



(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)



1-0035794

(51)⁸ A61L 27/36

(13) B

(21) 1-2018-02477

(22) 25/11/2016

(86) PCT/EP2016/078898 25/11/2016

(87) WO2017/093147 08/06/2017

(30) 102015000078236 30/11/2015 IT

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/01/2019 370A

(73) BIOCOMPATIBILITY INNOVATION SRL (IT)

Via Enrico Petrella, 4, 35132 Padova, Italy

(72) NASO, Filippo (IT); GANDAGLIA, Alessandro (IT).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP BẮT HOẠT KHÁNG NGUYÊN ALPHA-GAL Ở MÔ SINH HỌC VÀ KIT ĐỂ THỰC HIỆN PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bắt hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học, cụ thể là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước sau: điều chế dung dịch chứa axit cafeic để bắt hoạt ít nhất một phần kháng nguyên alpha-Gal ở mô này; ủ mẫu mô cần xử lý trong các dung dịch này trong điều kiện có kiểm soát; và rửa nhiều lần mô đã được xử lý. Sáng chế cũng đề cập đến kit để thực hiện phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô sinh học, cụ thể là để bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô liên kết nguyên vẹn và/hoặc mô liên kết được cố định, mô liên kết tương đồng hoặc mô liên kết không tương đồng, cụ thể là epitop alpha-Gal, và ở mô tim mạch nhờ hoạt tính sinh học của hợp chất phenol, hợp chất polyphenol và dẫn xuất của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, bộ phận cấy ghép giả sinh học ngày càng được sản xuất nhiều. Sự cải tiến các phương pháp phẫu thuật trên lâm sàng, việc làm giảm các biến chứng sau phẫu thuật, sự phát triển và quản lý các thuốc điều hòa miễn dịch thể hệ mới, kết hợp với kiến thức chuyên sâu hơn về các cơ chế tương tác giữa mảnh ghép và vật chủ đã góp phần tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng bộ phận cấy ghép giả sinh học được cấu thành từ mô động vật hoặc mô tương đồng. Về vấn đề này, chuyên ngành tim mạch là một lĩnh vực quan trọng, đặc biệt là về khía cạnh xã hội và sức khỏe của biện pháp thay thế van tim.

Công nghệ y sinh học có khả năng phát triển và ứng dụng phẫu thuật bộ phận cấy ghép van tim bất chước chức năng mở và đóng của van tim tự nhiên bị suy giảm chức năng, cho mục đích thay thế.

Bộ phận cấy ghép van tim lý tưởng cần có khả năng cho phép dòng máu chảy qua tương tự như van tim khỏe mạnh, có thời hạn sử dụng kéo dài và không gây hội chứng tan máu hoặc đông máu.

Bộ phận cấy ghép van tim thường được sử dụng nhất là bộ phận cấy ghép giả sinh học có nguồn gốc từ mô ngoại lai, cụ thể từ van tim của lợn hoặc van tim được sản xuất từ màng ngoài tim của bò hoặc ngựa.

Các bộ phận cấy ghép van tim này có nhược điểm là thường bị loạn dưỡng vôi hóa và/hoặc suy giảm do vỡ đỉnh van, dễ bị nhiễm trùng cơ tim. Để cải thiện đặc tính cơ học, làm giảm tính kháng nguyên, và bảo quản, các bộ phận cấy ghép van tim này thường

được xử lý bằng hợp chất tạo liên kết chéo/khử trùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glutaraldehyt. Ngoài ra, các bộ phận cấy ghép van tim này có thể được xử lý bằng phương pháp khử canxi hoặc khử độc.

Thuật ngữ “mô ngoại lai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô có nguồn gốc từ các loài sinh vật không phải là người; các mô này có các kháng nguyên bề mặt đặc trưng có thể dung nạp vào bên trong các loài có cùng nguồn gốc, nhưng không tương thích khi cấy trên người, khi không được xử lý hoàn toàn, mô ngoại lai có thể hoạt hóa một loạt phản ứng bao gồm kết tập tiểu cầu, gây ra hội chứng tương tự như hội chứng xuất hiện trong trường hợp không tương thích nhóm máu.

Hội chứng này còn được gọi là “hội chứng thải loại siêu cấp tính”. Nguyên nhân chính gây hội chứng này là sự có mặt của kháng nguyên alpha-Gal ngoại lai. Epitop này là đi-galactosit (galactosa-alpha, 3-galactosa) có trên glycoprotein và glycolipit màng (chủ yếu là màng của tế bào nội mô), cũng như các loại tế bào khác nhau, như bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt và hồng cầu và ở các vùng mô quan trọng, như vùng cơ tim và vùng xương. Kháng nguyên quyết định này được biểu hiện cấu trúc ở toàn bộ các động vật có vú, ngoại trừ động vật linh trưởng và người.

Từ khi sinh ra, cơ thể người đã biểu hiện kháng thể kháng epitop này do hoạt tính kích thích liên tục bởi hệ vi khuẩn đường ruột.

Hiện nay, để thu được độ tương thích sinh học, mô ngoại lai sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được xử lý bằng glutaraldehyt.

Mặc dù đã được xử lý bằng glutaraldehyt, nhưng epitop alpha-Gal đã được kiểm chứng là vẫn phản ứng trong các bộ phận cấy ghép van tim có bán trên thị trường, nên sau khi cấy ghép, làm tăng tuần hoàn kháng thể kháng alpha-Gal ở cả bệnh nhân nhi và bệnh nhân trưởng thành.

Hơn nữa, phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành có thể làm tăng cường lắng đọng muối canxi, và gây ra tình trạng loạn dưỡng và vôi hóa van.

US 2015/087611 A1 đề cập đến phương pháp ổn định mô cấy được làm bằng mô liên kết bằng cách xử lý mô liên kết này bằng các hợp chất phenol bao gồm: axit tannic, tanin, hydroxytyrosol, oleuropein.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục nhược điểm của phương pháp điều trị thông thường, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học, cụ thể là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước sau: điều chế dung dịch chứa axit cafeic để bất hoạt ít nhất một phần kháng nguyên alpha-Gal ở mô này; ủ mẫu mô cần xử lý trong các dung dịch này trong điều kiện có kiểm soát; và rửa nhiều lần mô đã được xử lý; phương pháp này có thể được áp dụng cho mô liên kết nguyên vẹn và/hoặc mô liên kết được cố định, mô liên kết tương đồng hoặc mô liên kết không tương đồng, để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học, và sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên được tối ưu để đảm bảo bất hoạt epitop alpha-Gal ở mô tim mạch.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, để bất hoạt epitop nêu trên, do đó đảm bảo phương pháp điều trị hữu hiệu có thể được áp dụng cho các bộ phận cấy ghép giả sinh học khác nhau có bán trên thị trường.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, sau khi cấy ghép, không làm tăng tuần hoàn kháng thể kháng alpha-Gal.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, không tăng cường lắng đọng muối canxi, do đó hạn chế hội chứng loạn dưỡng và vôi hóa van.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên có thể được thực hiện bằng máy móc và thiết bị thông thường.

Để đạt được các mục tiêu nêu trên và các mục tiêu khác, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học, cụ thể là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước sau:

- điều chế dung dịch chứa axit cafeic để bất hoạt ít nhất một phần kháng nguyên alpha-Gal ở mô này;

- ủ mẫu mô cần xử lý trong các dung dịch này trong điều kiện có kiểm soát; và
- rửa nhiều lần mô đã được xử lý.

Sáng chế cũng đề cập đến mô liên kết thu được bằng phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, khác biệt ở chỗ mô liên kết này có ít nhất một phân yếu tố kháng nguyên ở dạng bất hoạt.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng mô liên kết, thu được bằng phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y.

Sáng chế cũng đề cập đến kit để thực hiện phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học nêu trên, khác biệt ở chỗ kit này bao gồm ít nhất:

- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đệm để hòa tan axit cafeic ở liều hữu hiệu nhất;
- một hoặc nhiều đồ chứa chứa axit cafeic ở liều hữu hiệu và dạng bột để hòa tan bằng dung dịch đệm;
- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đệm rửa; và
- tờ hướng dẫn sử dụng chứa thông tin về định mức thời gian và cách thức sử dụng kit này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua phần mô tả dưới đây cùng hình vẽ kèm theo, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô sinh học theo sáng chế.

Fig.1 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm bất hoạt kháng nguyên ngoại lai thu được từ phương pháp theo sáng chế theo biến thể thứ nhất;

Fig.2 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm bất hoạt kháng nguyên ngoại lai thu được từ phương pháp theo sáng chế theo biến thể thứ hai;

Fig.3 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm bất hoạt kháng nguyên ngoại lai thu được từ phương pháp theo sáng chế theo biến thể thứ ba; và

Fig.4 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm bất hoạt kháng nguyên ngoại lai thu được từ phương pháp theo sáng chế theo biến thể thứ tư.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ

Thuật ngữ “hợp chất phenol” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử chứa ít nhất một nhân thơm (vòng benzen) được gắn kết với một hoặc nhiều nhóm chức hydroxyl. Ví dụ không giới hạn về hợp chất phenol bao gồm phenol (phân tử chỉ chứa một vòng benzen duy nhất và các nhóm thế là nhóm hydroxyl, ví dụ phenol và hydroquinon), aldehyt phenolic (chứa cả nhóm phenolic và nhóm aldehyt, ví dụ aldehyt vanilic), axit phenolic (ví dụ axit xinamic), phenylamin (phân tử lưỡng tính chứa nhóm axit yếu và nhóm bazơ mạnh, ví dụ phenylalanin), hợp chất phenol (vòng phenol được gắn kết với một vòng benzen khác hoặc hợp chất dị vòng khác có nhóm chức hydroxyl/lacton/keton, ví dụ coumarin và xanthon), flavonoit (chứa hai vòng benzen được liên kết bởi chuỗi chứa ba nguyên tử cacbon cấu thành dị vòng chứa oxy, ví dụ catechin, flavonon, flavon, chalcon, flavanonol, flavanol, leucoanthoxyanidin, anthoxyanidin), phenylpropanoit (phân tử chứa vòng thơm với chuỗi béo mạch bên có ba nguyên tử cacbon, ví dụ axit hydroxyxinamic) và tanin. Theo sáng chế, thuật ngữ “phenol” và “polyphenol” có nghĩa giống nhau và có thể sử dụng thay thế cho nhau. Trong phương pháp và kit theo sáng chế, axit cafeic được sử dụng.

Thuật ngữ “kháng nguyên ngoại lai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử có nguồn gốc động vật có thể được nhận diện bởi hệ miễn dịch và gây đáp ứng kháng thể/quá trung gian miễn dịch/viêm ở người. Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng nguyên ngoại lai”, “kháng nguyên”, “kháng nguyên ngoại sinh”, “epitop” và “kháng nguyên quyết định” có nghĩa giống nhau và có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “mô liên kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô mạch, van tim, gân, dây chằng, màng ngoài tim, bó cơ, màng cứng, màng nhĩ, lớp đệm niêm mạc ruột, sụn, mô mỡ và mô xương, nhưng không chỉ giới hạn ở các mô này.

Thuật ngữ “mô được cố định” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô được xử lý bằng hợp chất hóa học hoặc hợp chất sinh học, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở glutaraldehyt, formaldehyt và quercitin.

Thuật ngữ “mô được cố định” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô được xử lý bằng hợp chất hóa học hoặc hợp chất sinh học, tạo ra các liên kết chéo nội mô có chức năng bảo vệ protein, lipid và cấu trúc tế bào, cũng như làm giảm đặc tính kháng nguyên tiềm tàng của vật chủ. Theo sáng chế, thuật ngữ “được cố định” và “được tạo liên kết chéo” có nghĩa giống nhau và có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “mô không tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô có nguồn gốc không phải từ người. Các mô này có thể được sử dụng trên lâm sàng dưới dạng nguyên vẹn hoặc không được xử lý, thay vì xử lý bằng các phương pháp tăng cường đặc tính tái tạo của chúng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp khử tế bào hoặc phương pháp phủ/hấp thụ hợp chất tiền tái tạo/bảo quản cho thành phần tế bào). Theo sáng chế, thuật ngữ “không tương đồng” và “ngoại sinh” có nghĩa giống nhau và có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “mô tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô có nguồn gốc từ người. Các mô này có thể được sử dụng trên lâm sàng dưới dạng nguyên vẹn hoặc không được xử lý, thay vì được xử lý bằng các phương pháp bảo quản (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp bảo quản lạnh đông) hoặc phương pháp xử lý tăng cường đặc tính tái tạo của chúng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp khử tế bào hoặc phương pháp phủ/hấp thụ hợp chất tiền tái tạo/bảo quản cho thành phần tế bào).

Thuật ngữ “phương pháp khử tế bào” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ hoặc nhiều phương pháp xử lý riêng biệt sử dụng dung dịch nước muối (ưu trương, đẳng trương hoặc nhược trương), dung dịch tẩy rửa (dạng ion, dạng không ion hoặc dạng lưỡng tính) và enzym, để loại bỏ một phần, chọn lọc hoặc toàn bộ thành phần tế bào có trong mô ban đầu, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Thuật ngữ “bộ phận cấy ghép giả sinh học” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bộ phận giả sinh học được tạo cấu trúc để thay thế bộ phận thiếu hụt của cơ quan (chi, bộ phận cơ thể hoặc mô) hoặc để khôi phục bộ phận bị hỏng, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y. Theo sáng chế, thuật ngữ “bộ phận cấy ghép giả sinh học”,

“cơ quan cấy ghép giả sinh học”, “bộ phận giả sinh học” hoặc “bộ phận cấy ghép” có nghĩa giống nhau và có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Thuật ngữ “động vật được loại bỏ kháng nguyên alpha-Gal” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật không biểu hiện gen mã hóa enzym alpha-galactosyltransferaza. Enzym này gắn kết glycoprotein và lipoprotein màng của epitop alpha-Gal. Sự vắng mặt của gen này gây sản sinh mô hoàn toàn không có epitop alpha-Gal và hoàn toàn tương đồng với mô của cơ thể người. Theo sáng chế, các mô mạch từ động vật được loại bỏ kháng nguyên alpha-Gal đã được sử dụng làm mẫu đối chứng âm tuyệt đối.

Ví dụ không giới hạn về lĩnh vực ứng dụng của phương pháp theo sáng chế được mô tả dưới đây.

Phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học theo sáng chế, cụ thể là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y, bao gồm các bước sau:

- điều chế dung dịch chứa axit cafeic để bất hoạt ít nhất một phân kháng nguyên alpha-Gal ở mô này;
- ủ mẫu mô cần xử lý trong các dung dịch này trong điều kiện có kiểm soát; và
- rửa nhiều lần mô đã được xử lý.

Phương pháp này cũng bao gồm bước tiếp theo để đánh giá mức độ bất hoạt hữu hiệu epitop alpha-Gal bằng cách so sánh các mô được xử lý/chưa được xử lý và mô được loại bỏ gen mã hóa enzym alpha-galactosyltransferaza của lợn.

Bước đánh giá này được bộc lộ trong Patent Italy số 0001409783 và EP2626701.

Mô sinh học được cấu thành từ mô liên kết có thể là mô liên kết nguyên vẹn, hoặc mô liên kết nguyên vẹn được cố định, hoặc mô liên kết được cố định.

Mô sinh học có thể là mô tương đồng hoặc mô không tương đồng.

Điều kiện có kiểm soát của bước ủ bao gồm ít nhất một điều kiện xử lý ở nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Sáng chế cũng đề cập đến mô liên kết thu được bằng phương pháp nêu trên, khác biệt ở chỗ mô liên kết này có ít nhất một phần yếu tố kháng nguyên ở dạng bất hoạt.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng mô liên kết nêu trên, để sản xuất bộ phận cây ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cây ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y.

Sáng chế cũng đề cập đến kit để thực hiện phương pháp bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô sinh học nêu trên, khác biệt ở chỗ kit này bao gồm ít nhất:

- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đệm để hòa tan axit cafeic ở liều hữu hiệu nhất;
- một hoặc nhiều đồ chứa chứa axit cafeic ở liều hữu hiệu và dạng bột để hòa tan bằng dung dịch đệm;
- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đệm rửa; và
- tờ hướng dẫn sử dụng chứa thông tin về định mức thời gian và cách thức sử dụng kit này.

Kit này được sử dụng dự phòng để tự xử lý bộ phận cây ghép giả sinh học đã được sản xuất bằng phương pháp nêu trên, hữu ích cho các cơ sở y tế, như phòng khám và bệnh viện.

Thực tế cho thấy rằng sáng chế hoàn toàn đạt được mục đích và mục tiêu dự định.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt epitop alpha-Gal ở mô để sản xuất bộ phận cây ghép giả sinh học để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng và/hoặc thú y.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt kháng nguyên nêu trên, do đó đảm bảo phương pháp điều trị hữu hiệu có thể được áp dụng cho các bộ phận cây ghép mô khác nhau có bán trên thị trường.

Do đó, sau khi cấy mô đã được xử lý bằng phương pháp này, sự tuần hoàn kháng thể kháng alpha-Gal không được gia tăng.

Hơn nữa, phương pháp theo sáng chế có thể hạn chế lắng đọng muối canxi, do đó không gây ra tình trạng loạn dưỡng và vôi hóa van.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện bằng máy móc và thiết bị thông thường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phương pháp bất hoạt kháng nguyên ngoại lai ở mô sinh học theo sáng chế, tức là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học, được sử dụng để bất hoạt epitop alpha-Gal ở mô cấu thành các bộ phận cấy ghép giả sinh học:

- Van tim hai lá có nguồn gốc từ lợn Hancock II™ (kiểu T510, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) được ký hiệu trên các hình vẽ là “HANCK”;
- Van tim gốc động mạch chủ Freestyle® (kiểu 995, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) được ký hiệu trên các hình vẽ là “FREE”;
- Van tim Carpentier-Edwards S.A.V. (kiểu 6650, Edwards Lifesciences LCC, California, USA) được ký hiệu trên các hình vẽ là “SAV”;
- Van tim hai lá Carpentier-Edwards Perimount Plus (kiểu 6900P, Edwards Lifesciences LCC, California, USA) được ký hiệu trên các hình vẽ là “PERI”;
- Miếng dán tim mạch CardioCel (kiểu C0404, Admedus Regen Pty Ltd, Perth, Australia) được ký hiệu trên các hình vẽ là “CC”; nhưng không chỉ giới hạn ở các bộ phận cấy ghép giả sinh học này.

Phương pháp bất hoạt epitop alpha-Gal ở các mẫu bộ phận cấy ghép giả sinh học, được mô tả chi tiết dưới đây.

Các mẫu mô được phân tách từ các bộ phận cấy ghép giả sinh học nêu trên. Các mẫu này được cân trong điều kiện ẩm sau khi thấm bằng giấy lọc trong (nằm trong khoảng từ 30 đến 50mg) và cắt thành các mảnh nhỏ để tăng bề mặt tiếp xúc của nó.

Đối với mỗi bộ phận cấy ghép giả sinh học, 4 nhóm mẫu khác nhau được điều chế (n = 8 đối với mỗi nhóm mẫu).

Mỗi nhóm mẫu sẽ được xử lý theo các phương pháp khác nhau.

4 dung dịch khác nhau được điều chế chứa dẫn xuất phenol, tương đương với 4 biến thể khác nhau của phương pháp theo sáng chế, và các mẫu sẽ được xử lý ở thể tích cuối cùng bằng 5mL, cụ thể là:

- phương pháp T1: axit cafeic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM (theo sáng chế nồng độ 20mM được ưu tiên)/dung dịch đệm natri phosphat chứa $600 \pm 50 \text{ U/mL}$ Tyrosinaza ở tỷ lệ bằng 1:20;

- phương pháp T2: axit cafeic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM (theo sáng chế nồng độ 20mM được ưu tiên) trong dung dịch NaOH $0,2 \text{ M} \pm 0,1 \text{ M}$;

- phương pháp T3: axit tanic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1M đến 1,5M (theo sáng chế nồng độ 1M được ưu tiên) trong dung dịch đệm natri phosphat;

- phương pháp T4: hydroxytyrosol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3mM đến 10mM (theo sáng chế nồng độ 6mM được ưu tiên) trong dung dịch NaOH $0,2 \text{ M} \pm 0,1 \text{ M}$.

Các dung dịch này được khuấy liên tục ở tốc độ vừa phải trong tổng cộng 12 ± 2 giờ ở nhiệt độ bằng $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Ở thời điểm kết thúc bước ủ, các mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch đẳng trương, trong 15 phút mỗi lần, và lần thứ ba bằng dung dịch đệm chuyên dụng (TP) trong 15 phút.

Epitop bất kỳ vẫn có hoạt tính trên bề mặt của các mẫu đã được xử lý được đánh giá bằng phương pháp cải biến dựa trên phương pháp được mô tả trong Patent Italy số 0001409783 và EP2626701.

Cụ thể, các mẫu mô đã được xử lý và rửa được đặt vào các ống thử nghiệm có bổ sung dung dịch đệm TP đến thể tích cuối cùng nằm trong khoảng từ $1000 \mu\text{L}$ đến $1500 \mu\text{L}$.

Sau đó, kháng thể đơn dòng của chuột, kháng trực tiếp epitop alpha-Gal, được bổ sung (tức là dòng kháng thể IgM M86), ở nồng độ ưu tiên bằng 1:50 (thể tích/thể tích) và hỗn hợp thu được được ủ trong 120 ± 10 phút ở nhiệt độ $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện ổn định ở tốc độ khuấy vừa phải.

Ở thời điểm kết thúc, các mẫu được ly tâm ở tốc độ bằng $14750 \times g$ trong 30 ± 5 phút ở nhiệt độ môi trường.

Trong quá trình ủ với kháng thể M86, đĩa 96 giếng được chuẩn bị, trong đó đáy của các giếng được phủ bằng alpha-Gal/albumin huyết thanh ở nồng độ bằng $5 \mu\text{g/mL}$ trong dung dịch đệm phosphat ($100 \mu\text{L}$ /giếng). Sau đó, đĩa 96 giếng này được ủ trong 60 ± 10 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C , mặc dù tốt hơn nếu để ổn

định hoàn toàn, đĩa 96 giếng này được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, đĩa 96 giếng này được ủ rửa 3 lần bằng dung dịch đệm phosphat (300µL/giếng) ở nhiệt độ môi trường.

Lần rửa thứ nhất được thực hiện trong 5 phút, hai lần rửa tiếp theo được thực hiện trong 3 phút.

Bước phong bế được thực hiện bằng albumin huyết thanh (300µL/giếng), sau đó ủ trong 60±10 phút ở nhiệt độ môi trường, trong bóng tối. Sau đó, đĩa 96 giếng này được rửa 3 lần như nêu trên.

Đối với mỗi giếng riêng biệt, dịch nổi (100µL), được lấy từ mỗi mẫu được xử lý sau khi ly tâm, được bổ sung vào.

Các mẫu được nạp vào đĩa, mỗi loại mẫu chiếm các giếng của toàn bộ cột. Sau đó, đĩa này được ủ trong 120±10 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, mặc dù tốt hơn nếu để ổn định hoàn toàn, đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C.

Sau đó, đĩa này được rửa 3 lần như nêu trên và dung dịch kháng thể thứ cấp (kháng thể đa dòng của thỏ kháng IgG của chuột) được tiếp hợp với enzym peroxidaza (dung dịch lý tưởng là dung dịch chứa kháng thể này ở nồng độ bằng 1:1000, 1:500 và 1:100, tốt hơn nếu dung dịch lý tưởng là dung dịch chứa kháng thể này ở nồng độ bằng 1:500) được bổ sung vào (100µL/giếng).

Sau đó, đĩa được ủ một lần nữa trong 60±10 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, mặc dù tốt hơn nếu để ổn định hoàn toàn, đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C.

Sau đó, đĩa này được rửa 3 lần như nêu trên. Dung dịch khai triển enzym peroxidaza được bổ sung vào (100µL/giếng), sau đó đĩa này được ủ trong 5±1 phút trong bóng tối.

Sau đó, dung dịch dừng phản ứng chứa H₂SO₄ được bổ sung vào (50µL/giếng), sau đó đĩa này được đọc trên máy đọc đĩa ở bước sóng bằng 450 nm.

Tỷ lệ phần trăm bất hoạt epitop alpha-Gal có thể được xác định bằng cách so sánh số lượng epitop thu được ở mô đối chứng được cấu thành từ mô mạch của động vật được loại bỏ kháng nguyên alpha-Gal, mô cấy ghép sinh học chưa được xử lý và mô được xử lý bằng các phương pháp xử lý khác nhau nêu trên.

Kết quả trên Fig.1 cho thấy phương pháp theo biến thể T1 có độ biến thiên về tỷ lệ phần trăm bất hoạt epitop rất cao giữa các mô cấy ghép sinh học được xử lý.

Phương pháp T1 có hiệu lực thấp hơn đáng kể so với các phương pháp còn lại, cho thấy tỷ lệ phần trăm bất hoạt epitop cao nhất bằng khoảng 43%.

Kết quả trên Fig.2 cho thấy phương pháp theo biến thể T2 chỉ với dẫn xuất axit xianamic thể hiện tác dụng bất hoạt kháng nguyên rất cao, với tỷ lệ phần trăm bất hoạt epitop nằm trong khoảng từ 90% đến 98%, tương đương với tỷ lệ phần trăm bất hoạt epitop thu được từ phương pháp theo biến thể T3 (tỷ lệ phần trăm bất hoạt nằm trong khoảng từ 80% đến 100%, Fig.3) và phương pháp theo biến thể T4 (tỷ lệ phần trăm bất hoạt nằm trong khoảng từ 89% đến 95%, Fig.4).

Các biến thể và cải biến khác của sáng chế có thể được thực hiện, toàn bộ các biến thể và cải biến này nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo. Hơn nữa, toàn bộ các chi tiết có thể được thay thế bằng các yếu tố khác, tương đương về mặt kỹ thuật.

Trong thực tế các thành phần và yếu tố được sử dụng, miễn là chúng tương thích với việc sử dụng cụ thể, và các kích thước và hình dạng ngẫu nhiên, có thể theo bất kỳ yêu cầu và tình trạng kỹ thuật của sáng chế.

Tài liệu tham khảo

- Nkomo VT et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet 2006;368: 1005-1011.
- Zeng LY et al. A prompt method to quantitative assay of alpha-Gal on pig cell surface without injury. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005;36(3):419-421.
- Galili U et al. A sensitive assay for measuring alpha Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. Transplantation 1998;65: 1129-1132.
- Chen RH et al. alpha-Gal and beta-Gal are preferentially expressed on porcine cardiac microvascular endothelium. Transplant Proc 2000;32:877-878.
- Feng W et al. Distribution of the Alpha-Gal epitope on adult porcine bone tissue. Transplant. Proceed. 2006;38:2247-2251.
- Galili U. The alpha Gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. Immun Cell Biol 2005;83 :674-686.

- Konakci KZ et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest* 2005;35(1): 17-23.
- Park CS et al. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. *J Heart Valve Dis* 2010; 19(1): 124-30.
- Lila N et al. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(5):538-43.
- Naso F et al. First quantitative assay of alpha- Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater* 2011 ;7(4): 1728-1734.
- Naso F et al. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. *Xenotransplantation* 2013;20(4):252-261.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học, cụ thể là mô được sử dụng để sản xuất bộ phận cấy ghép giả sinh học và/hoặc trong bộ phận cấy ghép giả sinh học đã được sản xuất, để sử dụng trong lĩnh vực lâm sàng trên người hoặc thú y, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước sau:

- điều chế dung dịch chứa axit cafeic để bất hoạt ít nhất một phần kháng nguyên alpha-Gal ở mô này;

- ủ mẫu mô cần xử lý trong các dung dịch này trong điều kiện có kiểm soát; và

- rửa nhiều lần mô đã được xử lý.

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ mô sinh học này được cấu thành từ mô liên kết nguyên vẹn, hoặc mô liên kết nguyên vẹn được cố định, hoặc mô liên kết được cố định.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ mô sinh học này là mô tương đồng hoặc mô không tương đồng.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ điều kiện có kiểm soát bao gồm ít nhất một điều kiện xử lý ở nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

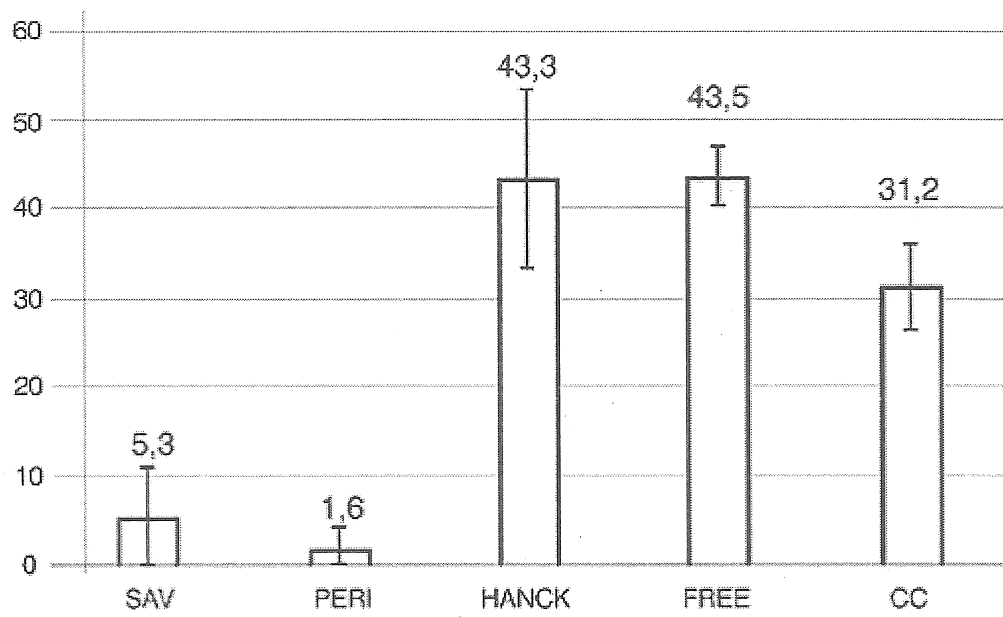
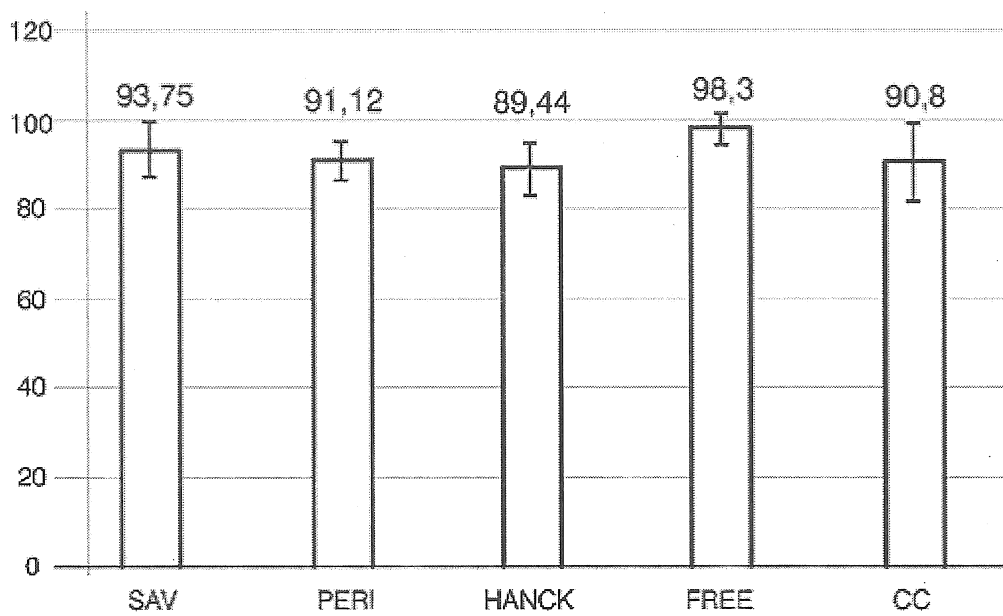
5. Kit để thực hiện phương pháp bất hoạt kháng nguyên alpha-Gal ở mô sinh học theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ kit này bao gồm ít nhất:

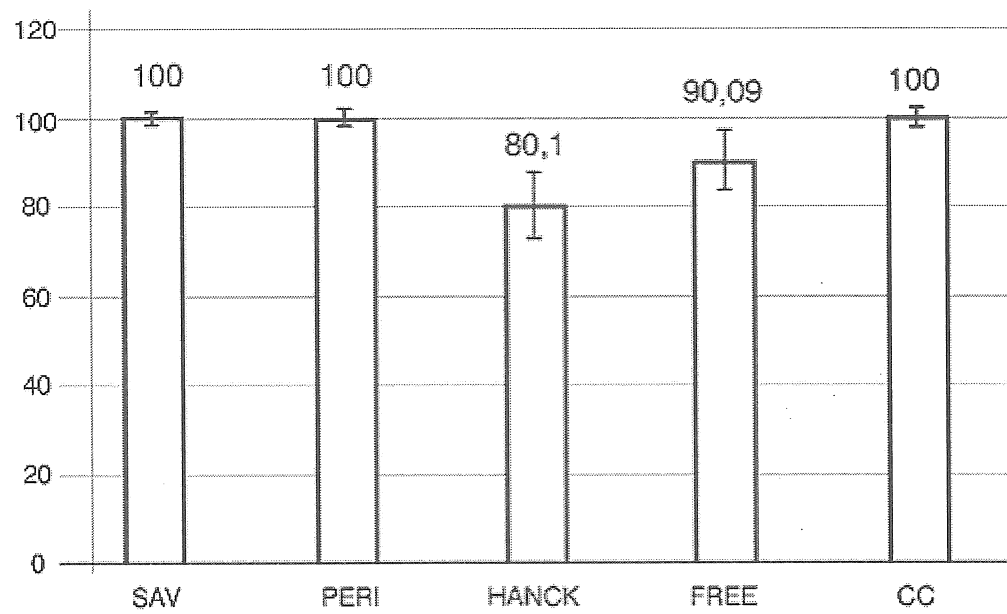
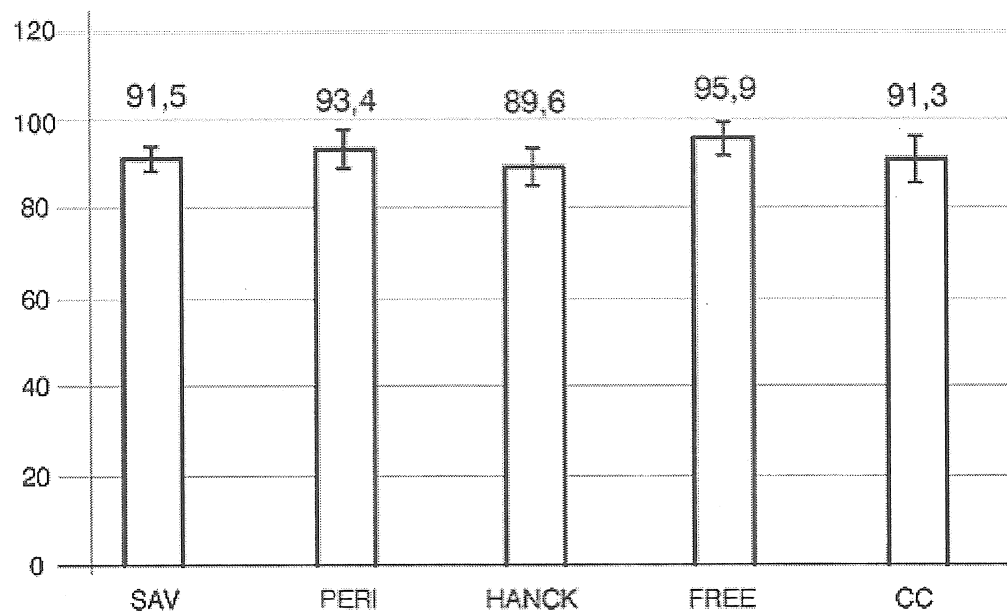
- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đậm để hòa tan axit cafeic ở liều hữu hiệu nhất;

- một hoặc nhiều đồ chứa chứa axit cafeic ở liều hữu hiệu và dạng bột để hòa tan bằng dung dịch đậm;

- một hoặc nhiều đồ chứa chứa dung dịch đậm rửa; và

- tờ hướng dẫn sử dụng chứa thông tin về định mức thời gian và cách thức sử dụng kit này.

**Fig.1****Fig.2**

**Fig.3****Fig.4**