



(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)



1-0026908

(51)⁷ A61K 39/39; A61P 35/00; A61P 31/06; (13) B
A61P 31/18; A61K 9/127; A61P 31/00

(21) 1-2013-00006

(22) 05/07/2011

(86) PCT/CU2011/000004 05/07/2011

(87) WO2012/003814 12/01/2012

(30) CU/P/2010/144 06/07/2010 CU

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/04/2013 301A

(73) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa, La Habana 12100, Cuba

(72) FERNANDEZ MOLINA, Luis Enrique (CU); LANIO RUIZ, Maria Eliana (CU);

LABORDE QUINTANA, Rady Judith (CU); CRUZ LEAL, Yoelys (CU);

LUZARDO LORENZO, Maria del Carmen (CU); MESA PARDILLO, Circe (CU);

ALVAREZ VALCARCEL, Carlos Manuel (CU); PAZOS SANTOS, Isabel Fabiola

(CU); TEJUCA MARTINEZ, Mayra (CU); VALLE GARAY, Aisel (CU); ALONSO

BIOSCA, Maria Eugenia (CU); CANET SANTOS, Liem (CU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) VẬT TRUYỀN VACXIN ĐỂ GÂY ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TẾ BÀO VÀ CHẾ
PHẨM VACXIN CHỨA NÓ

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực áp dụng công nghệ sinh học trong y tế. Sáng chế đề cập tới vật truyền vacxin trong đó các độc tố từ vi sinh vật có nhân điển hình được bao nang vào các túi đa lớp thu được bằng phương pháp loại nước-tái hydrat hoá trong đó chế phẩm lipit là dipalmitoylphosphatidylcholin:cholesterol với tỷ lệ mol 1:1 để dùng theo đường dưới da hoặc trong cơ. Các chế phẩm này không đòi hỏi phải sử dụng các chất bổ trợ khác.

Chế phẩm theo sáng chế cho phép điều biến đáp ứng miễn dịch đặc hiệu CTL kháng lại một hoặc nhiều kháng nguyên được đồng bao nang vào liposom chứa độc tố. Vật truyền vacxin theo sáng chế có nhiều ưu điểm hơn so với các vật truyền đã biết khác về hiệu lực và khả năng gây đáp ứng miễn dịch cũng như các đặc tính điều biến miễn dịch của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực áp dụng công nghệ sinh học trong y tế. Cụ thể, sáng chế đề cập đến vật truyền vacxin có thể được dùng cả dưới da lẫn trong cơ bao gồm liposom chứa sticholysin và giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu đối với các kháng nguyên, có tác dụng trong điều trị miễn dịch ung thư và điều trị các bệnh gây ra bởi các tác nhân gây bệnh nội bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khả năng hỗ trợ miễn dịch của các túi liposom đã được biết đến từ lâu. Tính hợp lý của việc sử dụng liposom để gây miễn dịch và thiết kế vacxin dựa trên khả năng của chúng trong việc giải phóng phân tử kháng nguyên trên tế bào hiển thị kháng nguyên (antigen presenting cells - APC) và kích thích đáp ứng miễn dịch. Ưu điểm quan trọng nhất của các liposom với vai trò các chất hỗ trợ miễn dịch được tóm tắt như sau: (i) khả năng bắt chước tác nhân gây bệnh mang lượng lớn kháng nguyên tới APC, (ii) khả năng đồng bao nang kháng nguyên với phân tử kích thích miễn dịch, (iii) tính linh hoạt trong việc cải biến các đặc tính hóa lý của nó để thu được hiệu quả tốt hơn, và (iv) khả năng thoái biến sinh học và không có độc tính (Leserman in Journal of Liposome Research, 2004, 14 (3 & 4), 175–189).

Một thách thức trong lĩnh vực vacxin là tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào qua trung gian lympho T CD8⁺ (CTL) gây độc tế bào đặc hiệu với kháng nguyên, là yếu tố quan trọng trong việc phòng ngừa và điều trị các bệnh gây ra bởi các tác nhân gây bệnh nội bào và tế bào khối u. Các túi liposom có thể tăng cường đáp ứng CTL nhưng không phải lúc nào cũng có hiệu quả. Nhiều chiến lược sử dụng túi liposom khác nhau đã được định ra nhằm tăng hiệu quả của chức năng này; ví dụ như sử dụng liposom nhạy với pH axit, liposom cation, kết hợp với các chất điều biến miễn dịch như CpG và các độc tố tạo lỗ tạo ra bởi vi

khuẩn. Mặc dù đã có nhiều công bố khác nhau, nhưng chỉ một vài trong số các chiến lược này có thành công hạn chế trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào hiệu quả hoặc vẫn có nhược điểm và do đó cần phải được cải thiện cho tốt hơn trước khi áp dụng.

Việc gắn protein màng virus lên màng liposom để thúc đẩy quá trình dung hợp màng trong các điều kiện pH axit hoặc phân giải protein là phương án khác để phát triển vật truyền vaccin. Các vật truyền như vậy được gọi là các virosom và không chỉ được dùng làm vaccin virus gốc, mà còn đóng vai trò làm vật truyền để vận chuyển kháng nguyên vaccin được gắn kết hoặc bao nang với virosom (Zurbriggen en Vaccine, 2003 14; 21(9-10):921-4). Các tiểu phân virosom được viết tắt là IRIV (*immunopotentiating reconstituted influenza virosome* - virosom cúm hoàn nguyên có khả năng tạo miễn dịch), chứa các protein và lipid từ vỏ của virus cúm, là ví dụ đặc trưng nhất cho chiến lược này và là nền tảng của sáng chế về vaccin chống lại bệnh viêm gan A (Patent Mỹ số 5565203). Tuy nhiên, chế phẩm vaccin này được thiết kế để tăng cường đáp ứng kháng thể trung hòa chống lại bệnh viêm gan A. Việc gắn kết virus viêm gan A đã bất hoạt và có độ tinh khiết cao vào màng virosom tạo thuận lợi cho quá trình xử lý và hiển thị peptit đã chuyển hóa bằng con đường kinh điển MHCII, nhờ quá trình dung hợp virosom và màng thể nhân ở các APC (Glück y Wälti in Dev Biol (Basel), 2000, 103,189-97). Đã có bằng chứng chỉ rằng dạng kết hợp vật lý kháng nguyên-virosom có vai trò quan trọng trong chất bổ trợ miễn dịch (Zurbriggen *et al.*, Progr., in Lipid Res., 2000, 39(1), 3-18; Amacker *et al.*, in Int Immunol., 2005, 17(6), 695-704).

Schumacher *et al.*, trong Vaccine 22:714-723, 2004, đã cho rằng IRIV có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Cụ thể, Schumacher *et al.* đã chứng minh được hoạt tính bổ trợ của nó trong việc cảm ứng CTL *in vitro*. Khả năng này phụ thuộc chủ yếu vào sự kích thích hoạt tính của các tế bào T CD4+ đặc hiệu với protein virus. Tuy nhiên, cho dù việc sử dụng virosom làm chất bổ trợ có nhiều ưu điểm như độc tính thấp và tính sinh miễn dịch cao, nhưng một trong các vấn đề gặp phải hiện nay trong kỹ thuật

virosom là không có phương pháp thích hợp để bao nang chất tan như các protein cần thiết để gây ra đáp ứng CTL. Do nồng độ lipid tại đó virosom được tạo ra (xấp xỉ 1mM lipid), và đường kính của nó (khoảng 200nm), nên chỉ ít hơn 1% pha nước được bao nang trong virosom (Schoen *et al.*, en J. Liposome Res., 3: 767-792, 1993). Các đặc tính này sẽ làm giảm đáng kể hiệu quả giải phóng kháng nguyên hoặc gen của virosom vào các tế bào. Một chiến lược để khắc phục hạn chế này và để tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch cho các tế bào T CD8+, đã được công bố mới đây trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100015214, dựa trên việc kết hợp virosom rộng với vật truyền, tốt hơn là liposom, chứa kháng nguyên được bao nang. US 20100015214 bộc lộ tác dụng bổ trợ chéo của các virosom, mặc dù giữa các hạt này và liposom không có bất kỳ sự tương tác vật lý nào.

Trong báo cáo của Lanio. *et al.* công bố trong J Liposom Res., 2008, 18(1), 1-19 đã mô tả, đối với rhEGF, hiệu quả duy trì trạng thái bao nang cao của liposom thu được bằng phương pháp loại nước-tái hydrat hoá (DRV – dehydration-rehydration procedure) và chứa phosphatidylcholin (PC) đã bão hoà (dipalmitoylphosphatidylcholin, DPPC) và cholesterol (Cho) với tỷ lệ mol 1:1 so với các rhEGF chứa PC không bão hoà và Cho. Thực tế, quá trình thu nhận DRV này tạo ra các túi đa lớp kép có hiệu quả bao nang/duy trì cao đối với nhiều loại chất tan dễ hòa tan. Lanio *et al.* đã chứng minh rằng đặc tính bổ trợ miễn dịch của các túi này là tăng cường đáp ứng kháng thể và vượt trội về mặt định tính và định lượng so với rhEGF.

Bài tổng quan của Alvarez *et al.* công bố trong Toxicon, 2009, 54(8):1135-47, tóm tắt đặc điểm cấu trúc và chức năng của hai protein được tạo ra bởi động vật biển không xương sống, hải quỳ Ca-ri-bê *Stichodactyla helianthus*, và được các tác giả gọi tên là Sticholysins (Sts) I và II (StI/II). Các protein này là các độc tố tạo lỗ (PFT – pore-forming toxin) thuộc họ protein *Actinoporins*, lớp duy nhất của PFT có nguồn gốc từ sinh vật có nhân điển hình được tìm thấy duy nhất ở hải quỳ. Tương tự với các chi khác thuộc họ này, Sts là các protein bazơ có điểm đẳng điện cao (>9,5), có khối lượng phân tử xấp xỉ 20kDa, không có các gốc

xystein trong trình tự axit amin của chúng và có tác động chủ yếu với màng chứa sphingomyelin (SM). Sts được tạo ra dưới dạng hòa tan nhưng có thể liên kết dễ dàng với hệ tế bào và hệ màng mô hình tạo ra các lỗ có đường kính 2nm, có thể do sự tương tác của dạng xoắn ốc ở đầu tận cùng N của 4 monome. Cả hai trường hợp liên kết và tạo lỗ đều phụ thuộc vào các đặc tính hóa lý của màng.

Trong bài báo đã công bố trong *Toxicon*, 2007, 49: 68-81, Martinez *et al.* chỉ ra mối tương quan của SM và Cho với sự gắn kết và tạo lỗ trên màng bởi StII. Tình trạng pha của màng ảnh hưởng tới sự gắn kết StII với các cấu trúc này. Như được Martinez et al., báo cáo trong tạp chí *Biology*, 2002, 16, 2: 85-93, độc tố này có mối liên quan thuận nghịch với màng chứa DPPC và SM với khả năng thấm rất thấp.

Mặc dù đã có nhiều báo cáo về các đặc tính điều biến miễn dịch của độc tố tạo lỗ từ vi khuẩn trong việc tạo ra đáp ứng CTL đặc hiệu với kháng nguyên, bằng cách sử dụng các chiến lược khác nhau bao gồm bao nang chúng vào liposom, như được tóm tắt trong bài tổng quan của Dietrich et al. and Morón et al., in *TRENDS in Microbiology*, 2001, Vol.9 No.1, 23-28 và *TRENDS in Immunology*, 2004, Vol.25 No.2, 92-97, tương ứng; nhưng không có tài liệu nào đề cập tới các độc tố đồng nhất chức năng từ các vi sinh vật biển có nhân điển hình.

Để áp dụng trong điều trị miễn dịch bệnh ung thư, mong muốn có được chế phẩm vacxin mới có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu với kháng nguyên và ít độc hại hơn chế phẩm chứa độc tố vi khuẩn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế bất ngờ nhận thấy rằng khi kháng nguyên được dùng dưới da (sc) hoặc trong cơ (im) trong chế phẩm vacxin Liposom-St được bao nang với biến thể bất kỳ trong số các biến thể độc tố đã mô tả bao gồm cả các biến thể không có hoạt tính tạo lỗ hoặc hoạt tính phân giải, thì tỷ lệ phần trăm phân giải tế bào đích là cao hơn nhiều so với tỷ lệ quan sát được ở nhóm đối chứng dương tính sử dụng axit polyinosinic:polyxytydyllic (poly I:C, PIC) đã biết

trong tình trạng kỹ thuật làm chất tăng cường thiết yếu đáp ứng CTL, nồng độ kháng thể và đáp ứng Th1/Th2 kết hợp gây ra bởi kháng nguyên liposom là không thay đổi. Điều này cho thấy rằng hệ liposom-St có khả năng tạo ra cả đáp ứng tế bào lẫn đáp ứng thể dịch kháng lại protein kháng nguyên, khiến cho có thể sử dụng chế phẩm này nhằm mục đích chủng ngừa.

Mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất vật truyền vaccin dựa trên chế phẩm liposom của các độc tố như Sts được đồng bao nang bằng DPPC và cho cùng với protein kháng nguyên. Chế phẩm liposom của DPPC và Cho bao nang các thể đột biến của độc tố Sts (ví dụ, StIW111C và StIW111C_{irrev}) cùng với protein kháng nguyên cũng là đối tượng của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin bao gồm vật truyền vaccin chứa độc tố cùng với kháng nguyên nêu trên để dùng theo đường dưới da hoặc trong cơ nhằm gây đáp ứng CTL đặc hiệu kháng nguyên mạnh.

Sáng chế cũng mô tả việc chế phẩm vaccin chứa vật truyền vaccin chứa độc tố cùng với kháng nguyên nêu trên để dùng theo đường dưới da hoặc trong cơ nhằm tăng cường đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân mắc các bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư và bệnh lây nhiễm gây ra bởi các tác nhân gây bệnh nội bào.

Tiếp theo, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân cần tăng cường đáp ứng miễn dịch, trong đó bệnh nhân mắc các bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư và bệnh lây nhiễm gây ra bởi các tác nhân gây bệnh nội bào và trong đó phương pháp này bao gồm bước dùng chế phẩm vaccin chứa vật truyền vaccin chứa độc tố Sts này hoặc các thể đột biến của chúng cùng với kháng nguyên liên quan tới bệnh này theo đường dưới da hoặc trong cơ.

Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả khả năng bảo vệ được tạo ra bởi chế phẩm vaccin này để kích thích các tế bào khối u biểu hiện kháng nguyên, làm giảm tỷ lệ phần trăm xuất hiện khối u và làm tăng khả năng sống sót của đối tượng bị khối u. Do đó, phương pháp phòng ngừa sự khởi phát của bệnh liên quan đến kháng nguyên cũng được mô tả.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị minh họa tỷ lệ phân giải của các tế bào đích mang peptit trội miễn dịch OV (SIINFEKL) và được dán nhãn CFSE ở động vật thử nghiệm đã được điều trị bằng các vaccin khác nhau trong thử nghiệm độc tế bào *in vivo*. Mỗi điểm tương ứng với dữ liệu thu được từ mỗi con vật và dòng tương ứng với giá trị trung bình của ít nhất hai thử nghiệm độc lập. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm gây miễn dịch theo thử nghiệm Dunnett T3 ($p < 0,05$).

Fig.2A thể hiện tỷ lệ phần trăm các động vật không chứa khối u ở 3 nhóm động vật thử nghiệm được điều trị bằng các vaccin khác nhau và tác động lên tế bào khối u biểu hiện OVA.

Fig.2B là đồ thị thể hiện khả năng sống sót trong 3 nhóm sau khi chủng ngừa các tế bào khối u biểu hiện OVA. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê theo thử nghiệm Log-Rank ($p < 0,05$).

Fig.3 thể hiện sự thay đổi độ đục của huyền phù hồng cầu do tác động của các biến thể đime chứa StI (StIW111C hoặc StIW111C_{irrev}) trong các điều kiện khử (với sự có mặt của 2-ME) và điều kiện không khử.

Fig.4 thể hiện khả năng giảm độ đục của huyền phù hồng cầu do tác động của StII âm tính (protein hoạt tính) hoặc đã bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt.

Fig.5 thể hiện các biểu hiện thay đổi của chất đánh dấu phân tử chứa các tế bào hình cây (DC) do sự phơi nhiễm *in vitro* của chúng với St II ở cả dạng biến thể hoạt tính và dạng bất hoạt bằng nhiệt của nó với sự có mặt hoặc không có mặt tác nhân trung hòa nội độc tố (pmxB).

Đồ thị A: Tỷ lệ phần trăm của CD80

Đồ thị B: Tỷ lệ phần trăm của CD86

Đồ thị C: Tỷ lệ phần trăm của CD40

Fig.6 là hai đồ thị thể hiện tỷ lệ phân giải tế bào đích mang peptit trội miễn dịch OVA (SIINFEKL) và được dán nhãn CFSE ở động vật thử nghiệm được điều trị bằng các vaccin khác nhau trong thử nghiệm độc tính tế bào *in vivo*. Mỗi điểm tương ứng với dữ liệu thu được từ mỗi con vật và dòng tương ứng với giá trị

trung bình. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trong số các nhóm gây miễn dịch theo thử nghiệm Tukey ($p < 0,05$).

Đồ thị A: Đáp ứng thu được trong quá trình chủng ngừa bằng liposom đồng bao nang OVA, StII âm tính hoặc các biến thể dime của StI thuận nghịch (StIW111C) hoặc bất hoạt không thuận nghịch (StIW111_{Cirrev}).

Đồ thị B: Đáp ứng thu được trong quá trình chủng ngừa bằng liposom đồng bao nang OVA và StII bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vật truyền vaccin theo sáng chế dựa trên các thể phân tán trong nước của liposom DRV có tỷ lệ mol DPPC:Cho bằng 1:1, bao nang St với kháng nguyên, và có thể chứa các đồng dung môi khác có thể trộn lẫn với nước, không độc, không kích ứng và không làm mất độ ổn định của vật truyền, và có thể được sử dụng trong dược phẩm dùng để tiêm, ví dụ đường, polyetylen glycol, v. v..

Chế phẩm liposom theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp loại nước-tái hydrat hoá và được cấu thành từ DPPC và Cho với tỷ lệ mol 1:1 và đồng bao nang kháng nguyên với một số biến thể Sts hoặc các thể đột biến bất hoạt thuận nghịch của chúng, trong đó chế phẩm vaccin này có khả năng thúc đẩy đáp ứng miễn dịch CTL đặc hiệu kháng nguyên và bảo vệ kháng lại tác động của tế bào khối u.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa kháng nguyên là protein OVA, nhưng trong đó kháng nguyên này có thể là protein hoặc polypeptit bất kỳ liên quan tới bệnh cần điều trị, gây ra đáp ứng CTL đặc hiệu kháng lại kháng nguyên protein này. Ví dụ, kháng nguyên này có thể là protein hoặc polypeptit liên quan tới bệnh ung thư, protein hoặc polypeptit liên quan tới bệnh AIDS hoặc protein hoặc polypeptit liên quan tới bệnh lao.

Các liposom theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp loại nước-tái hydrat hoá đã được Kirby và Gregoriadis mô tả trong *Biotechnology*, 1984, 2, 979-984, có dạng các túi với pha nước ở trong được bao quanh bởi một số lớp lipid kép, đặc trưng bởi hiệu quả cao trong việc bao nang và lưu giữ các phân tử

không bền như kháng nguyên và protein điều biến miễn dịch. Dung dịch clorofom chứa DPPC và Cho với tỷ lệ mol 1:1 được làm bay hơi và giữ trong điều kiện chân không trong 30 phút. Các lipid được hydrat hoá bằng nước khử ion ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ chuyển pha (T_c) của DPPC ($T > 45^\circ\text{C}$). Huyền phù chứa các túi đa lớp (MLV) được chuyển dạng thành SUV hoặc LUV (*Small Unilamellar Vesicles and Large Unilamellar Vesicles* - Túi nhỏ đơn lớp và túi lớn đơn lớp, tương ứng) bằng các chu trình sóng siêu âm và nghỉ hoặc bằng cách ép đùn qua màng polycarbonat có cỡ lỗ 100nm. Các túi thu được được trộn với dung dịch protein, theo tỷ lệ lipid: protein từ 16 - 64 μmol lipid: 1,8 - 7nmol kháng nguyên và 0,5 - 2nmol St, và được đông khô nhanh trong 20-24 giờ. Quá trình tái hydrat hoá được tiến hành bằng nước khử ion và khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ nhỏ hơn 45°C . Các chất không được bao nang trong liposom được loại bỏ bằng cách rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) độ pH = 7,4 (NaCl 136mmol/L, KH_2PO_4 1,47mmol/L, Na_2HPO_4 9,55mmol/L, KCl 2,68mmol/L) tiếp đó ly tâm ở 10.000 g trong 15 phút. Các chế phẩm như vậy đạt được hiệu quả bao nang đối với các biến thể Sts khác nhau vào khoảng 50% và khả năng lưu giữ là 70% sau 1 tháng bảo quản ở 4°C , được tạo huyền phù trong PBS.

Các độc tố StI và StII được phân lập và tinh chế từ hải quỳ *Stichodactyla helianthus*, bằng cách sử dụng quy trình đã mô tả bởi Lanio *et al.* trong Toxicon. 2001, 39, 187-94. Thể đột biến tái tổ hợp Sticholysin I (rStI) và rStI, StI W111C, thu được theo các phương pháp đã mô tả lần lượt bởi Pazos *et al.* in Toxicon, 2006, 48, 1083-1094 and Pentón *et al.* in Protein Eng Des Sel. 2011, 24, 485-493.

Nồng độ Sts được sử dụng trong vật truyền vaccin theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,25 đến $1\mu\text{M}$, được đồng bao nang với kháng nguyên ở khoảng nồng độ 1 - $3,5\mu\text{M}$ trong huyền phù liposom với tổng nồng độ lipid nằm trong khoảng từ 16 đến 64 mM.

Tốt hơn, nếu vật truyền vaccin theo sáng chế chứa lượng Sts nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,4 nmol, được đồng bao nang với kháng nguyên với lượng từ

1 đến 2nmol trong huyền phù liposom chứa 20 μ mol lipid toàn phần với thể tích 200 μ L.

Khoảng liều sử dụng đối với vacxin theo sáng chế, để dùng theo đường dưới da hoặc trong cơ là 1 - 2nmol (50-100mg) kháng nguyên.

Một đặc điểm quan trọng của chế phẩm vacxin theo sáng chế là chúng không có các chất bổ trợ miễn dịch ngoài các thành phần đã nêu.

Như đã nêu trong tình trạng kỹ thuật, các độc tố tạo lỗ vi khuẩn được bao nang vào các túi liposom có khả năng tăng cường đáp ứng CTL, nhưng cũng biết rằng việc sử dụng chế phẩm vacxin chứa độc tố vi khuẩn lại gây ra các tác dụng phụ trên người; tuy nhiên, các tác giả sáng chế bất ngờ phát hiện ra rằng các độc tố không phải vi khuẩn có tác dụng kích thích miễn dịch tương tự. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cần theo dõi để tách riêng hoạt tính tạo lỗ của các độc tố có tác dụng kích thích đáp ứng CTL của chúng, để tạo ra các lợi ích quan trọng khi sử dụng lâm sàng vật truyền vacxin này trên người. Các kết quả thu được nhờ sử dụng vật truyền vacxin theo sáng chế chứa phân tử thực thể StIW111C_{irrev} hoặc StII được bất hoạt bằng nhiệt đồng bao nang với kháng nguyên vào liposom, chỉ ra rằng không có sự phụ thuộc hoàn toàn giữa mức gia tăng đáp ứng miễn dịch CTL đặc hiệu kháng nguyên bởi chế phẩm chứa liposom-St và khả năng tạo lỗ của các protein này trên màng. Thử nghiệm gây đột biến tế bào hình cây (DC - dendritic cell) được phân lập từ tủy xương của chuột nhắt C57BL/6 và được tiếp xúc với StII *in vitro*, cho thấy protein này không những có tác dụng trên các biến thể hoạt tính của nó, mà còn có tác dụng bất hoạt bởi nhiệt, để tạo ra quá trình hoạt hóa CD, tương tự với kết quả thu được đối với LPS (nhóm đối chứng dương tính) trong các điều kiện tương tự.

Khả năng tạo lỗ của Sts trên màng được đánh giá bằng cách thử nghiệm hoạt tính phân giải hồng cầu và khả năng thấm LUV mang carboxy phát huỳnh quang (CF – carboxyfluorescein) như được mô tả bởi Martínez et al. in Toxicon, 2001, 39,1547–1560. Nhận thấy rằng Sts không có hoạt tính thấm bằng cách phân tích khả năng thấm của các túi liposom chứa DPPC:Cho (1:1) đồng bao nang CF, so

với các Sts trong các túi bao gồm lòng đỏ trứng phosphatidylcholin và SM (1:1) (nhóm đối chứng dương tính).

Đã chứng minh được rằng thể đột biến StIW111C tạo ra đime bất hoạt ổn định bởi liên kết disulfua bằng thử nghiệm hoạt tính phân giải hồng cầu và SDS-PAGE khi có mặt và không có mặt chất khử 2-mercaptoetanol (2-ME), như Pentón *et al.* mô tả trong Protein Eng Des Sel. 2011, 24, 485-493. Cấu trúc đime không có khả năng tạo lỗ trong hồng cầu, là các tế bào mô hình, là kết quả của việc không gắn kết với màng.

Quy trình tạo ra loại đime không thuận nghịch StIW111C (StIW111C_{irrev}) dựa trên quá trình khử StIW111C bằng cách ủ với 2-ME (0,1 mol/L), loại bỏ chất khử bằng cách lọc trên cột PD-10, và ủ ngay StIW111C_{monome} với chất phản ứng hồng cầu chức kép bis (maleimide) hexan (BMH) với tỷ lệ mol StIW111C_{monome}:BMH nằm trong khoảng từ 1:1 tới 2:1 trong 2 giờ ở 4°C, được thiết lập. StIW111C_{irrev} được tinh chế bằng cách sắc ký lọc gel trên cột Superdex 75 HR 10/300 với sự có mặt của chất khử. Quá trình tạo ra đime không thuận nghịch và độ tinh khiết của nó được xác định bởi SDS-PAGE trong các điều kiện khử. Đime không thuận nghịch thu được có độ tinh khiết 94% và chỉ có 6% tạp chất là đime thuận nghịch. Sự vắng mặt hoạt tính chức năng được xác định bằng thử nghiệm hoạt tính phân giải hồng cầu.

Quá trình bất hoạt không thuận nghịch StII bằng cách xử lý nhiệt được thực hiện theo quy trình được mô tả bởi Martínez *et al.* in Toxicon, 2001, 39,1547–1560 và khả năng suy giảm quá trình tạo lỗ toàn phần trên màng được xác định bởi thử nghiệm hoạt tính phân giải hồng cầu.

Các đặc tính điều biến miễn dịch của các loại phân tử Sts khác nhau trong hệ liposom-St liên quan đến khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch gây độc đặc hiệu kháng nguyên *in vivo* và tính miễn dịch kháng khối u ở mô hình phòng ngừa bệnh, có thể được xác định ở mô hình thử nghiệm chủng chuột nhắt C57BL/6 bằng cách sử dụng kháng nguyên OVA và dòng tế bào khối u E.G7, dòng phụ của u tuyến ức EL-4 của loài gặm nhấm (Kusmartsev y Gabrilovich, in J Leukoc Biol., 2003, 74: 186-96), được chuyển nhiễm bằng ADN bổ trợ của OVA pAc-

neo-OVA (Moore, *et al.* in Cell, 1988, 54: 777-85) và thu được từ “*American Type Cultures Collection*” (ATCC, VA).

Các tác giả sáng chế cũng nhận thấy rằng việc chủng ngừa bằng vật truyền vaccin liposom-St chứa kháng nguyên có tác dụng bảo vệ kháng khối u ở mức cao hơn so với vật truyền tạo ra bởi liposom không chứa StII.

Các kết quả này chứng tỏ rằng hệ liposom-St có tác dụng tạo ra đáp ứng kháng khối u có chức năng tăng cường và bảo vệ, khi sử dụng protein kháng nguyên, mà không cần các chất bổ trợ. Tiếp theo, việc sử dụng chế phẩm này kết hợp với các liệu pháp có thể còn tăng cường tác dụng kháng khối u.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây đưa ra các thử nghiệm so sánh một cách chi tiết cho phép kiểm tra tác dụng gây miễn dịch tạo ra đáp ứng miễn dịch gây độc đặc hiệu kháng nguyên *in vivo* và tính miễn dịch kháng khối u ở mô hình phòng ngừa bệnh của chế phẩm vaccin theo sáng chế so với các chế phẩm không chứa liposom khác và không chứa Sts.

Ví dụ 1: Đánh giá độc tính tế bào và đáp ứng CTL của vật truyền vaccin bằng cách sử dụng StI hoặc StII âm tính và OVA làm kháng nguyên protein.

Vật truyền vaccin chứa liposom được điều chế như đã nêu trên.

Trong các túi DRV chứa DPPC và Cho (tỷ lệ mol 1:1), OVA làm kháng nguyên mẫu và Sts (StI hoặc StII) được đồng bao nang trong hỗn hợp với tỷ lệ 10pmol lipit toàn phần:1,1nmol OVA và 0,3nmol St trong dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) có độ pH = 7,4. Sau quá trình này, tạo ra được hai chế phẩm vaccin:

Chế phẩm vaccin A: liposom DRV chứa DPPC:Cho (60 μ mol lipit toàn phần) đồng bao nang với 6,6 nmol (50 μ g) OVA.

Chế phẩm vaccin B: liposom DRV chứa DPPC:Cho (60 μ mol lipit toàn phần) đồng bao nang với 6,6nmol (50 μ g) OVA và 1,88nmol StI hoặc StII.

15 con chuột nhắt cái C57BL/6 có thể trọng khoảng 18-20g được chọn và chia thành 5 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm chứa 3 con vật.

Nhóm 1 (nhóm đối chứng âm tính) được cho chủng ngừa 0,2mL dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) theo đường dưới da vào các ngày 0, 12, 13 và 14.

Nhóm 2 (nhóm đối chứng dương tính) được cho chủng ngừa theo đường dưới da vào ngày 12, bằng 22,2nmol (1mg) OVA và trộn với 100 µg axit polyinosinoic-polycitidilic (PIC), phối tử tổng hợp TLR3 và chất gây cảm ứng kinh điển của đáp ứng CTL (Hamilton-Williams et al. trong J. Immunol., 2005, 174: 1159-63), vào các ngày 13 và 14, con vật lại được cho nhận tiếp 100 µg PIC.

Nhóm 3 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin A (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 µg OVA) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 4 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 µg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 µg StI) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 5 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 µg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 µg StII) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Vào ngày 20 của thử nghiệm, các tế bào lá lách lấy từ chuột nhắt C57BL/6 không được gây miễn dịch được ủ với điaxetat succinimidyl este phát huỳnh quang carboxy (CFSE) ở hai nồng độ (lần lượt là 0,33 và 5 µmol/L); các tế bào dán nhãn có cường độ phát huỳnh quang mạnh nhất cũng được ủ với 1 µmol/L peptit trội miễn dịch OVA (257-SIINFELK-264) kết hợp với kiểu đơn MHC I đối với chủng C57BL/6 của chuột nhắt. Sau đó, cả hai quần thể tế bào đã dán nhãn được trộn theo tỷ lệ 1:1 và các nhóm thử nghiệm 1-5 được cho chủng ngừa theo đường tĩnh mạch đuôi bằng 30×10^6 tế bào trong hỗn hợp với tổng thể tích 0,2mL. Chuột nhắt được đem giết sau 16 giờ và khả năng phân giải (%) tế bào đích được xác định ở khối u ben gần với vị trí gây miễn dịch bằng cách đo dòng tế bào (flow cytometry - FACS).

Fig.1 minh họa độc tính tế bào *in vivo* thu được bằng cách gây miễn dịch liposom đồng bao nang OVA và Sts cho chuột nhắt. Các con vật đã gây miễn dịch bằng liposom đồng bao nang Sts (StI hoặc StII) có đáp ứng lympho bào T CD8+ (CTL) gây độc tế bào đặc hiệu với OVA cao hơn về mặt thống kê so với nhóm đối chứng dương tính. Ngoài ra, liposom chỉ chứa OVA cũng gây đáp ứng CTL tương đương về mặt thống kê so với nhóm đối chứng dương tính kinh điển đối với thử nghiệm này (PIC).

Ví dụ 2: Tạo ra khả năng bảo vệ kháng khối u của vật truyền vaccin trong mô hình protein OVA.

Khả năng bảo vệ kháng khối u của vaccin chứa liposom được nghiên cứu. Nhằm mục đích này, 60 con chuột nhắt cái C57BL/6 có thể trọng khoảng 18-20g được chọn và chia thành 3 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 20 con vật.

Nhóm 1 (nhóm đối chứng âm tính) được cho chủng ngừa 0,2mL dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) theo đường trong cơ vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 2 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin A được mô tả trong ví dụ 1 (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 µg OVA) theo đường trong cơ vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 3 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B được mô tả trong ví dụ 1 (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 µg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 µg StII) theo đường trong cơ vào các ngày 0 và 12.

Toàn bộ các nhóm từ 1 đến 3 được kích thích vào ngày 19 bằng 3×10^5 tế bào lấy từ dòng khối u E.G7 theo đường dưới da (0,2mL).

Các con vật xử lý riêng rẽ từ ngày 0 và các thông số sau được xác định 3 lần/tuần: thể tích khối u, thời gian tiến triển và khả năng sống sót.

Các kết quả thu được được mô tả như sau:

- Thời gian tiến triển

Thời gian tiến triển là thông số mô tả thời gian mà mỗi con vật có khối u được chủng ngừa đến khi nhìn thấy khối u. Do khối u chuột nhắt không phát triển ở giai đoạn cuối thử nghiệm, nên coi rằng thời gian tiến triển là 60 ngày.

Ảnh hưởng của việc kéo dài thời gian tiến triển là thông số quan trọng đối với vaccin chống ung thư. Như được thể hiện ở Fig.2A, các con vật ở nhóm 3, được chủng ngừa chế phẩm vaccin B đã mô tả trong Ví dụ 1 và là đối tượng của sáng chế, cũng thu được các kết quả quan trọng.

- Khả năng sống sót

Thông số này đánh giá khả năng chủng ngừa để làm tăng thời gian sống sót của động vật đã gây miễn dịch trong khi kích thích bằng các tế bào khối u biểu hiện OVA (E.G7). Thông số này được đo vào các ngày và có tính chất tương đối, vì nó được so sánh với khả năng sống sót của động vật không được điều trị. Để chứng minh sự khác nhau có ý nghĩa thống kê về khả năng sống sót giữa các nhóm, thử nghiệm Log-Rank được sử dụng.

Fig.2B rõ ràng chỉ ra rằng các động vật thuộc nhóm 3, được chủng ngừa bằng chế phẩm vaccin B đã nêu trong ví dụ 1 và là đối tượng của sáng chế là các động vật sống lâu hơn sau khi chủng ngừa khối u.

Ví dụ 3: Hoạt tính phân giải hồng cầu của thể đột biến Sts.

Việc tạo lỗ ở màng hồng cầu gây sốc thẩm thấu keo có khả năng phân giải tế bào. Khả năng tạo lỗ của các porin như vậy có thể được tạo ra bởi hoạt tính phân giải hồng cầu (HA) của nó có thể được xác định bằng thực nghiệm nhờ đo mức độ giảm độ hấp thụ biểu kiến ($\epsilon = 600 \text{ nm}$) của huyền phù hồng cầu do quá trình phân giải tế bào.

Trong thử nghiệm, HA của đime bất hoạt không thuận nghịch StIW111C (StI W111C_{irrev}) được so sánh với HA của đime thuận nghịch StIW111C, trong các điều kiện khử (2-ME 0,1mol/l) và không khử, với nồng độ protein tương đối cao trong thử nghiệm (0,15 $\mu\text{mol/l}$), khi so sánh với HA của StI/StII được Álvarez et al. báo cáo trong Toxicon, 2009, 54(8):1135-47. Thời gian phân giải hồng cầu thể hiện ở Fig.3 cho thấy rằng StIW111C_{irrev} bị bất hoạt trong các điều kiện không khử. Trong các điều kiện khử, StIW111C_{irrev} có hoạt tính kém hơn so với StIW111C khi được khử hoàn toàn hoặc không được khử.

Ví dụ 4: Đánh giá khả năng tạo lỗ của StII đã bất hoạt.

Khả năng suy giảm trong việc tạo lỗ trên màng bởi StII không thuận nghịch đã bất hoạt bằng cách gia nhiệt ở 80°C trong hai giờ được tiến hành bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính phân giải hồng cầu. Fig.4 thể hiện sự mất hoạt tính phân giải hồng cầu đối với StII đã bất hoạt bởi nhiệt khi so sánh với protein có hoạt tính.

Ví dụ 5: Tác dụng của vật truyền vacxin trên quá trình gây đột biến DC.

Quá trình gây đột biến DC gây ra bởi StII được đánh giá trên các tế bào thu được từ tủy xương chuột nhắt C57BL/6 đã phơi nhiễm với StII có hoạt tính (0,1nmol hoặc 2 µg) hoặc đã được bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt (4 µg) với sự có mặt hoặc không có mặt 20 µg polymyxin B (pmxB, tác nhân trung hòa hoạt tính sinh học của nội độc tố bằng cách gắn kết với phân đoạn lipit A của LPS), trong 24 giờ ở 37°C trong khoang chứa 5% CO₂.

Nhóm đối chứng dương tính sử dụng LPS (2 µg) và nhóm đối chứng âm tính là môi trường RPMI chứa 30 pmxB. Các tế bào lấy từ tủy xương chuột nhắt được nuôi cấy trong một lượng lớn tiền chất 600.000 DC trong môi trường RPMI trong 1 giếng bằng cách sử dụng các đĩa nuôi cấy 6 giếng. Huyết thanh bào thai bò (BFS – bovine fetal serum) ở nồng độ 10%, 400 µL GMCSF và môi trường RPMI được bổ sung đến thể tích 3mL trên mỗi giếng.

Fig. 5 thể hiện mức tăng (%) của các chất đánh dấu phân tử (CD80, CD86 và CD40) biểu thị sự hoạt hóa DC do sự phơi nhiễm *in vitro* của các tế bào này với cả các biến thể StII hoạt hóa và bất hoạt bằng nhiệt, kết quả thu được giống so với mức tăng thu được đối với nhóm đối chứng dương tính.

Ví dụ 6. Đánh giá độc tính tế bào và đáp ứng CTL của vật truyền vacxin bằng cách sử dụng các biến thể St và OVA làm kháng nguyên protein.

Các biến thể dime StI có hoạt tính tạo lỗ thuận nghịch (StIW111C) hoặc không thuận nghịch (StIW111C_{irrev}) ở mức thấp và biến thể bất hoạt StII bằng nhiệt có thể được đồng bao nang với OVA vào liposom chứa DPPC:Cho (1:1),

theo tỷ lệ 10 μmol lipid toàn phần:1,1nmol OVA:0,3nmol StIW111C, StIW111C_{irrev} hoặc StII được bất hoạt bằng nhiệt, trong PBS có độ pH = 7,4 và khả năng tạo ra hoạt tính gây độc tế bào đặc hiệu OVA của các chế phẩm vaccin này *in vivo* được đánh giá. Trong các thử nghiệm này, về cơ bản các chế phẩm vaccin tương tự được sử dụng như các chế phẩm được nêu trong Ví dụ 1, trong trường hợp chế phẩm B, các biến thể St khác nhau được sử dụng.

Chế phẩm vaccin A: liposom DRV chứa DPPC:Cho (60pmol lipid toàn phần) được đồng bao nang với 6,6nmol OVA.

Chế phẩm vaccin B: liposom DRV chứa DPPC:Cho (60 μmol lipid toàn phần) được đồng bao nang với 6,6nmol OVA và 1,875nmol St (StIW111C, StIW111C_{irrev}, St II hoặc StII âm tính được bất hoạt bằng nhiệt)

Trong thử nghiệm đầu tiên, 12 con chuột nhắt cái C57BL/6 được chọn có thể trọng khoảng 18-20g, và được chia thành 4 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 3 con vật.

Nhóm 1 (nhóm đối chứng âm tính) được cho chủng ngừa 0,2mL PBS theo đường dưới da, vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 2 (nhóm đối chứng dương tính) được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 μg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 μg StII âm tính) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 3 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 μg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 μg StIW111C) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 4 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vaccin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 μg OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 μg StIW111C_{irrev}) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Fig.6A minh họa các động vật được gây miễn dịch bằng liposom chứa các biến thể St có hoạt tính tạo lỗ thấp (LP/OVA+StIW111C hoặc LP/OVA+StIW111C_{irrev}) có đáp ứng gây độc tế bào tương đương về mặt thống kê so với đáp ứng thu được bởi StII khi đồng bao nang với OVA vào liposom (LP/OVA+StII).

Trong thử nghiệm khác, 9 con chuột nhắt cái C57BL/6 có thể trọng 18-20g được chọn và được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 3 con vật.

Nhóm 1 (nhóm đối chứng âm tính) được cho chủng ngừa 0,2mL nước muối đệm phosphat (PBS) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 2 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vacxin A (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 μ g OVA) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Nhóm 3 được cho chủng ngừa 0,2mL chế phẩm vacxin B (tương đương với 1,1nmol hoặc 50 μ g OVA và 0,3nmol hoặc 6,25 μ g StII bất hoạt) theo đường dưới da vào các ngày 0 và 12.

Fig.6B minh họa khả năng gây miễn dịch với liposom đồng bao nang OVA, biến thể StII được bất hoạt hoàn toàn bằng nhiệt gây ra hoạt tính gây độc tế bào đặc hiệu OVA cao hơn đáng kể so với hoạt tính gây ra bởi liposom chỉ chứa kháng nguyên và tương tự với hoạt tính quan sát được ở chế phẩm liposom chứa StI/StII âm tính.

Các kết quả thử nghiệm đã chứng minh rằng vacxin liposom theo sáng chế có thể được đồng bao nang kháng nguyên với biến thể sticholysin bất kỳ, ngay cả với biến thể không biểu hiện hoạt tính tạo lỗ, để tạo ra đáp ứng CTL mạnh, có hiệu lực đặc hiệu với kháng nguyên chức năng, thậm chí là mạnh hơn đáp ứng gây ra bởi nhóm đối chứng dương tính kinh điển (PIC) đã sử dụng trong thử nghiệm CTL *in vivo*. Chế phẩm liposom-St trên mô hình phòng ngừa làm tăng đáng kể thời gian cấy ghép khối u và làm tăng đáng kể khả năng sống sót ở các nhóm được đánh giá chỉ được nhận PBS. Tóm lại, việc chủng ngừa liposom-St thu được kết quả tốt hơn so với các túi liposom chỉ chứa kháng nguyên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vật truyền vaccin để gây đáp ứng miễn dịch tế bào được đồng bao nang vào liposom chứa đipalmitoylphosphatidylcholin và cholesterol với tỷ lệ đẳng mol giữa các protein thu được từ loài *Stichodactyla helianthus* được chọn từ nhóm bao gồm Sticholysin I (StI), Sticholysin II (StII), thể đột biến Sticholysin I W111C (StIW111C), dime bất hoạt không thuận nghịch StIW111C (StIW111C_{irrev}) StII bất hoạt bằng nhiệt và kháng nguyên.
2. Vật truyền vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên là protein hoặc polypeptit gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào lympho T gây độc tế bào đặc hiệu với bệnh ung thư.
3. Chế phẩm vaccin chứa vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-2, trong đó chế phẩm này không chứa các chất bổ trợ miễn dịch.

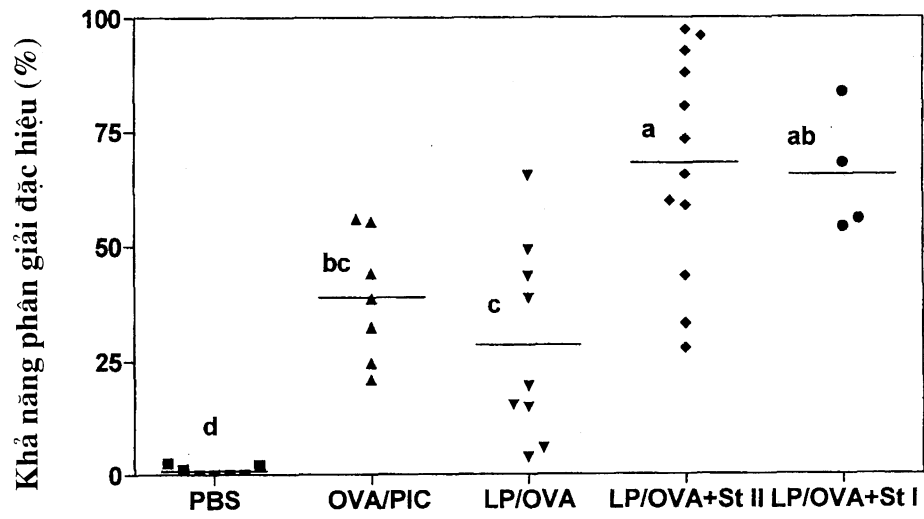


Fig.1

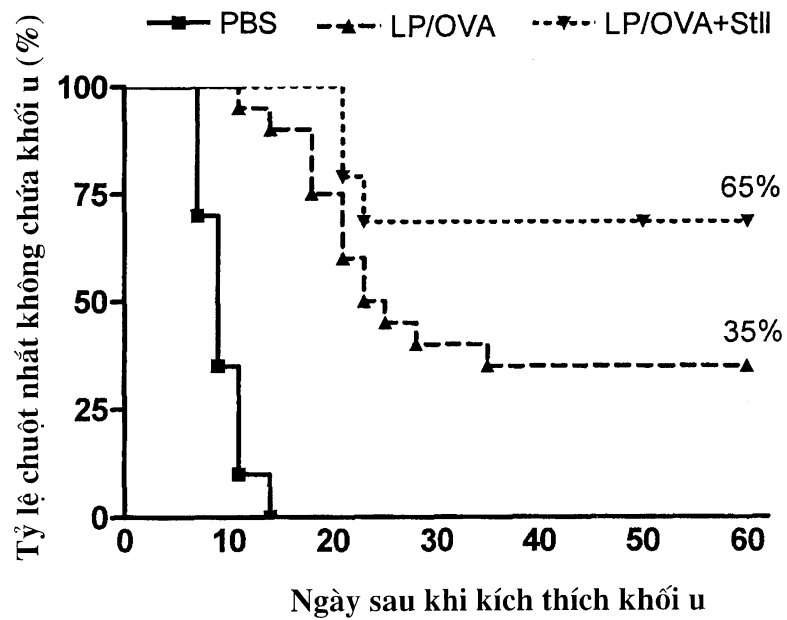


Fig.2A

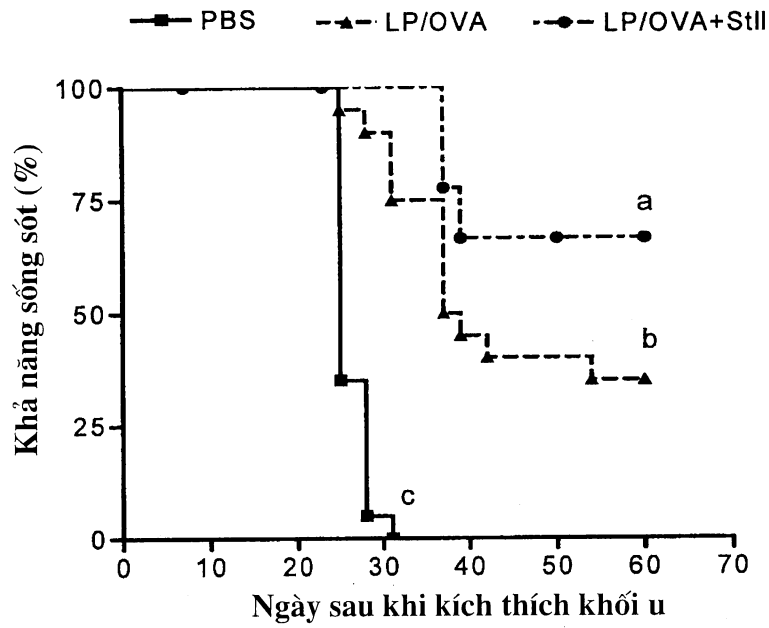


Fig.2B

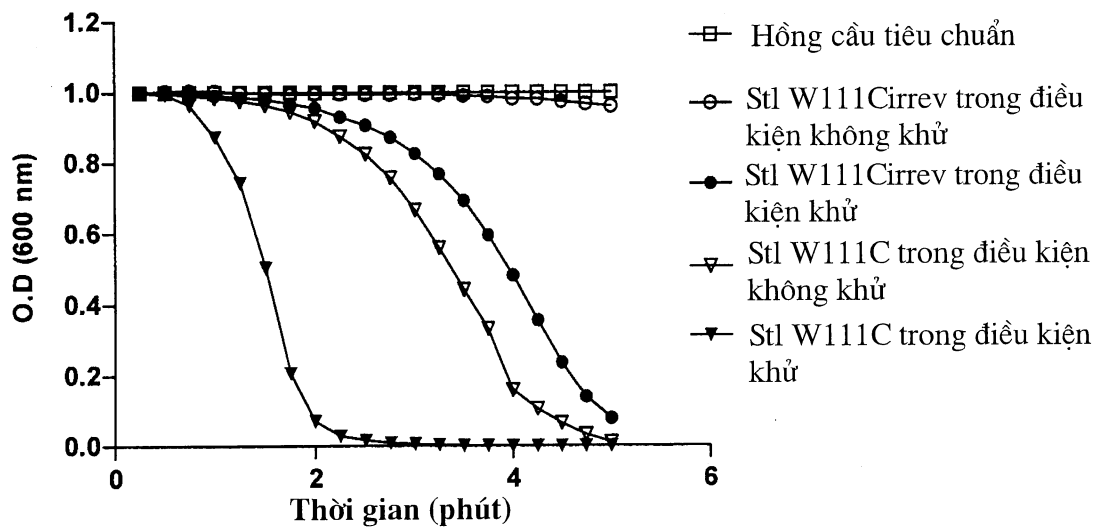


Fig.3

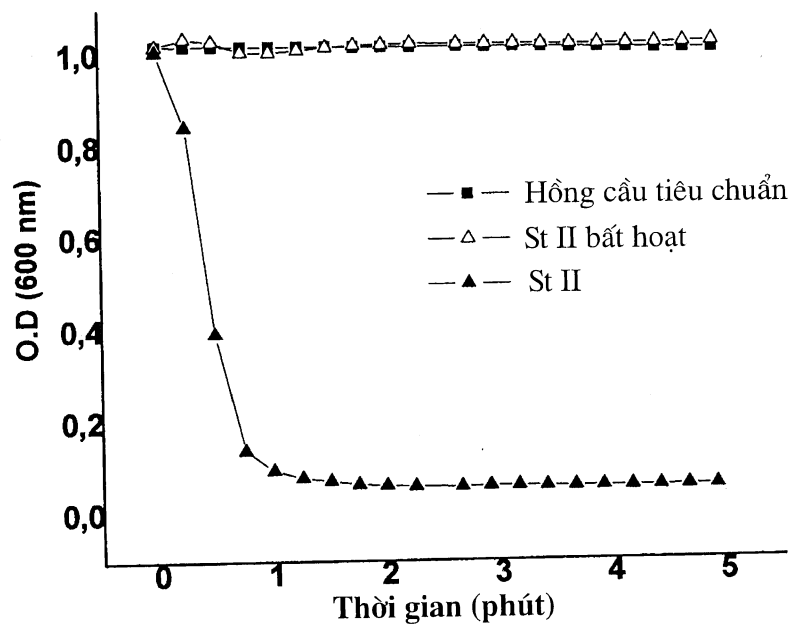


Fig.4

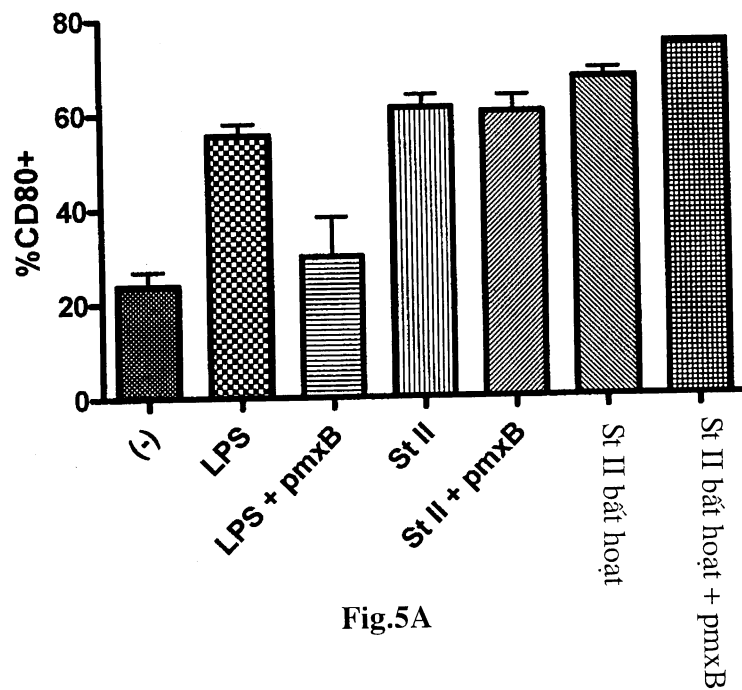


Fig.5A

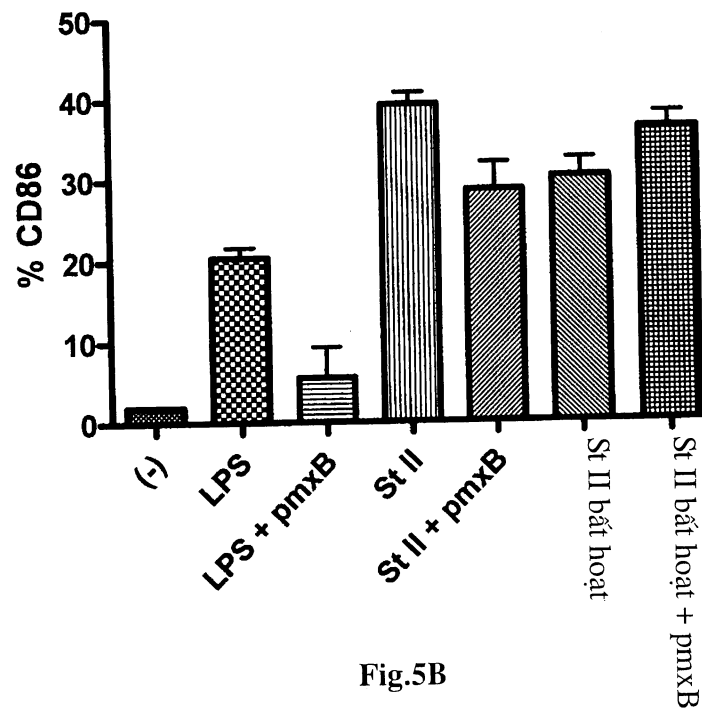


Fig.5B

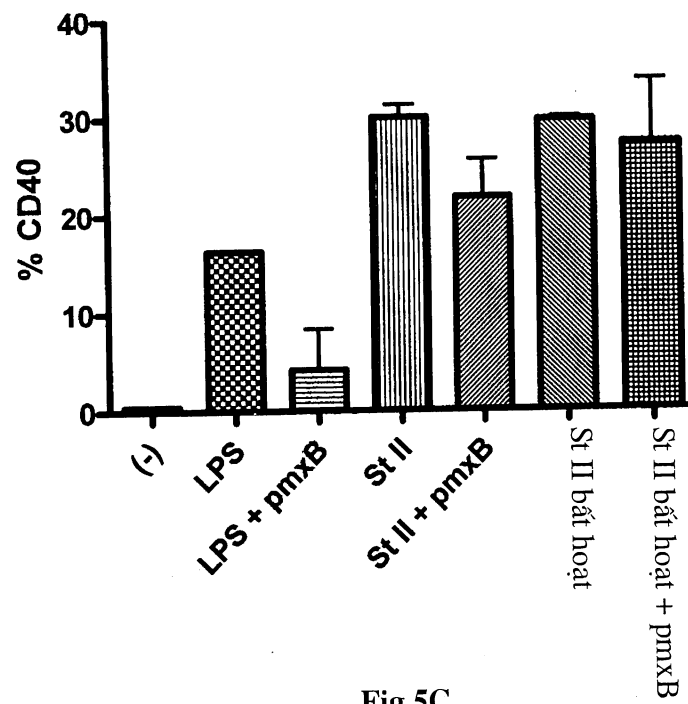


Fig.5C

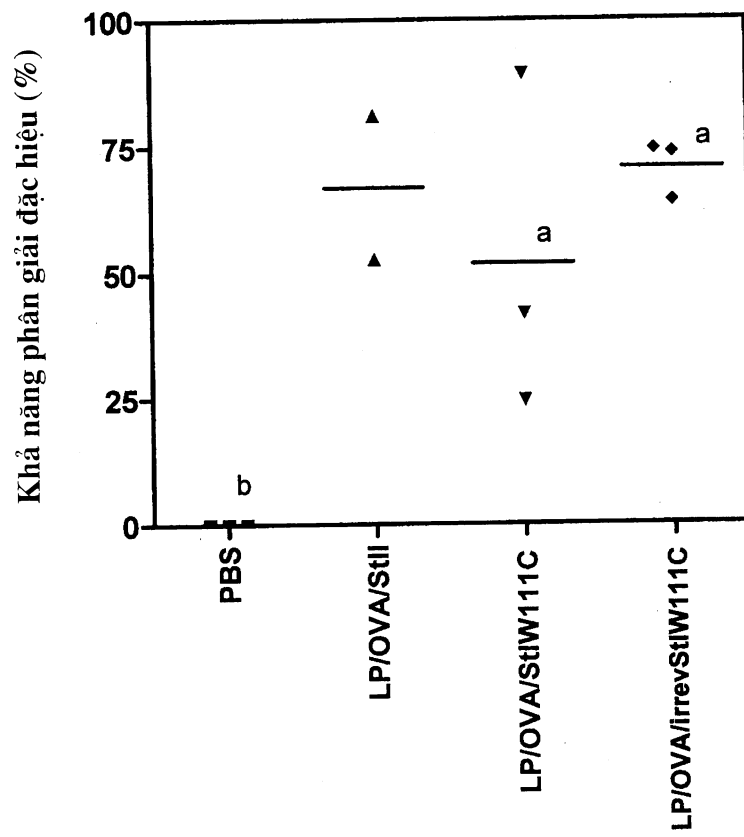


Fig.6A

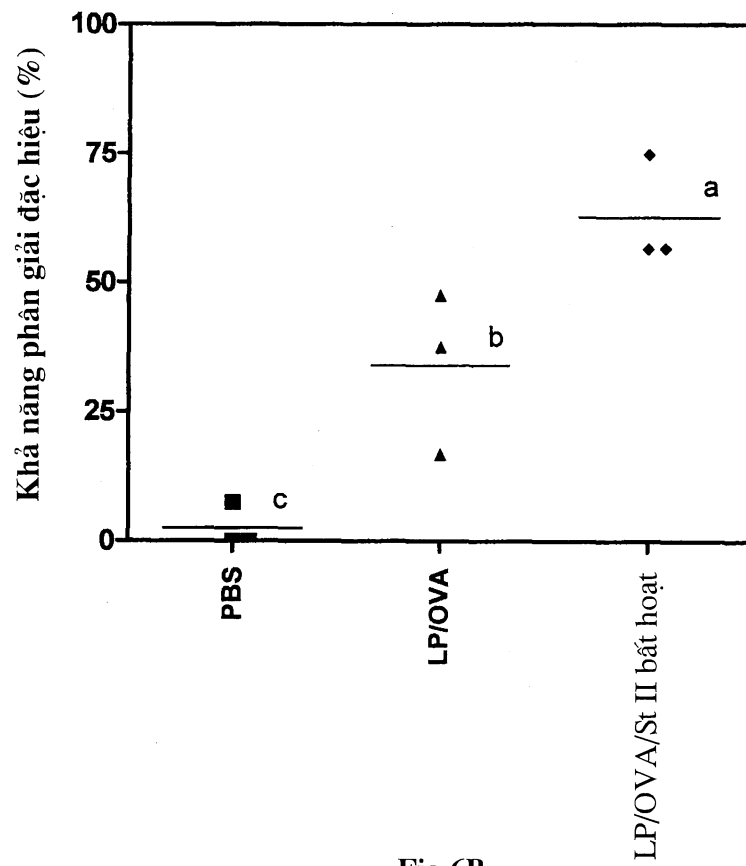


Fig.6B