mô hình tiêm vacxin cúm thích hợp lâm sàng ở cả chuột và các loài linh trưởng không phải người. Khi chuột được miễn dịch với vacxin phân chia không virion giàu kháng nguyên hemagglutinin đã điều trị ete (SV) thêm tá dược đã quy định, K3-SPG đã chứng minh các hiệu quả tá dược siêu việt hơn K3 khi các phản ứng kháng thể và các phản ứng tế bào T được so sánh (Fig.43). Quan trọng hơn, sự miễn dịch SV thêm K3-SPG dẫn đến phản ứng kháng thể lớn hơn gấp 100 lần, thậm chí so sánh với tiêm vacxin với cả (virion) vacxin bất hoạt (WIV) (0,2 μ g/chuột) (Fig.39), mà chứa virus ARN được xây dựng trong tá dược (Koyama, S., et al., Science translational

medicine 2, 25ra24 (2010)). Chuột được miễn dịch với SV (0,1 μ g/chuột) và K3-SPG đã thể hiện trọng lượng cơ thể dưới chuột được miễn dịch với WIV (Fig.40). Đáng chú ý, K3-SPG đã ban 100% sự bảo vệ chống lại thử thách virus PR8 gây chết, ở liều mà chỉ 10% chuột được tiêm vaccin WIV sống sót (Fig.40). Các kết quả này hỗ trợ mạnh mẽ quan điểm rằng K3-SPG làm việc như một tá dược mạnh đối với protein hoặc các vaccin gốc protein ở mô hình chuột, thúc đẩy là tác giả sáng chế mở rộng phát hiện này sang mô hình động vật linh trưởng không phải người sử dụng khi đuôi dài. Mỗi nhóm gồm khi đuôi dài được miễn dịch với SV thêm K3 hoặc K3-SPG vào các ngày 0 và 14. Các chuẩn độ kháng thể huyết thanh sau đó được kiểm soát trong 8 tuần. SV thêm K3-SPG đã gây ra chuẩn độ kháng thể cao hơn đáng kể 2 tuần sau khi tiêm miễn dịch, và các mức chuẩn độ vẫn ở mức cao trong ít nhất 6 tuần sau (Fig.41). 2 năm (110 tuần) sau khi miễn dịch, nhóm K3-SPG có chuẩn độ kháng thể cao hơn đáng kể so với nhóm K3 (các Fig.42 và 43). Tóm lại, các kết quả này gợi ý rằng K3-SPG là tá dược nổi bật của vaccin ở mô hình động vật linh trưởng không phải người.

8) Khảo sát các phản ứng viêm gây ra khả năng của các phức chất K3-LNT và K3-SPG bằng cách sử dụng các PBMC người

Sử dụng các PBMC người (Lonza, Cat# CC-2702, Lot# 0000396517), khả năng của K3 (K3-dA30, K3-dA35, K3-dA40) riêng rẽ, các phức chất K3-LNT (K3-dA30-LNT, K3-dA35-LNT, K3-dA40-LNT) và phức chất K3-SPG (K3-dA40-LNT) để gây ra sự sản xuất mọi IFN- α (hIFN α) và IL-6 (hIL-6) được đánh giá.

Các kết quả được thể hiện ở Fig.44. Khi được kích thích ở liều thấp, sự sản xuất mọi IFN- α và IL-6 cao hơn K3-SPG mà là phức chất của K3 và SPG, và K3-LNT mà là phức chất của K3 và LNT, được so sánh với K3 riêng rẽ. Ngoài ra, khả năng sản xuất xytokin gây viêm mà được sản xuất bởi các K3-LNT có độ dài đuôi dA khác nhau (dA30, dA35, dA40) được gợi ý là có khả năng gần như tương đương. Ngoài ra, khi khả năng sản xuất xytokin gây viêm của K3-SPG và K3-LNT được so sánh, khả năng gây ra sự sản xuất mọi IFN- α của K3-LNT được gợi ý là có khả năng cao hơn khả năng gây ra sự sản xuất mọi IFN- α của K3-SPG. Mặt khác, K3-SPG và K3-LNT được thấy là tương đương với sự sản xuất IL-6.

9) Chuẩn độ kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên RSV F trong các huyết thanh

của chuột được tiêm với vacxin tiểu đơn vị được bổ sung K3-LNT và phức chất K3-SPG

Chuột C57BL/6 7 tuần tuổi được miễn dịch hai lần ở gốc đuôi với kháng nguyên RSV F (0,5 μ g) và nhiều tá dược (10 μ g) (K3 riêng rẽ (K3-dA30, K3-dA35, K3-dA40), phức chất K3-LNT (K3-dA30-LNT, K3-dA35-LNT, K3-dA40-LNT) và phức chất K3-SPG (K3-dA40-SPG), phosphat phen), trên mỗi con chuột, vào mỗi khoảng 2 tuần. 1 tuần sau khi miễn dịch lần cuối cùng, máu ngoại vi được phục hồi và huyết thanh được bào chế, mà được sử dụng là các mẫu đánh giá. Chuẩn độ của kháng thể mà liên kết với kháng nguyên vacxin RSV F trong huyết thanh được đo bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Như được thể hiện ở Fig.45, sự gây ra IgG tổng đặc hiệu kháng nguyên RSV F được tăng cường bằng cách bổ sung tá dược như đã so sánh với nhóm tiêm chủng riêng rẽ kháng nguyên RSV F (F), mà gợi ý rằng hiệu quả tá dược của K3 riêng rẽ (F+K3-dA30, F+K3-dA35, F+K3-dA40), K3-LNT (F+K3-dA30-LNT, F+K3-dA35-LNT, F+K3-dA40-LNT) và phức chất K3-SPG (F+K3-dA40-SPG) và phosphat phen (F+Alum) có thể là tương đương. Ở nhóm chuột được tiêm phosphat phen (F+Alum), mà là tá dược Th2, đã phát hiện thấy rằng khả năng gây ra lớp phụ IgG1 cao hơn nhóm tiêm chủng dọc theo kháng nguyên RSV F. Mặt khác, các kết quả đã thể hiện rằng nhóm miễn dịch được tiêm K3 riêng (F+K3-dA30, F+K3-dA35, F+K3-dA40), K3-LNT (F+K3-dA30-LNT, F+K3-dA35-LNT, F+K3-dA40-LNT), K3-SPG (F+K3-dA40-SPG) là cao hơn về kháng thể lớp phụ IgG2c với phosphat phen (F+Alum), mà gợi ý rằng phức chất K3-LNT có thể là tá dược Th1 giống K3-SPG.

10) Khả năng sản xuất xytokin đặc hiệu kháng nguyên RSV F ở chuột được tiêm Vacxin vacxin tiểu đơn vị được bổ sung K3-LNT và phức chất K3-SPG

Chuột C57BL/6 7 tuần tuổi được miễn dịch hai lần ở gốc đuôi với kháng nguyên RSV F (0,5 μ g) và nhiều tá dược (10 μ g) (K3 riêng rẽ (K3-dA30, K3-dA35, K3-dA40), K3-LNT (K3-dA30-LNT, K3-dA35-LNT, K3-dA40-LNT) và phức chất K3-SPG (K3-dA40-SPG), phosphat phen), trên mỗi con chuột, cách nhau khoảng 2 tuần. Một tuần sau lần miễn dịch cuối cùng, lá lách được phục hồi, và các tế bào lá lách được bào chế. Các tế bào lá lách được tạo phôi ở đĩa nuôi cấy 96

giếng được kích thích với từng MHC lớp I bị hạn chế epitop peptit, MHC lớp II bị hạn chế epitop peptit, và protein kháng nguyên của kháng nguyên RSV F, và được nuôi cấy trong 24 giờ hoặc 48 giờ. Khả năng sản xuất xytokin đặc hiệu kháng nguyên RSV F được đánh giá bởi phương pháp xytokin ELISA và sử dụng phần dịch nổi nuôi cấy làm mẫu. Ở khảo sát này, ba loại xytokin (IFN-g mà là xytokin Th1, IL-2 được sản xuất từ các tế bào T đã hoạt hóa, và IL-13 mà là xytokin Th2) được đánh giá.

Kết quả là, như được thể hiện ở Fig.46, nó được gợi ý rằng tăng cường các hiệu quả ở sự gây ra đặc hiệu kháng nguyên RSV F của sự sản xuất IFN-g và sự sản xuất IL-2 có thể là tương đương ở K3-LNT (F+K3-dA30-LNT, F+K3-dA35-LNT, F+K3-dA40-LNT) và K3-SPG (F+K3-dA40-SPG). Ở nhóm tiêm chủng tá được phosphat phèn (tá được Th2) (F+Alum), sự sản xuất IFN-g là dưới mức giới hạn phát hiện bởi sự kích thích bất kỳ. Mặt khác, hiệu quả tăng cường sự sản xuất IL-13 là cao ở nhóm tiêm chủng phosphat phèn (tá được Th2) và thấp ở nhóm tiêm chủng K3-SPG (tá được Th1). Thú vị là, ở nhóm tiêm chủng K3-LNT (F+K3-dA30-LNT, F+K3-dA 35-LNT, F+K3-dA 40-LNT), hiệu quả tăng cường sự sản xuất IL-13 là cao khi so sánh với sự sản xuất đó ở nhóm tiêm chủng tá được Th1 (K3-SPG) (F+K3-dA40-SPG). Từ đó được gợi ý rằng phức chất K3-LNT có khả năng tăng cường phản ứng Th2 ngoài hiệu quả tăng cường phản ứng Th1 cao được sở hữu bởi K3-SPG.

11) Hiệu quả bảo vệ chống lại bệnh nhiễm RSV ở chuột cotton được tiêm vaccin tiểu đơn vị RSV F được bổ sung K3-LNT và K3-SPG

Các chuột cotton từ 6 đến 7 tuần tuổi được miễn dịch hai lần ở gốc đuôi với kháng nguyên RSV F (1 μ g) và nhiều tá được (10 μ g) (K3-LNT (K3-dA35-LNT, K3-dA40-LNT) và phức chất K3-SPG (K3-dA40-SPG), phosphat phèn), trên mỗi con chuột, cách nhau 2 tuần. 2 tuần sau khi miễn dịch lần cuối, các chuột cotton được thử với RSV serotyp A (sợi dài) bằng cách tiêm chủng transnasal, và lượng virus trong phổi được đo vào 3 ngày sau. Nhóm sử dụng Synagis (palivizumab) được sử dụng theo đường tiêm bắp với Synagis (2,5mg/kg) một ngày trước khi thử sự lây nhiễm, và khả năng bảo vệ sự lây nhiễm được đánh giá theo cách giống như ở trên. Các mẫu máu được thu gom từ tĩnh mạch cổ của các chuột trong khi gây tê

ngay trước khi thử sự lây nhiễm và chuẩn độ kháng thể trung tính được nghiên cứu bằng cách sử dụng huyết thanh thu được.

Các kết quả của lượng virus trong phổi được thể hiện ở bên trái Fig.47, và các kết quả của chuẩn độ kháng thể trung tính được thể hiện ở bên phải của Fig.47. Các kết quả của lượng virus trong phổi tiết lộ rằng lượng virus là khoảng 10^5 pfu/phổi được quan sát thấy ở nhóm sử dụng PBS, trong khi nó được ngăn chặn lượng virus thấp hơn 100 lần (trung bình) ở nhóm sử dụng vacxin RSV F được bổ sung phosphat phèn (F+Alum). Mặt khác, hoạt tính để gây ra sự bảo vệ sự lây nhiễm cũng được quan sát thấy ở nhóm sử dụng vacxin bổ sung K3-SPG (F+K3-dA40-SPG). Nhóm vacxin bổ sung K3-LNT (F+K3-dA35-LNT, F+K3-dA40-LNT) đã thể hiện hiệu quả bảo vệ tốt nhất khỏi sự lây nhiễm, do đó đề xuất khả năng là đối tượng mục tiêu mới về tá dược của vacxin, mà đóng góp vào khả năng bảo vệ sự lây nhiễm, khi được so sánh với alum phosphat và K3-SPG.

Đối với khả năng gây ra kháng thể trung tính, hoạt tính trung tính trong máu tương đương với Synagis được phát hiện thấy trong nhóm sử dụng vacxin được bổ sung phosphat phèn (F+Alum). Mặt khác, do kháng thể trung tính hầu như không được gây ra ở 3 trong 5 con chuột trong nhóm sử dụng vacxin được bổ sung K3-SPG (F+K3-dA40-SPG), hiệu quả bảo vệ sự lây nhiễm mà K3-SPG đóng góp được xem xét xuất phát từ cơ chế độc lập của kháng thể trung tính. Ngoài ra, do kháng thể trung tính cao được phát hiện thấy ở nhóm sử dụng K3-LNT (F+K3-dA35-LNT, F+K3-dA40-LNT), được so sánh với K3-SPG, nó gợi ý rằng tá dược K3-LNT có thể có đặc tính khác với ở K3-SPG, ví dụ như, khả năng tăng cường phản ứng Th2.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế đề cập đến oligodeoxynucleotit có hoạt tính kích thích miễn dịch vượt trội và phức chất chứa oligodeoxynucleotit. Cụ thể là, phức chất theo sáng chế đồng thời có hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ K và hoạt tính kích thích miễn dịch chỉ có ở ODN CpG typ D. Ngoài ra, K3-SPG và K3-LNT có hoạt tính tá dược của vacxin mạnh, và sự gây miễn dịch với K3-SPG hoặc K3-LNT cùng với kháng nguyên kích thích cả miễn dịch dịch thể đặc hiệu của kháng nguyên và miễn dịch tế bào. Do đó, phức chất theo sáng chế hữu ích làm chất kích

thích miễn dịch hoặc tá dược của vacxin trong lĩnh vực dược phẩm.

Đơn này được dựa trên đơn sáng chế số 2013-196206 đã nộp ở Nhật Bản (ngày nộp đơn: 20 tháng 9 năm 2013), các nội dung của nó được kết hợp đầy đủ ở đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức chất chứa oligodeoxynucleotit và β -1,3-glucan, trong đó oligodeoxynucleotit chứa: oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người và poly deoxyadenylat, trong đó poly deoxyadenylat được đặt ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người, trong đó oligodeoxynucleotit CpG typ K được làm giống như của người bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, trong đó poly deoxyadenylat có chiều dài từ 30 đến 40 nucleotit, và trong đó β -1,3-glucan là lentinan.
2. Phức chất theo điểm 1, trong đó các liên kết phosphodiester trong oligodeoxynucleotit được thế một phần hoặc toàn bộ bằng các liên kết phosphothioat, tốt hơn trong đó các liên kết phosphodiester trong oligodeoxynucleotit được thế toàn bộ bằng các liên kết phosphothioat.
3. Phức chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:
 - (i) poly deoxyadenylat được liên kết ở đầu 3' của oligodeoxynucleotit có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, và tất cả các liên kết phosphodiester trong oligodeoxynucleotit được thế bằng các liên kết phosphothioat,
 - (ii) phức chất có cấu trúc chuỗi xoắn ba; và/hoặc
 - (iii) phức chất có hoạt tính để hoạt hóa các tế bào B để sản xuất IL-6, và hoạt tính để hoạt hóa các tế bào đuôi gai để sản xuất IFN- α .
4. Dược phẩm chứa phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
5. Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ở động vật máu nóng chứa phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bệnh là nhiễm virus, bệnh ung thư, bệnh dị ứng, hoặc bệnh nhiễm động vật nguyên sinh ký sinh nội bào hoặc vi khuẩn, tùy ý trong đó nhiễm virus là nhiễm virus RS hoặc virus cúm
6. Thuốc theo điểm 5, trong đó động vật máu nóng là người.
7. Thuốc kích thích phản ứng miễn dịch bảo vệ ở động vật máu nóng, chứa phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
8. Dược phẩm theo điểm 4 chứa:
 - (a) phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

(b) kháng nguyên.

9. Thuốc kích thích phản ứng miễn dịch với kháng nguyên, tùy ý trong đó kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh, chứa:

(a) phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

(b) kháng nguyên.

10. Thuốc phòng ngừa hoặc điều trị nhiễm tác nhân gây bệnh chứa:

(a) phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, và

(b) kháng nguyên.

trong đó kháng nguyên có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh.

11. Thuốc theo điểm 10, trong đó tác nhân gây bệnh là virus, tùy ý trong đó virus là virus RS hoặc virus cúm.

12. Thuốc kích thích sự sản xuất interferon typ I và/hoặc typ II, chứa phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

13. Thuốc kích thích miễn dịch chứa phức chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, tùy ý là tá dược của vaccin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> Phức chất chứa oligonucleotit có hoạt tính kích thích miễn dịch và được phẩm chứa phức chất này

<130> 092215

<150> JP 2013-196206

<151> 2013-09-20

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 1

atcgactctc gagcgttctc

20

<210> 2

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 2

atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

aaaaaaaaaa 60

<210> 3

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atcgactctc
gagcgttctc 60

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 4

ggtgcatcga tgcagggggg
20

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 5

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg
23

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 6

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg
23

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 7
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg
 22

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 8
 tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat
 25

<210> 9
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 9
 atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 40

<210> 10
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 10

atcgactctc gagcggttctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa
45

<210> 11

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 11

atcgactctc gagcggttctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
50

<210> 12

<211> 55

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 12

atcgactctc gagcggttctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa
55

Fig. 1

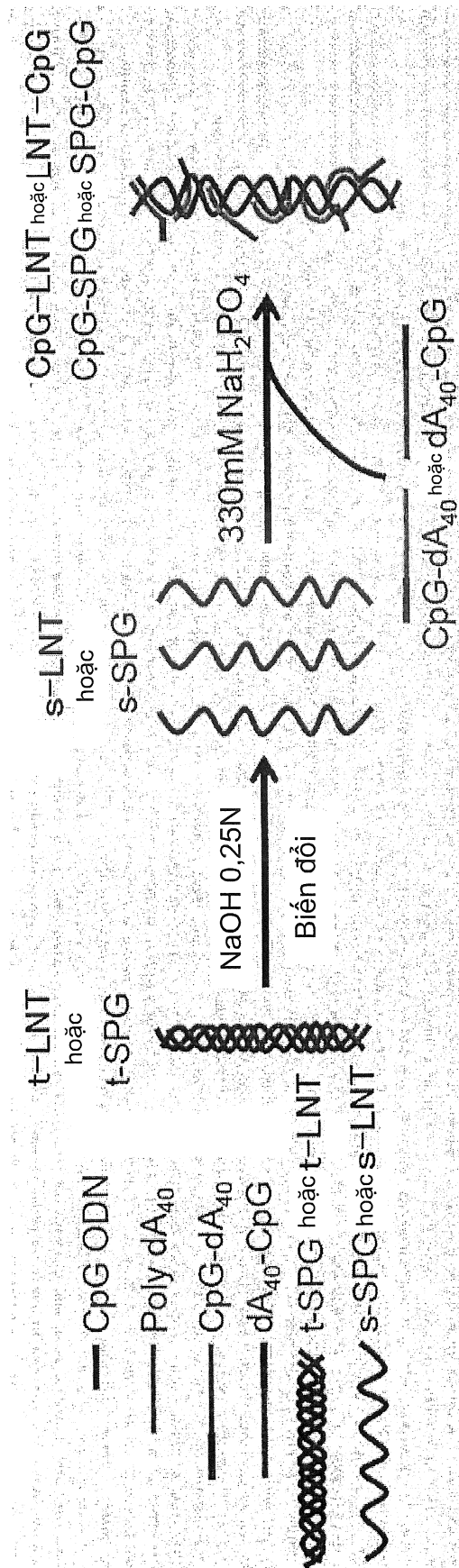


Fig. 2

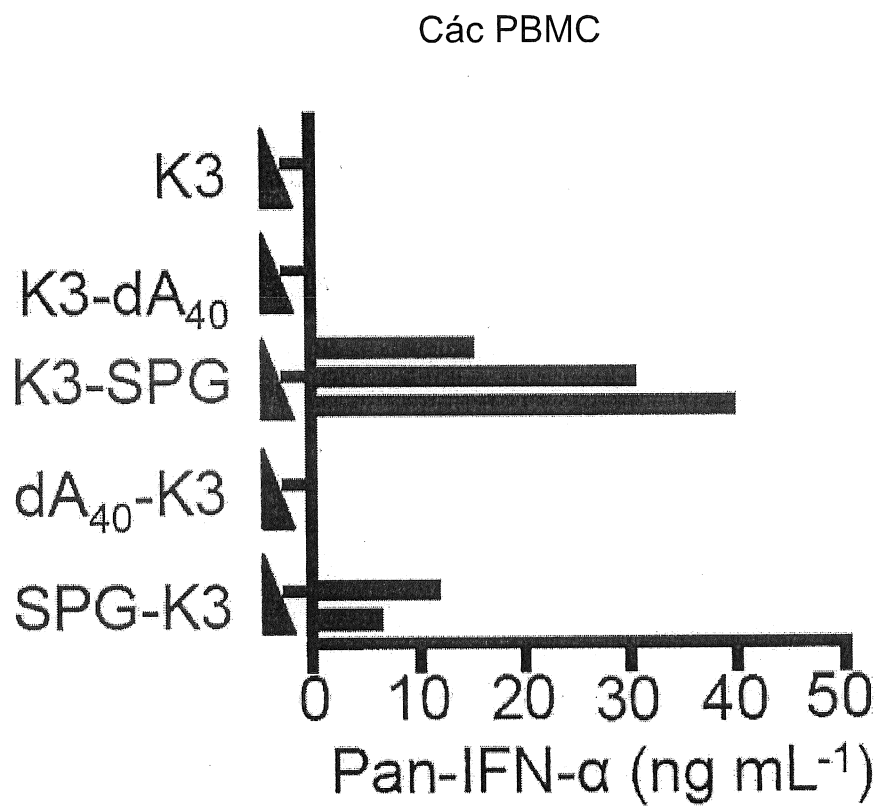


Fig. 3

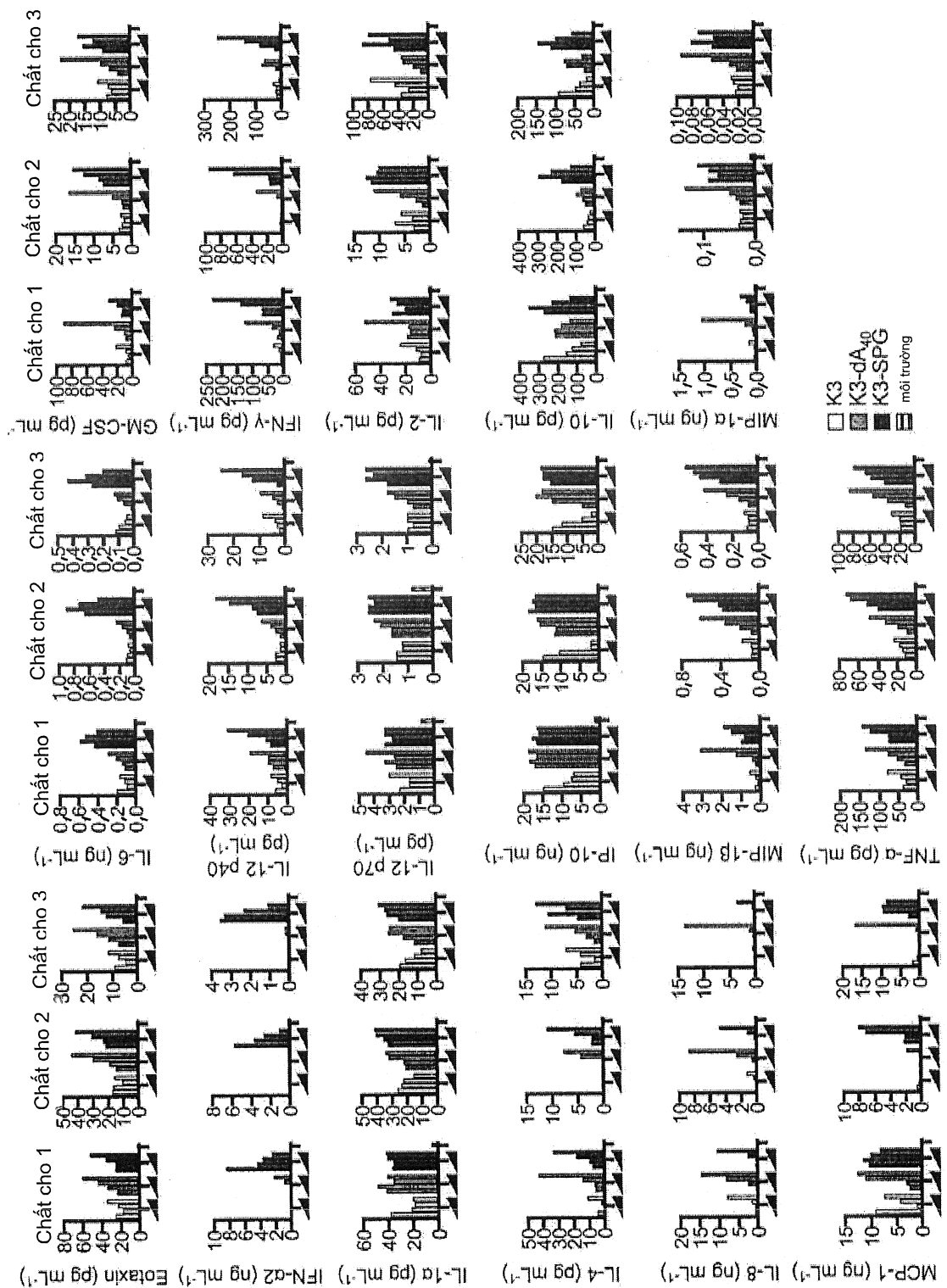


Fig. 4

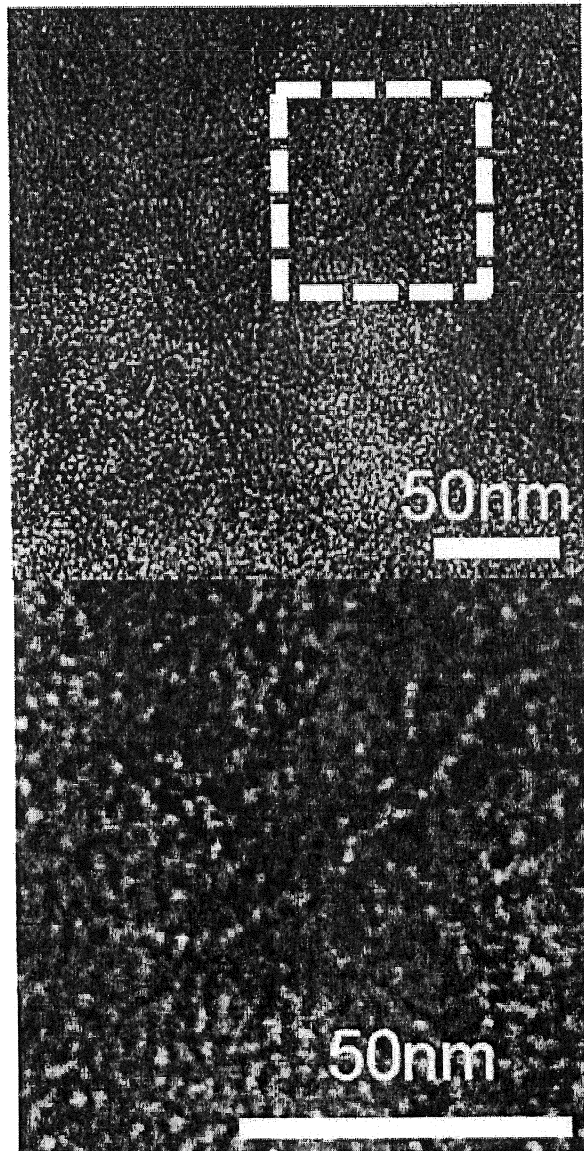


Fig. 5

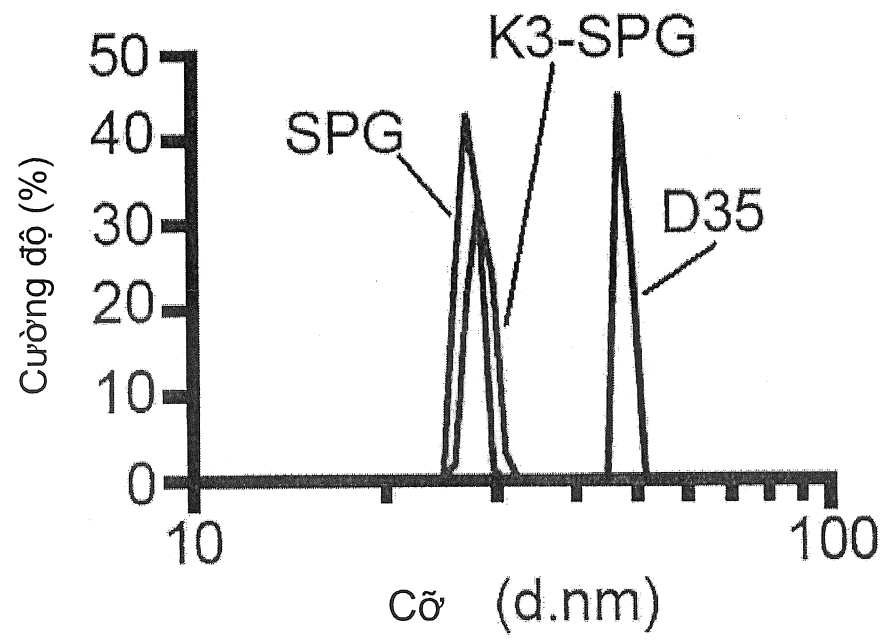


Fig. 6

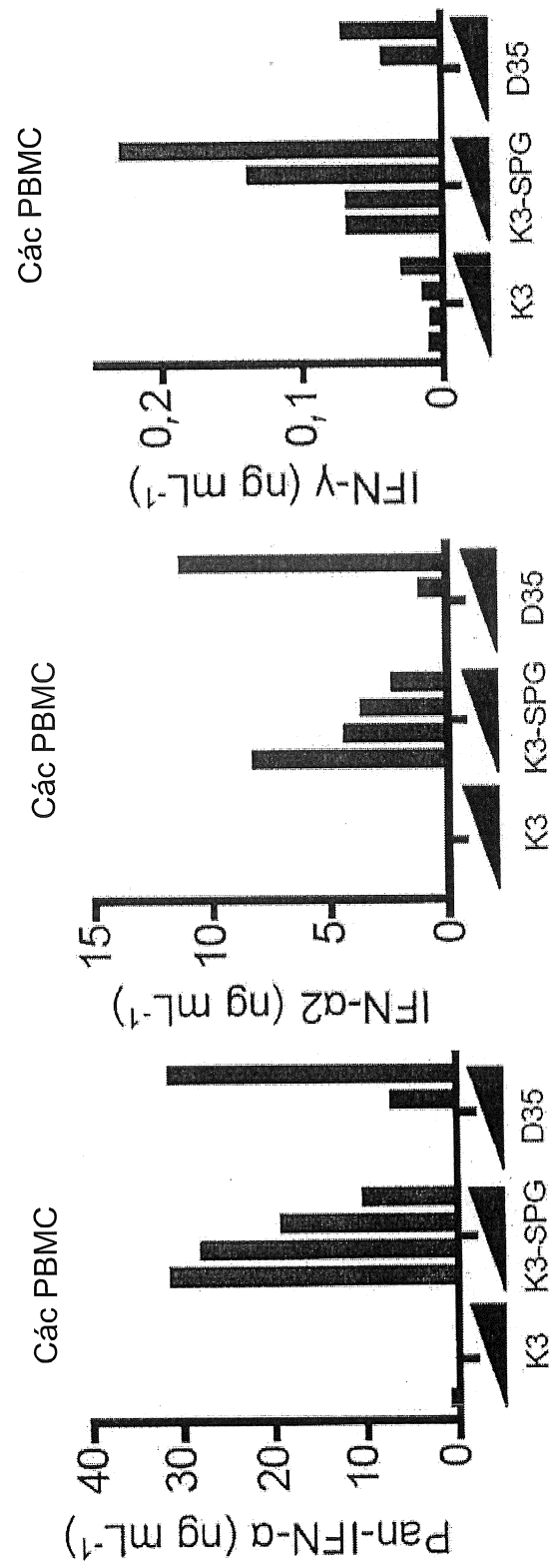


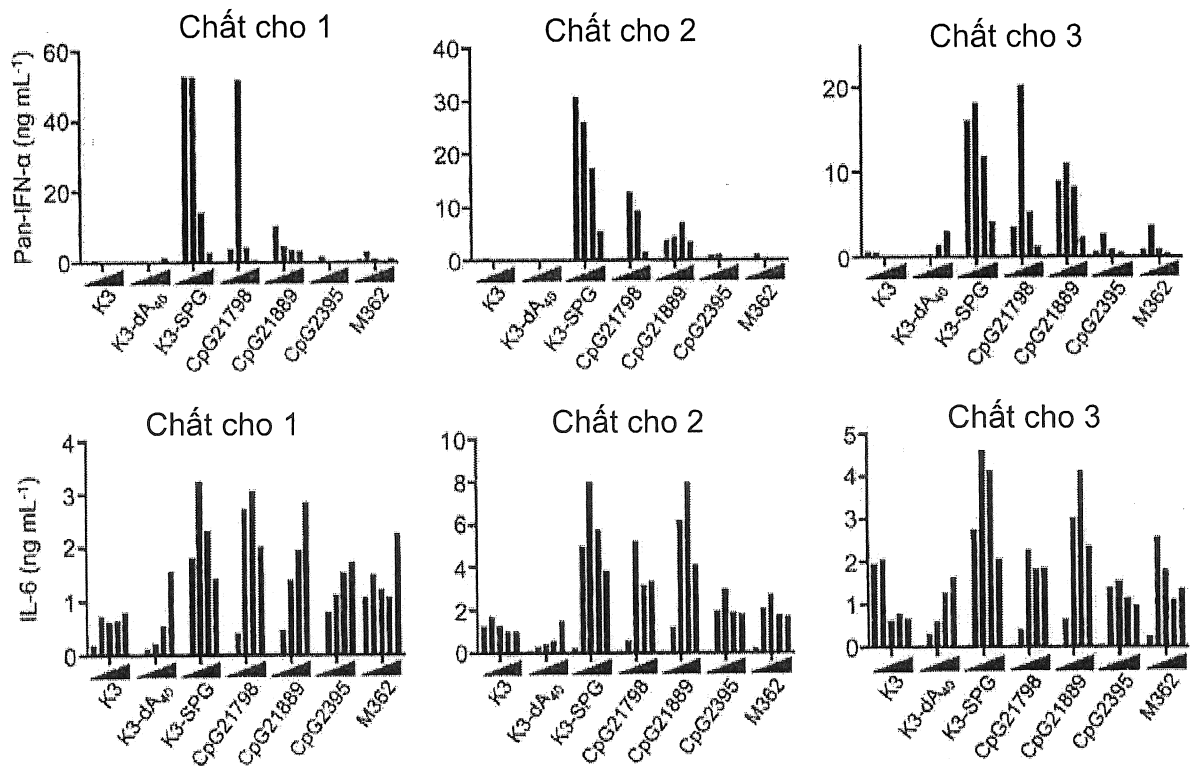
Fig. 7

Fig. 8

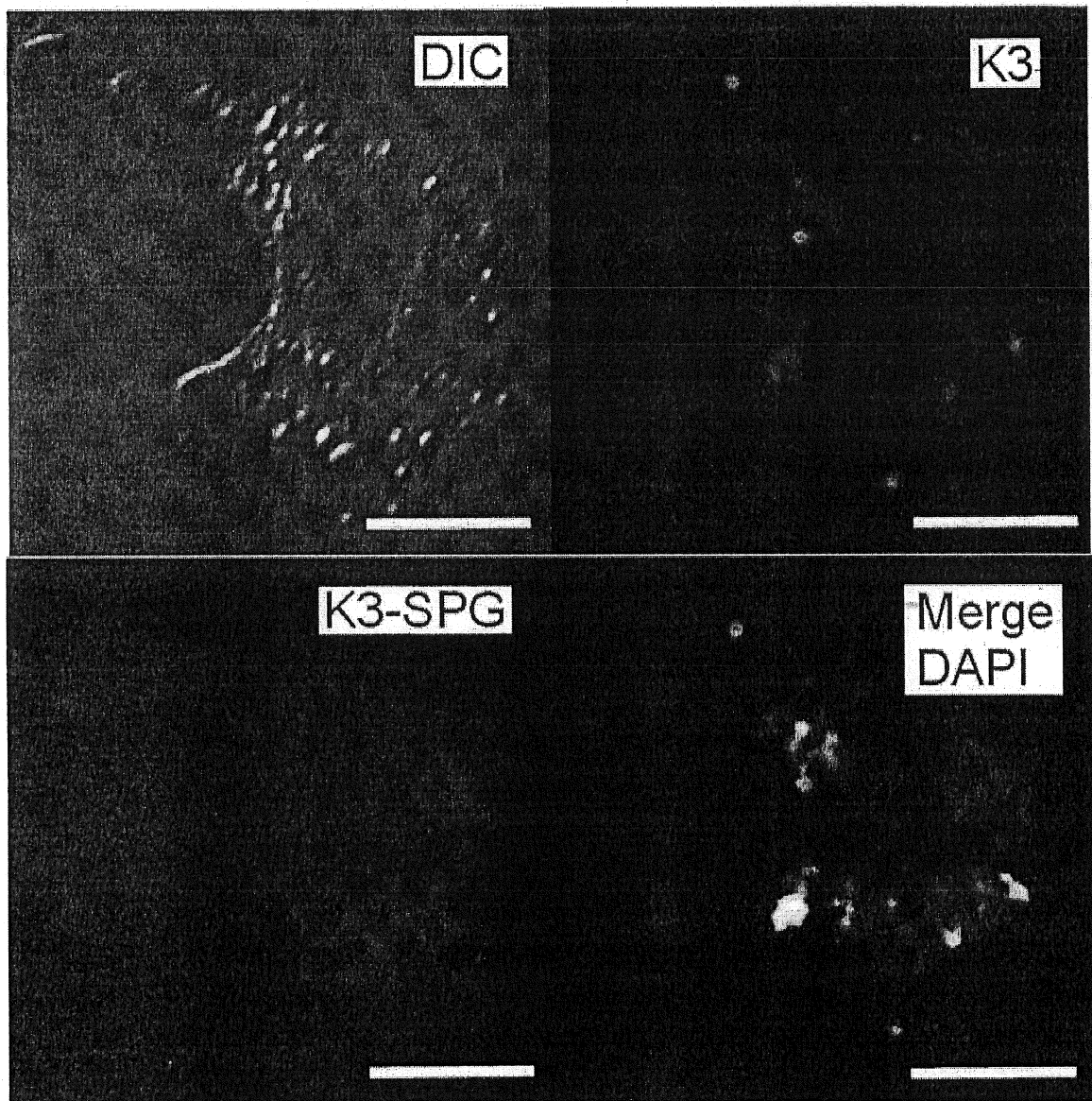


Fig. 9

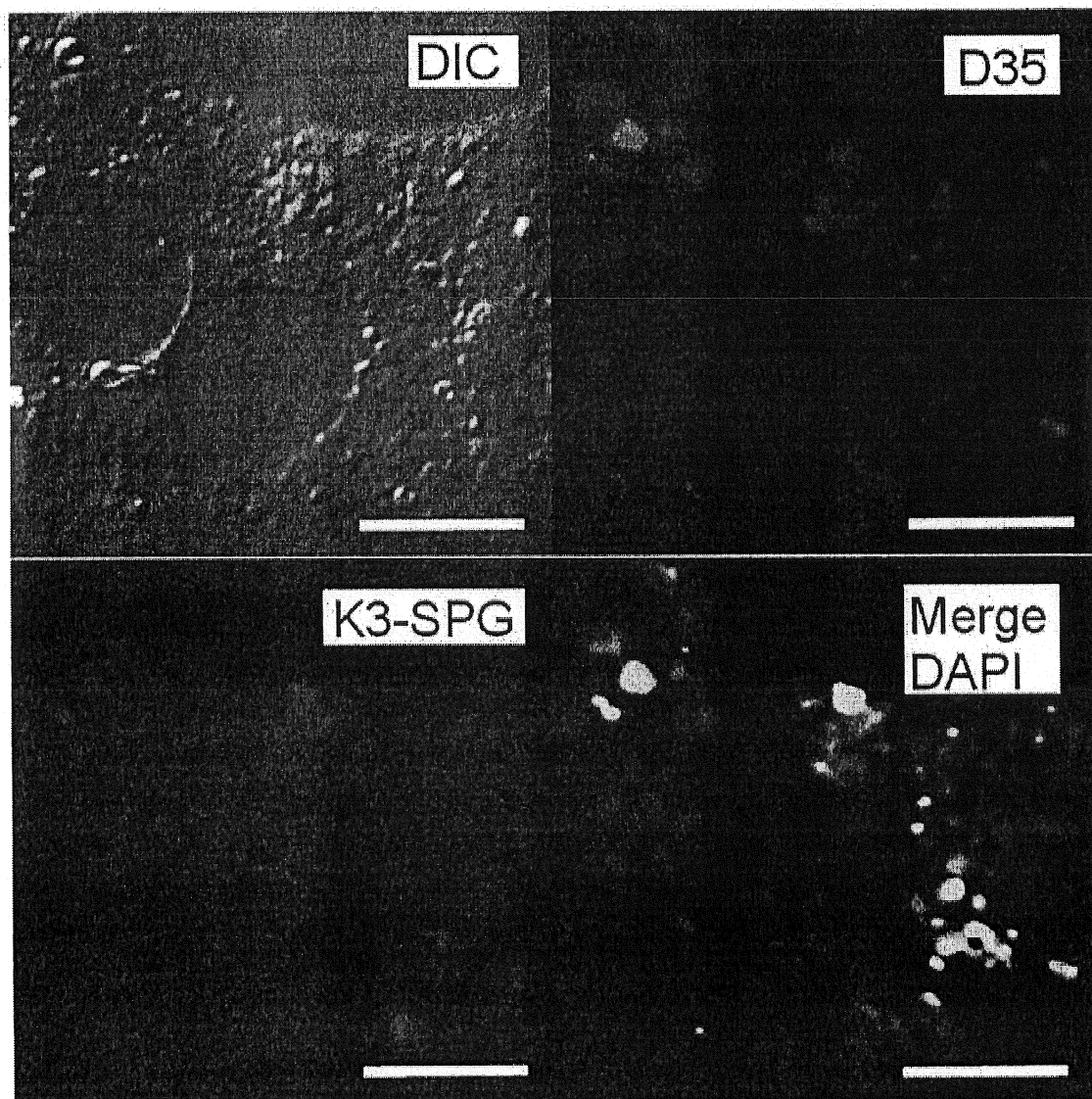


Fig. 10

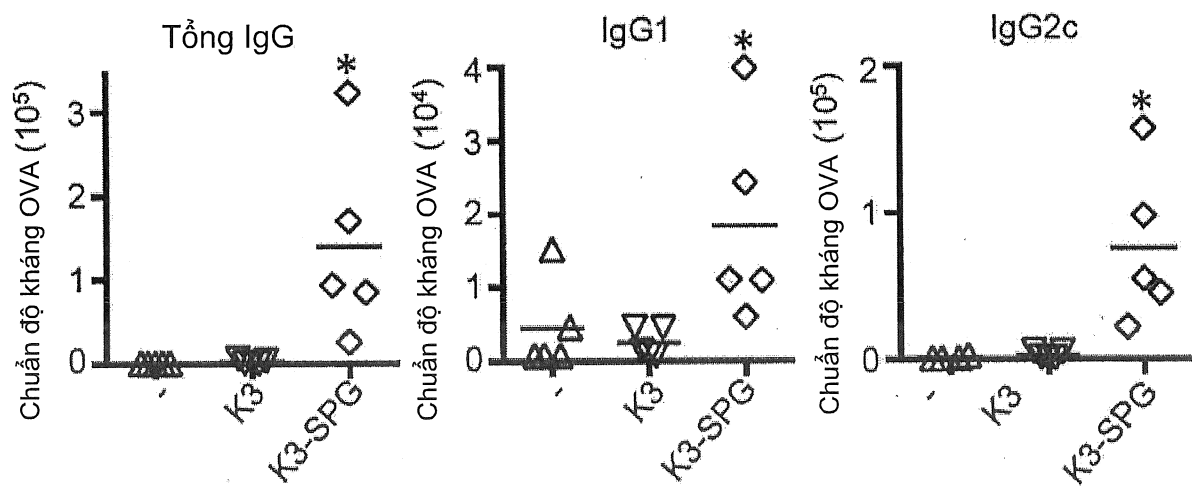


Fig. 11

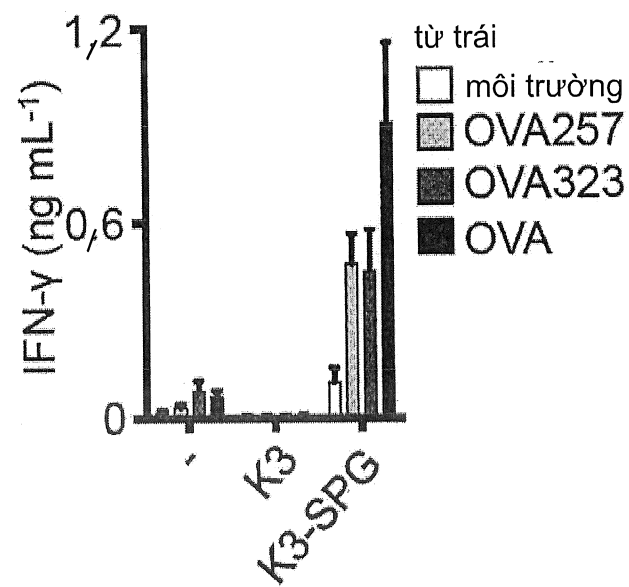


Fig. 12

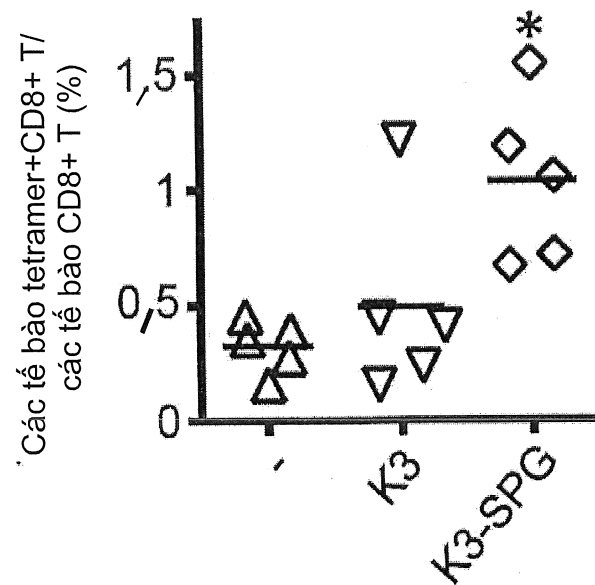


Fig. 13

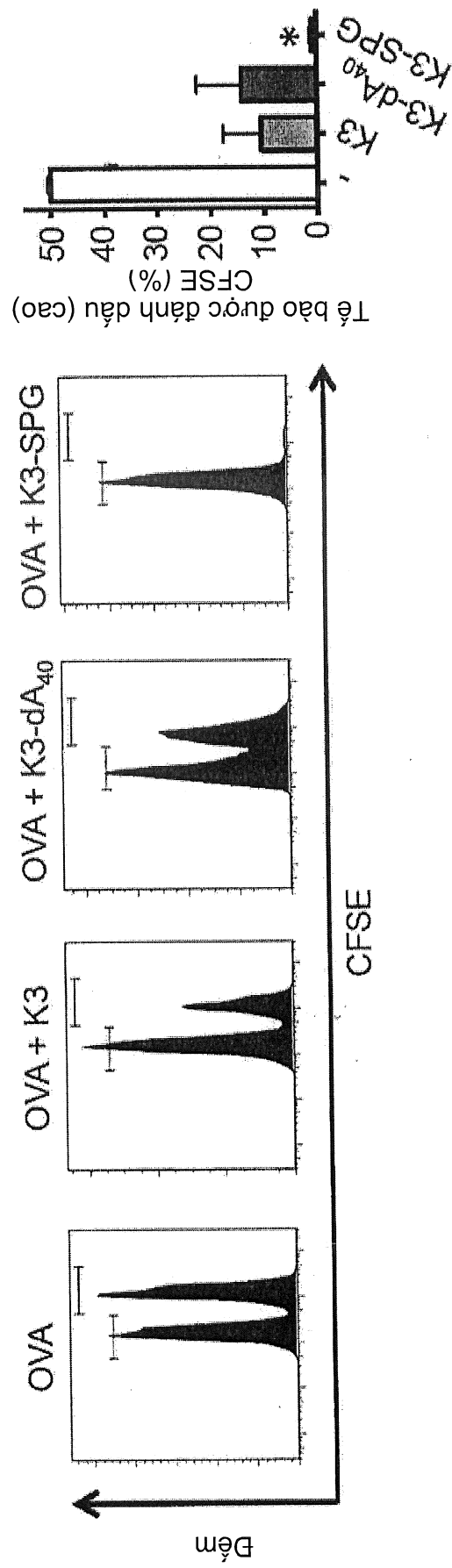


Fig. 14

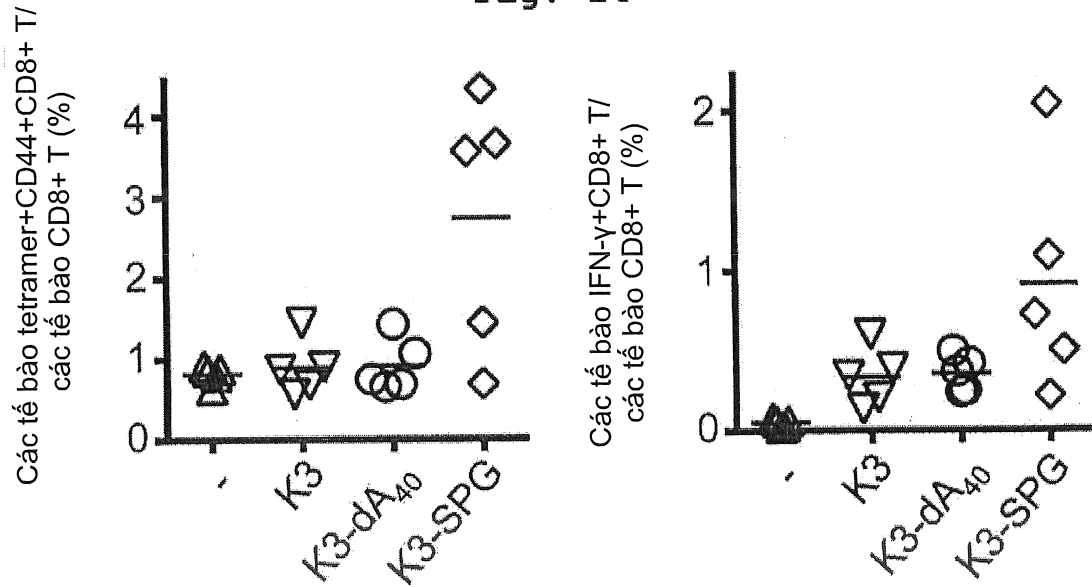


Fig. 15

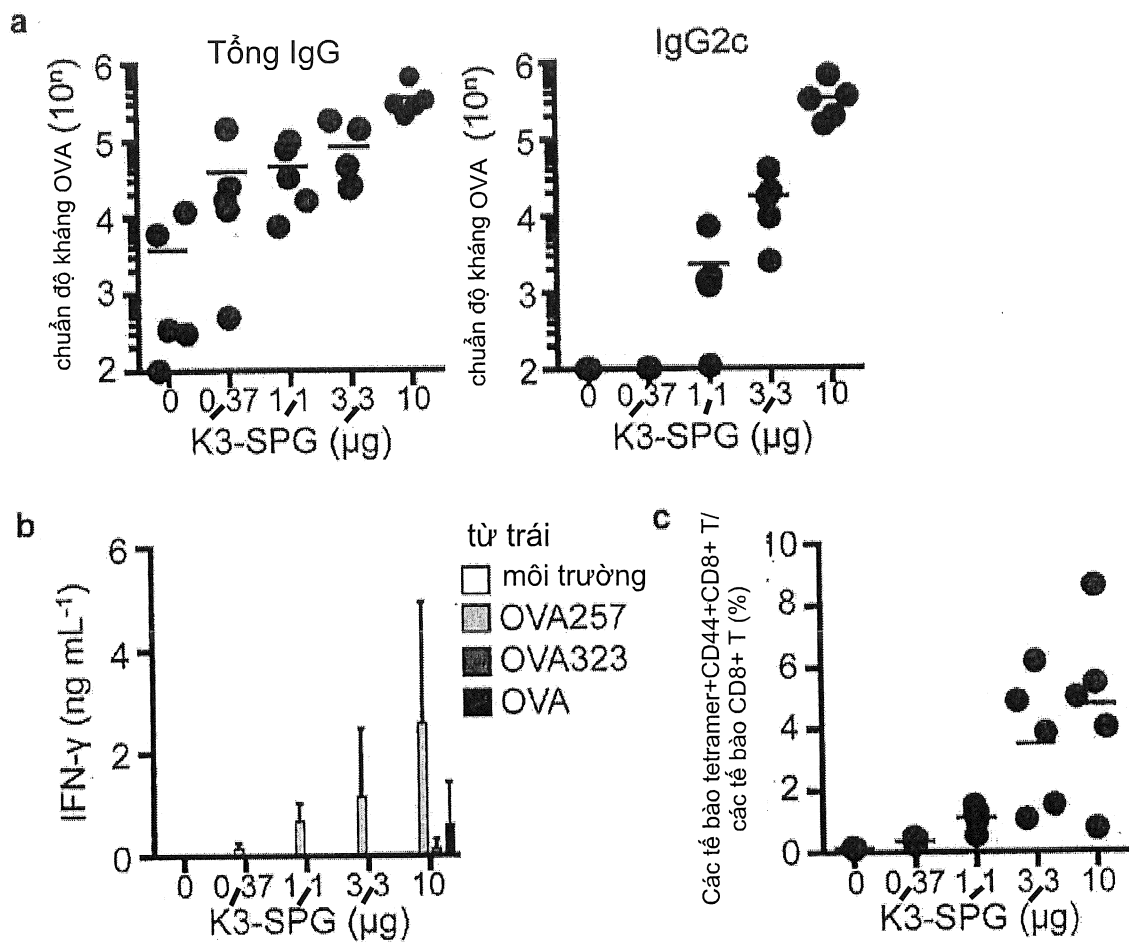


Fig. 16

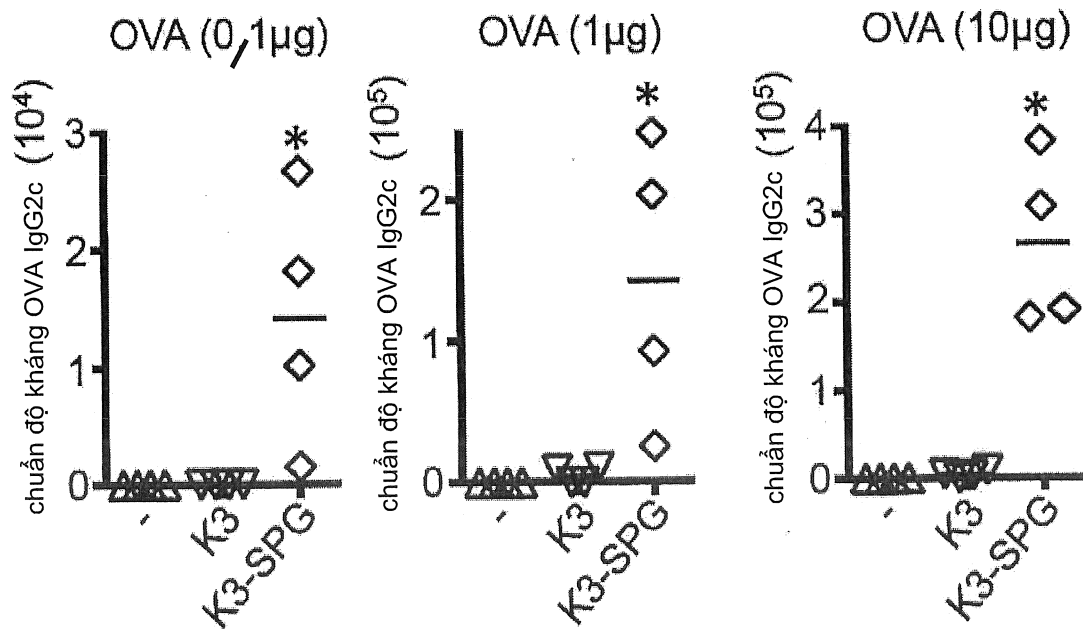


Fig. 17

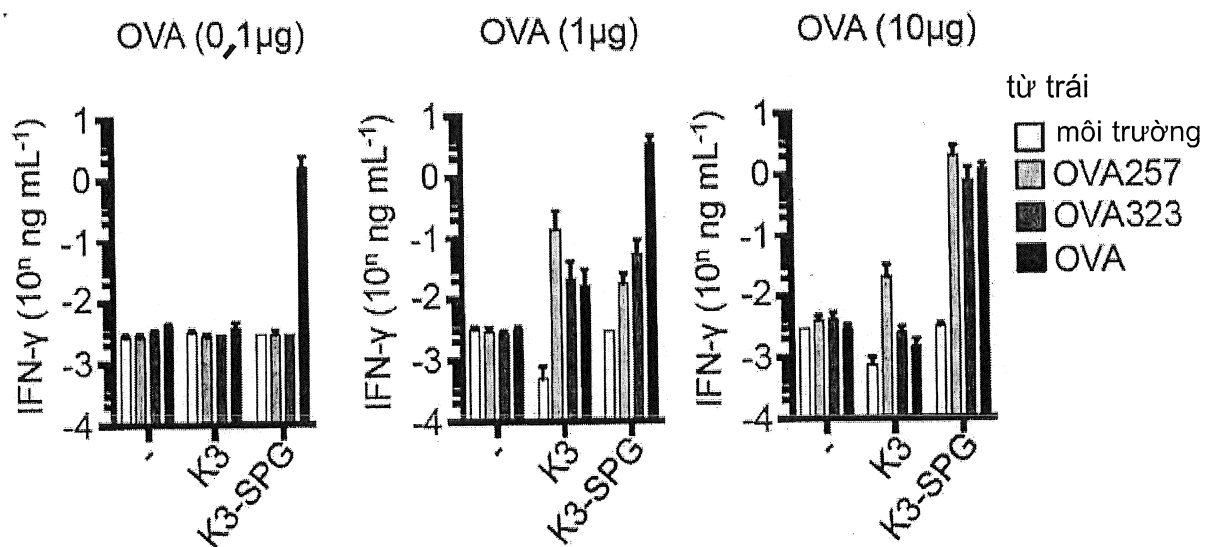


Fig. 18

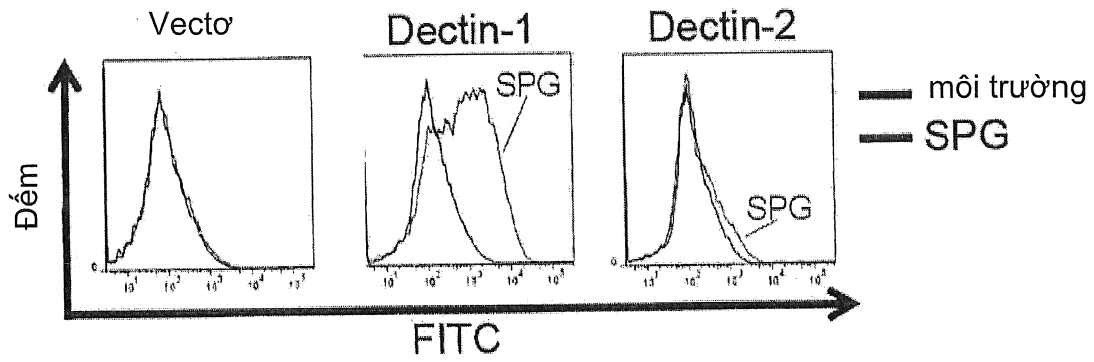


Fig. 19

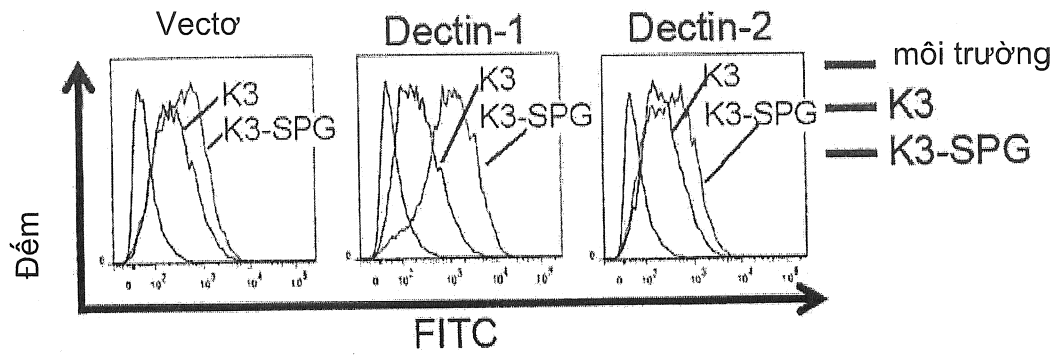


Fig. 20

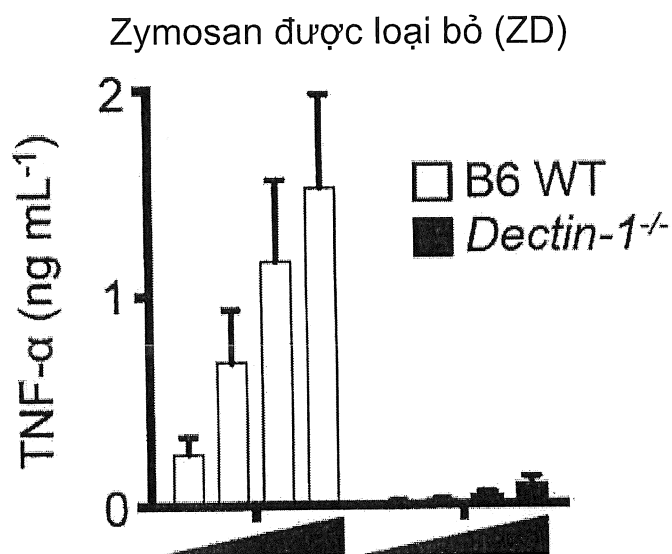


Fig. 21

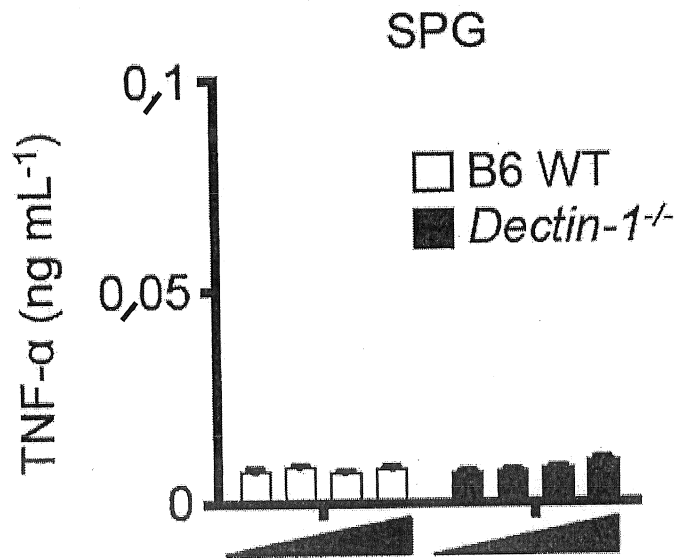


Fig. 22

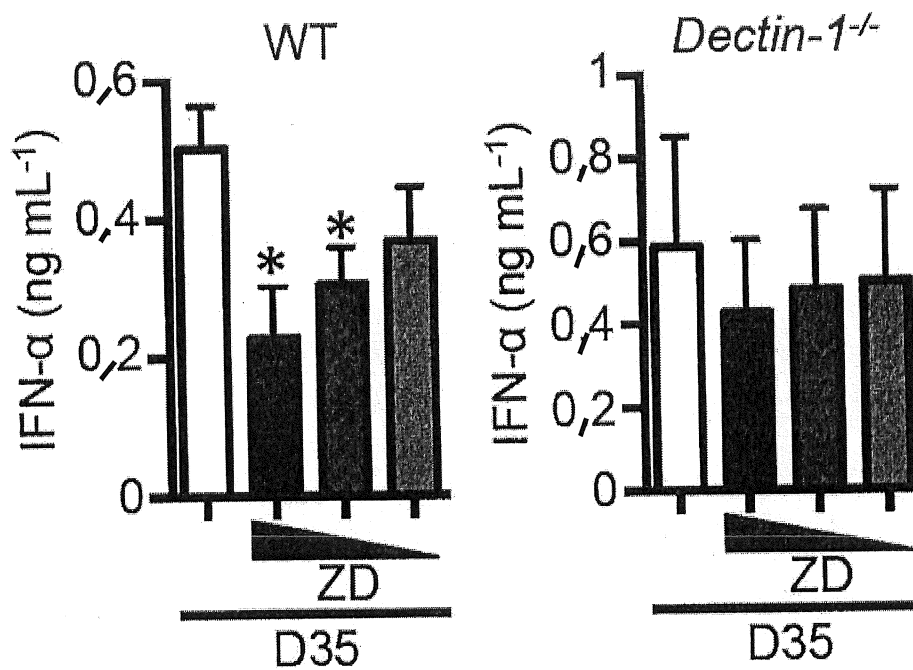


Fig. 23

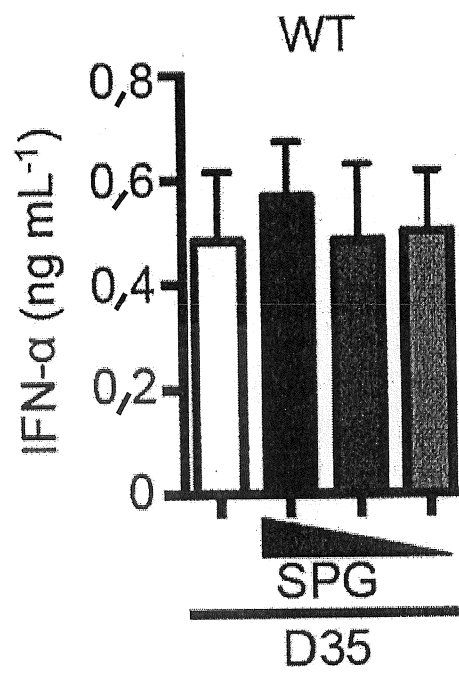


Fig. 24

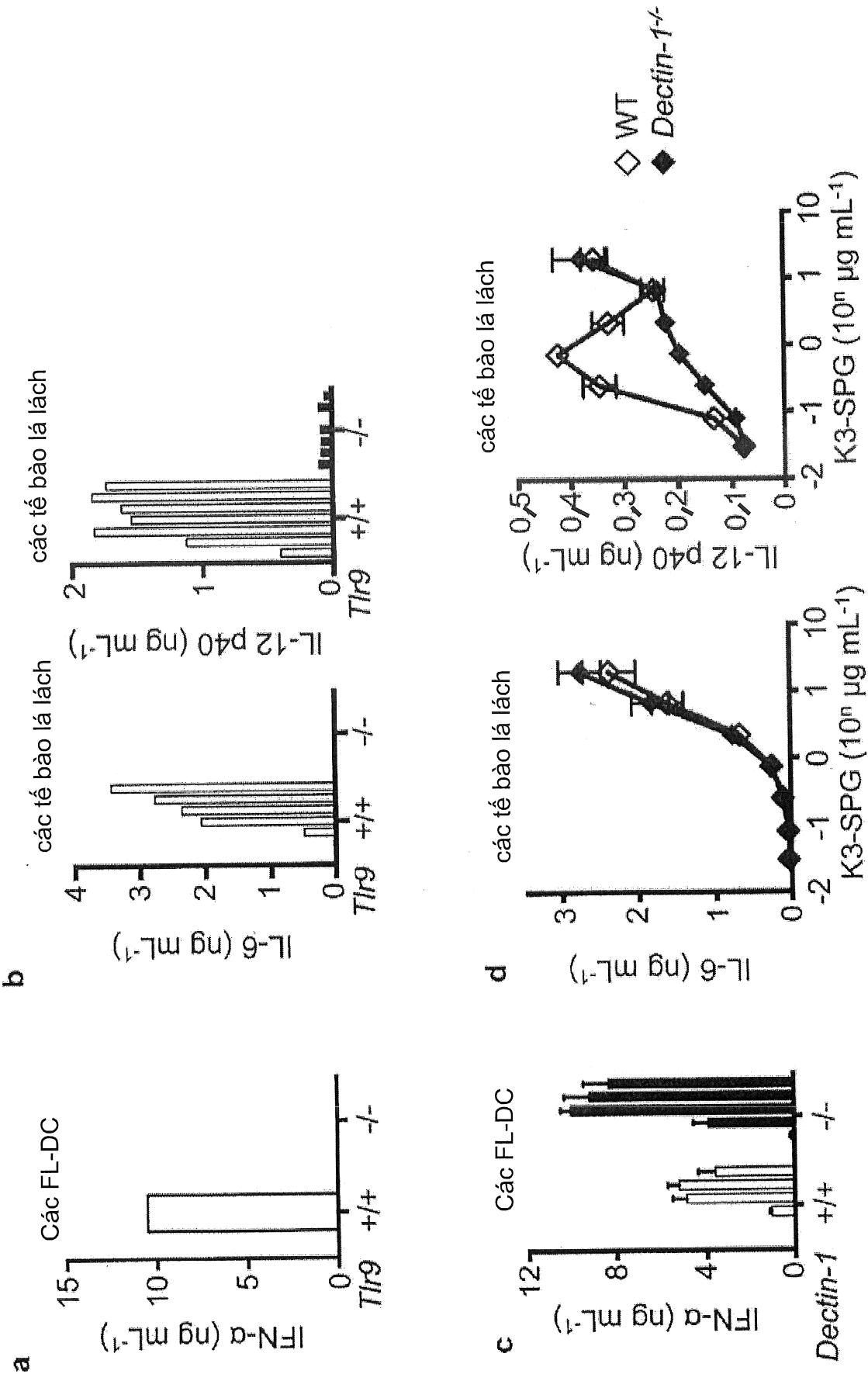


Fig. 25

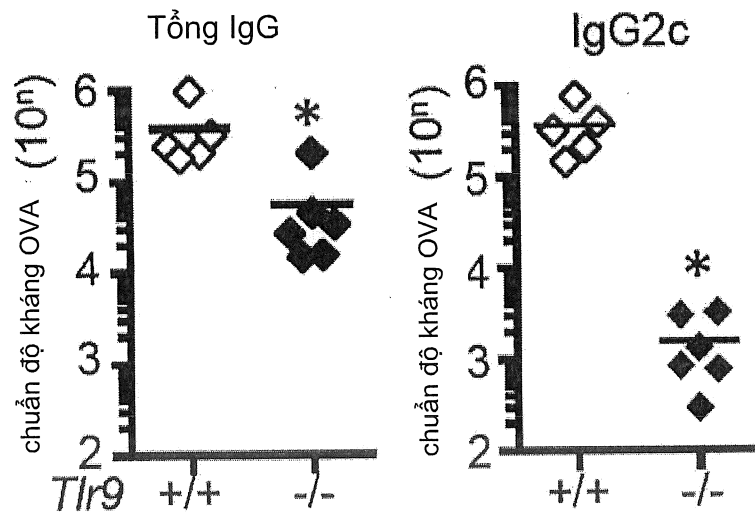


Fig. 26

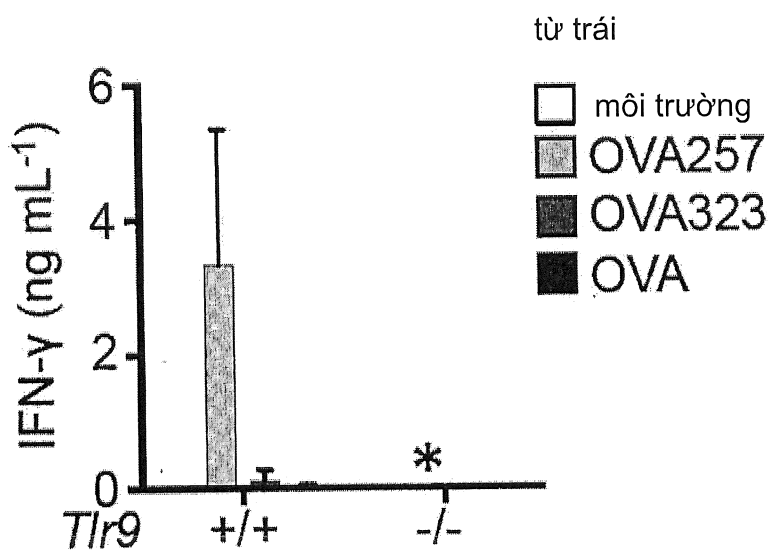


Fig. 27

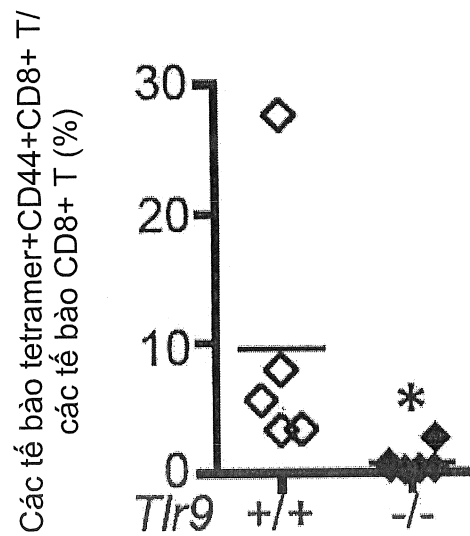


Fig. 28

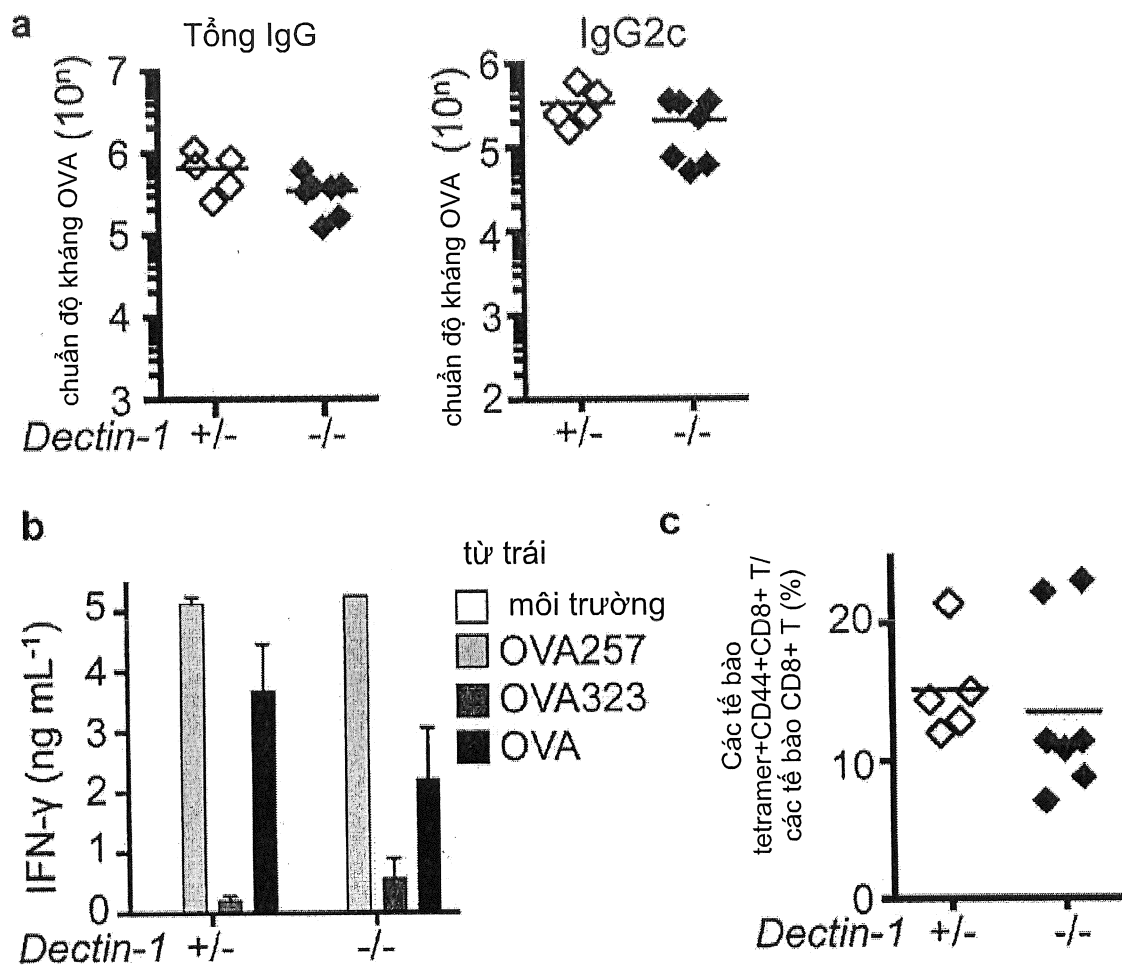


Fig. 31

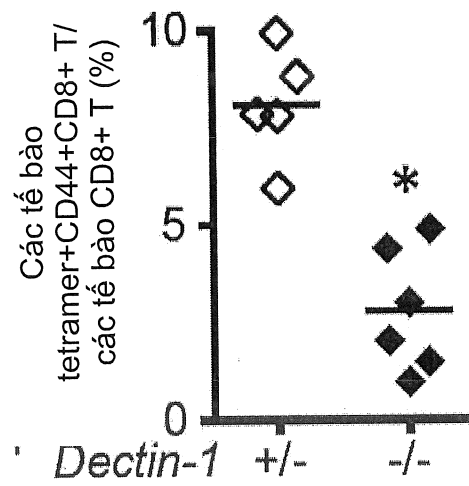


Fig. 32

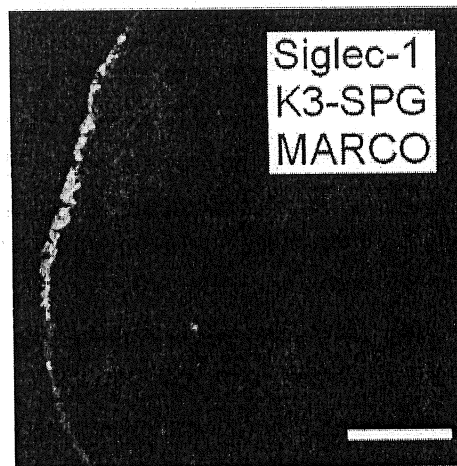


Fig. 33

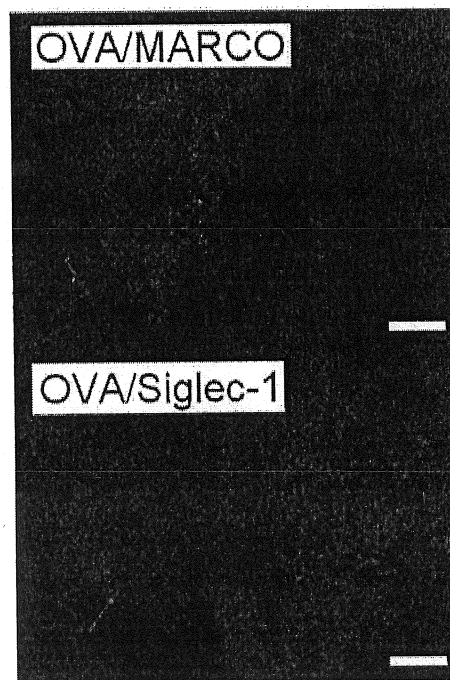


Fig. 34

Kháng nguyên hấp thụ
các đại thực bào LN

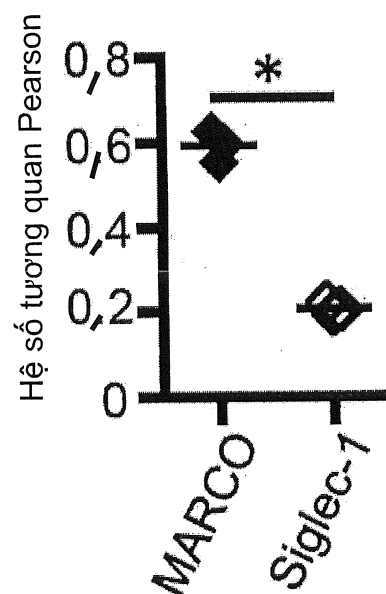


Fig. 35

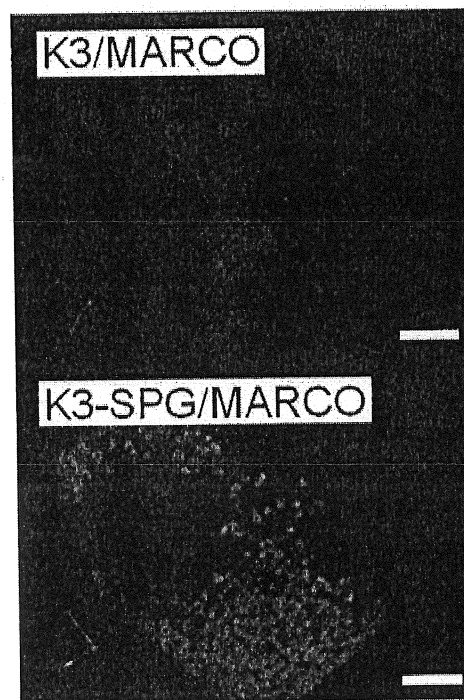


Fig. 36

Tá dước hấp thụ các đại
thực bào MARCO+

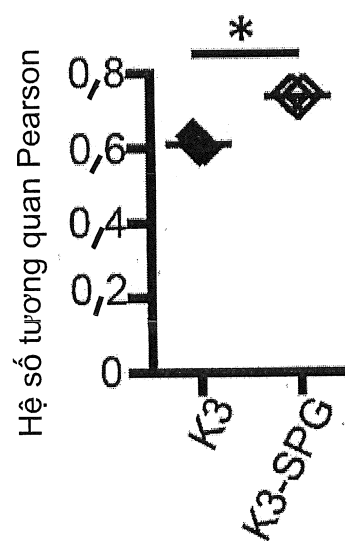


Fig. 37

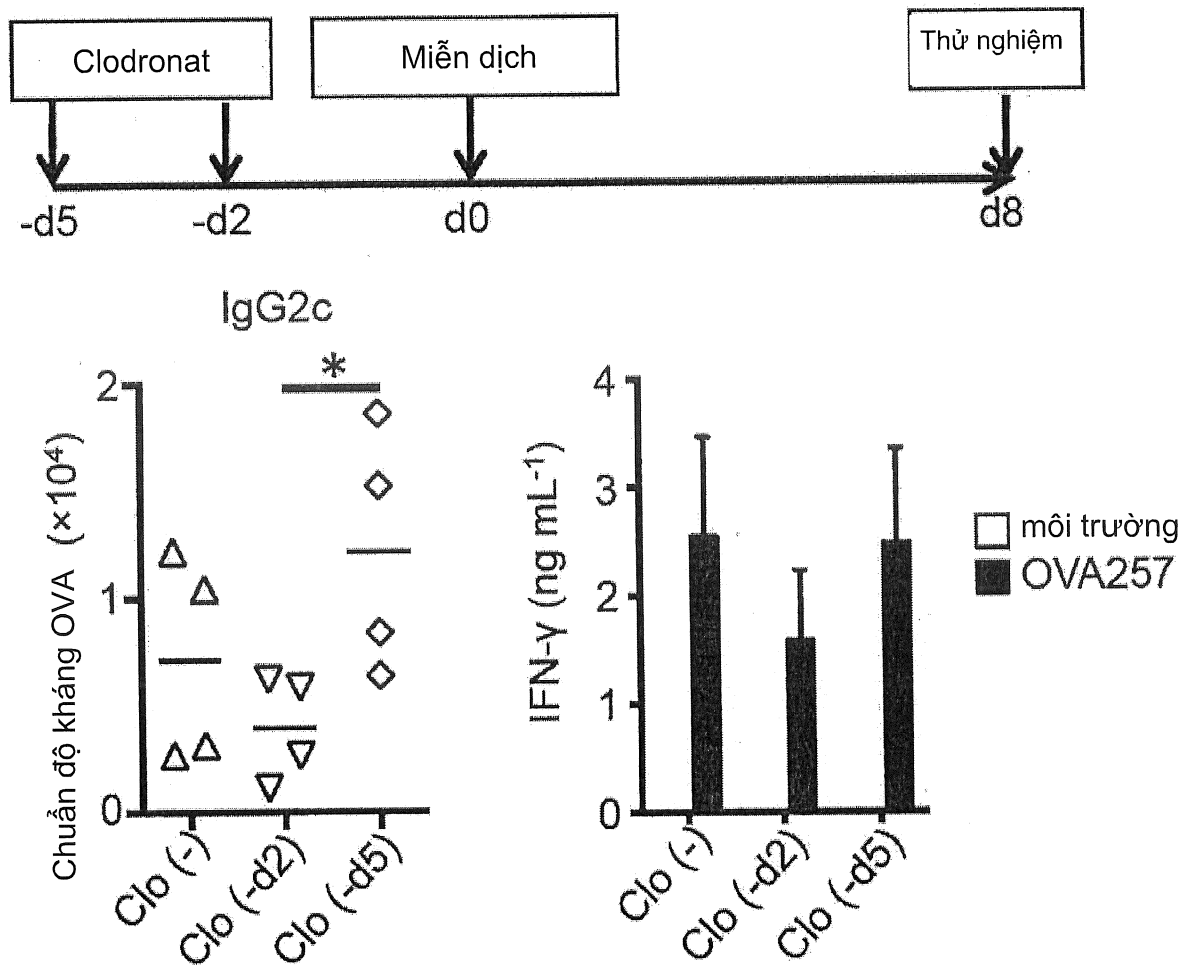


Fig. 38

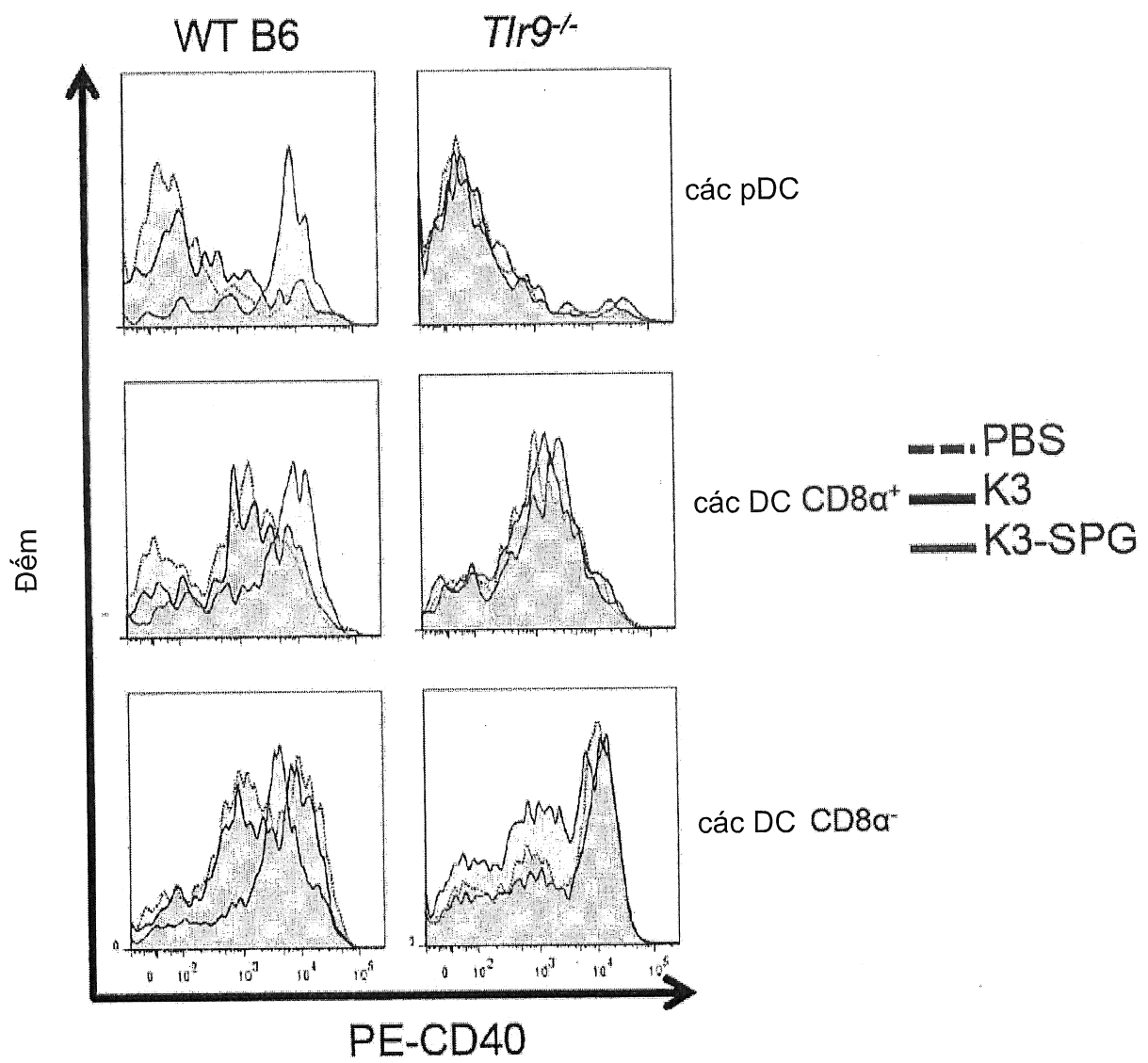


Fig. 39

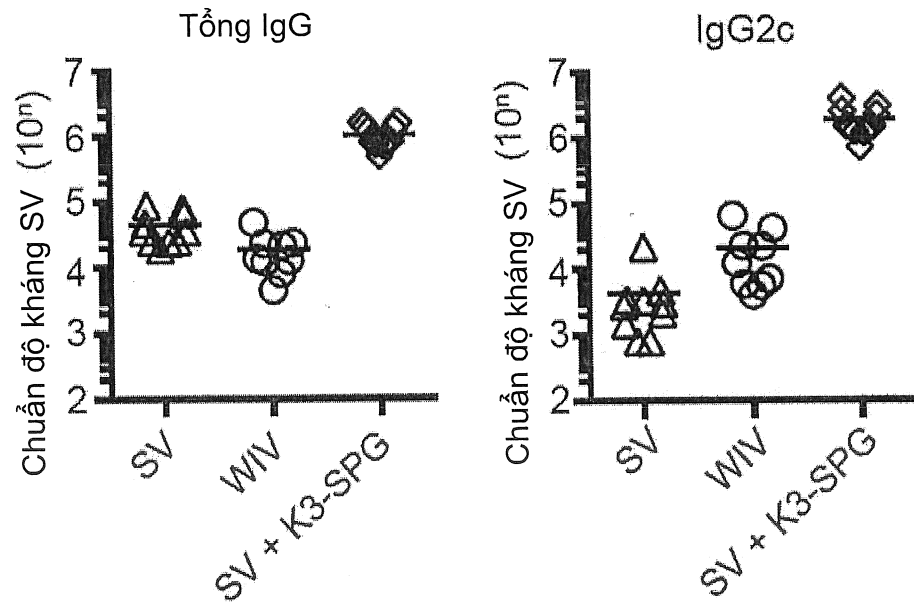


Fig. 40

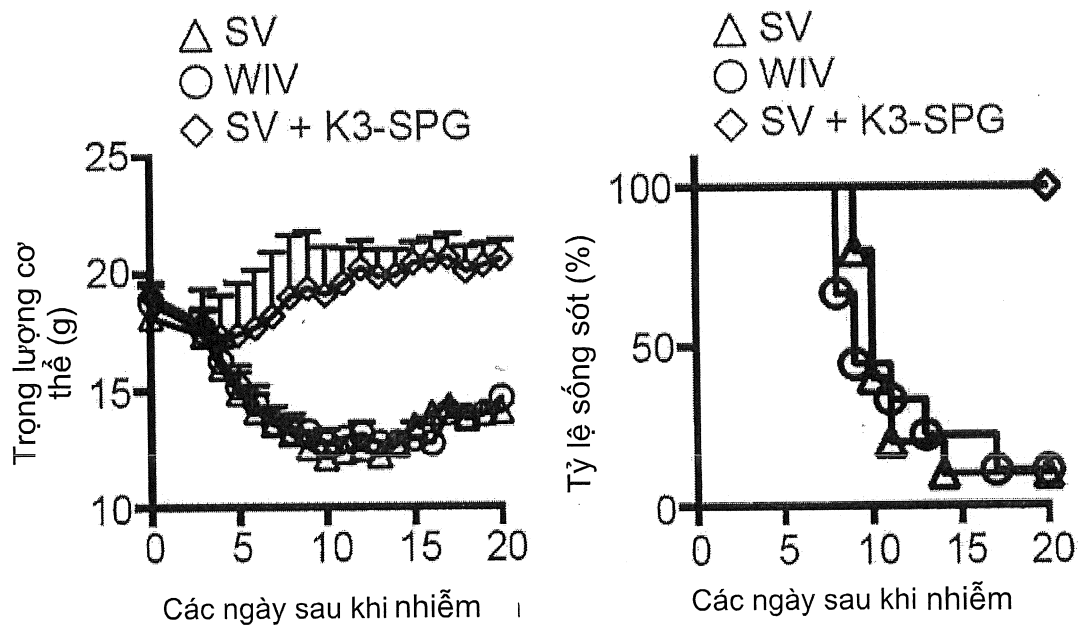


Fig. 41

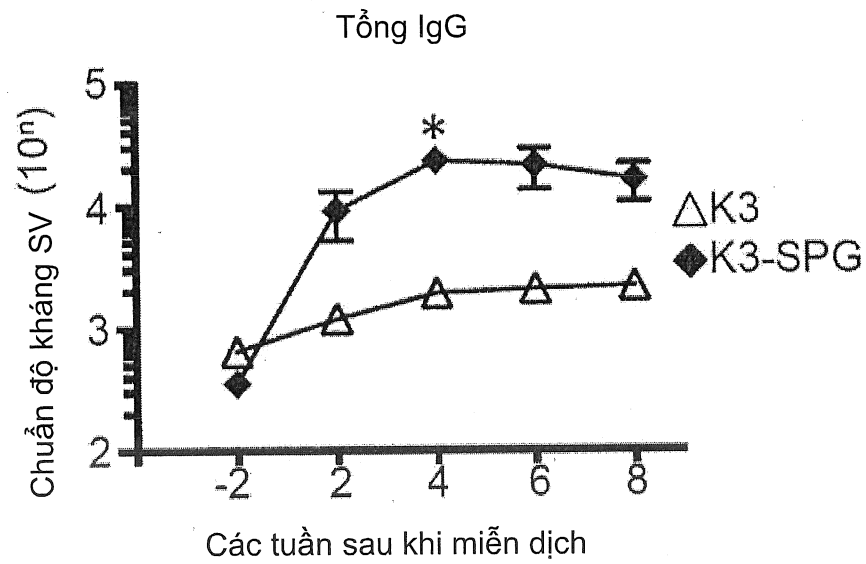


Fig. 42

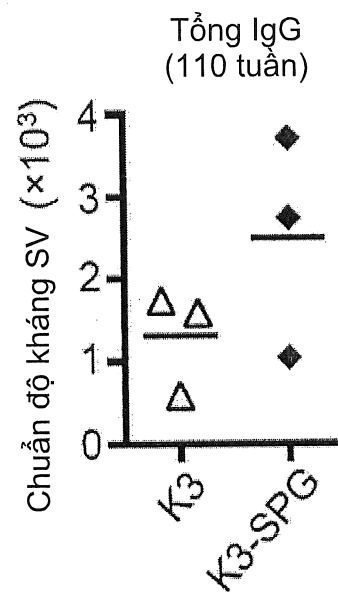


Fig. 43

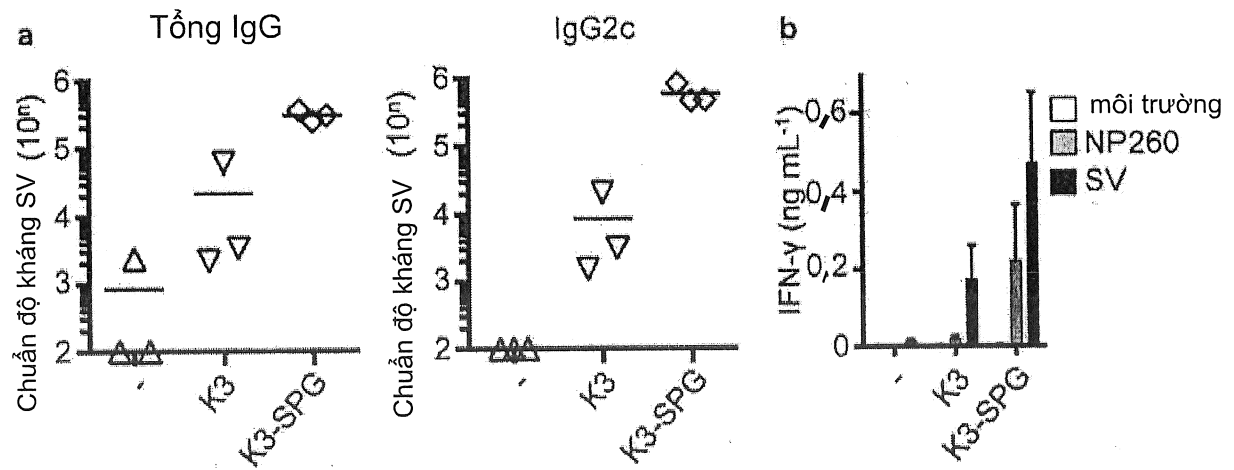


Fig. 44

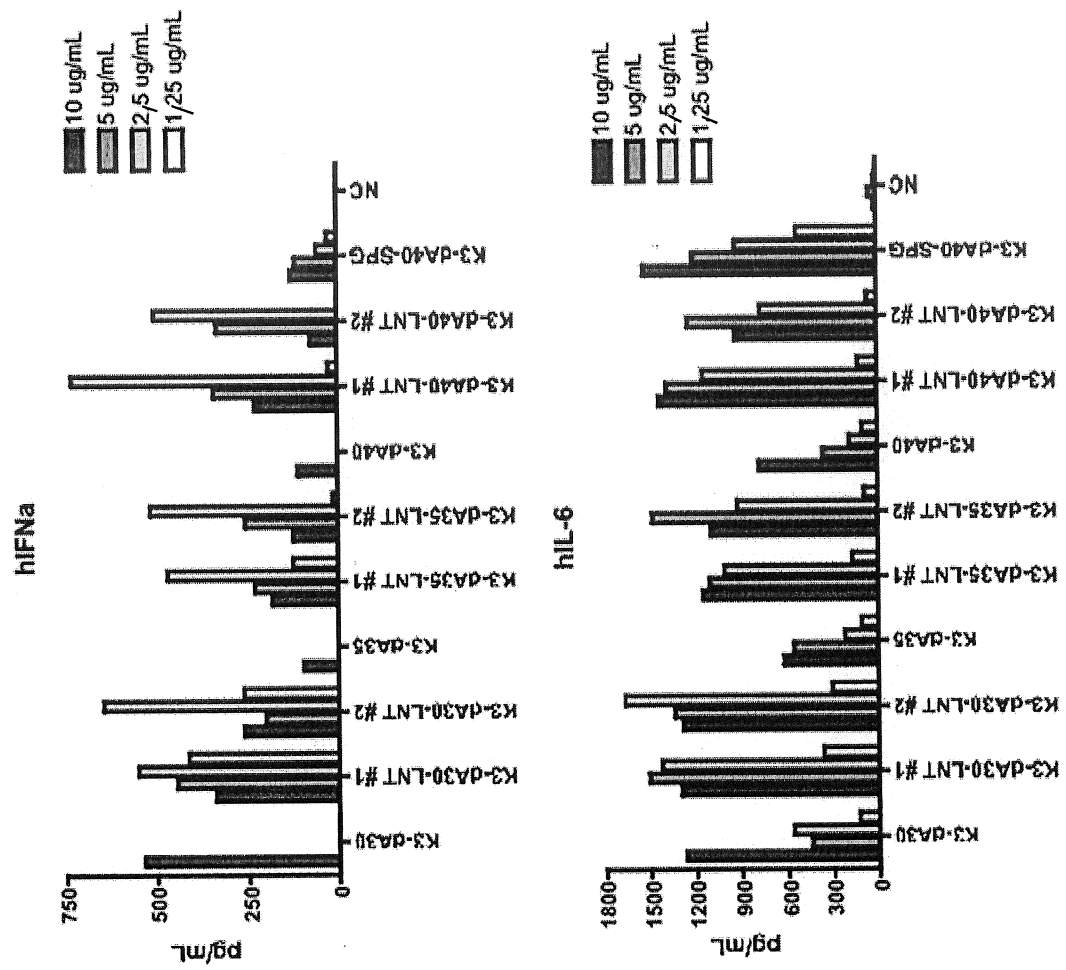


Fig. 45

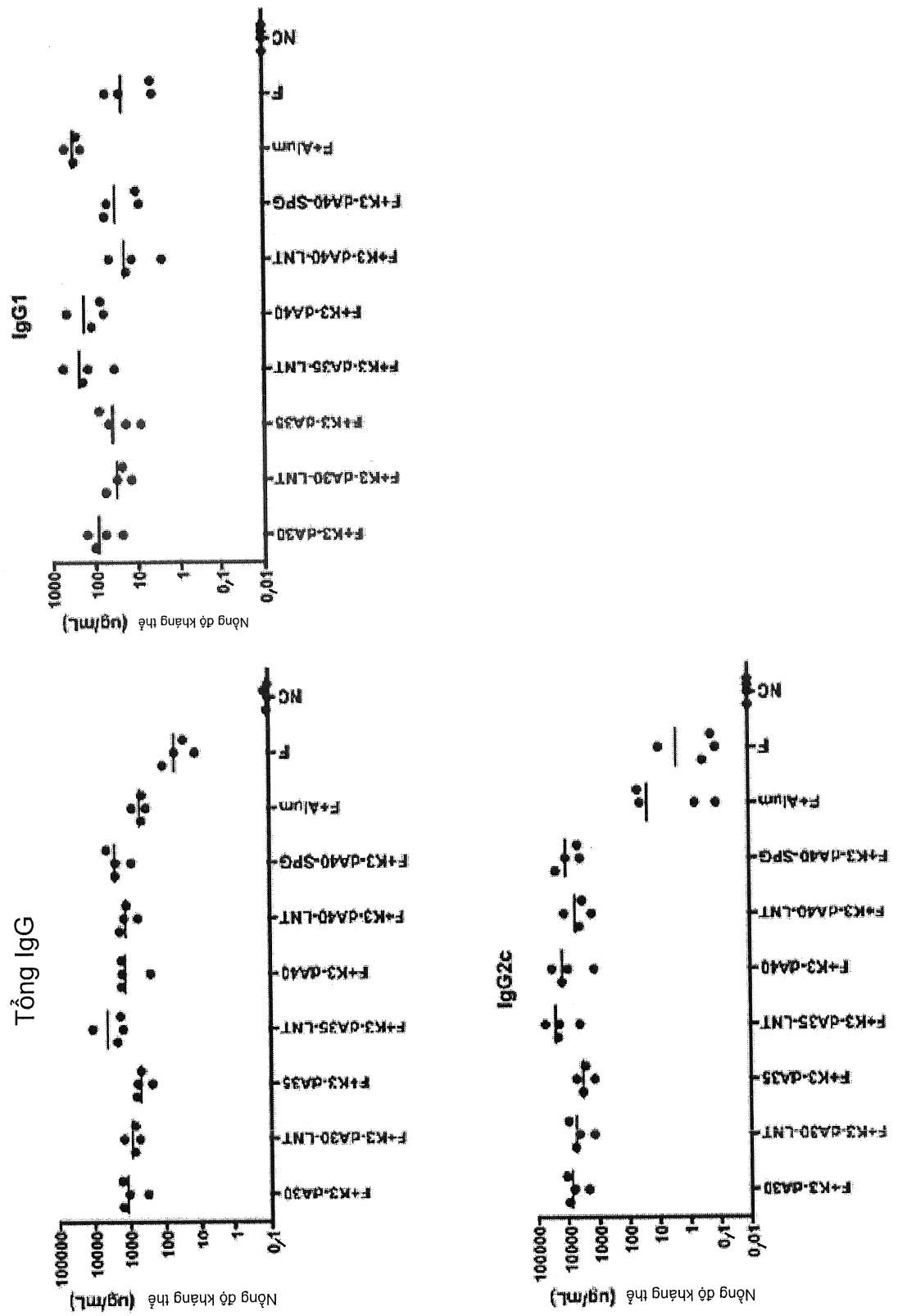


Fig. 46

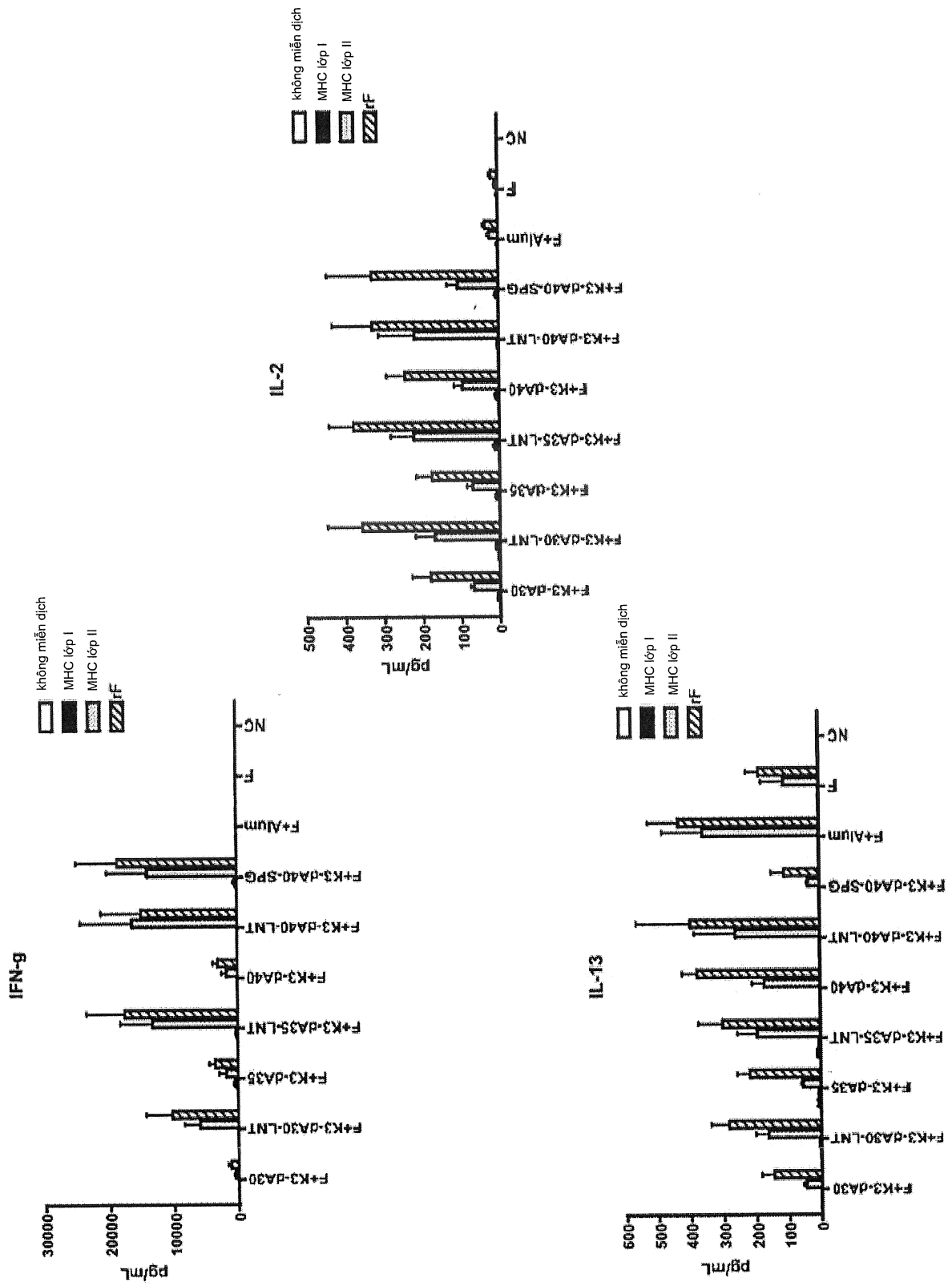


Fig. 47

