



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

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

(11)



1-0035672

(51)⁷ A61K 39/12; A61P 31/20; C12R 1/245; (13) B
C07K 14/025; C12N 1/20; C12N 15/09;
A61P 15/00; A61P 35/00

(21) 1-2017-03314

(22) 28/01/2016

(86) PCT/JP2016/052481 28/01/2016

(87) WO 2016/121865 A1 04/08/2016

(30) 2015-017407 30/01/2015 JP

(45) 25/05/2023 422

(43) 27/11/2017 356A

(73) 1. The University of Tokyo (JP)

3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

2. JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES (JP)

3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

(72) KAWANA, Kei (JP); IGIMI, Shizunobu (JP).

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

(54) CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN AXIT LACTIC, DƯỢC PHẨM DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ NHIỄM HPV VÀ/HOẶC CÁC U LIÊN ĐỐI HPV, VÀ THUỐC KÍCH ỨNG MIỄN DỊCH NIÊM MẠC

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) trên bề mặt của nó, trong đó polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,03μg đến 1,0μg trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic; dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic; và thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic trong đó vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) trên bề mặt của nó, được phẩm điều trị dùng qua đường miệng dùng cho ít nhất một trong số các bệnh: bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, và thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus gây u nhú ở người (HPV) là các virus ADN. Cho đến nay, 100 hoặc nhiều loại virus HPV hơn đã được báo cáo. Các virus HPV truyền nhiễm qua da (ví dụ, HPV1 và HPV2) và bề mặt niêm mạc (ví dụ, HPV6 và HPV11) mà qua đó hình thành các khối u lành tính (mụn cóc) tồn tại từ vài tháng đến vài năm.

Ngoài ra, 15 loại virus HPV (ví dụ, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV52, và HPV58) truyền nhiễm qua niêm mạc trong một khoảng thời gian dài để qua đó gây ra các khối u ác tính. Do đó, chúng được gọi là các virus HPV nguy cơ cao.

Hầu như 100% các bệnh ung thư cổ tử cung, mà có nguy cơ mắc cao thứ hai bên cạnh các bệnh ung thư vú trong số các bệnh ung thư điển hình ở phụ nữ, được phát triển bằng cách truyền nhiễm các virus HPV trong các cơ quan sinh sản trong một khoảng thời gian dài. Có báo cáo rằng 530000 người trên thế giới và 15000 người ở Nhật Bản mới phát triển bệnh ung thư cổ tử cung mỗi năm.

Số người tử vong hàng năm do bệnh ung thư cổ tử cung lên đến 270000 trên thế giới và 3500 ở Nhật Bản.

Về mặt lý thuyết, nếu sự truyền nhiễm virus HPV được ngăn chặn hoàn toàn, thì bệnh ung thư cổ tử cung có thể được loại trừ triệt để.

Sự truyền nhiễm virus HPV đã được tiết lộ là có liên quan đến bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư hậu môn, bệnh ung thư miệng, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư họng, và bệnh sùi mào gà (bệnh mào gà), ngoài bệnh ung thư cổ tử cung. Do đó, các vắc xin phòng ngừa chống lại sự truyền nhiễm virus HPV được cho là có hiệu quả phòng ngừa các bệnh ung thư và các bệnh truyền nhiễm qua đường tình dục nêu trên. Tuy nhiên, vắc xin phòng ngừa virus HPV hiện tại chỉ có thể phòng ngừa duy nhất hai loại virus HPV nguy cơ cao.

Trong số các virus HPV, HPV16 và HPV18 chiếm khoảng 65% nguyên nhân gây ra bệnh ung thư cổ tử cung ở phụ nữ Nhật Bản, đặc biệt là khoảng 90% ở độ tuổi hai mươi.

Virus HPV16 và virus HPV18 cũng được biết đến là chiếm ít hơn 50% nguyên nhân gây ra tổn thương cấp độ cao của u nội biểu mô âm hộ mà là sự tiền phát triển của bệnh ung thư âm hộ, và liên đới với 85% sự phát triển của u nội biểu mô âm đạo mà phát triển thành bệnh ung thư âm đạo.

Các u nội biểu mô cổ tử cung (CIN), mà là sự tổn thương tiền ung thư cổ tử cung gây ra do sự truyền nhiễm virus HPV, xảy ra trên biểu mô niêm mạc của phần âm đạo (phần nửa dưới hoặc phần mở rộng vào trong âm đạo của cổ tử cung). Các bệnh truyền nhiễm HPV là các bệnh truyền nhiễm do virus trong đó các virus HPV xâm nhập vào tế bào gốc của biểu mô niêm mạc (biểu mô vảy xếp lớp) do sự tổn thương nhẹ gây ra bởi các hoạt động tình dục và tăng lên nhanh chóng trong biểu mô niêm mạc. Khi các virus HPV liên tục tăng lên nhanh chóng trong biểu mô trong một khoảng thời gian dài, thì các tế bào biểu mô là bất diệt và gây ung thư. Điều này được cho là nguồn gốc của bệnh ung thư cổ tử cung.

Trong quá trình phát triển của bệnh ung thư cổ tử cung, những sự thay đổi sau đây sẽ xảy ra: khi virus HPV liên tục lây lan đến các tế bào gốc, một số gen virus của các virus HPV được chèn vào các gen của các tế bào biểu mô, và các protein E6 và các protein E7 có biểu hiện gia tăng liên tục.

Các protein E6 và các protein E7 có biểu hiện rất thấp trong CIN1 (chứng loạn sản nhẹ), mà là đặc tính truyền nhiễm, nhưng có biểu hiện cao trong CIN2 (chứng loạn sản trung bình) và CIN3 (chứng loạn sản nặng), mà gây ung thư. Do đó, tin rằng sẽ xảy ra tại giai đoạn CIN2 hoặc sau khi các protein E6 và các protein E7 liên tục gia tăng biểu hiện như được mô tả ở trên.

Các protein E6 và các protein E7, đặc biệt là các protein E7, của các virus HPV được coi là mục tiêu phù hợp để phát triển vắc xin điều trị chống lại các bệnh ung thư liên đới HPV. Điều này là do các protein E7 có tính kháng nguyên cao ở người.

Mặc dù đã từng phát triển một số vắc xin điều trị dùng làm kháng nguyên E7 protein của các virus HPV (ví dụ, xem tài liệu phi sáng chế 1 và tài liệu sáng chế 1), nhưng chưa chứng minh rằng để loại bỏ các tổn thương tiền ung thư (CIN) và các tế bào ung thư trong cổ tử cung của bệnh nhân. Do đó, có một nhu cầu cấp thiết để phát triển các vắc xin mà được chứng minh rằng có hiệu quả điều trị.

Các tác giả tìm ra rằng phản ứng gây miễn dịch tế bào đặc hiệu E7 có thể được khơi ra không chỉ trong lá lách mà còn trong niêm mạc ở chuột thông qua việc uống vắc xin (LacE7) mà được tạo ra bằng cách biểu hiện các protein E7 đột biến (SEQ ID NO. 2) trong *Lactobacillus casei*, sau đó đưa đi xử lý nhiệt để tiêu diệt và làm khô thành bột (xem tài liệu phi sáng chế 2). Các protein E7 đột biến là các protein mà trong đó Asp tại vị trí 21, Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26 liên quan đến việc liên kết với các protein Rb được thế bởi Gly trong các protein E7 của HPV16.

Các tác giả cũng đã tiến hành nghiên cứu về sự kết hợp giữa các polypeptit E7 của virus HPV và các chế phẩm Kampo có hoạt động tái tạo làm được phẩm dùng qua đường miệng để điều trị cho các bệnh truyền nhiễm HPV (xem tài liệu sáng chế 2).

Dựa vào nghiên cứu trước đây của các tác giả, vắc xin điều trị mà có hiệu quả điều trị đang được phát triển.

Tuy nhiên, vắc xin điều trị chỉ có thể thoái bộ từ CIN3 (chứng loạn sản nặng) đến CIN2 (chứng loạn sản trung bình) trong các giai đoạn dẫn đến sự phát triển bệnh ung thư cổ tử cung, và vắc xin điều trị khó có thể đạt được trạng thái bình thường. Để cải thiện hơn nữa hiệu quả điều trị ở những bệnh nhân đang trải qua ít nhất một trong số các giai đoạn u nội biểu mô cổ tử cung và giai đoạn tiền ung thư cổ tử cung để bình thường hóa bệnh ung thư, thì có một nhu cầu cấp thiết là nhanh chóng cung cấp được phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV có khả năng tạo miễn dịch niêm mạc tốt hơn.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (JP-A) số 2012-514469

Tài liệu sáng chế 2: Công bố quốc tế số 2013/191225

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: H. Poo et al., Int J. Cancer, 2006, vol. 119, pp. 1702 - 1709

Tài liệu phi sáng chế 2: K. Adachi et al., Vaccine, 2010, vol. 28, pp. 2810 – 2817

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên và đạt được mục đích sau đây. Mục đích của sáng chế nhằm đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic mà có khả năng tạo miễn dịch niêm mạc tốt hơn, và được phẩm dùng qua đường miệng dùng cho ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, và thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic.

Phương án giải quyết vấn đề

Các phương án để giải quyết vấn đề nêu trên bao gồm các khía cạnh dưới

đây:

1. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm:

vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) trên bề mặt của nó,

trong đó polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,03µg đến 1,0µg trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic.

2. Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV, dược phẩm này bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục 1.

3. Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục 1.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, có thể giải quyết các vấn đề nêu trên và đạt được mục đích của sáng chế. Đó là, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic mà có khả năng tạo miễn dịch niêm mạc tốt hơn, và dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, và thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc mà bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1A là sơ đồ pQE31::cA=E7Rb trong ví dụ sản xuất 1.

Fig.1B là đồ thị 1 minh họa kết quả của phép phân tích FACS trong ví dụ sản xuất 1.

Fig.1C là đồ thị 2 minh họa kết quả của phép phân tích FACS trong ví dụ sản xuất 1.

Fig.1D là hình ảnh minh họa một kết quả điển hình của sự thâm Western cho nhiều protein khác nhau.

Fig.2A là sơ đồ pIGM2::E7Rb=prtP neo trong ví dụ sản xuất 2.

Fig.2B là đồ thị minh họa kết quả của phép phân tích FACS trong ví dụ

sản xuất 2.

Fig.3A là đồ thị minh họa kết quả của phép phân tích FACS (điều kiện của phép đo: 525 vôn) ví dụ thử nghiệm 1.

Fig.3B là đồ thị minh họa kết quả của phép phân tích FACS (điều kiện của phép đo: 600 vôn) ví dụ thử nghiệm 1.

Fig.4 là đồ thị minh họa kết quả của bài kiểm tra ELISPOT của ví dụ thử nghiệm 2.

Fig.5 là đồ thị minh họa kết quả của bài kiểm tra ELISPOT của ví dụ thử nghiệm 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic của sáng chế bao gồm ít nhất là vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) trên bề mặt của nó, và, nếu cần thiết, còn bao gồm các thành phần khác nữa.

Vi khuẩn axit lactic

Vi khuẩn axit lactic không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng được ưu tiên là vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactobacillus*, được ưu tiên hơn là *Lactobacillus casei* vì được khẳng định là tạo ra tế bào hỗ trợ T (Th1) loại 1. Vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic có thể bao gồm vi khuẩn axit lactic không có polypeptit có nguồn gốc protein của virus HP7 trên bề mặt của nó. Tuy nhiên, vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein của virus HP7 trên bề mặt của nó được ưu tiên có lượng nằm trong khoảng 80% hoặc lớn hơn, khoảng ưu tiên hơn là 90% hoặc lớn hơn, khoảng đặc biệt ưu tiên là 95% hoặc lớn hơn.

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV không bị giới hạn cụ

thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, miễn là có tính kháng nguyên. Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Loại virus HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng được ưu tiên là HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73, HPV82, HPV26, HPV53, và HPV63, mà thuộc nhóm có nguy cơ cao mắc bệnh ung thư, được ưu tiên hơn là HPV16 và HPV18, được đặc biệt ưu tiên là HPV16. Protein E7 của virus HPV16 là kháng nguyên ung thư biểu hiện chủ yếu trong bệnh ung thư cổ tử cung và các bệnh ung thư liên đới HPV (ví dụ, bệnh ung thư hậu môn, bệnh ung thư họng, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư âm hộ, và bệnh ung thư âm đạo).

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV có thể là protein E7 của virus HPV có chiều dài đầy đủ hoặc protein E7 của virus HPV mà trong đó một hoặc một vài axit amin được loại bỏ, được thay thế, hoặc được bổ sung.

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV có thể có nguồn gốc từ protein E7 kiểu dại hoặc từ protein E7 đột biến.

Trong số polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV, được ưu tiên là protein E7 đột biến trong đó dư lượng axit amin liên quan đến việc liên kết với protein Rb của protein E7 (ví dụ, Asp tại vị trí 21, Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26 của protein E7 kiểu dại của virus HPV16 (SEQ ID No. 1)) được thay thế bởi dư lượng axit amin khác. Được ưu tiên hơn là protein E7 đột biến (SEQ ID No. 2) trong đó Asp tại vị trí 21, Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26 của protein E7 kiểu dại của virus HPV16 (SEQ ID No. 1) tất cả được thế bởi Gly.

Hàm lượng

Lượng polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trên bề mặt của vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, miễn là nằm trong khoảng từ 0,03 μ g đến 1,0 μ g trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic. Tuy nhiên, lượng được ưu tiên nằm trong khoảng từ

0,03 μ g đến 0,3 μ g, khoảng ưu tiên hơn là 0,06 μ g đến 0,3 μ g, khoảng đặc biệt ưu tiên là 0,09 μ g đến 0,3 μ g. Khi lượng nằm trong khoảng ưu tiên nêu trên, thì đó là một ưu điểm mà trong đó hiệu quả điều trị tốt hơn (khả năng miễn dịch niêm mạc) có thể đạt được.

Phương pháp đo lượng polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trên bề mặt của vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của phương pháp như vậy bao gồm phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS) bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu cho virus protein E7 của virus HPV.

Phương pháp FACS có thể đo lượng polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trên bề mặt của vi khuẩn trong mẫu bao gồm một lượng chưa xác định của polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV bằng cách đo tương tự như đối với mẫu bao gồm một lượng xác định của polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV.

Khía cạnh

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV có thể được liên kết trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic (sau đây được gọi là “vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7”) hoặc được biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic (sau đây được gọi là “vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7”). Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 và vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 có thể cùng tồn tại với nhau.

Vi khuẩn axit lactic có thể là vi khuẩn sống hoặc vi khuẩn đã chết.

Phương pháp tiêu diệt vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm phương pháp trong đó vi khuẩn được gia nhiệt trong nồi hấp ở 80°C trong 5 phút.

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 có thể được sản xuất bằng cách liên kết polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV, mà được sản

xuất bởi phương pháp tái tổ hợp gen bằng cách sử dụng vi khuẩn biến đổi hoặc phương pháp tổng hợp hóa học, vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được ưu tiên sản xuất bởi phương pháp tái tổ hợp gen bằng cách sử dụng vi khuẩn biến đổi theo quan điểm tiết kiệm chi phí, chẳng hạn.

Vi khuẩn được sử dụng làm vật chủ trong phương pháp tái tổ hợp gen không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm men, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, và vi khuẩn axit lactic.

Vật truyền biểu hiện phù hợp để biểu hiện trong polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trong vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm pQE31.

Phương pháp biến đổi vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp từ các phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước đây.

Polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được sản xuất bởi vi khuẩn biến đổi có thể được lọc bằng cách lựa chọn một cách thích hợp từ các phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước đây.

Phương pháp liên kết polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp từ các phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước đây như liên kết cộng hóa trị và liên kết điện. Tuy nhiên, được ưu tiên là phương pháp trong đó polypeptit được liên kết điện vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic qua protein neo.

Protein neo không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm protein liên kết thành tế bào cA có nguồn gốc từ AcmA là peptidoglycan hydrolaza của *Lactococcus lactis*.

Khi polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được liên kết vào vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic qua protein neo, polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được ưu tiên hợp nhất với protein neo để tạo thành protein hợp nhất.

Thứ tự của protein neo và polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trong protein hợp nhất không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Tuy nhiên, protein neo và polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được ưu tiên hợp nhất theo thứ tự này. Các ví dụ điển hình của nó bao gồm trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO. 3.

Phương pháp liên kết điện (sau đây được gọi là “sự cố định”) không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm phương pháp trong đó dung dịch bao gồm polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được bổ sung vào và được trộn với vi khuẩn axit lactic.

Thời gian trộn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, ví dụ khoảng 1 giờ.

Trong phương pháp liên kết điện, sự xử lý sơ bộ có thể được thực hiện.

Sự xử lý sơ bộ không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, ví dụ như xử lý nhiệt. Vi khuẩn axit lactic được tiêu diệt bởi sự xử lý nhiệt.

Điều kiện xử lý nhiệt không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, ví dụ gồm có gia nhiệt ở 100°C trong 30 phút.

Sự xử lý nhiệt có thể được thực hiện trên vi khuẩn axit lactic được tạo huyền phù trong axit tricloaxetic (TCA) hoặc vi khuẩn axit lactic được tạo huyền phù trong PBS.

Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic mà được biến đổi với vật truyền biểu hiện

chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV.

Vật truyền biểu hiện không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, ví dụ như pIGM2. pIGM2 chứa tín hiệu bài tiết của dòng gen dưới *Lactobacillus brevis* ATCC1559 prtP của trình tự gen khởi động của protein *Lactobacillus brevis* ATCC1559 lớp S và còn chứa gen neo có nguồn gốc từ dòng dưới *Lactobacillus casei* (trình tự proteinaza của *L. casei*) của nó.

Ví dụ khác về vật truyền biểu hiện bao gồm vật truyền chứa gen repE đột biến, chất hoạt hóa aldolaza có nguồn gốc từ vi khuẩn axit lactic (Pald), và gen phức hợp tổng hợp axit polyglutamic được lựa chọn từ nhóm bao gồm pgsB, pgsC, và gsA (xem JP-A Nos. 2012-514468 và 2012-514469).

Phương pháp biến đổi không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp từ các phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước đây.

Trong trường hợp của vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7, axit nucleic mã hóa cho polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được ưu tiên kết nối với gen neo.

Gen neo không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng được ưu tiên là gen neo có nguồn gốc từ *Lactobacillus casei* (trình tự proteinaza của *L. casei*).

Thứ tự của axit nucleic mã hóa cho polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV và gen neo không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Tuy nhiên, axit nucleic mã hóa cho polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV và gen neo được ưu tiên kết nối theo thứ tự này. Các ví dụ của nó bao gồm trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO. 4.

Vi khuẩn axit lactic sử dụng cho vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng được ưu tiên là *Lactobacillus casei* IGM393 hoặc *Lactobacillus casei* IGM394. *Lactobacillus casei* IGM394 là chủng cấy có

nguồn gốc từ *Lactobacillus casei* IGM393 và là chủng đột biến có hiệu quả chuyển đổi cao. *Lactobacillus casei* IGM393 và *Lactobacillus casei* IGM394 có tính đồng nhất cao nhất với trình tự chuỗi gen tổng của *Lactobacillus casei* BL23.

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp từ các phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước đây.

Phương pháp cải biến lượng biểu hiện của polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trên bề mặt của vi khuẩn trong vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm phương pháp trong đó dung dịch nuôi cấy được điều chỉnh độ pH.

Như được mô tả trong ví dụ sản xuất 2 bên dưới, lượng biểu hiện của polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV trên bề mặt của vi khuẩn có thể được cải biến bằng cách sử dụng môi trường mà nồng độ natri hydro cacbonat được thay đổi và do đó độ pH được điều chỉnh.

Độ pH của dung dịch nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng độ pH được ưu tiên bằng 7.

Khi polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV là protein hợp nhất với protein neo, lượng protein hợp nhất trên bề mặt của vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, nhưng khoảng ưu tiên là từ 0,1µg đến 3,3µg, khoảng ưu tiên hơn là từ 0,1µg đến 1,0µg, khoảng ưu tiên hơn nữa là từ 0,2µg đến 1,0µg, khoảng đặc biệt ưu tiên là từ 0,3µg đến 1,0µg trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic. Khi hàm lượng nằm trong khoảng ưu tiên nêu trên, đó là một ưu điểm mà trong đó hiệu quả điều trị tốt hơn (khả năng miễn dịch niêm mạc) có thể đạt được.

Các thành phần khác nữa

Các thành phần khác nữa trong chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic không

bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, miễn là chúng không gây ảnh hưởng đến hiệu quả của sáng chế, ví dụ như chất mang được chấp nhận về mặt dược lý. Chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Lượng thành phần khác trong chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV của sáng chế bao gồm ít nhất là chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, và, nếu cần thiết, còn bao gồm các thành phần khác nữa.

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic là chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic của sáng chế được mô tả ở trên.

Lượng chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic được chứa trong dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Các thành phần khác nữa

Các thành phần khác nữa trong dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm chế phẩm Kampo có hoạt động tái tạo (hiệu quả tăng cường miễn dịch), chất điều chỉnh niêm mạc, và chất mang được chấp nhận về mặt dược lý. Chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Chế phẩm Kampo có hoạt động tái tạo (hiệu quả tăng cường miễn dịch)

Chế phẩm Kampo có hoạt động tái tạo (hiệu quả tăng cường miễn dịch)

không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm Kakkonto, Juzentaihoto, Hochuekkito, Shosaikoto, và Shoseiryuto. Chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Chất điều chỉnh niêm mạc

Chất điều chỉnh niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Ví dụ ưu tiên của nó bao gồm những chất tăng cường dịch miễn dịch và miễn dịch tế bào trung gian đặc hiệu cho vắc xin dùng qua đường miệng như polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV bằng cách kết hợp với chế phẩm Kampo có hoạt động tái tạo (hiệu quả tăng cường miễn dịch).

Ví dụ về chất điều chỉnh niêm mạc bao gồm chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn, ceramit tổng hợp (α GalCer), oligonucleotit CpG, SP-C (SURFACTEN), SP-B, IFN- α (kiểu đại hoặc đột biến), ARN sợi kép, và chất đột biến TNF được tăng cường hoạt tính. Chúng có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp.

Chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm polypeptit có nguồn gốc độc tố cholera (CT), polypeptit có nguồn gốc độc tố enterotoxin của E. coli không chịu nhiệt (LT), polypeptit có nguồn gốc độc tố verotoxin (VT), polypeptit có nguồn gốc độc tố bệnh đậu mùa (DT), và polypeptit có nguồn gốc độc tố ho gà (PT).

Chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn có thể là chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn kiểu đại hoặc chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn đột biến. Tuy nhiên, được ưu tiên là chất điều chỉnh có nguồn gốc độc tố vi khuẩn đột biến trong đó sự đột biến được đưa ra trước để không gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng trong trường hợp con người uống vào.

Chất mang được chấp nhận về mặt dược lý

Chất mang được chấp nhận về mặt dược lý không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp từ các chất mang đã biết trong kỹ thuật

phụ thuộc vào dạng bào chế.

Lượng thành phần khác nữa trong dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Sử dụng

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các dược phẩm bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính. Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV cũng có thể được sử dụng trong tình trạng trong đó nó được kết hợp trong dược phẩm bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính.

Dạng bào chế

Dạng bào chế của dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, miễn là uống được. Các ví dụ của nó bao gồm chế phẩm dùng qua đường miệng dạng rắn (ví dụ, dạng viên nén, dạng viên nén được phủ, dạng hạt, dạng bột, và dạng viên nang) và dung dịch dùng qua đường miệng (ví dụ, dạng lỏng, dạng sirô, và dạng cồn ngọt). Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV các dạng bào chế bất kỳ được mô tả ở trên có thể được sản xuất theo các phương pháp thông thường.

Kiểm soát

Lượng kiểm soát, thời gian kiểm soát, và đối tượng kiểm soát của dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Lượng kiểm soát không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một

cách phù hợp khi xem xét nhiều yếu tố khác nhau như độ tuổi, trọng lượng, thể trạng, và các triệu chứng của đối tượng kiểm soát, và các dược phẩm hoặc thuốc có hoặc không bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính được kiểm soát.

Ví dụ phù hợp về đối tượng kiểm soát bao gồm con người.

U liên đới HPV không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Các ví dụ của nó bao gồm bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư hậu môn, bệnh ung thư miệng, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư họng, và các tổn thương tiền ung thư của chúng.

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV là có sẵn để điều trị ít nhất một trong số bệnh u nội biểu mô cổ tử cung và giai đoạn tiền ung thư cổ tử cung.

Giai đoạn tiền ung thư cổ tử cung bao gồm ung thư biểu mô vi xâm nhập.

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV là phù hợp để sử dụng làm vắc xin điều trị bệnh truyền nhiễm HPV bằng cách kiểm soát bệnh nhân đang trải qua bệnh truyền nhiễm HPV.

Phương pháp điều trị ít nhất một trong số bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV

Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV có thể điều trị ít nhất một trong số bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV trong một cá thể bằng các kiểm soát cá thể đó. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị ít nhất một trong số bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV, phương pháp bao gồm việc sử dụng dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV cho cá thể.

Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc

Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc của sáng chế bao gồm ít nhất là chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, và, nếu cần thiết, còn bao gồm các thành phần khác nữa.

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic là chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic được mô tả ở trên của sáng chế.

Lượng chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic được chứa trong thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Các thành phần khác nữa

Các thành phần khác nữa trong thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích. Ví dụ, chúng có thể tương tự như được mô tả trong phần tiêu đề “các thành phần khác nữa” cho được phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV.

Lượng thành phần khác nữa được chứa trong thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Sử dụng

Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các dược phẩm bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính. Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc cũng có thể được sử dụng ở trạng thái trong đó nó được kết hợp trong dược phẩm bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính.

Dạng bào chế

Dạng bào chế của thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích, miễn là uống được. Các ví dụ của nó bao gồm chế phẩm dùng qua đường miệng dạng rắn (ví dụ, dạng viên nén, dạng viên nén được phủ, dạng hạt, dạng bột, và dạng

viên nang) và dung dịch dùng qua đường miệng (ví dụ, dạng lỏng, dạng sirô, và dạng cốm ngọt). Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc các dạng bào chế bất kỳ được mô tả ở trên có thể được sản xuất theo các phương pháp thông thường.

Kiểm soát

Lượng kiểm soát, thời gian kiểm soát, và đối tượng kiểm soát của thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp phụ thuộc vào mục đích.

Lượng kiểm soát không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn một cách phù hợp khi xem xét nhiều yếu tố khác nhau như độ tuổi, trọng lượng, thể trạng, và các triệu chứng của đối tượng kiểm soát, và có hay không có các dược phẩm hoặc thuốc bao gồm các thành phần khác nữa làm các thành phần hoạt tính được kiểm soát.

Ví dụ phù hợp về đối tượng kiểm soát bao gồm con người.

Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc có thể gây ra phản ứng miễn dịch qua tế bào trung gian đặc hiệu của protein E7 của virus HPV trong niêm mạc.

Phương pháp gây miễn dịch niêm mạc

Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc có thể gây miễn dịch niêm mạc trong một cá thể bằng các kiểm soát cá thể đó. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gây miễn dịch niêm mạc, phương pháp bao gồm việc sử dụng thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc qua đường miệng cho cá thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sản xuất và ví dụ thử nghiệm của sáng chế được mô tả dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ sản xuất so sánh 1: Sản xuất chế phẩm LacE7 đã biết

Chế phẩm LacE7, mà là chế phẩm đã biết, được sản xuất theo phương pháp được mô tả trong Poo H. et al., Int. J. Immunol., 2006, vol. 119, pp. 1,702 - 1,709.

Tóm lại, protein đột biến E7 có nguồn gốc từ HPV16 mà bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID No. 2, đó là, trong đó Asp tại vị trí 21,

Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26, mà liên quan đến sự liên kết với protein Rb, của protein E7 kiểu đại được thay thế tất cả bởi Gly được đưa qua vật truyền biểu hiện vào trong *Lactobacillus casei* mà đã được xác nhận là tạo ra tế bào hỗ trợ T loại 1 (tế bào Th1). Chất tái tổ hợp thu được (LacE7) được nuôi cấy trong môi trường và sau đó bị tiêu diệt bằng cách gia nhiệt. LacE7 được lọc từ môi trường, rửa bằng nước cất vài lần, và sau đó được sấy khô thành bột (chế phẩm LacE7). Chế phẩm thu được lưu trữ ở 4°C tới khi sử dụng. Chế phẩm LacE7 không tan trong dung môi nước.

Ví dụ sản xuất 1: Sản xuất vi khuẩn axit lactic liên kết protein E7 loại đột biến

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà gắn trên bề mặt được sản xuất bằng cách dưới đây. Protein E7 đột biến (SEQ ID No. 2) là polypeptit có nguồn gốc protein của virus HP7.

Sản xuất protein E7 đột biến

Xây dựng plasmid để biểu hiện protein vào chỗ mà trình tự hợp nhất của cA và protein E7 đột biến được chèn vào

Protein cA là protein neo mà được sử dụng làm công cụ để cố định protein E7 đột biến trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic. Protein cA có thể cố định các protein trên peptidoglycan của vi khuẩn gram dương qua vật mang điện và môtip nhất định và là protein liên kết thành tế bào có nguồn gốc từ AcmA mà là peptidoglycan hydrolaza của *Lactococcus lactis* (Tjibbe Bosma, Rolf Kanninga, Jolanda Neef, Sandrine A. L. Audouy, Maarten L. van Roosmalen, Anton Steen, Girbe Buist, Jan Kok, Oscar P. Kuitrêns, George Robillard, và Kees Leenhouts (2006) Novel Surface Display System for Proteins on Non-Genetically Modified Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. p. 880 - 889).

Trình tự hợp nhất của cA và protein E7 đột biến (xem SEQ ID NO. 3) được chèn vào trong vật truyền plasmid pQE31 bằng phương pháp thông thường (sau đây được gọi là “pQE31::cA=E7Rb,” xem Fig.1A).

Sự biến đổi

Để làm vật chủ để biểu hiện protein hợp nhất của cA và protein E7 đột biến, thì CLEARCOLI (thương hiệu đã được đăng kí) (*E. coli* BL21DE3 LPS modified strain, Lucigen) được sử dụng.

Thứ nhất, CLEARCOLI (thương hiệu đã được đăng kí) được biến đổi bằng phương pháp điện di để qua đó đưa pREP4 (invitrogen) vào trong.

Sau đó, pQE31::cA=E7Rb được đưa vào trong chất biến đổi thu được bởi phương pháp canxi clorua để qua đó thu được *E. coli* mà biểu hiện protein hợp nhất của cA và protein E7 đột biến (sau đây được gọi là “CLEARCOLI (thương hiệu đã được đăng kí) pQE31::cA=E7Rb, pREP4”).

Sự biểu hiện và sự lọc protein hợp nhất

Một vòng platin của *E. coli* được cấy vào trong môi trường lỏng Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories) chứa ampicilin (nồng độ cuối: 100µg/mL) và kanamycin (nồng độ cuối: 25µg/mL) và được nuôi cấy bằng cách lắc ở 37°C qua đêm.

E. coli được nuôi cấy như vậy được thu hồi và rửa sạch. Sau đó, PBS được bổ sung vào đó tương tự lượng được sử dụng cho việc nuôi cấy. Phần thu được có lượng bằng 1/20 của môi trường lỏng LB để nuôi cấy chủ yếu được cấy vào trong môi trường lỏng LB để nuôi cấy chủ yếu chứa ampicilin (nồng độ cuối: 100µg/mL) và kanamycin (nồng độ cuối: 25µg/mL).

Môi trường nuôi cấy chính được thực hiện bằng cách nuôi cấy lắc tại 37°C. Khi O. D.₆₀₀ đạt tới 0,5, IPTG được bổ sung để tạo ra nồng độ cuối là 1mM. Sau đó, phần thu được nuôi cấy bằng cách lắc ở 37°C trong 4 giờ để qua đó làm biểu hiện protein hợp nhất.

E. coli được thu hồi từ dung dịch nuôi cấy thu được. 5mL/g *E. coli* của đệm Lysis (NaH₂PO₄ 100mM, Tris·Cl 10mM, Urea 8M, pH 8) được bổ sung vào đó và sau khi khuấy nhẹ nhàng tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phần thu được ly tâm tại 10000 × g trong 30 phút ở 4°C và sau đó huyền phù được thu hồi.

4mL dịch lơ lửng thu được được trộn nhẹ nhàng tại nhiệt độ phòng trong 40 phút bằng 1mL TALON (tên thương hiệu đã được đăng kí) Metal Affinity

Resin (Clontech) mà đã được cân bằng bởi đệm Lysis. Phần dung dịch trộn thu được của dịch lơ lửng và nhựa được chuyển vào các cột Polypropylen (QIAGEN) để qua đó loại bỏ dịch lơ lửng. Phần thu được rửa sạch 2 lần bằng 4mL nước đệm rửa (NaH_2PO_4 100mM, Tris·Cl 10mM, Urea 8M, pH 6,3) và protein hợp nhất được gắn nhãn His được tách rửa bằng đệm tách rửa 1 (NaH_2PO_4 100mM, Tris·Cl 10mM, Urea 8M, Imidazol 150mM, pH 5,9) và đệm tách rửa 2 (NaH_2PO_4 100mM, Tris·Cl 10mM, Urea 8M, Imidazol 300mM, pH 4,5).

Dung dịch protein thu được được khử muối bằng cách thẩm tách và cô đặc bằng cách sử dụng máy lọc siêu cấp ULTRACEL (thương hiệu đã được đăng kí)–10k (Merck Millipore).

Nồng độ protein trong dung dịch protein thu được đo bởi QUICK START (tên thương mại) Bradford Protein Assay (BIO-RAD) và sau đó dung dịch được lưu trữ ở -80°C tới khi sử dụng.

Xác nhận protein hợp nhất bằng cách thẩm Western

Trong môi trường nuôi cấy chính được mô tả trong phần “sự biểu hiện và sự lọc protein hợp nhất” phần dung dịch nuôi cấy thu được mà được bổ sung IPTG và được nuôi cấy tại 37°C trong 4 giờ được ly tâm tại $10000 \times g$ trong 3 phút và sau đó E. coli được thu hồi. Dịch lơ lửng bị loại bỏ. Phần viên thu được tạo huyền phù trong 100 μL mẫu đệm $1 \times$ SDS-PAGE. Dịch lỏng huyền phù lơ lửng được gia nhiệt tại 100°C trong 5 phút.

Dịch lỏng huyền phù đã gia nhiệt được đưa đi điện di bởi SDS-PAGE và được chuyển sang màng PVDF (EDM Millipore).

Màng đã chuyển được ủ tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ trong dung dịch kháng thể sơ cấp (1% BSA, 0,05% Tween 20 trong PBS (-), IgG của chuột kháng His (Anti-His-tag mAb, MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) (1 : 2000)).

Sau đó, màng được rửa sạch 2 lần bằng PBST.

Sau đó, màng được ủ tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ trong dung dịch

kháng thể thứ cấp (1% BSA, 0,05% Tween 20 trong PBS (-), HRP của dê kháng IgG của chuột (Anti-Mouse IgG (toàn bộ phân tử)-kháng thể peroxidaza tạo ra ở dê, SIGMA-ALDRICH) (1 : 10000)).

Sau đó, màng được rửa sạch 2 lần bằng PBST.

Sau đó, sự biểu hiện của protein hợp nhất được xác nhận bằng cách xác định các dải bằng ECL Plus (GE Health care Life Science) với Chemi doc (Bio-Rad Laboratories).

Sự liên kết với bề mặt của vi khuẩn axit lactic

Protein hợp nhất của cA và protein E7 đột biến được liên kết vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic (sau đây được gọi là “sự cố định”) bằng phương pháp được mô tả trong tham khảo tài liệu Tjibbe Bosma, Rolf Kanninga, Jolanda Neef, Sandrine A. L. Audouy, Maarten L. van Roosmalen, Anton Steen, Girbe Buist, Jan Kok, Oscar P. Kuitrêns, George Robillard, và Kees Leenhouts (2006) Novel Surface Display System for Proteins on Non-Genetically Modified Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. p. 880 - 889.

Nuôi cấy vi khuẩn axit lactic

Để làm vi khuẩn axit lactic, *Lactobacillus casei* IGM393 mà đã được xác nhận trước đó là có tác dụng phụ làm chất mang kháng nguyên (Kajikawa A, Igimi S (2010) Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. Vaccine 28: 3409 - 3415) được sử dụng.

Vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy tĩnh tại 37°C qua đêm trong môi trường lỏng Mann-Rogosa-Sharp (MRS) (Difco Laboratories). Vi khuẩn axit lactic được thu hồi từ phần dung dịch nuôi cấy thu được và được rửa 2 lần bằng PBS.

Xử lý sơ bộ để cố định

Đối với sự xử lý sơ bộ để cố định, hai loại vi khuẩn axit lactic, ví dụ, “vi khuẩn axit lactic được xử lý bằng axit tricloaxetic (TCA) (sau đây được gọi là “xử lý TCA”) và “vi khuẩn axit lactic được xử lý bằng PBS (sau đây được gọi là

“không xử lý TCA”) được điều chế.

Vi khuẩn axit lactic được xử lý bằng TCA bằng cách tạo dịch huyền phù vi khuẩn trong 10% TCA với một lượng bằng 0,2 lần so với dung dịch nuôi cấy, gia nhiệt ở 100°C trong 30 phút, và rửa bằng PBS 3 lần.

Vi khuẩn axit lactic được xử lý bằng PBS bằng cách tạo dịch huyền phù vi khuẩn trong PBS với một lượng bằng 0,2 lần so với dung dịch nuôi cấy, gia nhiệt ở 100°C trong 30 phút, và rửa bằng PBS 3 lần.

Sự cố định

Protein hợp nhất được bổ sung với lượng 1,0µg, 0,3µg, 0,1 µg, hoặc 0,03µg (tương ứng với 0,3µg, 0,09µg, 0,03µg, hoặc 0,009µg protein E7 đột biến) trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic được xử lý từ trước. Phần thu được được trộn với dung dịch PBS chứa protein hợp nhất trong 1 giờ. Kết quả là, protein hợp nhất được liên kết điện vào bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

Sau khi trộn, phần thu được được rửa bằng PBS 3 lần và được lưu trữ tại -80°C tới khi sử dụng.

Vì vậy, thu được vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến được mô tả như dưới đây:

- (1) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3µg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA);
- (2) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,09µg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA);
- (3) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,03µg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA);
- (4) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,009µg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA);

- (5) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA);
- (6) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,09 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA);
- (7) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,03 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA); và
- (8) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,009 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA).

Phép phân tích FACS

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến theo mục (1) đến (8) được dán nhãn huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu cho protein E7 của virus HPV và sau đó được xác nhận sự cố định bởi dụng cụ đo tế bào theo dòng chảy (FACS, BD).

Đặc biệt là, mỗi vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến được trộn lẫn (nhiệt độ phòng, 60 phút) trong 0,5mL dung dịch kháng thể sơ cấp (1% BSA, 0,05% Tween 20 trong PBS (-), IgG chuột kháng HPV16 E7 (Kháng thể protein loại 16 E7 [289-17013 (TVG-701Y)], GeneTex) (1 : 1000)). Sau đó, phần thu được được ly tâm (15000 $\times$ g, 3 phút) và sau đó được rửa 2 lần bằng PBS (-). Sau đó, phần thu được được trộn lẫn bằng cách khác (nhiệt độ phòng, 60 phút) trong 0,5mL dung dịch kháng thể thứ cấp (1% BSA, 0,05% Tween 20 trong PBS (-), IgG chuột kháng Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor(R) 488 của dê kháng IgG chuột (H+L), Life technologies) (1 : 500)). Sau đó, phần thu được được ly tâm (15000 $\times$ g, 3 phút) và sau đó được rửa 2 lần bằng PBS (-).

Sau đó, phần thu được được bổ sung bằng PBS (-) đến thể tích bằng 0,6mL và được đưa đi xử lý FACS để qua đó phát hiện huỳnh quang.

Lưu ý rằng, chúng được điều chế theo cách tương tự ngoài trừ rằng protein hợp nhất không được sử dụng để kiểm soát nghiêm ngặt.

Các kết quả được minh họa trong Fig.1B và Fig.1C.

Trong Fig.1B, “N” là kết quả của việc kiểm soát nghiêm ngặt, “(1)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA), “(2)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,09μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA), “(3)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,03μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA), và “(4)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,009μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA).

Trong Fig.1C, “N” là kết quả của việc kiểm soát nghiêm ngặt, “(5)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA), “(6)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,09μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA), “(7)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,03μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA), và “(8)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,009μg protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA).

Đối với các kết quả của Fig.1B và Fig.1C, đã chỉ ra rằng cường độ huỳnh quang được tăng cường theo sự gia tăng lượng protein E7 đột biến.

Lưu ý rằng, khi lượng protein E7 đột biến là 0,9μg trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic, một kết quả tương tự thu được trong trường hợp mà ở đó

protein E7 đột biến là 0,3 μ g trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic. Do đó, lượng protein E7 đột biến được liên kết trên bề mặt của vi khuẩn được thấy là bão hòa tại khoảng 0,3 μ g.

Lưu ý rằng, một kết quả điển hình của việc thăm Western của protein được mô tả dưới đây được minh họa trong Fig.1D.

Protein

- Protein hợp nhất của cA được dán nhãn His và protein E7 đột biến (48 kDa);
- CA được dán nhãn His (33 kDa); và
- Protein E7 đột biến được dán nhãn His (15 kDa).

Trong Fig.1D, “1” là kết quả của “protein hợp nhất của cA được dán nhãn His và protein E7 đột biến,” “2” là kết quả của “cA được dán nhãn His,” “3” và “5” là kết quả của “mẫu được điều chế từ *E. coli* trước đó để tạo ra biểu hiện của cA được dán nhãn His,” “4” và “6” là kết quả của “mẫu được điều chế từ *E. coli* sau khi tạo ra biểu hiện của CA được dán nhãn His,” “7” là kết quả của “protein E7 đột biến được dán nhãn His,” “8” và “10” là kết quả của “mẫu được điều chế từ *E. coli* trước để tạo ra biểu hiện của protein E7 đột biến được dán nhãn His,” “9” và “11” là kết quả của “mẫu được điều chế từ *E. coli* sau khi tạo ra biểu hiện của protein E7 đột biến được dán nhãn His.”

Ví dụ sản xuất 2: Sản xuất vi khuẩn axit lactic đột biến loại biểu hiệu protein E7

Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, protein E7 đột biến (SEQ ID No. 2) mà là polypeptit có nguồn gốc protein của virus HP7 được biểu hiện, được sản xuất bằng cách dưới đây.

Bằng cách sử dụng vật truyền plasmid, pIGM2 (Kajikawa Akinobu, Eiko Ichikawa, và Shizunobu Igimi (2010) Development of a Highly Efficient Protein-Secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. J. Microbiol. Biotechnol., 20(2), 375-382), vật truyền plasmid trong đó trình tự mã hóa cho protein E7 đột biến (SEQ ID NO. 2) và gen neo có nguồn gốc từ *Lactobacillus casei* (trình tự proteinaza của *L. casei*) được liên kết theo thứ tự này (SEQ ID

NO. 4) được chèn vào (sau đây được gọi là “pIGM2::E7Rb=prtP neo”) được sản xuất (xem Fig.2A).

Trình tự gen kết thúc được loại bỏ khỏi vật truyền plasmid. Phần thu được được đưa vào *Lactobacillus casei* IGM394 bằng phương pháp điện di (sau đây được gọi là “*L. casei* IGM394 [pEK7::E7Rb]”).

Để làm chất kiểm soát nghiêm ngặt, chủng *Lactobacillus casei* IGM394 mà vật truyền plasmid được đưa vào đó được sản xuất bằng cách tương tự như được mô tả ở trên, ngoại trừ việc trình tự mã hóa cho protein E7 đột biến (SEQ ID NO. 2) và gen neo có nguồn gốc từ *Lactobacillus casei* (trình tự proteinaza của *L. casei*) được liên kết theo thứ tự này (SEQ ID NO. 4) không bị chèn vào vật truyền plasmid (sau đây được gọi là “*L. casei* IGM394 [pLP empty]”).

Vi khuẩn axit lactic được cấy vào môi trường lỏng (MRSE) mà là Mann-Rogosa-Sharp (Difco Laboratories) được tạo dịch huyền phù bằng 5µg/mL Em và sau đó được nuôi cấy tại 37°C qua đêm (khoảng 14 giờ). Vi khuẩn axit lactic được thu hồi từ dung dịch nuôi cấy (5000g × 10 phút) và được rửa một lần bằng PBS (5000g × 10 phút). PBS được bổ sung vào đó qua đó điều chỉnh nồng độ của phần dịch huyền phù tế bào thu được đến 1×10^9 CFU/mL.

Dịch huyền phù tế bào được điều chỉnh được cấy vào 1L MRSE ((i) mà không bổ sung NaHCO₃, pH 6,4, (ii) với sự bổ sung NaHCO₃ 10mM, pH 6,8, hoặc (iii) với sự bổ sung NaHCO₃ 25mM, pH 7,1) với một lượng bằng 10% MRSE (1×10^8 CFU/mL). Phần thu được được nuôi cấy tại 37°C trong khoảng 5 giờ bằng cách khuấy nhẹ trong điều kiện kỵ khí (sử dụng ANAEROPACK).

Lưu ý rằng, vi khuẩn axit lactic phục vụ cho sự kiểm soát nghiêm ngặt trong việc nuôi cấy trong (i) MRSE mà không bổ sung NaHCO₃.

Vi khuẩn axit lactic được thu hồi từ dung dịch nuôi cấy (5000g × 10 phút) và được rửa một lần bằng PBS (5000g × 10 phút). 30mL PBS được bổ sung vào đó qua đó điều chỉnh nồng độ cuối của phần dịch huyền phù tế bào thu được đến $7,5 \times 10^9$ tế bào/mL (OD ≈ 7,5). Lưu ý rằng, số lượng vi khuẩn axit lactic được đếm bởi huyết cầu kế.

Dịch huyền phù tế bào được hấp ở 80°C trong 5 phút để tiêu diệt vi khuẩn. Ngoài ra, vi khuẩn mà không được hấp được sử dụng làm mẫu vi khuẩn sống.

Vì vậy, thu được vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến như được mô tả dưới đây:

- (i-1) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE mà không bổ sung NaHCO_3 (pH 6,4) và bị tiêu diệt;
- (i-2) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE mà không bổ sung NaHCO_3 (pH 6,4) và không bị tiêu diệt;
- (ii-1) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 10mM (pH 6,8) và bị tiêu diệt;
- (ii-2) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 10mM (pH 6,8) và không bị tiêu diệt;
- (iii-1) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 25mM (pH 7,1) và bị tiêu diệt; và
- (iii-2) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 25mM (pH 7,1) và không bị tiêu diệt.

Phép phân tích FACS

Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến của (i-1), (ii-1), và (iii-1) và sự kiểm soát nghiêm ngặt được đưa đi phân tích FACS theo cách tương tự như trong ví dụ sản xuất 1 để qua đó xác nhận mức độ biểu hiện của protein E7 đột biến trên bề mặt vi khuẩn trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic. Các kết quả được minh họa trong Fig.2B.

Trong Fig.2B, “N” là kết quả của việc kiểm soát nghiêm ngặt (vi khuẩn bị tiêu diệt), “(i-1)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE mà không bổ sung NaHCO_3 (pH 6,4) và bị tiêu diệt, “(ii-1)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 10mM (pH 6,8) và bị tiêu diệt, và “(iii-1)” là kết quả của vi khuẩn axit lactic loại biểu hiệu

protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 25mM (pH 7,1) và bị tiêu diệt.

Theo kết quả của Fig.2B, đã chỉ ra rằng lượng biểu hiện của protein E7 đột biến trên bề mặt của vi khuẩn có thể được cải biến bằng cách điều chỉnh pH của dung dịch nuôi cấy.

Ví dụ thử nghiệm 1: So sánh lượng protein E7 đột biến trên bề mặt vi khuẩn)

Các mẫu được mô tả dưới đây được đưa đi phân tích FACS theo cách tương tự như trong ví dụ sản xuất 1 để qua đó so sánh lượng protein E7 đột biến trên bề mặt vi khuẩn trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic. Các kết quả được minh họa trong Fig.3A và Fig.3B.

Mẫu

- (I) Sự kiểm soát nghiêm ngặt trong ví dụ sản xuất 2 (vi khuẩn bị tiêu diệt);
- (II) Chế phẩm LacE7 thu được trong ví dụ sản xuất so sánh 1;
- (III) Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, $0,03\mu\text{g}$ protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (xử lý TCA) của (3) trong ví dụ sản xuất 1; và
- (IV) Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 25mM (pH 7,1) và bị tiêu diệt của (iii-1) trong ví dụ sản xuất 2.

Trong Fig.3A và Fig.3B, “(I)” là kết quả của mẫu (I), “(II)” là kết quả của mẫu (II), “(III)” là kết quả của mẫu (III), và “(IV)” là kết quả của mẫu (IV).

Theo kết quả của Fig.3A (điều kiện của phép đo: 525 vôn), đã chỉ ra rằng, trong chế phẩm LacE7, cường độ huỳnh quang đã được phân phối rộng rãi, ví dụ, có một lượng lớn vi khuẩn axit lactic mà trên bề mặt của nó các protein E7 đột biến không được biểu hiện. Ngoài ra, theo kết quả của Fig.3B (điều kiện của phép đo: 600 vôn), đã chỉ ra rằng, trong chế phẩm LacE7, protein E7 đột biến trên bề mặt của vi khuẩn có biểu hiện thấp.

Trong khi đó, trong vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO_3 25mM (pH 7,1) và bị

tiêu diệt của (iii-1) trong ví dụ sản xuất 2, lượng biểu hiện của protein E7 đột biến trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic được ước tính là khoảng 0,3 μ g.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm khả năng miễn dịch niêm mạc chống virus HPV-1

Thử nghiệm khả năng miễn dịch niêm mạc chống virus HPV được thực hiện bằng cách dưới đây mà sử dụng chế phẩm LacE7 được tạo ra trong ví dụ so sánh 1.

Sự miễn dịch của chuột

Chuột nhắt được miễn dịch bằng cách cho uống chế phẩm LacE7 theo thủ tục được mô tả trong K. Adachi et al., Vaccine, 2010, vol. 28, pp. 2810 - 2817.

Kiểm soát qua đường miệng chế phẩm LacE7 đối với chuột

Chuột nhắt cái sáu tuần tuổi SPF C67BL (CLEA Japan, Inc.) được miễn dịch bởi chế phẩm LacE7 thông qua việc kiểm soát qua đường miệng.

Chế phẩm LacE7 (0,1mg, 0,3mg, hoặc 1,0mg trên con chuột) được kiểm soát tổng cộng 4 vòng vào các tuần 1, 2, 4, và 6. Đối việc kiểm soát hoàn toàn, chế phẩm LacE7 được tạo huyền phù trong 200 μ L PBS và được kiểm soát thông qua ống trong dạ dày sau 3 giờ không ăn một lần một ngày và trong năm ngày liên tiếp mỗi tuần.

Sản phẩm trong ruột

Một tuần sau lần nuôi cấy cuối của chế phẩm LacE7 (tại tuần 7), năm con chuột nhắt mà chế phẩm LacE7 được cấy ghép vào đó bị chia cắt, mà ruột được thu hồi từ đó. Sau đó phân được loại bỏ khỏi ruột, bên trong mỗi vùng ruột được rửa bằng 10mL của HBSS được tạo dịch huyền phù bằng chất ức chế proteaza.

Điều chế tế bào bạch huyết niêm mạc chuột bạch

Mỗi vùng ruột được mở theo chiều dọc và được lắc mạnh trong môi trường PRMI1640, mà chứa 10% theo khối lượng huyết thanh bò không hoạt hóa, L-glutamin 2mM, natri pyruvat 1mM, $1 \times$ các axit amin không cần thiết, và

2-mercaptoethanol 50mM, được tạo dịch huyền phù bằng 10% theo khối lượng FBS, 100 đơn vị/mL penicillin và 100µg/mL streptomycin ở 37°C trong 30 phút. Dung dịch huyền phù tế bào được thu hồi sau đó, đi qua thiết bị lọc tế bào BD FALCON (tên thương mại) (BD Bioscience, USA) để qua đó loại bỏ mảnh vỡ mô, và sau đó được đưa đi ly tâm gradien ở mật độ ngắt quãng trong 15mL ống trong đó 40% theo khối lượng PERCOLL PLUS được xếp lớp trên 70% theo khối lượng PERCOLL PLUS. Khoảng 10^7 đến 10^8 tế bào được xếp lớp trên đó, sau đó ly tâm tại $600 \times g$ và nhiệt độ phòng trong 20 phút. Kết quả là, các tế bào lympho niêm mạc (khả năng phát triển tế bào: 95%) được cô đặc tại phần giao diện giữa 70% theo khối lượng lớp PERCOLL PLUS và 40% theo khối lượng lớp PERCOLL PLUS. Khoảng 5×10^6 đến 10×10^6 các tế bào niêm mạc thu được từ mỗi con chuột.

Thử nghiệm ELISPOT

50µL huyền phù của các tế bào bạch huyết niêm mạc trong ruột (5×10^6 tế bào/mL) được ủ trong 24 giờ ở 37°C cùng với tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất của MOUSE IFN- γ ELISPOT KIT (MABTECH AB, Sweden), 10µL peptit tổng hợp (1µg/mL) bao gồm các axit amin tại vị trí từ 49 đến 57 của protein E7 mà được báo cáo là epitope CTL cho protein E7 của virus HPV16 (SEQ ID No. 1), mitogen (40ng/mL phorbol myristat axetat thêm 4µg/mL ionomycin), hoặc môi trường riêng lẻ (kiểm soát) được bổ sung nhỏ giọt vào tấm 96-well (ví dụ, tấm ELIIP, Millipore, USA) được phủ bởi các kháng thể kháng IFN- γ của chuột. Số lượng điểm tích cực IFN- γ trên tấm 96-well được phân tích bằng hệ thống phân tích hình ảnh video hỗ trợ máy tính hoàn toàn tự động, KS ELISPOT (Carl Zeiss Vision, Germany).

Phân tích thống kê

Dữ liệu ELISPOT được thể hiện là phương tiện $\pm$ độ lệch chuẩn. Những giá trị này hoặc những giá trị tương đối được so sánh giữa các nhóm miễn dịch (5 con chuột nhất/nhóm) bằng cách sử dụng thử nghiệm-t của nghiên cứu hai mặt. Giá trị giá trị p < 0,05 được coi là đáng kể.

Các kết quả của ví dụ thử nghiệm 2 được minh họa trong Fig.4.

Như thấy rõ từ Fig.4, số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trên 10^6 tế bào được gia tăng phụ thuộc vào lượng kiểm soát.

Ngoài ra, đối với các kết quả của Fig.4, số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trên 10^6 tế bào được tính toán là 65,8 tế bào trong trường hợp mà ở đó 0,5mg của chế phẩm LacE7 được kiểm soát (như được chỉ ra bởi mũi tên trong Fig.4). (Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm khả năng miễn dịch niêm mạc chống virus HPV lần 2)

Thử nghiệm khả năng miễn dịch niêm mạc chống virus HPV được thực hiện theo cách tương tự như ví dụ thử nghiệm 2, ngoại trừ việc mỗi mẫu được mô tả ở trên được kiểm soát tại 0,5mg/con chuột.

Mẫu

- Mẫu 1: Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (không xử lý TCA) của (1) trong ví dụ sản xuất 1;
- Mẫu 2: Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,09 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (bằng cách xử lý TCA) của (6) trong ví dụ sản xuất 1;
- Mẫu 3: Vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến mà trên bề mặt của nó, 0,3 μ g protein E7 đột biến được liên kết trên $1,0 \times 10^8$ vi khuẩn axit lactic (bằng cách xử lý TCA) của (5) trong ví dụ sản xuất 1;
- Mẫu 4: Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO₃ 25mM (pH 7,1) và không bị tiêu diệt của (iii-2) trong ví dụ sản xuất 2; và
- Mẫu 5: Vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến mà được nuôi cấy trong MRSE với sự bổ sung NaHCO₃ 25mM (pH 7,1) và bị tiêu diệt của (iii-1) trong ví dụ sản xuất 2.

Các kết quả được minh họa trong Fig.5. Trong Fig.5, số từ 1 đến 5 trên trục ngang thể hiện số mẫu.

Trong Fig.5, các kết quả của ví dụ thử nghiệm 2 cũng được minh họa. Trong Fig.5, A thể hiện kết quả trong trường hợp mà ở đó chế phẩm LacE7 được kiểm soát ở 0,1mg/con chuột trong ví dụ thử nghiệm 2, B thể hiện kết quả trong trường hợp mà ở đó chế phẩm LacE7 được kiểm soát ở 0,3mg/con chuột trong ví dụ thử nghiệm 2, và C thể hiện kết quả trong trường hợp mà ở đó chế phẩm LacE7 được kiểm soát ở 1,0mg/con chuột trong ví dụ thử nghiệm 2.

Mũi tên trong Fig.5 thể hiện số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trên 10^6 tế bào trong trường hợp mà ở đó chế phẩm LacE7 được kiểm soát ở 0,5mg/con chuột được tính toán từ các kết quả của ví dụ thử nghiệm 2.

Đối với kết quả của Fig.5, đã chỉ ra rằng các mẫu từ 1 đến 5, mà là vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến hoặc vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến của sáng chế, có khả năng miễn dịch chống HPV tốt hơn chế phẩm LacE7, mà là chế phẩm đã biết, được kiểm soát với hàm lượng tương tự như các mẫu.

Cụ thể là, đã chỉ ra rằng khả năng miễn dịch chống lại HPV của các mẫu từ 2 đến 5 là rất tốt, ví dụ, cao hơn gấp hai lần so với chế phẩm LacE7, mà là chế phẩm đã biết, được kiểm soát với hàm lượng tương tự như các mẫu.

Trong thử nghiệm điều trị của các bệnh nhân CIN3 bằng cách sử dụng chế phẩm LacE7 đã biết được thực hiện bởi các tác giả, số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trong nhóm được chữa khỏi được so sánh với nhóm không được chữa khỏi. Điều này chứng minh rằng số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trong nhóm được chữa khỏi nhiều gấp hai lần so với nhóm không được chữa khỏi (K. Kawana et al., "Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients.", Vaccine, 2014 Oct 29; 32 (47): 6233 - 9.).

Do đó, dựa trên thực tế rằng số lượng tế bào sản xuất IFN- γ trong những người mà được kiểm soát với vi khuẩn axit lactic loại liên kết protein E7 đột biến hoặc vi khuẩn axit lactic loại biểu hiện protein E7 đột biến của sáng chế khoảng hai lần so với những người mà được kiểm soát với chế phẩm LacE7 đã

biết với hàm lượng tương tự, có mong muốn rằng vi khuẩn axit lactic của sáng chế sẽ cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị (tốc độ phản ứng).

Các khía cạnh sáng chế như sau:

1. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm

vi khuẩn axit lactic có polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) trên bề mặt của nó,

trong đó polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,03 μ g đến 1,0 μ g trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic.

2. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục 1, trong đó polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được liên kết vào trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

3. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục 1, trong đó polypeptit có nguồn gốc protein E7 của virus HPV được biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

4. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn axit lactic là *Lactobacillus casei*.

5. Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV, chế phẩm bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4.

6. Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV theo mục 5, trong đó chế phẩm được sử dụng để điều trị ít nhất một trong số u nội biểu mô cổ tử cung và giai đoạn tiền ung thư cổ tử cung.

7. Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm:

vi khuẩn axit lactic có polypeptit trên bề mặt của nó,

trong đó polypeptit là protein E7 của virus gây u nhú ở người (HPV) kiểu đại hoặc thể đột biến của protein E7 mà trong đó dư lượng axit amin liên quan đến việc liên kết với protein u nguyên bào vồng mạc (Rb) của protein E7 được thế bởi dư lượng axit amin khác,

trong đó polypeptit được hợp nhất với protein neo mà là protein liên kết thành tế bào cA của AcmA để tạo ra protein hợp nhất, hoặc được biểu hiện từ trình tự của axit nucleic mã hóa cho polypeptit được liên kết với gen prtP neo,

trong đó polypeptit được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,03 μ g đến 1,0 μ g trên 1×10^8 vi khuẩn axit lactic trên bề mặt của vi khuẩn.

2. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm 1, trong đó protein E7 của virus HPV là protein E7 của virus HPV16.

3. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polypeptit là protein E7 đột biến mà trong đó Asp tại vị trí 21, Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26 của protein E7 của virus HPV16 kiểu đại (SEQ ID No. 1) được thế bởi dư lượng axit amin khác.

4. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm 3, trong đó Asp tại vị trí 21, Cys tại vị trí 24, và Glu tại vị trí 26 của protein E7 của virus HPV16 kiểu đại (SEQ ID No. 1) được thế bởi Gly.

5. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polypeptit được gắn trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

6. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polypeptit được biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn axit lactic.

7. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó vi khuẩn axit lactic là *Lactobacillus casei*.

8. Dược phẩm dùng qua đường miệng để điều trị ít nhất một trong số các bệnh

truyền nhiễm HPV và u liên đới HPV, dược phẩm này bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

9. Thuốc kích ứng miễn dịch niêm mạc bao gồm chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thuốc này được sử dụng để tạo ra miễn dịch niêm mạc chống lại sự truyền nhiễm virus HPV.

FIG.1A

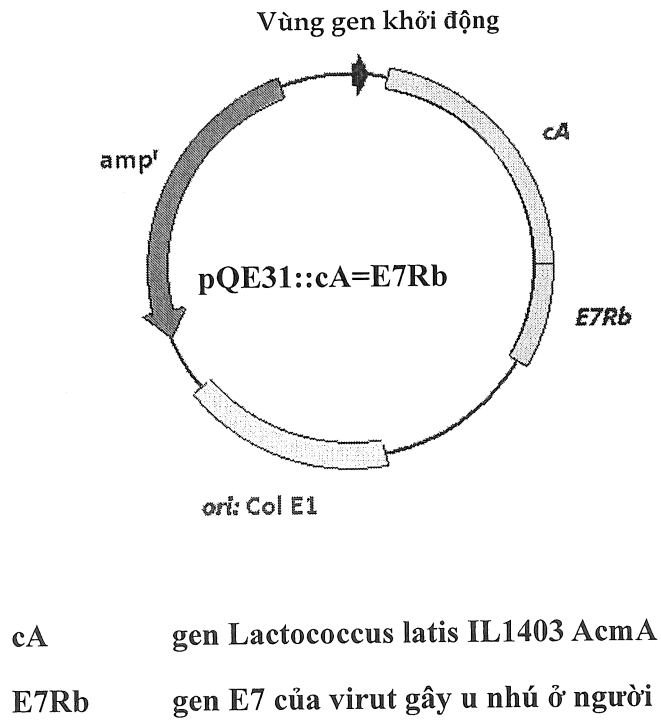


FIG.1B

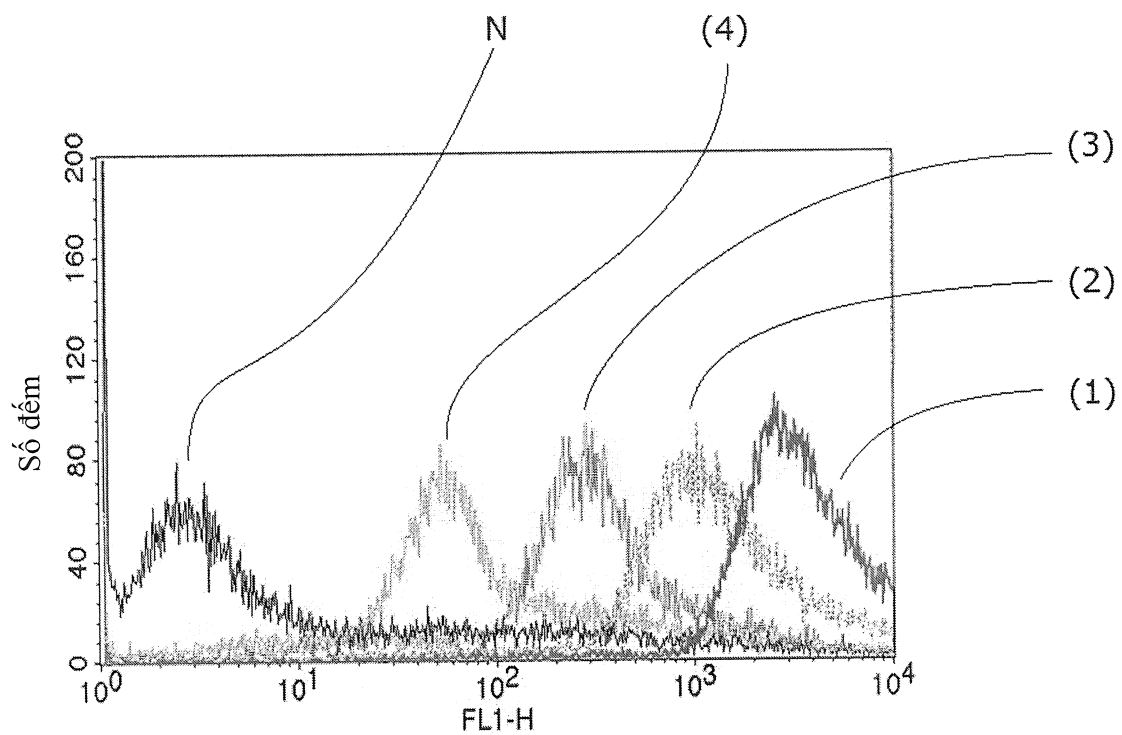


FIG.1C

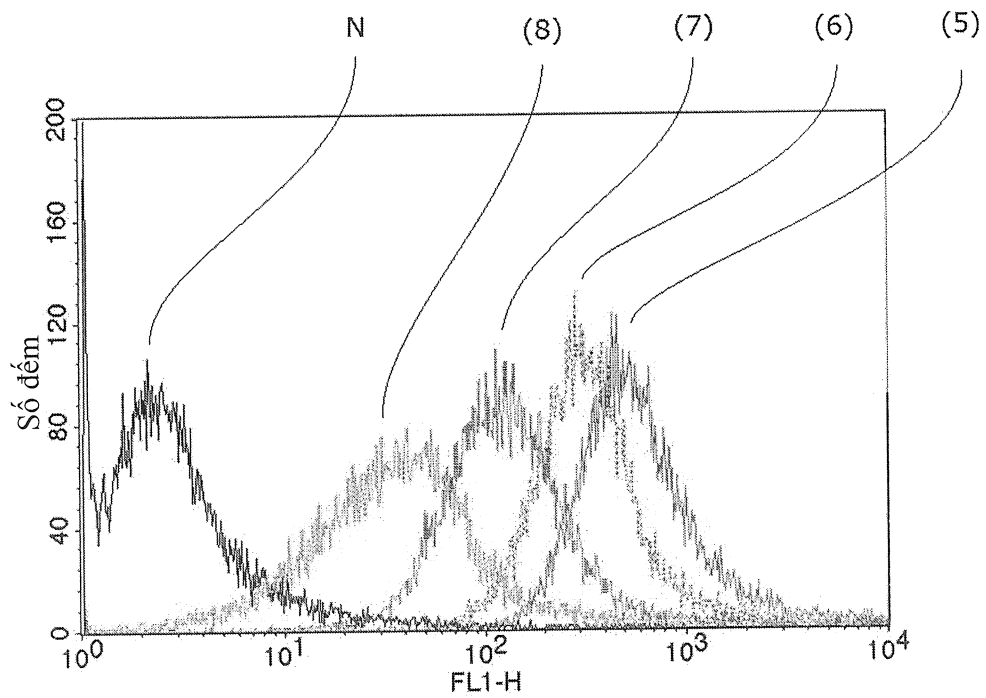


FIG.1D

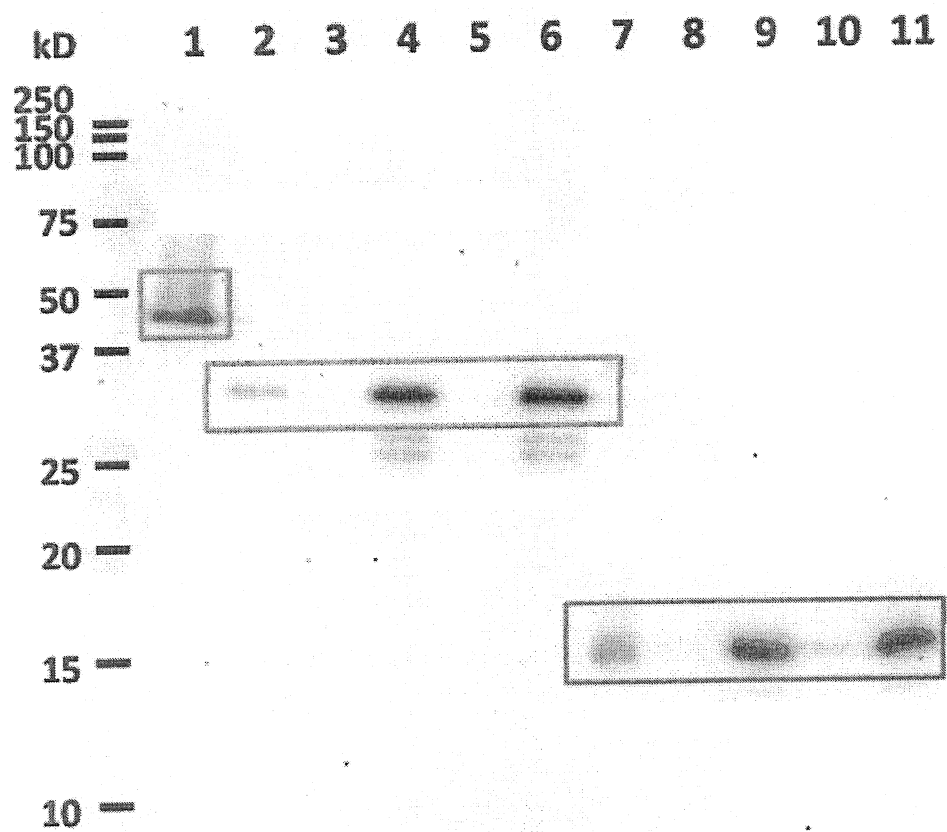
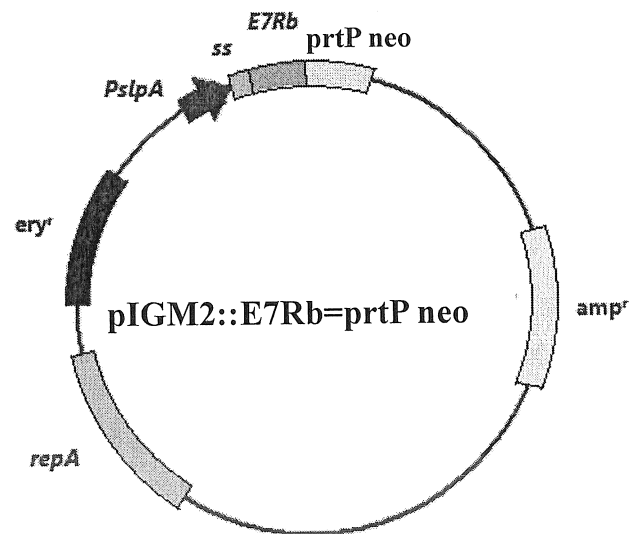


FIG.2A



PslpA trình tự gen khởi động của *Lactobacillus brevis* ATCC1599

Protein lớp S

ss tín hiệu bài tiết của gen *L. brevis* ATCC1559 prtP

E7Rb gen E7 gây u nhú ở người

neo trình tự protein của *Lactobacillus casei*

amp^r gen kháng ampicillin của plasmid pGEM-3

ery^r gen kháng erythromycin của *Staphylococcus aureus* plasmid pE194

FIG.2B

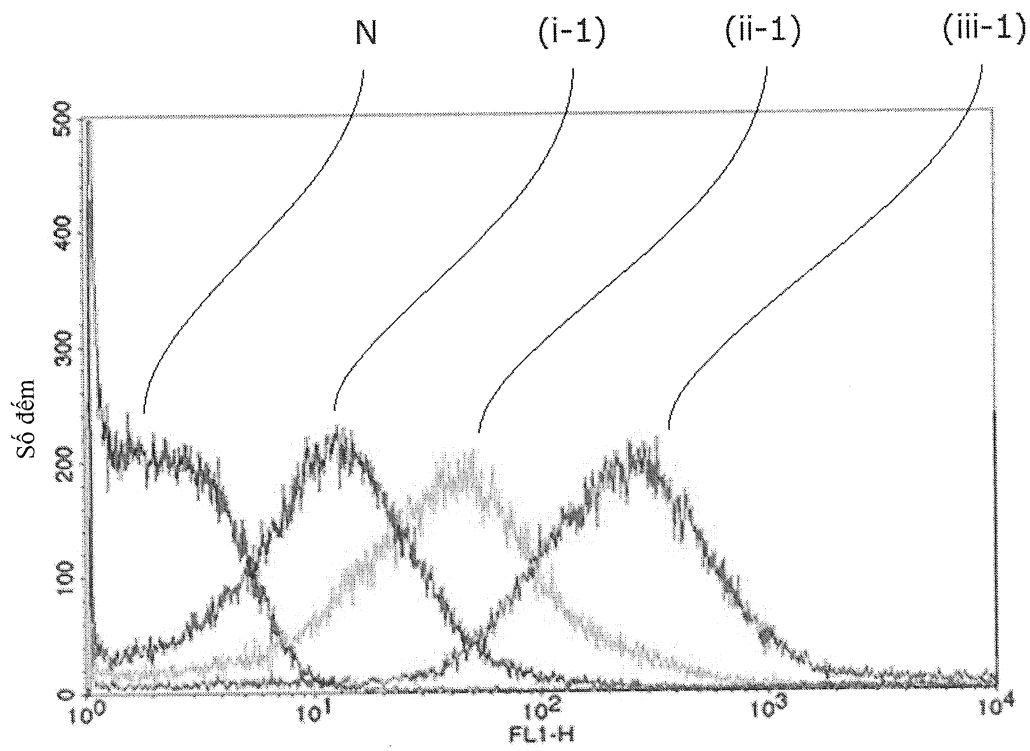


FIG.3A

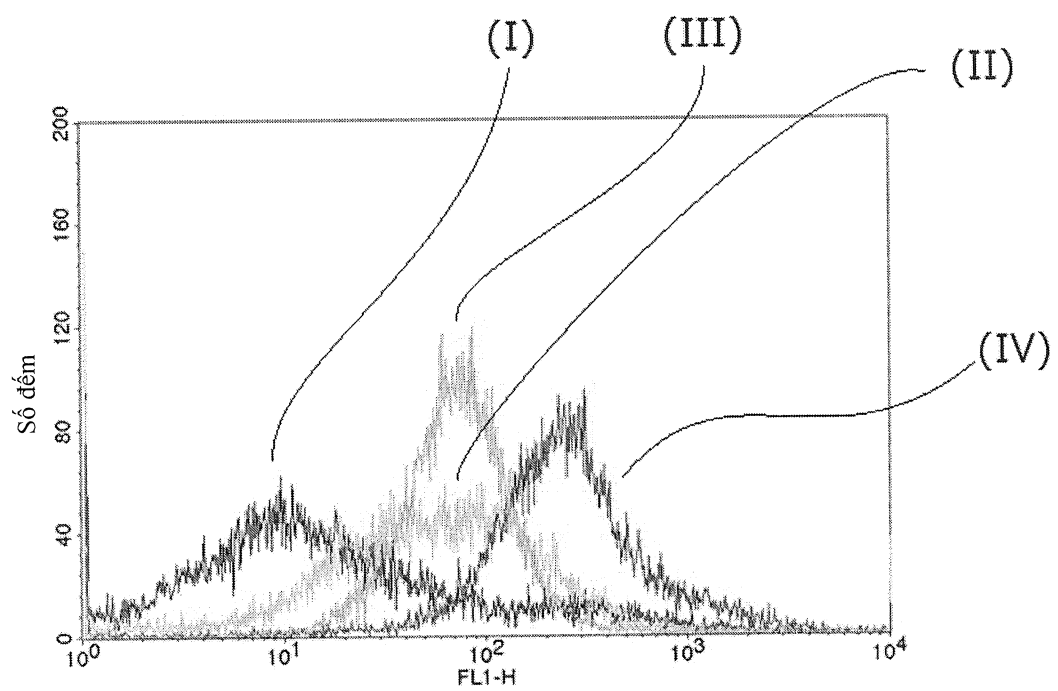


FIG.3B

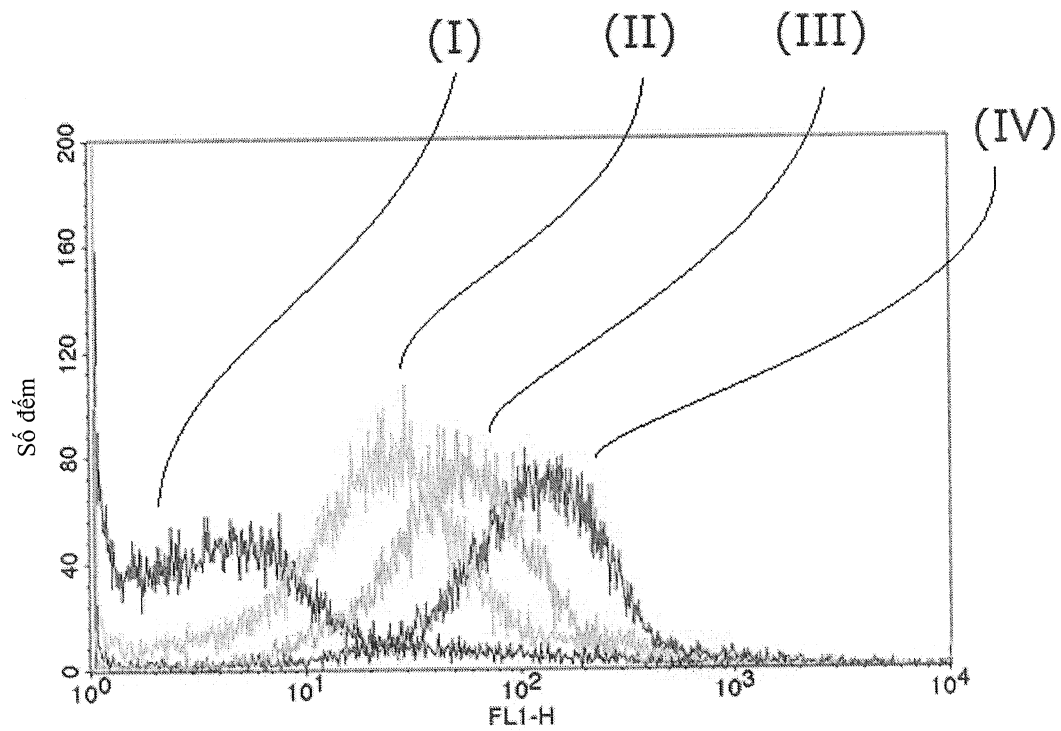


FIG.4

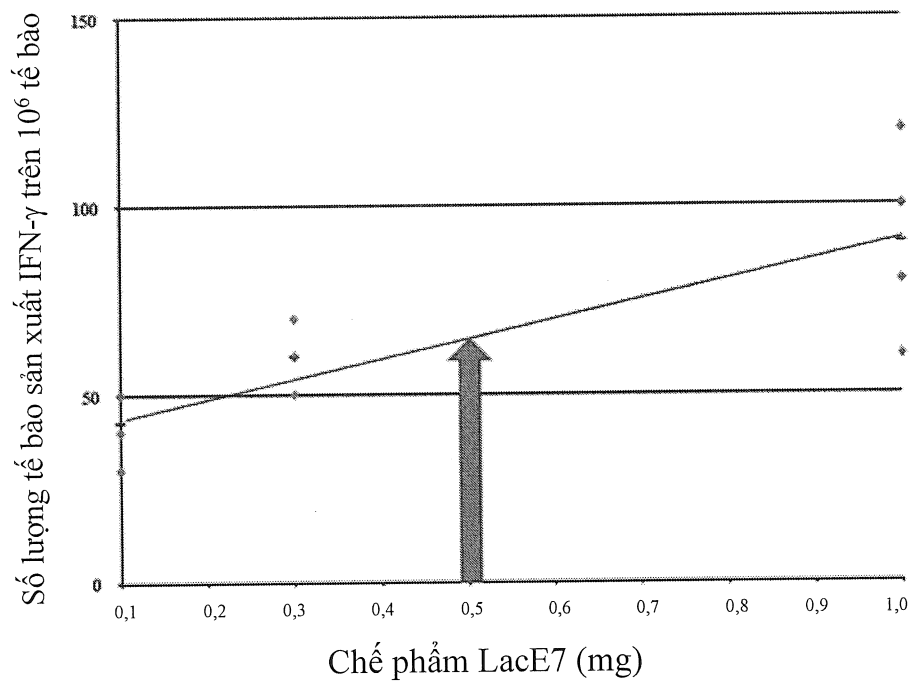
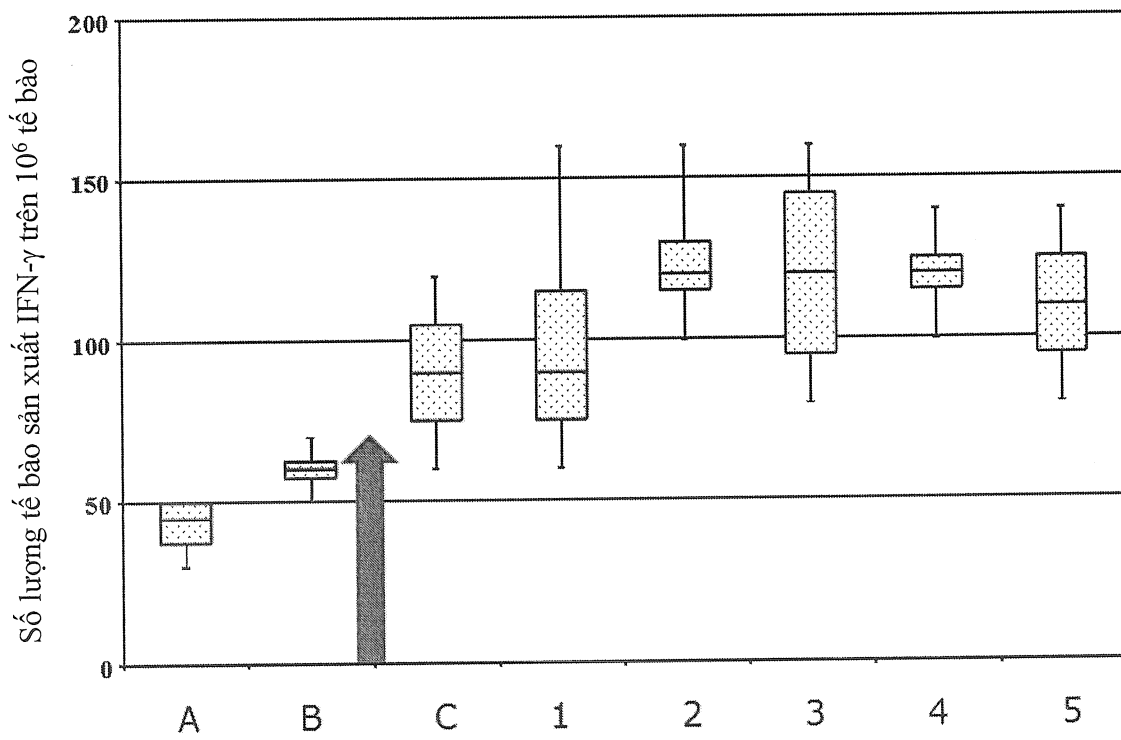


FIG. 5



Danh mục trình tự

<110> The University of Tokyo
Japan Health Sciences Foundation

<120> CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN AXIT LACTIC, DƯỢC PHẨM DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ NHIỄM HPV VÀ/HOẶC CÁC U LIÊN ĐỐI HPV, VÀ THUỐC KÍCH ỨNG MIỄN DỊCH NIÊM MẠC

<130> N-ST016-15P

<150> JP 2015-017407

<151> 2015-01-30

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 1

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> HPV16

<400> 2

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

Lys Pro

<210> 3
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 3

tcttctgctg gtacttctaa ttccggtggt tcaacagcta caaataccaa taataattca 60
 aatacaagct caaccactta tacagttaaa tctggcgata cactttgggg aatttcgcaa 120
 aaatatggaa ttagtggtgc tcaaattcaa agcgcaaaca atcttaaaag tacagtcac 180
 tatattgggc aaaagcttgt attgacaact tcaagttctt cgtctaatac aaatagtca 240
 acttcttcag gaaattctgc cggaactaca acgcctacta cttegggtcac tctgceaaa 300
 ccagcttcac agacgacgat taagggttaa tctgggtgata cgctttgggg actctctgtc 360
 aaatataaaa cgacgattgc tcaactcaag agttggaatc attgaattc tgatacaatt 420
 ttcatggac aaaacttgat tgtttcacia tctgccggtt ctcaagttc ttcaacaggt 480
 tcaagctcag cctctacgag ttcaacttct aactcttctg cagcttcaaa tacctctac 540
 cataaggttg ttaaaggaga tacgctttgg ggactttcac aaaaatctgg tagcccaatt 600
 gcttcaatta aggcttgga tcatattca agtgatacca ttttaattgg tcaatatctt 660
 cgtattaaag aggatccgat gcatggagat acacctacat tgcataaata tatgttagat 720
 ttgaaccag agacaactgg tctctacggt tatgggcaat taaatgacag ctgagaggag 780
 gaggatgaaa tagatgggcc agctggacaa gcagaaccgg acagagccca ttacaatatt 840
 gtaacctttt gttgcaagtg tgactctacg cttegggtgt gcgtacaaag cacacacgta 900
 gacattcgta ctttgaaga cctgttaatg ggcacactag gaattgtgtg ccccatctgt 960
 tctcagaaac cataa 975

<210> 4

<211> 624

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 4

atgcatggag atacacctac attgcatgaa atatgttaga ttgcaacca gagacaactg 60
 gtctctacgg ttatgggcaa ttaatgaca gctcagagga ggaggatgaa atagatggtc 120
 cagctggaca agcagaaccg gacagagccc attacaatat tgtaaccttt tgttgcaagt 180
 gtgactctac gcttcgggtg tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt actttggaag 240
 acctgttaat gggcacacta ggaattgtgt gccccatctg ttctcagaaa ccactcgagg 300
 cagctgccgt tgaagcggcc aagacagctg gtaaaggcga cgatacaagc ggtactagcg 360
 acaaaggcgg cggtaaggt accccggcgc ccgctccagg cgacacaggt aagaacaaag 420
 gcgatgaggg cagccagcct agttctggcg gtaatatccc acaaagcca gccacaacga 480
 cgtaacgag cacggatgat acgactgac gtaatggtca acatacatcc ggtaaggag 540
 cattaccaa gacagcagag acaactgagc ggccagcggt tggttcttg ggtgtcattg 600
 tggtcagtct gatgggggta ttag 624