



(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)



1-0049166

(51)^{2020.01} A61K 35/74; A61P 35/00; A61K 9/51

(13) B

(21) 1-2020-04331

(22) 17/12/2018

(86) PCT/CU2018/050005 17/12/2018

(87) WO 2019/129313 04/07/2019

(30) 2017-0173 27/12/2017 CU

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/03/2021 396A

(73) CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR (CU)

Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, La Habana, Habana 11 600, CUBA

(72) MESA PARDILLO, Circe (CU); OLIVER RÍOS, Liliana (CU); ALVAREZ ARZOLA, Rydell (CU); PEÑA SÁNCHEZ, Vladimir (CU); FERNÁNDEZ MOLINA, Luis Enrique (CU); VALDÉS ZAYAS, Anet (CU); RÁBADE CHEDIAK, Maura Lisett (CU); AGUIAR GARCÍA, Lena (CU); HERNÁNDEZ de la Rosa, Lourdes (CU); FERNÁNDEZ GÓMEZ, Audry (CU); PÉREZ RUÍZ, Leslie (CU); RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Camilo (CU); GRACIA MEDINA, Elias Antonio (CU); RUBIO HERNÁNDEZ, María Caridad (CU); VALDÉS GUERRERO, Orlando (CU); CURBELO HAREDA, Idelmis (CU).

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

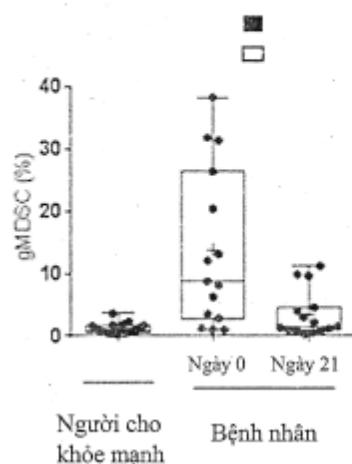
(54) DƯỢC PHẨM CHỨA HẠT NANO VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT NANO

(21) 1-2020-04331

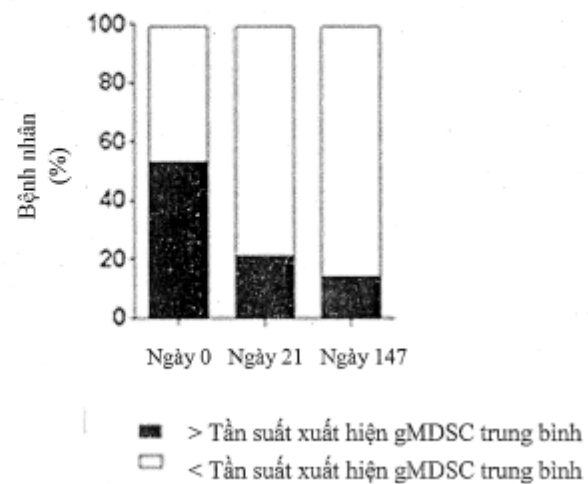
(57) Sáng chế đề xuất được phẩm mà thành phần hoạt tính của nó bao gồm liên hợp giữa màng của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* và GM3 gangliosit theo tỷ lệ liên hợp dư protein, có các đặc điểm đặc trưng về kích cỡ, diện tích mặt và hình thái liên kết với hệ hạt nano để tạo ra các đặc tính có lợi, được dùng để điều biến miễn dịch vì nó làm giảm đáng kể số lượng tế bào ức chế có nguồn gốc tủy xương, tác động đến đáp ứng của tế bào lympho T và sự sống sót của bệnh nhân có khối u.

Hình 4

a)



b)



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực miễn dịch bằng công nghệ nano và miễn dịch chống ung thư, cụ thể là được phẩm điều biến miễn dịch dùng để điều trị bệnh nhân ung thư và/hoặc bệnh nhân viêm mạn tính do virus gây ung thư. Cụ thể, sáng chế đề xuất được phẩm điều biến miễn dịch chứa hạt nano chuyên cản trở tế bào ức chế có nguồn gốc tủy xương (Myeloid-derived suppressor cells - MDSCs) một cách đặc hiệu ở các bệnh nhân này và ngoài ra còn phục hồi đáp ứng của tế bào T.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, các kết quả lâm sàng quan trọng đã đạt được bằng việc sử dụng kháng thể (Antibodies - Abs) ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, với khả năng kích thích đáp ứng mục tiêu lâu dài cùng với tác động đáng kể lên sự sống sót của bệnh nhân. Các phương pháp điều trị này điều chỉnh hệ miễn dịch và phục hồi khả năng tiêu diệt tế bào u của bệnh nhân, dẫn đến sự tái sinh của liệu pháp miễn dịch trong điều trị ung thư với sự tập trung đặc biệt vào việc thiết kế thuốc điều biến miễn dịch mới.

Tuy nhiên, có những dòng ức chế đáp ứng miễn dịch chống khối u khác, đây là những mục tiêu quan trọng để phát triển của thuốc điều biến miễn dịch mới (Malmberg K.J. và đồng tác giả (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53 (10):879-92). Tế bào ức chế có nguồn gốc tủy xương (MDSC) tạo thành một trong những quần thể tế bào chính được huy động bởi khối u có khả năng ức chế đáp ứng miễn dịch (Mantovani A. và đồng tác giả (2010) *Curr Opin Immunol* 22 (2):231-7; Condamine T. và đồng tác giả (2011) *Trends Immunol* 32 (1):19-25). Cụ thể là, như được đề xuất bởi Shipp và đồng tác giả trong bài báo tổng quan, tần suất xuất hiện tế bào ức chế có nguồn gốc tủy xương tuần hoàn là yếu tố tiên lượng xấu ở bệnh nhân có khối u ở nhiều vị trí khác nhau. Ngoài ra, mức độ tuần hoàn cao của các quần thể này liên quan

đến sự giảm hiệu quả của các liệu pháp thông thường như hóa trị, xạ trị và cả kháng thể chống lại điểm kiểm soát miễn dịch (Shipp C. và đồng tác giả (2016) *Cell Mol Life Sci* 73(21):4043-61). Ở người, đa số đồng ý rằng có ba quần thể MDSC: MDSC giai đoạn sớm (the early stage MDSCs - eMDSC), được xác định là $\text{LIN}^- \text{CD11b}^+ \text{CD33}^+ \text{HLA-DR}^-$; MDSC đơn nhân (monocytic MDSCs - mMDSC), được xác định là $\text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^{\text{thấp}/-}$ - và MDSC hạt (granulocytic MDSCs-gMDSC) có kiểu hình $\text{CD11b}^+ \text{CD33}^+ \text{CD14}^- \text{CD15}^+ (\text{CD66b}^+)$ (Bronte V. và đồng tác giả (2016) *Nat Commun* 7:12150). Cả ba quần thể này đều được xem là các quần thể tế bào ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu khối u (Shipp C. và đồng tác giả (2016) *Cell Mol Life Sci* 73 (21):4043-61).

Các chiến lược nghiên cứu hiện đang phát triển nhằm chống lại sự ức chế miễn dịch gây ra bởi MDSC tập trung vào ba phương pháp: (1) làm giảm số lượng tế bào ức chế, (2) tác động đến chức năng của chúng và (3) tác động đến sự biệt hóa của chúng. Trong các chiến lược này, các kết quả đáng khích lệ đã được báo cáo với một số thuốc đã được đánh giá (Najjar Y. G. và đồng tác giả (2013) *Frontiers in Oncology* 3 (49):1-9).

Trong số các chiến lược trị liệu nhằm vào MDSC, đặc biệt liên quan đến sáng chế là chiến lược dựa trên hệ hạt nano. Đã biết rằng hạt nano mang lại hàng loạt ứng dụng, và tùy thuộc vào kích cỡ và các đặc điểm bề mặt mà chúng hoạt động khác nhau *in vivo*. Kích cỡ, ví dụ, là điều kiện xác định các vị trí lưu dẫn, còn các đặc tính bề mặt ảnh hưởng đến độ bám dính và các cơ chế bắt giữ (Wilkerson A. và đồng tác giả (2017) *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17:1843-57). Về mặt này, theo báo cáo của Serda R.E., hệ hạt có đường kính nằm trong khoảng từ 500 đến 2000nm được ưu tiên bắt giữ tại vị trí tiêm và được chuyển đến hạch bạch huyết (lymph nodes-- LN), trong khi các hạt có đường kính nằm trong khoảng từ 20 đến 200nm được dẫn lưu thụ động đến các hạch bạch huyết, nơi chúng tiếp xúc với các tế bào tại đó (Serda R.E. (2013) *Int J of Nanomed* 8:1683-1696).

Cho đến nay, chỉ có sáu chiến lược nghiên cứu dựa trên hạt nano có tác động đến MDSC đã được mô tả, trong số đó là: hạt nano mang gemxitabin, hạt nano mang chemokin CCL21, hạt nano mang CpG, liposom mang axit retinoic toàn liên kết-trans và hạt nano mang glucan (Wilkerson A. và đồng tác giả (2017) *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17:1843-57). Năm chiến lược này giống nhau ở ba đặc điểm cơ bản: kích cỡ của hạt nano được bao gồm nằm trong khoảng từ 30 đến 250nm, việc sử dụng chúng bị giới hạn ở mô hình chuột và chúng chứa các hạt không có tác động thực sự đến MDSC mà chúng là hệ thống mang tác nhân sinh học.

Chiến lược thứ sáu dựa trên hệ hạt nano có tác động đến MDSC là việc sử dụng proteoliposom rất nhỏ (very small proteoliposom - VSSP) chứa GM3 gangliosit. Các chế phẩm này được xem là giải pháp kỹ thuật gần nhất với sáng chế. Ban đầu, Molina và đồng tác giả của bằng sáng chế Mỹ 8.591.917 B2 mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch ở những người sử dụng VSSP qua đường tiêm dưới da (administered subcutaneously - SC). Ngoài ra, các nghiên cứu của Fernández và đồng tác giả và Oliver và đồng tác giả đã chứng minh rằng ở chuột khỏe mạnh, mang khối u hoặc chuột bị giảm bạch cầu do hóa trị liệu, việc sử dụng VSSP đã làm gia tăng đáng kể số lượng tế bào ở lách có kiểu hình tương tự kiểu hình của MDSC nhưng khả năng ức chế đã bị giảm một cách đáng kể (Fernández A. và đồng tác giả (2011) *J Immunol* 186:264-74; Oliver L. và đồng tác giả (2012) *Vaccine* 30:2963-72). Các nghiên cứu khác cũng mô tả rằng việc sử dụng VSSP ở chuột mang khối u ngăn chặn sự trình diện chéo của các kháng nguyên do MDSC đã được huy động bởi khối u và biệt hóa chúng thành tế bào trình diện kháng nguyên (Fernández A. và đồng tác giả (2014) *J Immunotherapy of Cancer* 2:5). Phương pháp tạo ra VSSP được mô tả bởi Rodríguez và đồng tác giả trong đơn US số 6.149.921, nhấn mạnh rằng sự liên hợp giữa protein của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* và một lượng dư gangliosit GM3 với sự có mặt của chất tẩy rửa, chất tẩy rửa này sau đó được loại bỏ bằng phương pháp thẩm tách. Ngoài ra, Estevez và đồng tác giả mô tả rằng sau khi thẩm tách, bước siêu ly tâm được thực hiện để loại bỏ các liên hợp có khối lượng và kích cỡ lớn hơn (Estevez F. và đồng tác giả (2000) *Vaccine* 18:190-7).

Nguyên lý hoạt động mới của chế phẩm điều biến miễn dịch này được mô tả theo sáng chế còn bao gồm các liên hợp giữa túi màng của vi khuẩn *N. meningitidis* và GM3 gangliosit. Chế phẩm này có các đặc điểm đặc trưng về kích cỡ, điện tích mặt và hình thái liên hợp với hệ hạt nano mà chưa từng được mô tả trước đó trong giải pháp kỹ thuật bất kỳ hoặc công bố khoa học trước đây. Các đặc tính này làm cho sáng chế có các đặc tính có lợi và đáng ngạc nhiên về tác dụng của chúng đối với MDSC so với các đặc điểm đã được mô tả trước đây bởi Fernández A. và đồng tác giả và Oliver L. và đồng tác giả. Tốt hơn là, sáng chế được thực hiện bằng cách tiêm dưới da để điều trị bệnh nhân có khối u, và trái với những gì được bộc lộ trong phương pháp đó, tạo ra sự thuận tiện và làm giảm đáng kể số lượng gMDSC và mMDSC, và có tác động đáng kể đối với đáp ứng của tế bào lympho T và sự sống sót của bệnh nhân đã được điều trị. Vì vậy, tính mới của sáng chế bao gồm việc tạo ra được phẩm điều biến miễn dịch mới có tác dụng làm giảm lượng MDSC ở bệnh nhân có khối u.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất được phẩm dùng để điều biến đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân ung thư, chứa hạt nano được tạo thành bởi liên hợp kỵ nước giữa phức hệ protein màng ngoài (outer membrane protein complex - OMPC) của vi khuẩn *N. meningitidis* và GM3 gangliosit, trong đó, tỷ lệ liên hợp protein-gangliosit nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 10:1.

Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế được đặc trưng bởi phân phối đơn đỉnh của thể tích các hạt có kích cỡ nằm trong khoảng từ 15 đến 25nm, chỉ số đa phân tán bằng 0,230, điện thế Z âm có trị số danh định nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng đối tượng của được phẩm theo sáng chế trong điều trị ung thư, và cụ thể là làm được phẩm điều biến miễn dịch MDSC ở bệnh nhân ung thư có gia tăng sự có mặt của các tế bào này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị đối tượng cần điều trị bằng phương pháp này, bao gồm bước cho dùng được phẩm được mô tả theo sáng chế bằng cách tiêm dưới da, tiêm trong da, tiêm bắp, tiêm vào khối u hoặc bôi trực tiếp lên màng

nhảy với tần suất hàng tuần cho tổng lượng ít nhất là bốn liều và sau đó cho dùng liều duy trì sau mỗi hai tuần hoặc sau mỗi tháng trong ít nhất sáu tháng.

Sáng chế còn mô tả phương pháp chọn bệnh nhân ung thư làm đối tượng được điều trị bằng được phẩm đã mô tả, bao gồm các bước sau:

- tách mẫu máu và/hoặc mẫu mô của bệnh nhân và
- xác định lượng MDSC trong mẫu máu và/hoặc mẫu mô đã nêu

Bệnh nhân có MDSC với số lượng lớn hoặc số MDSC tuyệt đối trong máu là cao hoặc bệnh nhân có kết quả xét nghiệm dương tính về mức độ xâm nhiễm của MDSC trong mẫu khối u sẽ được chọn làm bệnh nhân cho việc điều trị này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Hình 1. Đo đường kính hạt VSSP-iMod bằng phương pháp quang phổ tương quan photon.

Hình 2. Đo điện thế Z của hạt VSSP-iMod bằng phương pháp quang phổ tương quan photon.

Hình 3. Hình ảnh hình thái của hạt VSSP-iMod qua kính hiển vi lực nguyên tử.

Hình 4. Đánh giá hiệu quả điều trị bằng VSSP-iMod trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào thận có di căn (metastatic renal cell carcinoma - mRCC) thông qua kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy, dựa trên: **a)** tần suất xuất hiện gMDSC và **b)** tỷ lệ bệnh nhân có tần suất xuất hiện gMDSC cao hơn và thấp hơn tỷ lệ trung bình.

Hình 5. Đánh giá hiệu quả điều trị bằng VSSP-iMod lên khả năng ức chế của MDSC đối với sự tăng sinh của: **a)** tế bào lympho TCD4+ và **b)** tế bào lympho TCD8+ thông qua kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy.

Hình 6. Sử dụng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy để đánh giá hiệu quả điều trị bằng VSSP-iMod ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến vú dựa trên: **a)** tần suất xuất hiện và % bệnh nhân có tần suất xuất hiện gMDSC cao hơn và thấp hơn tần suất trung

bình, b) tần suất xuất hiện và % bệnh nhân có tần suất xuất hiện mMDSC cao hơn và thấp hơn tần suất trung bình.

Hình 7. Xác định hiệu quả điều trị bằng VSSP-iMod dựa trên số tế bào lympho TCD8+ tuyệt đối ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến vú bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm điều biến miễn dịch

Sáng chế đề xuất hệ điều biến miễn dịch làm giảm đáng kể MDSC tuần hoàn ở các bệnh nhân ung thư có tế bào này tuần hoàn hoặc trong khối u với số lượng lớn. Hệ điều biến miễn dịch có được xác định là hệ có khả năng loại bỏ hoặc điều biến các chất trung gian ức chế bất kỳ của đáp ứng miễn dịch, như trường hợp MDSC.

Đối tượng điều biến miễn dịch được bảo hộ trong sáng chế bao gồm hạt nano thu được từ màng ngoài của vi khuẩn Gram âm, *N. meningitidis* liên hợp với GM3 gangliosit. Sáng chế chứng minh rằng trước tiên, phức hệ protein màng ngoài của vi khuẩn (the outer membrane protein complex - OMPC) *N. meningitidis* được phân tán trong dung dịch đệm Tris-HCl chứa hỗn hợp bao gồm natri deoxycholat (với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 40 mM) và natri dodecyl sulfat (với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10 mM) trong lò phản ứng khuấy trộn trong khoảng thời gian từ 1 đến 36 giờ.

Tiếp đó, bổ sung GM3 gangliosit với lượng nhỏ hơn từ 0,6 đến 10 lần lượng OMPC đã bổ sung sao cho tỷ lệ protein:gangliosit nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 10:1 và tiếp tục khuấy. Việc tạo ra hạt nano đạt được thông qua việc sử dụng hệ thống lọc tiếp tuyến bằng màng có khối lượng nằm trong khoảng từ 10kDa đến 100kDa và ở áp lực xuyên màng nằm trong khoảng từ 1,15 đến 1,75 bar sao cho các chất tẩy rửa này được loại bỏ hoàn toàn. Dung dịch còn lại sau khi siêu lọc được siêu ly tâm ở tốc độ 100.000 g và được cô đặc để điều chỉnh nồng độ của nó tới nồng độ OMPC mong

muốn nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2mg/ml và được vô trùng bằng cách lọc trong bộ lọc với màng lọc có kích cỡ lỗ là 0,2 μ m.

Nhờ kết hợp tỷ lệ giữa khối lượng protein và gangliosit thích hợp với lượng protein cùng với quá trình siêu lọc tiếp tuyến ở điều kiện được kiểm soát, đã tạo ra chế phẩm có các đặc tính xác định, được các tác giả sáng chế đặt tên là VSSP-iMod. Phân tích hình thái, kích cỡ, mật độ điện tích siêu tới hạn của các hạt cho thấy sự có mặt của dạng hạt nano không đồng nhất, có kích cỡ nằm trong khoảng từ 15 đến 25nm và có điện thế Z âm với trị số danh định nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV.

Phương pháp xác định và/hoặc lựa chọn bệnh nhân cho việc điều trị bằng VSSP-iMod

Để lựa chọn bệnh nhân sẽ được điều trị bằng VSSP-iMod, cần xác định lượng gMDSC và mMDSC mà có thể ức chế đáp ứng đặc hiệu tế bào T đối với khối u. Sự gia tăng MDSC do sự có mặt của khối u có thể được xác định bằng cách đánh giá các quần thể phụ khác nhau của các tế bào này trong hệ tuần hoàn hoặc trong vi môi trường xung quanh khối u. Ngoài ra, sự có mặt của nó nói lên rằng có sự gia tăng một số protein huyết tương và ADN tuần hoàn. Nguồn mẫu để đánh giá là cả hai nguồn: mẫu máu ngoại vi và mẫu khối u bao gồm nhưng không bị hạn chế bởi sinh thiết khối u, protein huyết tương tuần hoàn, dịch cổ trướng, và ADN tuần hoàn.

Sự gia tăng số lượng tế bào này có thể được xác định dựa vào xét nghiệm dùng để chẩn đoán hoặc tiên lượng, bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy, hóa mô miễn dịch (immunohistochemistry - IHC), ELISA, huỳnh quang miễn dịch hoặc PCR (polymerase chain reaction). Mặt khác, bệnh nhân không bị tăng lượng MDSC do giai đoạn bệnh hoặc vị trí khối u là người có số lượng cao hơn so với số lượng của người hiến tặng khỏe mạnh bình thường nhưng lại không đạt tới số lượng đáng kể đã quan sát thấy ở bệnh nhân có bệnh lý tương tự.

Việc xác định lượng MDSC trong mẫu máu của bệnh nhân được thực hiện bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy, trong đó cả hai quần thể đều được phân tích trong vùng $FSC^{trung\ bình/cao}/SSC^{thấp/cao}$. Cụ thể là, đối với quần thể gMDSC, quần thể dương tính kép với CD11b và CD33 là được chọn và trong quần thể này, quần thể phụ

dương tính với CD66b và âm tính với CD14. Đối với mMDSC, quần thể có HLA-DR âm tính hoặc biểu hiện ở mức độ thấp và dương tính với CD14 là được chọn. Dựa trên các kết quả này, và liên quan đến cùng cách xác định đối với người hiến tặng khỏe mạnh tương ứng về độ tuổi và giới tính, lượng MDSC được phân loại theo tần suất xuất hiện hoặc số tuyệt đối của chúng như sau:

- Âm tính: Trị số phần trăm và/hoặc số nằm trong khoảng được xác định bởi giá trị trung bình của các trị số bình thường (M) $\pm$ độ lệch chuẩn với độ tin cậy là 95%.

- Thấp: Trị số phần trăm và/hoặc số lượng MDSC nằm trong khoảng $2M \leq \text{MDSC} < 3M$ so với M.

- Cao: Trị số phần trăm và/hoặc số lượng MDSC có giá trị $3M \leq \text{MDSC}$.

Bệnh nhân có tần suất xuất hiện hoặc số MDSC tuyệt đối trong máu là cao sẽ được điều trị bằng VSSP-iMod.

Để xác định lượng MDSC trong mẫu mô khối u, có thể sử dụng phương pháp đánh giá bằng kỹ thuật IHC đối với tế bào CD33+. Nhằm mục đích này, tỷ lệ tế bào CD33+ trong mô này phải được xác định và được thể hiện như sau:

- Âm tính: Dưới 10% tế bào dương tính

- Dương tính/MDSC xâm nhiễm ở mức độ thấp: từ 10-19% tế bào dương tính

- Dương tính/MDSC xâm nhiễm ở mức độ cao: Trên 20% tế bào dương tính

Tùy thuộc vào loại mô và giai đoạn bệnh mà có thể xác định khối u có huy động MDSC là dương tính liên quan đến mức độ xâm nhập của nó bởi tế bào CD33+.

Ứng dụng trong điều trị và các phương pháp điều trị

Sáng chế đề xuất chế phẩm điều biến miễn dịch chuyên dùng để làm giảm lượng MDSC ở cả hai kiểu hình gMDSC và mMDSC, thiết lập giải pháp được quan tâm đặc biệt trong lĩnh vực miễn dịch chống ung thư, trong đó, đã biết rằng MDSC tạo thành hạch ức chế rất quan trọng trong đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Sự tiến triển của một số khối u được đi kèm bởi sự huy động MDSC tại vị trí khối u, theo đó, các cơ chế chuyên biệt ức chế đáp ứng miễn dịch chống khối u của tế bào lympho T và NK đã được mô tả. Sáng chế đề xuất rằng ở các bệnh nhân bị tăng gMDSC và/hoặc mMDSC trong hệ tuần hoàn và/hoặc trong khối u, số lượng các tế bào này có thể được giảm một cách đáng kể bằng cách điều trị với VSSP-iMod. Việc làm giảm này sẽ cho phép đáp ứng miễn dịch chống khối u tự nhiên diễn ra ở các bệnh nhân này hoặc ở bệnh nhân đã được điều trị bằng liệu pháp không bị ngăn cản bởi MDSC, dẫn tới sự sống sót của bệnh nhân được điều trị.

Chế phẩm điều biến miễn dịch VSSP-iMod theo sáng chế có thể được đưa vào cơ thể bệnh nhân bằng cách: tiêm dưới da, tiêm trong da, tiêm bắp, tiêm vào trong khối u hoặc bôi trực tiếp lên màng nhày.

Các dạng ung thư có thể được điều trị bằng chế phẩm điều biến miễn dịch VSSP-iMod theo sáng chế là các dạng đã được báo cáo rằng chúng huy động MDSC để tạo ra cơ chế ức chế miễn dịch trong đáp ứng miễn dịch chống khối u. Cụ thể hơn là, các ví dụ về các dạng ung thư này bao gồm ung thư tế bào hắc tố, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư phổi không tế bào nhỏ, bạch cầu lympho mãn tính, ung thư biểu mô tế bào vảy của thực quản, u lympho Hodgkin, ung thư biểu mô thận và ung thư biểu mô tuyến vú.

Giới hạn liều của chế phẩm điều biến miễn dịch VSSP-iMod được sử dụng ở người là nằm trong khoảng từ 100 μg đến 2 mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 200 μg đến 1200 μg (theo lượng OMPC).

Chế phẩm điều biến miễn dịch theo sáng chế được sử dụng trên các đối tượng với tần suất hàng tuần cho tổng lượng ít nhất là bốn liều để làm giảm nhanh lượng MDSC và sau đó cho dùng liều duy trì hai tuần một lần hoặc mỗi tháng một lần trong ít nhất sáu tháng. Việc điều trị này có thể được thực hiện thường xuyên khi bệnh nhân yêu cầu điều trị.

Sáng chế còn được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và hình vẽ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Các ví dụ này bao gồm cả các phần thử nghiệm mà cho phép kiểm tra các đặc tính lý - hóa cụ thể của VSSP-iMod này và tác dụng của nó trong việc làm giảm lượng MDSC ở các bệnh nhân đã được điều trị. Ngoài ra, các ví dụ này minh họa tác động của việc làm giảm này đối với đáp ứng của tế bào lympho T cũng như đối với sự sống sót của bệnh nhân đã được điều trị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. VSSP-iMod có kích cỡ và điện tích bề mặt xác định

Kích cỡ được tính bằng nanomet và điện thế Z của các hạt tạo nên VSSP-iMod được đo bằng phương pháp quang phổ tương quan photon. Các mẫu được đo ba lần, các trị số kích cỡ và điện thế Z thu được bằng cách sử dụng lần lượt các thuật toán CONTIN và Smoluchowski. Như được thể hiện trong Hình 1, VSSP-iMod này có phân phối đơn đỉnh của thể tích các hạt có kích cỡ nằm trong khoảng từ 15 đến 25nm, có chỉ số đa phân tán (polydispersity index - PDI) bằng 0,230, điều này có nghĩa là có mặt các hạt không đồng đều về kích cỡ. Ngoài ra, VSSP-iMod này còn có điện thế Z âm và trị số danh định của nó là nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV, như được thể hiện trong Hình 2.

Ví dụ 2. Hình thái dạng hạt nano của VSSP-iMod

Hình ảnh VSSP-iMod thu được từ kính vi lực nguyên tử nhiều chế độ và giá đỡ silicon được sử dụng. 50µl mẫu được nhỏ lên tấm mica đã được chức năng hóa trước đó bằng dung dịch niken clorua 50mmol/l. VSSP-iMod này được pha loãng trong dung dịch đệm Tris nồng độ 10mmol/l có độ pH bằng 8,5 với độ pha loãng bằng 1/10 trước khi nhỏ lên tấm mica này. Hình ảnh trong Hình 3 thể hiện chế phẩm không đồng nhất chứa cấu trúc dạng hạt nano có hình cầu với kích cỡ hàng chục nanomet, tương ứng với kết quả đo được bằng phương pháp quang phổ tương quan photon.

Ví dụ 3. VSSP làm giảm tần suất xuất hiện và hoạt động ức chế của MDSC ở bệnh nhân mRCC.

Đã đánh giá tác dụng của VSSP-iMod đối với MDSC ở bệnh nhân mRCC. Nhằm mục đích này, mười lăm bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh này đã được điều trị bằng 400 μ g VSSP-iMod qua đường tiêm dưới da ở vùng delta. Tổng số bốn liều VSSP-iMod đã được sử dụng với tần suất hàng tuần, sau đó dùng liều duy trì hàng tháng cho tới khi kết thúc 6 tháng điều trị. Trong thử nghiệm này, tần suất xuất hiện gMDSC đã được đánh giá bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy. Nhằm mục đích này, tổng số 200.000 tế bào đã được phân tích và tỷ lệ gMDSC đã được xác định bằng cách đánh giá kiểu hình CD11b⁺/CD66b⁺/CD14⁻ trong PBMC tổng số. Để làm đối chứng, tần suất xuất hiện gMDSC ở 15 người cho khỏe mạnh tương ứng về độ tuổi và giới tính đã được đánh giá. Như đã thấy trong Hình 4a, VSSP-iMod này đã làm giảm tần suất xuất hiện gMDSC tuần hoàn ở bệnh nhân sau 21 ngày hoặc ba liều sau khi bắt đầu điều trị. Tình trạng kỹ thuật này bộc lộ rằng bệnh nhân có số lượng gMDSC dưới mức trung bình đã được thiết lập ở bệnh nhân ở một số vị trí, có tỷ lệ sống cao hơn đáng kể so với bệnh nhân có số lượng ít hơn (Shipp C. và đồng tác giả (2016) Cell, Mol.Life, Sci. 73 (21):4043-61). Việc phân tích tỷ lệ bệnh nhân có tần suất xuất hiện gMDSC cao hơn và thấp hơn tần suất trung bình được thể hiện trong Hình 4b. Như đã thấy, sau khi điều trị bằng VSSP-iMod, chỉ có khoảng 20% bệnh nhân đã được điều trị duy trì MDSC ở mức cao. Kết quả này được duy trì đến ngày thứ 147 hoặc sau tháng thứ năm, đã chỉ ra rằng tác dụng của VSSP-iMod được duy trì trong suốt quá trình điều trị.

Ở các bệnh nhân này, kết quả của đáp ứng của tế bào lympho T do tác dụng của VSSP-iMod lên MDSC cũng được đánh giá trong thử nghiệm tăng sinh bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy. Tổng số 40x10⁶ tế bào từ PBMC của các bệnh nhân này được sử dụng làm vật liệu ban đầu. Tế bào CD11b⁺ được tinh sạch bằng cách sử dụng hạt từ tính được gắn kháng thể đặc hiệu CD11b. Đoạn âm tính với CD11b- được đánh dấu là CFSE và được nuôi cấy một mình hoặc cùng với tế bào CD11b⁺ theo tỷ lệ 5:1

trong thời gian 96 giờ. Hình 5 thể hiện tỷ lệ tăng sinh tương đối của tế bào lympho T vào ngày thứ 0 và ngày thứ 21 sau khi điều trị bằng VSSP-iMod ở bệnh nhân RCC. Như đã thấy trong Hình 5a, sự tăng sinh của tế bào lympho TCD4+ tăng lên vào ngày thứ 21, tác dụng tương tự tác dụng đã quan sát ở tế bào lympho TCD8 + (Hình 5b), điều này có nghĩa là VSSP-iMod này có thể điều chỉnh sự ức chế sự tăng sinh tế bào T qua trung gian MDSC ở bệnh nhân RCC.

Phần lớn các bệnh nhân tham gia thử nghiệm này đều có chất lượng cuộc sống tốt sau khi kết thúc điều trị, như đã thiết lập trong phác đồ, đã quyết định rằng họ tiếp tục được tiêm chủng hàng tháng. Việc kéo dài thời gian điều trị đã duy trì gMDSC ở mức dưới trung bình ở ngày 0 và thời gian sống trung bình của tổng số bệnh nhân trong thử nghiệm này là 37,5 tháng (Bảng 1). Trị số này là cao hơn nhiều so với trị số trung bình là 6,6 tháng đã được báo cáo trước đó ở bệnh nhân tương tự được điều trị bằng interferon, tiêu chuẩn điều trị hiện tại ở Cuba. Ngoài ra, hướng dẫn thực hành lâm sàng cho mRCC của *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) phân loại bệnh nhân theo mô hình của *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) thành tiên lượng tốt, trung bình và xấu. Các hướng dẫn này bộc lộ rằng bệnh nhân mắc mRCC được điều trị bằng các liệu pháp chống lại yếu tố tăng trưởng nội mạch có thời gian sống sót trung bình là 27 tháng trong trường hợp các bệnh nhân này được chẩn đoán là có tiên lượng trung bình, trong khi 75% bệnh nhân được chẩn đoán là có tiên lượng tốt thì sống sót đến 24 tháng. So sánh tương đối giữa các trị số được nêu trong hướng dẫn so với các giá trị thu được bởi VSSP-iMod chỉ ra rằng tác dụng của VSSP-iMod đối với gMDSC cũng làm cho tỷ lệ sống cao hơn so với tiêu chuẩn định mức trong hướng dẫn NCCN. Trong thử nghiệm VSSP-iMod này, 100% bệnh nhân có tiên lượng tốt sống sót đến 36 tháng và bệnh nhân có tiên lượng trung bình có thời gian sống trung bình là 42 tháng.

Bảng 1. Sự sống sót của mRCC bệnh nhân được điều trị bằng VSSP-iMod.

Bệnh nhân	Tổng số liệu đã nhận được	Thời gian sống tính từ lúc tham gia thử nghiệm (tháng)	Tiền lượng theo MSKCC tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm
RCC 01	38	64,47	Tốt
RCC 02	8	5,2	Xấu
RCC 03	38	64,47	Trung bình
RCC 04	5	2,57	Xấu
RCC 05	8	30,07	Trung bình
RCC 06	12	37	Trung bình
RCC 07	2	5,9	Xấu
RCC 08	16	59,37	Trung bình
RCC 09	16	54,07	Tốt
RCC 10	37	48	Trung bình
RCC 11	16	43,6	Tốt
RCC 12	41	36,5	Tốt
RCC 13	24	36,5	Trung bình
RCC 14	4	2,17	Xấu
RCC 15	12	10,3	Xấu

Ví dụ 4. VSSP làm giảm tần suất xuất hiện MDSC có kiểu hình đơn nhân và hạt ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến vú.

Tác dụng của VSSP-iMod đối với MDSC cũng được đánh giá ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến vú. Nhằm mục đích này, thử nghiệm Cửa sổ cơ hội (Window-of-Opportunity) giai đoạn 0 đã được thiết kế, trong đó, bệnh nhân đã sử dụng 400µg VSSP-iMod với tần suất hàng tuần trong thời gian ba tuần bằng cách tiêm dưới da ở vùng delta. Việc điều trị này được thực hiện trong thời gian thông thường được thiết lập giữa thời gian chẩn đoán và điều trị bằng phẫu thuật hoặc hóa trị liệu tiêu chuẩn do bác sỹ chỉ định. Trong thử nghiệm này, tần suất xuất hiện G-MDSC, mMDSC và tế bào T CD8 được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy. Tổng số 200.000 tế

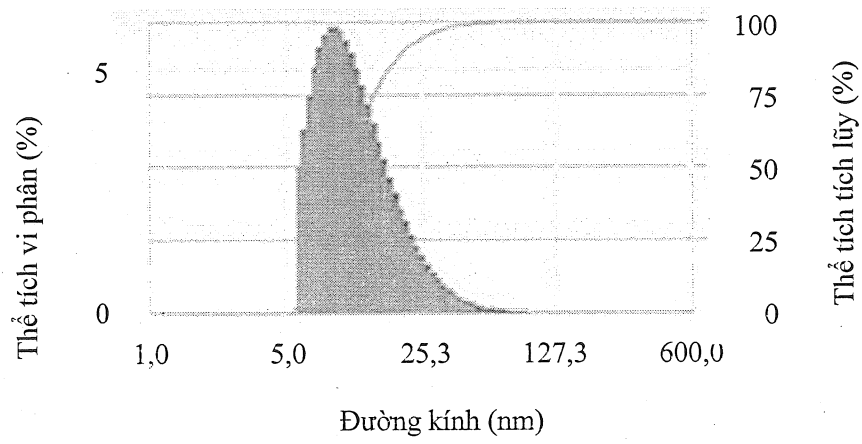
bào đã được phân tích và tỷ lệ gMDSC và mMDSC được xác định bằng cách sử dụng lần lượt các kiểu hình $CD11b^+/CD66b^+/CD14^-$ $CD11b^+/CD14^+/HLA-DR^{thấp/âm}$ tính trong tổng số PBMC. Như đã thấy trong Hình 6a, VSSP-iMod này đã làm giảm tần suất xuất hiện gMDSC tuần hoàn và tác dụng tương tự này cũng đã quan sát thấy trên mMDSC (Hình 6b) tuần hoàn ở các bệnh nhân này sau 21 ngày điều trị. Ngoài ra, việc phân tích tỷ lệ bệnh nhân có tần suất xuất hiện gMDSC và mMDSC cao hơn và thấp hơn tần suất trung bình cho thấy rằng, sau khi điều trị bằng VSSP-iMod, chỉ có 15% bệnh nhân đã điều trị duy trì gMDSC và 0% bệnh nhân đã điều trị duy trì mMDSC tương ứng ở mức cao. Việc điều trị này cũng làm giảm tần suất xuất hiện tế bào T $CD8^+$ trong máu của bệnh nhân (Hình 7).

YÊU CẦU BẢO HỘ

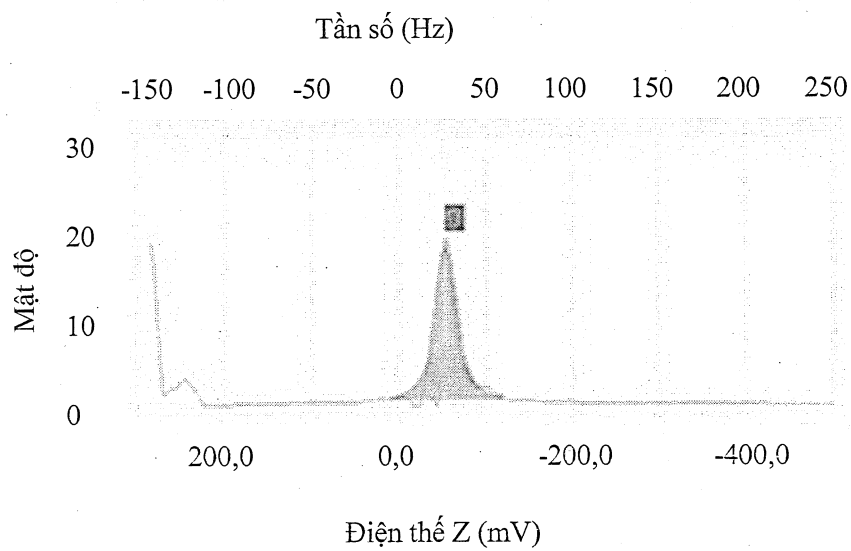
1. Dược phẩm chứa hạt nano, được đặc trưng bởi liên hợp kỵ nước của phức hệ protein màng ngoài (OMPC) của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* với GM3 gangliosit, trong đó tỷ lệ liên hợp gangliosit OMPC:GM3 này nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 10:1.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó hạt nano này được đặc trưng bởi phân bố thể tích đơn đỉnh của kích cỡ hạt nằm trong khoảng từ 15 đến 25 nm, chỉ số đa phân tán là 0,230, và/hoặc thế Z âm có trị số danh định nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV.
3. Dược phẩm chứa hạt nano, trong đó mỗi hạt nano này chứa phức hệ protein màng ngoài (OMPC) của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* được liên hợp kỵ nước với GM3 gangliosit, trong đó tỷ lệ liên hợp protein-gangliosit nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 10:1, và trong đó dược phẩm này được đặc trưng bởi phân bố thể tích đơn đỉnh nằm trong khoảng từ 15 đến 25 nm kích cỡ hạt, chỉ số đa phân tán là 0,230, thế Z âm có trị số danh định nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV.
4. Dược phẩm chứa hạt nano, được đặc trưng bởi liên hợp kỵ nước của phức hệ protein màng ngoài (OMPC) của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* với GM3 gangliosit, trong đó hạt nano này được đặc trưng bởi phân bố thể tích đơn đỉnh nằm trong khoảng từ 15 đến 25 nm kích cỡ hạt, chỉ số đa phân tán là 0,230, và thế Z âm có trị số danh định nằm trong khoảng từ 25 đến 45 mV.
5. Phương pháp sản xuất hạt nano, trong đó phương pháp này bao gồm bước liên hợp phức hệ protein màng ngoài (OMPC) của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* với GM3 gangliosit, trong đó tỷ lệ liên hợp gangliosit OMPC:GM3 này nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 10:1.

1/4

Hình 1

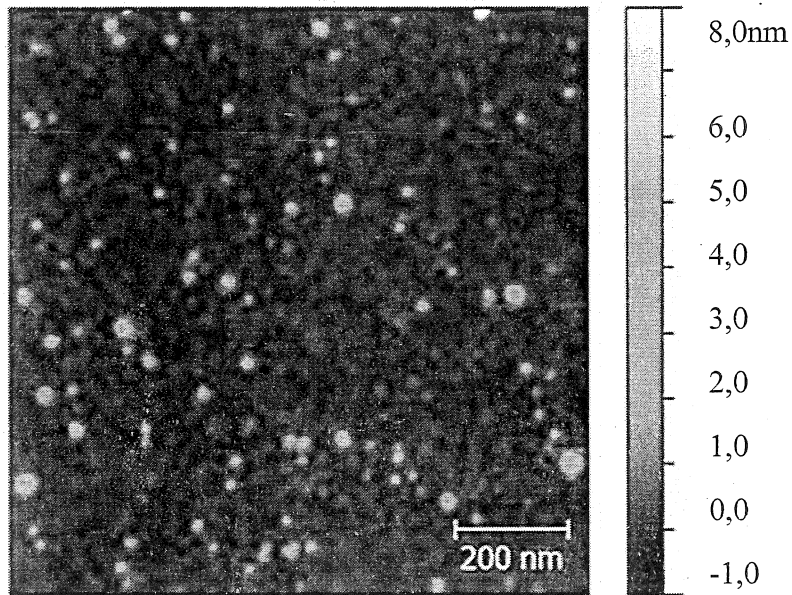


Hình 2



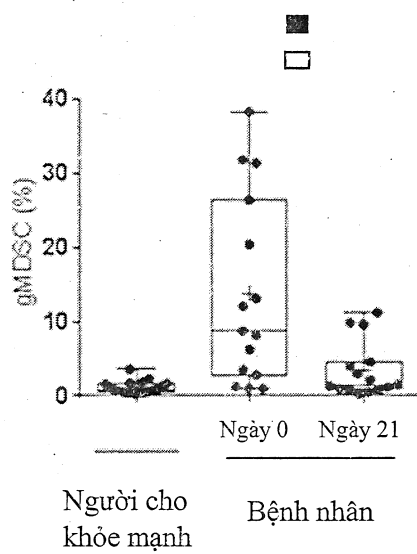
2/4

Hình 3

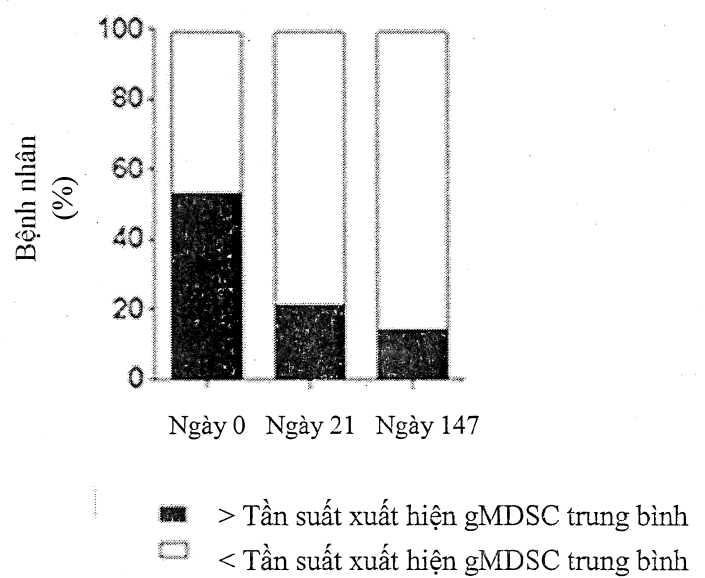


Hình 4

a)



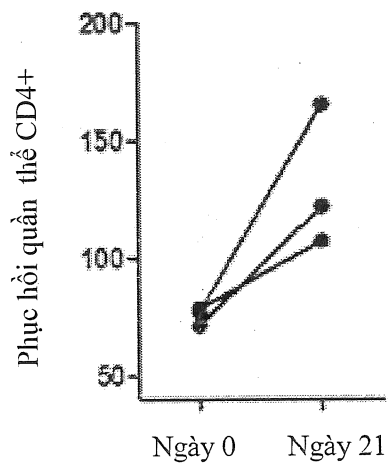
b)



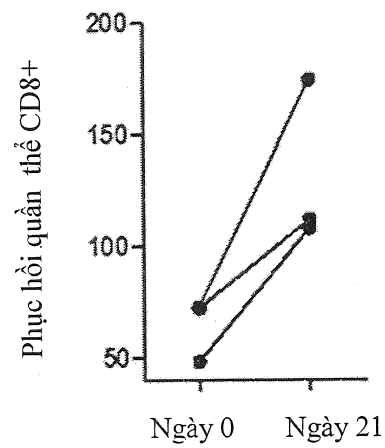
3/4

Hình 5

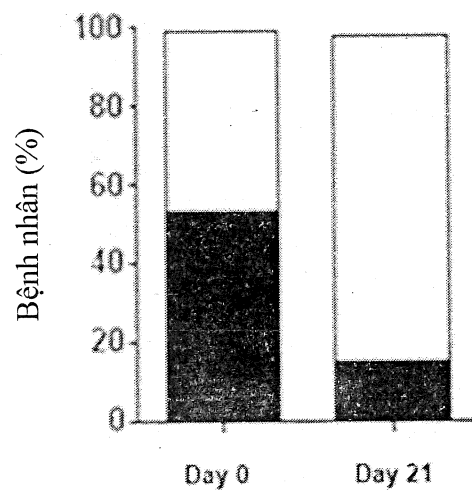
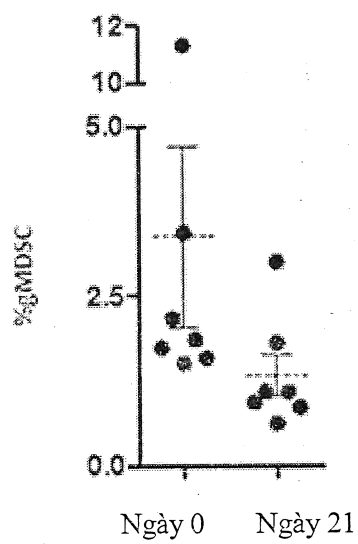
a)



b)



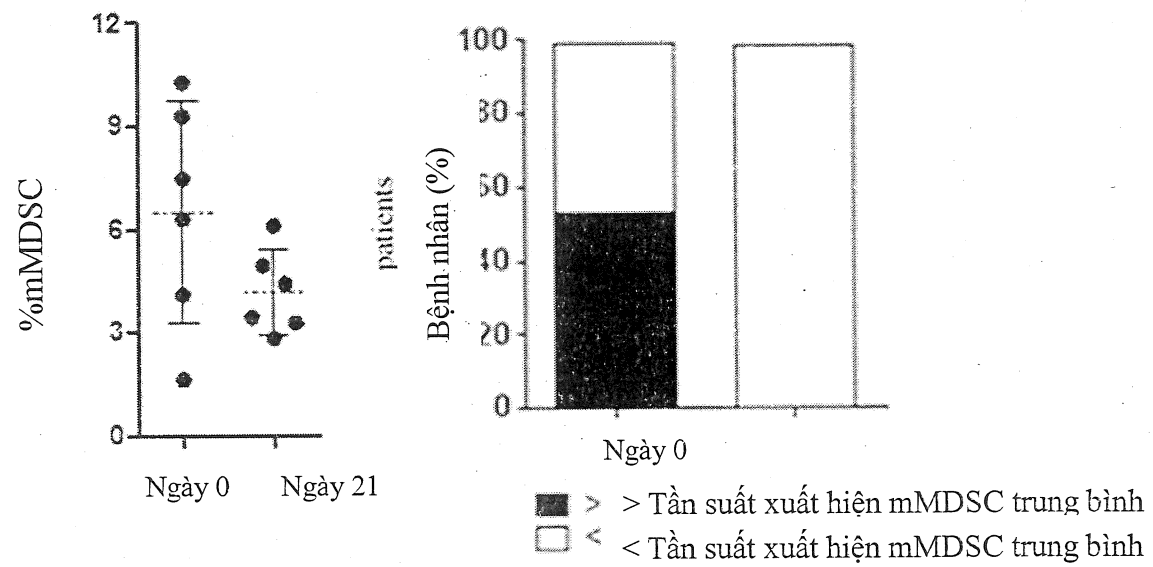
Hình 6a



■ > Tần suất xuất hiện gMDSC trung bình
□ < Tần suất xuất hiện gMDSC trung bình

4/4

Hình 6b



Hình 7

