

Chương X

GEN TRỊ LIỆU VỚI PHƯƠNG THỨC TIÊM CHỦNG POLYNUCLEOTID

MỞ ĐẦU

Do những giới hạn của các trị liệu ung thư thông thường (phẫu thuật, xạ trị và hóa trị) cùng với việc nâng cao không ngừng các kiến thức về cơ chế phân tử điều hòa miễn dịch đã dẫn đến gia tăng sự chú ý tới việc phát triển các trị liệu miễn dịch ung thư. Các phương pháp trị liệu miễn dịch chủ động thì tìm cách loại trừ các TB khối u bằng cách tạo ra các đáp ứng miễn dịch (ĐUMD) kháng trực tiếp các KN liên kết khối u. Các kỹ thuật chuyển gen đã mở rộng thêm cơ hội trong lĩnh vực này bằng việc gợi ra các phương pháp mới để kích thích ĐUMD. Trong mảng kỹ thuật phát triển các ứng dụng lâm sàng thì các vaccin acid nucleic hay polynucleotid đã nổi bật với tư cách là một phương pháp mới và hiệu quả cho việc cảm ứng các ĐUMD đặc hiệu KN khối u.

Thay vì tiêm chủng với một protein, việc tiêm chủng với một polynucleotid (polynucleotid immunization – PNI) lại dựa trên sự chuyển giao các phân tử DNA hay RNA mã hóa một KN cần quan tâm. Có một số lợi thế đối với phương thức chuyển giao này. Có lẽ điều quan trọng nhất là cả đáp ứng kháng thể và ĐUMD tế bào đều được tạo ra sau khi tiêm chủng với polynucleotid. Sự tổng hợp *in vivo* KN đã được mã hóa cho phép các protein được xử lý trình diện trên MHC lớp I, thúc đẩy việc sản sinh các CTL giới hạn bởi MHC lớp I. Vì các CTL là các tác nhân trung gian quan trọng của ĐUMD kháng u nên việc kích hoạt KN khối u là rất quan trọng đối với sự thành công của cách tiếp cận vaccin ung thư. Hơn nữa, trái ngược với các vaccin protein được điều chế trong các tác chủ không phải là động vật có vú, ở đây sự tổng hợp KN *in vivo* cho phép protein cuộn lại và cải biến sau dịch mã một cách thích hợp.

Các vaccin cơ sở DNA cũng biểu hiện trực tiếp KN trong thời gian dài, hỗ trợ cho các ĐUMD kháng u bền bỉ mà về mặt lý thuyết thì sẽ bảo vệ cho bệnh nhân khỏi bị tái phát. Các yếu tố phụ trợ khác để phát triển các chiến lược tiêm chủng dựa trên cơ sở DNA plasmid dễ làm và tương đối rẻ tiền nhưng lại có tính ổn định. Như đã đề cập chi tiết ở trên, các vaccin DNA được điều chế trong các tác chủ vi khuẩn nên tính kích thích miễn dịch có thể di truyền được vì có sự hiện diện của dinucleotid CpG chưa methyl hóa. Những trình tự này kích thích đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu mà không bị ảnh hưởng khi chuyển giao lặp lại vaccin. Điều này trái ngược với các vaccin cơ sở virus vì các ĐUMD được cảm ứng bởi vec tơ hay đã tồn tại từ trước có thể làm giảm đáng kể hiệu quả của vaccin. Xét về độ an toàn thì các vaccin polynucleotid cũng được ưa chuộng hơn các vaccin virus vì không có rủi ro bởi sự tái tổ hợp với các virus dạng hoang dã và các rủi ro bởi đột biến ghép cũng khá thấp. Sau chót là, các vaccin DNA hay RNA có tiềm năng sẵn sàng chuyển giao nhiều epitope và ngay cả nhiều KN trong một mũi tiêm đơn. Một yếu tố quan trọng đối với các khối u là có xu hướng tẩu thoát khỏi sự phát hiện miễn dịch vì các biến thể đã mất hết KN.

Mặc dầu với những lợi thế tiềm tàng và những nghiên cứu tiền lâm sàng đầy khích lệ, nhưng các vaccin polynucleotid cho ung thư vẫn chỉ đạt hoạt tính ở mức tối thiểu trong lâm sàng. Vì nhiều KN khối u chưa đột biến nên việc cảm ứng một

ĐUMD đối với KN này đòi hỏi hệ miễn dịch phải có khả năng nhận dạng và dựng lên một đáp ứng hiệu quả đối với một “tự kháng nguyên”. Các nghiên cứu bước đầu cho thấy, việc thiết lập quy trình điều trị ung thư trên người là hết sức khó khăn vì thế việc nâng cao tiềm năng và hiệu lực lâm sàng của các vaccin polynucleotid trở thành tâm điểm của các nghiên cứu trong lĩnh vực này.

Do tính linh hoạt của các vaccin cơ sở DNA hay RNA đã dẫn đến phát triển nhiều phương pháp chuyển giao trong miễn dịch trị liệu ung thư. Vì DNA hay mRNA có thể được dùng để cải biến các tế bào *ex vivo* như trong trường hợp các tế bào dendritic đã được thâm nhiễm hay các tế bào khối u đã bị chiếu xạ cho trị liệu vaccin nên trong chương này chúng tôi sẽ tập trung đặc biệt vào sự chuyển giao *in vivo* các DNA hay RNA cho trị liệu miễn dịch ung thư.

CHUYỂN GEN ACID NUCLEIC CHO VIỆC TIÊM CHỦNG

Việc phát triển các vaccin acid nucleic được lóe lên bởi các quan sát của Wolff và cộng sự khi tiêm trong cơ DNA trần dẫn đến biểu hiện được gen mã hóa bởi các tế bào sợi cơ. Các nghiên cứu tiếp theo đã chứng minh rằng tính khả dụng chung của phương pháp này là biểu hiện được các gen ngoại lai trong nhiều mẫu từ cá đến các động vật cao cấp không phải người. Mặc dầu vậy, việc chuyển DNA vào các sợi cơ thông qua tế bào cơ caveolae và các vi ống T là một quá trình hiệu quả. DNA vẫn duy trì trong nhân ở dạng ngoài nhiễm sắc thể, nhưng lại biểu hiện trong một thời gian dài, phụ thuộc vào tính sinh miễn dịch của protein được mã hóa.

Ulmer và cộng tác lần đầu tiên đã chứng minh khả năng chuyển giao trong cơ các DNA mã hóa một KN virus để tạo nên một đáp ứng miễn dịch giới hạn bởi MHC lớp I của các tế bào CD8⁺ T nhờ sử dụng một plasmid mã hóa protein nucleoprotein A của influenza. Nghiên cứu này đã tạo các lý do để phát triển các vaccin polynucleotid điều trị các bệnh kể cả ung thư mà không phải tuân theo những cách tiếp cận vaccin truyền thống trước đây dựa chủ yếu vào các ĐUMD thể dịch. Ngoài việc phòng bệnh, trị liệu tiêm chủng còn có khả năng kháng lại các bệnh mạn tính.

Cảm ứng các đáp ứng thể dịch và tế bào sau khi chuyển giao acid nucleic không chỉ giới hạn là trong cơ. Da rất giàu các tế bào trình diện KN (APC) như các tế bào Langerhan chưa chín ở biểu bì và các DC ở hạ bì. Tang và cộng sự đã chứng minh khả năng chuyển giao DNA tới da để tạo ĐUMD thể dịch đối với một gen đã được mã hóa. Trong phương pháp này, DNA chỉ được chuyển giao sau khi đã kết tủa thành những vi hạt. Các hạt vàng được chuyển tới da dưới một áp lực được tạo ra bởi một thiết bị bắn đạn. Quá trình này thường hay dùng một súng bắn gen không tạo chấn thương và chỉ cần một lượng rất ít DNA là đã có được một ĐUMD thể dịch (khi so sánh với cách chuyển giao trong cơ). Sự cảm ứng các CTL hiệu ứng có khả năng trung gian thải loại khối u cũng đã được chứng minh trong mô hình khối u có thể truyền ghép được trên chuột.

Tiêm chủng trong da cũng có thể thành công bằng cách tiêm DNA trần hay chuyển giao toàn hệ thống các hạt nano bọc DNA bằng hệ thống tiêm không kim. Việc phân phối qua mũi các vaccin DNA cũng được khai thác chủ yếu cho việc tiêm chủng kháng lại các bệnh truyền nhiễm, nhưng cũng có thể áp dụng được cho trị liệu ung thư.

Thực tế là, mọi con đường chuyển giao đều dẫn đến tổng hợp kháng thể và cảm ứng ĐUMD đặc hiệu KN, điều đó chứng tỏ rằng việc tiêm chủng polynucleotid rất linh hoạt. Điều quan trọng cần lưu ý là những con đường phân phối khác nhau có thể

dẫn đến các ĐUMD tương đối khác nhau về chất và hiệu lực trên người, vấn đề này cũng nên tiếp tục khảo sát.

Mặc dầu một cấu thành đặc biệt của DNA plasmid mã hóa cho một KN khối u xác định, nhưng các chiến lược vaccin cũng phát triển cả với mRNA. Một bất lợi tiềm ẩn của các vaccin cơ sở RNA so với các vaccin DNA là đời sống bán phần của RNA ngắn hơn. Thế nhưng khi sử dụng mRNA *in vivo* lại có lợi thế là kháng lại được các KN ung thư đã được mã hóa bởi gen *Her-2/neu* vì theo lý thuyết thì rủi ro bởi việc hợp nhất của gen chuyển vào trong hệ gen đã được loại trừ.

Qiu và cộng sự đã dùng cách bản gen mRNA để chứng minh sự biểu hiện của các gen đã được mã hóa trong biểu bì chuột và sự cảm ứng các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Chuyển giao trong cơ mRNA mã hóa KN ung thư phôi (carcinoembryonic antigen –CEA) cũng phát hiện thấy các kháng thể kháng CEA và kháng lại phần nào sự thách đố của các TB khối u biểu hiện CEA.

Đáp ứng miễn dịch được tạo ra bởi các vaccin cơ sở mRNA nói chung là ít quan trọng hơn các chiến lược dựa trên cơ sở DNA có lẽ vì tính không ổn định của mRNA sau khi được chuyển giao. Để tháo gỡ hạn chế này, việc sử dụng các RNA tự sao chép đã nổi lên như một phương tiện để nâng cao hiệu lực của tiêm chủng với cơ sở RNA. Những vec tơ này hợp nhất các trình tự vào trong các bản sao RNA mã hóa cho protein RNA replicase có nguồn gốc từ các virus (Sindbis hay Semliki Forest virus). Replicase chẳng những trực tiếp tác động tới sự tái bản tế bào chất của toàn bộ bản sao mà còn phiên mã mRNA cho KN từ một promoter dưới hệ gen (subgenomic) làm cho sự biểu hiện KN đạt tới mức cao. Sự thích nghi hơn nữa của hệ replicase RNA dẫn đến phát triển các vec tơ DNA plasmid mã hóa các bản sao của RNA có thể tái bản được (replicative RNA transcript), nó tổ hợp được cả ưu điểm của việc dễ dàng điều chế các vaccin DNA cũng như lợi thế của các RNA tái bản.

CƠ CHẾ SỰ CẢM ỨNG ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH SAU KHI TIÊM CHỦNG VỚI POLYNUCLEOTID

Khả năng của các vaccin polynucleotid tạo được ĐUMD tế bào đã mở đường cho việc phát triển của chúng với tư cách là một chất tạo phản ứng cho ĐUMD ung thư. Cơ chế cảm ứng ĐUMD sau tiêm chủng vẫn chưa sáng tỏ hoàn toàn, nhưng chắc chắn là có liên quan tới quá trình xử lý kháng nguyên thông qua con đường nội bào và ngoại bào để trình diện KN lên cả MHC lớp I và II. DNA có thể thâm chuyển được cả tế bào đích (như tế bào cơ sau khi được tiêm chủng trong cơ) cũng như các APC không di trú. Mặc dầu rõ ràng là các TB cơ tổng hợp protein đã được mã hóa, nhưng có lẽ chỉ các APC mới có khả năng chuyển giao tín hiệu đồng kích thích cần thiết để môi CTL một cách hiệu ứng.

Nhiều công trình nghiên cứu xác nhận vai trò chủ chốt của các APC nguồn gốc từ tủy xương trong việc cảm ứng ĐUMD sau tiêm chủng DNA. Các phát hiện cho thấy “hình ảnh môi chéo” trong đó các TB cơ sản sinh ra protein kháng nguyên và chuyển nó tới các APC theo phương thức KN được trình diện tới MHC lớp I của các tế bào T, do đó cho phép APC hoạt hóa trực tiếp các CTL. Trong khi protein được thu nhận ngoại sinh bởi các APC thường đi vào con đường lysosome nội bào để phân giải rồi được trình diện bởi các phân tử MHC lớp II, thì trong trường hợp tiêm chủng polynucleotid KN đã được xử lý có thể trình diện với cả MHC lớp I và II để thúc đẩy cả miễn dịch thể dịch và miễn dịch tế bào.

Ngoài ra còn một cách thích hợp hơn nữa là thâm chuyển chính các APC với các acid nucleic chuyển giao. *In vivo*, sự tổng hợp KN ở tế bào chất lại thúc đẩy việc trình diện peptide bởi các phân tử MHC lớp I. Các protein được tổng hợp trong tế bào được xử lý nội bào thành các peptid bởi proteasom. Những peptid này được tải lên các phân tử lớp I ở mạng lưới nội chất rồi chuyển tới bề mặt tế bào. Việc trình diện KN lên cả MHC lớp I và II với sự có mặt của các phân tử đồng kích thích thích ứng sẽ dẫn tới hoạt hóa cả tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$.

Vai trò quan trọng của $CD8^+$ CTL trong trung gian phá hủy TB khối u là do nó nhận diện được các peptid KN được trình diện ở MHC lớp I trên bề mặt các TB khối u. Những TB này giữ vai trò quan trọng trong việc phá hủy TB khối u và kháng cự lâu dài với các tái thách đó.

Tầm quan trọng của tế bào $CD4^+$ trong miễn dịch kháng u được đánh giá rất cao. Những tế bào $CD4^+$ T này tạo nên sự trợ giúp cho việc cảm ứng các $CD8^+$ CTL đặc hiệu và tiết ra các cytokin thúc đẩy sự hoạt hóa CTL. Hơn nữa, chúng cũng có thể hoạt hóa cả những TB hiệu ứng miễn dịch không đặc hiệu như các đại thực bào hay bạch cầu ưa eosin có tiềm năng cao hơn đối với việc phá hủy tế bào khối u.

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI CẢM ỨNG ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH

Nhiều nét đặc trưng về ảnh hưởng của vaccin polynucleotid tới bản chất và tiềm năng của ĐUMD mà nó tham dự từ thành phần của acid nucleic đến KN đã được mã hóa và vi môi trường mà vaccin biểu hiện. Thành phần của DNA được xem xét đầu tiên là ở các vaccin cơ sở plasmid. Dinucleotid CpG có tương đối ít trong hệ gen động vật có vú. Hơn nữa, khu vực giàu CpG thường là đã methyl hóa bởi cơ chế điều hòa phiên mã.

Trái lại với vấn đề này, chế phẩm vaccin DNA trong các tác chủ vi khuẩn thì lại hiện diện ở dạng dinucleotid CpG chưa methyl hóa trong plasmid. Những trình tự chưa methyl hóa này được nhận dạng bởi hệ thống miễn dịch bẩm sinh như là hiện diện một chất gây bệnh và kích thích miễn dịch. Đặc biệt là các trình tự được nhận dạng bởi receptor 9 gây nên hoạt hóa hệ miễn dịch bẩm sinh bao gồm các DC, đại thực bào, các tế bào NK và NKT. Kết quả là các CpG hoặc là có mặt trong plasmid hoặc là được chuyển giao như một oligodeoxynucleotid tinh khiết – một chất bổ trợ tiềm năng đẩy hệ miễn dịch sang hướng đáp ứng dạng Th1. Các oligodeoxynucleotid CpG cũng có hiệu ứng kháng apoptotic cả với tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$, do đó mà mở rộng nhóm tế bào T và nâng cao ĐUMD trong phương thức độc lập kháng nguyên. Sự có mặt của các motif CpG này cũng góp phần quan trọng đối với tính sinh miễn dịch nói chung của các vaccin DNA.

Các vaccin polynucleotid trên cơ sở virus alpha RNA cũng di truyền tính kích thích miễn dịch. Những vaccin này thúc đẩy apoptosis trong các TB thâm chuyển, do đó có thể nâng cao tính miễn dịch. Khi tái bản ở tế bào chất, một cấu trúc trung gian RNA sợi kép được tạo ra, nó hoạt hóa protein kinase R sợi kép và NF-kappa B, kích thích con đường kháng virus bẩm sinh, do vậy mà nâng cao ĐUMD. Lợi thế của các vaccin polynucleotid so với vaccin virus là các con đường miễn dịch đã được kích thích về bản chất là không đặc hiệu và không bị ảnh hưởng bởi sự tái phân phối vec tơ.

Ngoài thành phần của acid nucleic, một yếu tố quan trọng của ĐUMD, là mức độ biểu hiện của gen chuyển. Đó đó cần phải có một promoter mạnh để phiên mã trực tiếp protein đã được mã hóa và tối ưu hóa các tín hiệu polyadenylat hóa và những vùng chưa được dịch mã có thể góp phần làm tăng sự biểu hiện của gen chuyển. Promoter/enhancer

của cytomegalovirus đã được sử dụng rộng rãi để điều khiển sự biểu hiện của các trình tự đã được mã hóa và có thể được tăng cường bằng cách cài thêm các trình tự bổ sung, chẳng hạn như những hệ thống được tạo nên từ các virus adeno liên hợp.

Các vec tơ tối ưu hóa cũng đã được phát triển, vì đường phân phối cũng có thể gây ảnh hưởng tới kết quả ĐUMD. Như đã đề cập ở trên, nhiều cách tiêm chủng polynucleotid dẫn đến cảm ứng ĐUMD tế bào và thể dịch, nhưng tính chất của ĐUMD được tạo ra bởi các đường phân phối khác nhau có thể khác nhau về chất. Nhìn chung, phân phối theo kiểu bản gen DNA sẽ dẫn đến ĐUMD giống như T helper 2 (Th2) nhiều hơn, với các thành phần thể dịch mạnh nhưng có thể lại ít hiệu lực đối với trị liệu ung thư. Tuy nhiên, hiệu ứng này còn có thể được cải biến bằng cách phân phối đồng thời cùng với các cytokin thúc đẩy Th1. Bản chất của ĐUMD có thể bị ảnh hưởng xa hơn nữa bởi liều lượng và lịch trình phân phối vaccin.

Tính kháng nguyên của các protein đã mã hóa là một vấn đề rất quan trọng trong việc tạo ra đáp ứng hiệu quả. Thực tế là hầu hết các KN khối u đều là tự KN, đây là một thách thức đáng gờm đối với tất cả các dạng trị liệu miễn dịch chủ động dựa trên cơ sở là bề gãy dung nạp miễn dịch. Cải biến tính KN của protein hay thúc đẩy sự hấp thu của nó bởi các APC nhà nghề (các DC) là khía cạnh quan trọng nhất. Môi trường cytokin cục bộ cũng giữ vai trò quan trọng đối với việc làm nảy sinh các ĐUMD khác. Khi tối ưu hóa tất cả những yếu tố này thì sẽ tối ưu hóa được các ĐUMD sau khi tiêm chủng polynucleotid. Đây là một vấn đề được mọi người chú ý nhất khi khảo sát nghiên cứu lĩnh vực này.

Bảng 10.1. Các chiến lược nhằm nâng cao hiệu lực vaccin polynucleotid

Các khía cạnh về vaccin	Sự can thiệp
Nâng cao sự chuyển giao acid nucleic	Liposom Vi hạt PLG Điện chuyển (electroporation)
Cải biến kháng nguyên để đích các APC	Hỗn hợp KN với Cd40L, FLT3L, CTLA4
Cải biến kháng nguyên để tăng tính sinh miễn dịch	Thay đổi quá trình xử lý KN Hợp nhất các epitope miễn dịch Sử dụng KN từ các mẫu khác nhau Tối ưu hóa các mã
Cải biến vi môi trường	Bổ sung thêm các cytokin Bổ sung thêm các chemokin Giảm apoptosis trong các APC
Hợp nhất các vec tơ khác vào trong lịch trình tiêm chủng	Các vec tơ virus (adenovirus, vaccinia) Protein

CÁC CHIẾN LƯỢC NÂNG CAO ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH

Các vaccin đã thể hiện sự hứa hẹn trong việc tạo ra các đáp ứng CTL đối với các KN mới, nhưng vì đặc tính sinh miễn dịch yếu của các KN nên đòi hỏi các vaccin phải tiềm năng hơn nếu chúng được sử dụng trong lâm sàng. Vì vậy, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc nâng cao ĐUMD được tạo ra bởi tiêm chủng polynucleotid. Nhiều cách tiếp cận đã tập trung vào từng khía cạnh của vaccin, từ việc chuyển giao

acid nucleic đến cải biến KN đã mã hóa, từ việc làm xáo trộn vi môi trường đến việc tối đa hóa xây dựng ĐUMH dạng Th1. Tính linh hoạt của vaccin polynucleic rất cao vì nó là một acid nucleic và KN mã hóa cần quan tâm lại có thể được thao tác và đánh giá rất dễ dàng.

Vì quá trình chuyển giao acid nucleic tới các TB đích chưa hiệu quả nên các cách tiếp cận đều nhắm tới việc làm tăng hiệu quả chuyển giao và/hoặc tăng tính ổn định của acid nucleic *in vivo* làm cho các KN mã hóa cao hơn và rộng hơn, do đó mở rộng độ lớn của ĐUMD. Để đạt được điều này cần phải hợp nhất acid nucleic vào trong các liposom thì mới có thể bảo vệ được nó khỏi sự tác động phân giải của nuclease nội bào và thúc đẩy sự hấp thu trong các tế bào. Sự hấp thu DNA vào các vi hạt cationic bao gồm các poly (DL-lactide-co- glycolide- PLG) cho phép giải phóng từ từ các DNA và kết quả là có được một ĐUMD tiềm năng so với DNA trần. Để tăng cường vận chuyển acid nucleic vào trong các TB đích một cách vật lý thì điện chuyển các acid nucleic tới da hoặc cơ thể hiện là một phương tiện hiệu lực làm tăng hiệu ứng chuyển gen. Dĩ nhiên khi áp dụng công nghệ này trong lâm sàng lại phải tối ưu hóa thận trọng hơn nữa vì đối tượng là con người.

Sự dễ dàng trong thao tác DNA bảo cứu tái tổ hợp cho phép KN đã mã hóa được biến đổi theo cách làm tăng tính sinh miễn dịch; và có thể thao tác được nhiều và đa dạng về phương diện này. Vì sự hấp thu và trình diện thích hợp của KN là rất quan trọng đối với việc cảm ứng một ĐUMD hiệu quả nên một số nhóm nghiên cứu đã cải biến các KN đã được mã hóa để làm cho chúng được hấp thu hiệu quả hơn bởi các APC nhà nghề. Các kháng nguyên được hòa vào ligand CD40, domain ngoại bào của ligand tyrosine kinase 3 giống như Fms (Fms-like tyrosin kinase 3- FLT3), hoặc kháng nguyên 4 của lympho T độc tế bào (cytotoxic T-lymphocyt antigen 4- CTLA4), đó là các ví dụ trong đó receptor của mỗi ligand đều phát hiện thấy trên bề mặt của các DC, nên khi đích KN vào các TB này thì sẽ làm tăng cường ĐUMD. Trong tế bào, KN đã được mã hóa có thể được cải biến để thúc đẩy sự phân giải thông qua con đường endosome/lysosome với phương thức là tăng cường trình diện lên MHC lớp II và nâng cao đáp ứng tế bào CD4⁺ T. Trong một cách tiếp cận tương tự nhắm đích theo một cách khác trong đó quá trình xử lý tiêu protein của KN đã mã hóa có thể được thúc đẩy bằng cách hòa lẫn nó với các trình tự chỉ đạo sự ubiquitin hóa nó. Nhờ hợp nhất các trình tự sinh miễn dịch dị loại, chẳng hạn như epitope CTL độc tố uốn ván vào một KN khối u đã nhanh chóng cảm ứng CTL kháng lại KN khối u với việc kháng lại sự thách đố của khối u. Đối với các ung thư do virus HPV (human papilloma virus) như ung thư cổ tử cung thì việc tối ưu hóa mã của KN chứng tỏ là một phương thức hữu hiệu làm tăng sự biểu hiện của protein và nâng cao ĐUMD.

Một cách thông thường để nâng cao tính sinh miễn dịch của các vaccin acid nucleic là chuyển giao đồng thời các cytokin mã hóa DNA dựa trên lý lẽ là một đáp ứng miễn dịch tiềm năng hơn sẽ được tạo ra nếu KN được trình diện trong môi trường cytokin thích hợp. Kết cục là các cytokin đã thúc đẩy ĐUMD typ Th1, bao gồm yếu tố kích thích quần thể đại thực bào - bạch cầu hạt, interferon - γ , interleukin 2 và interleukin 12 đã được đánh giá sâu rộng trong các mô hình tiền lâm sàng về các bệnh truyền nhiễm và ung thư. Rõ ràng là cách tiếp cận này đã gây ảnh hưởng tới tính chất và tầm quan trọng của ĐUMD.

Căn cứ vào lý do cho rằng việc chuyển giao hiệu quả hơn các KN tới APC sẽ làm tăng cường các ĐUMD nên các chemokin đã được sử dụng để kéo các APC tới vị trí tổng hợp KN. Điều này được hoàn tất bằng cách hòa lẫn KN với các chemokin gây viêm hoặc chuyển giao đồng thời KN cùng với các chemokin. Những sửa đổi bổ sung

đối với vi môi trường cục bộ tiếp nhận vaccin polynucleotid là đồng chuyển giao các gen kháng apoptosis để tăng sự sống sót của các DC đã thâm chuyển với DNA và phân phối đồng thời DNA mã hóa KN với protein hòa tan hoạt hóa gen 3 của bạch cầu như là một phương thức thúc đẩy sự trình diện chéo của KN *In vivo*. Phát triển các DC để tăng cường các ĐUMD đã được định hướng bởi việc chuyển giao một plasmid mã hóa FLT3 ligand. Cách tiếp cận này có thể được sử dụng trong việc tổ hợp các vaccin peptid thông thường để nâng cao ĐUMD tế bào.

Mặc dầu cho rằng các tự KN có tính sinh miễn dịch yếu và xòe rộng epitope xảy ra do cảm ứng một ĐUMD, nhưng khái niệm về gây miễn dịch (tiêm chủng) tương đồng các mẫu chéo (cross-species homologous immunization) cũng được gọi là tiêm chủng trực sinh hay khác giống (xenogenic or orthologous immunization) đã chứng tỏ là một phương pháp hữu hiệu để phá bỏ dung nạp. Đối với tiêm chủng polynucleotid, chiến lược này đã sử dụng một gen KN khối u từ các mẫu khác nhau chứ không phải từ người nhận vaccin để cảm ứng ĐUMD có phản ứng chéo với protein tự thân của túc chủ. Đối với nhiều protein đã được nghiên cứu cho đến ngày nay thì các mẫu khác giống ngoại lai đã thể hiện nâng cao được tính sinh miễn dịch so với các KN tự thân hay tự KN. Cách tiếp cận này dẫn đến khả năng miễn dịch là có phản ứng chéo và bẻ gãy sự dung nạp đối với tự KN. Tiêm chủng khác giống cũng sử dụng thành công trong các mô hình động vật nhằm cảm ứng ĐUMD kháng u chống lại các KN khối u nội sinh hoặc các yếu tố thúc đẩy khối u. Các nghiên cứu lâm sàng đầu tiên trong ung thư tuyến tiền liệt khi sử dụng vaccin DC/protein đã chứng minh sự cảm ứng ĐUMD đối với tự KN, điều đó đã gợi lên một áp dụng tiềm năng phương pháp này cho các thử nghiệm lâm sàng.

Do các vaccin DNA dễ dàng pha chế và đã loại trừ các đáp ứng miễn dịch hướng vào vec tơ nên đã dẫn đến việc hợp nhất nó vào một loạt các chiến lược nhằm tăng cường sự miễn dịch. Những chiến lược này đã chứng tỏ hiệu lực hơn so với tiêm chủng chỉ với DNA trong một số mô hình tiền lâm sàng với nhiều chiến lược khác nhau. Hiệu ứng đặc biệt nhất trong tăng cường miễn dịch là sau khi tiêm DNA plasmid thì cần một vec tơ virus sống để thúc đẩy. Cách tiếp cận này dẫn tới ĐUMD rộng hơn và tiềm năng hơn so với vec tơ đơn lẻ. Chiến lược miễn ĐUMD với KN được mã hóa bởi DNA plasmid đã phá vỡ khả năng ĐUMD đặc hiệu vec tơ nhằm thủ tiêu sự biểu hiện của chất sinh miễn dịch xảy ra khi chuyển giao lặp lại các vec tơ virus sống. Đến lượt mình, tiềm năng của các vec tơ virus lại làm tăng vai trò quan trọng khá khiêm nhường của ĐUMD được tạo ra bởi DNA plasmid đơn lẻ. Sự biểu hiện liên tục dành được của các vaccin DNA có thể tạo ra các tế bào T ái lực cao, nó có thể liên tục phát triển nhờ sự kích thích của các vec tơ virus sống.

Adenovirus là một vec tơ virus khiếm khuyết sao chép đã tổ hợp thành công với DNA trong một mô hình trên chuột bị ung thư tế bào gan. Vec tơ virus vaccinia cũng rất hứa hẹn. DNA plasmid cũng có thể được tổ hợp cùng với các chất kích thích protein chẳng hạn như cho nó hấp thụ lên các hạt PLG để thu được các hiệu ứng có lợi. Mặc dầu vậy, những cách tiếp cận này muốn đi đến lâm sàng thì vẫn còn khá phức tạp, tuy nhiên khi nâng cao được tiềm năng của các vaccin tổ hợp thì trở ngại này sẽ được vượt qua.

CÁC NGHIÊN CỨU TIỀN LÂM SÀNG

Việc sử dụng các mô hình tiền lâm sàng thích hợp là một vấn đề rất quan trọng trong mọi phạm vi phát triển trị liệu ung thư và các vaccin polynucleotid cũng không phải là trường hợp ngoại lệ. Nhiều mô hình tiền lâm sàng thực tại chủ yếu là các mô hình ung thư trên chuột. Các mô hình tăng lên một cách nghiêm ngặt, phản ánh sự tiến bộ và trưởng thành của công nghệ này đã đến gần sát hơn thực trạng lâm sàng.

Trước hết là các chiến lược vaccin polynucleotid cho ung thư nhắm tới các KN khối u nhân tạo như ovalbumin hoặc β -galactosidase. Minh chứng về các hiệu ứng bảo vệ khối u trong hệ thống mô hình này dẫn tới việc phát triển các mô hình khối u trong đó các KN khối u của người như *CEA* và *MUCI* được thâm chuyển vào các dòng TB khối u chuột đồng gen. Những nghiên cứu này rất hữu ích vì nó cung cấp các bằng chứng cơ sở để chứng minh rằng các CTL được tạo ra dành cho các KN khối u này có thể kháng lại những thách đố nguy hiểm khủng khiếp của TB khối u. Tuy nhiên, do sự khác biệt chéo loài trong thành phần amino acid giữa người và chuột nên các vaccin này có tính sinh miễn dịch cao hơn với các thiết lập lâm sàng. Phát triển mô hình chuột chuyển gen biểu hiện KN ung thư người sẽ tạo ra điều kiện nghiêm ngặt hơn nhưng tốt hơn cho kịch bản lâm sàng để tối ưu hóa các vaccin polynucleotid. Những mô hình này cho phép xem xét những đòi hỏi đặc biệt để dựng lên một ĐUMD hiệu quả khi đối mặt với sự dung nạp với các KN khối u.

Một lĩnh vực khảo sát hiệu quả tiềm năng là điều trị các động vật nuôi như một báo cáo gần đây đối với chó phát sinh một cách tự nhiên u sắc tố ác tính. Các kỹ thuật chuyển gen tốt hơn sẽ là kịch bản thực hiện trên người.

Đối với việc thiết lập sự an toàn và tính khả thi của tiêm chủng polynucleotid thì những kinh nghiệm trên các động vật lớn và động vật cao cấp không phải người sẽ rất hữu ích cho việc chứng minh độ an toàn nói chung của cách tiếp cận này trước khi nó được TNLS trên người.

Những mô hình tiền lâm sàng tỏ ra là vô giá trong việc tìm hiểu các cơ chế phân tử liên quan tới việc tạo ra một ĐUMD kháng u hiệu quả sau khi tiêm chủng vaccin polynucleotid. Việc phát triển nhiều mô hình chuột với các khía cạnh riêng biệt về sự phá vỡ một cách chọn lọc của hệ miễn dịch (knockout gen) cho phép mô tả rõ hơn các yếu tố quan trọng cho việc cảm ứng ĐUMD hiệu quả. Khảo sát cơ chế thải loại khối u qua trung gian vaccin DNA trị liệu trong một mô hình chuột chuyển gen bị ung thư vú đã chứng minh được vai trò điều tiết của các tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$, các kháng thể, các receptor Fc, perforin, interferon $-\gamma$, NKT giới hạn bởi Cd1d và đại thực bào với vai trò quan trọng đối với bạch cầu trung tính hoạt hóa, nó có thể ly giải trực tiếp các TB ung thư và tác động cả tới hệ mạch của khối u.

NHỮNG TRẢI NGHIỆM LÂM SÀNG VỚI VACCIN POLYNUCLEOTID

Mặc dầu việc cảm ứng đáp ứng với cả tế bào B và T đối với các KN ngoại lai liên quan tới các bệnh truyền nhiễm đã được chứng minh khá thuyết phục trên người nhưng các KN khối u lại có tính sinh miễn dịch tương đối yếu, vì vậy việc cảm ứng một ĐUMD kháng u hiệu quả đối với các KN như thế rõ ràng là một thách đố to lớn và cho đến nay các trải nghiệm lâm sàng với các vaccin polynucleotid đã cho các kết quả có tính chất pha trộn. Các nghiên cứu lâm sàng đã củng cố thêm về độ an toàn và độc tính thấp của các vec tơ nói chung, nhưng tiềm năng của ĐUMD thì vẫn chưa được khảo sát và hiệu quả kháng u vẫn chưa rõ rệt.

Tuy nhiên, một số TNLS cũng đã được hoàn tất. Người ta chuyển trực tiếp qua cơ các DNA mã hóa một KN khối u đã được phân dòng (*CEA*) của ung thư kết tràng giai đoạn muộn. Các bệnh nhân được tiêm chủng một plasmid biểu hiện cả *CEA* và cả KN bề mặt của virus gây viêm gan B với tư cách là một đối chứng. Mặc dầu mức kháng thể bảo vệ đối với protein gây viêm gan đã được phát hiện trong một số bệnh nhân, nhưng vẫn còn ít bằng chứng về đáp ứng trực tiếp kháng lại *CEA*. Rosenberg và cộng sự đã báo cáo những phát hiện tương tự khi sử dụng DNA plasmid mã hóa KN u sắc tố gp100 trong một TNLS pha I đối với các bệnh nhân u sắc tố đã di căn. Trong thử nghiệm này, 22 bệnh nhân được tiêm chủng trong cơ hoặc trong da nhưng không

thấy có bằng chứng về ĐUMD đặc hiệu gp100. Tuy nhiên, có một bệnh nhân có đáp ứng một phần. Tác giả kết luận rằng không có ĐUMD nào được tạo ra. Điều này trái ngược với các thử nghiệm lâm sàng trước đây liên quan tới kháng nguyên gp100 được chuyển giao với tư cách là một gen chuyển vào trong vaccin cơ sở fowlpox hoặc với tư cách là các peptid và nhấn mạnh rằng điều cần thiết đối với các chiến lược này là phải nâng cao ĐUMD đối với các vaccin DNA plasmid.

Người ta đã phát hiện thấy tính sinh miễn dịch của vaccin DNA plasmid trong các bệnh nhân u lympho. Các nghiên cứu lâm sàng trước đó đã sử dụng các protein trình diện idiotyp globulin miễn dịch đặc hiệu khối u để tiêm chủng chủ động đã chứng minh được các lợi ích lâm sàng đối với tiêm chủng. Tuy nhiên, việc pha chế các vaccin protein đặc hiệu bệnh nhân thì rất vất vả và thiếu tính khả thi nếu muốn áp dụng rộng rãi. Tiêm chủng DNA có lợi thế là pha chế tương đối nhanh và không tốn nhiều tiền. Các bệnh nhân được tiêm chủng vaccin DNA mã hóa một phân tử chimeric bao gồm idiotyp đặc hiệu bệnh nhân được hòa cùng các chuỗi vùng hằng định G2a và k của globulin miễn dịch chuột. Các nhóm bệnh nhân được tiêm chủng với các DNA mã hóa của vaccin chimeric bằng một thiết bị Biojector không kim vào cơ hoặc da, có hoặc không có bổ sung DNA plasmid mã hóa yếu tố kích thích quần thể đại thực bào - bạch cầu hạt. Trong tất cả các nhóm bệnh nhân thì hầu hết đều tạo được ĐUMD đối với protein carrier Ig của chuột, điều đó chứng tỏ rằng các protein đã được mã hóa có được tạo ra và có khả năng tạo được một ĐUMD. Việc cảm ứng một ĐUMD với phần Id của một gen đã được mã hóa ít khi xảy ra, tuy nhiên cũng phát hiện được ở một số bệnh nhân.

Cần phải lưu ý rằng những TNLS này đã được thực hiện cho các bệnh ở giai đoạn muộn nhằm cảm ứng một ĐUMD thích hợp. Tuy nhiên với những kinh nghiệm chất lọc được từ việc chuyển giao DNA trần vào người trong trị liệu miễn dịch ung thư đã cho thấy các vaccin DNA plasmid thế hệ đầu tiên chưa đủ hiệu lực để tạo nên một ĐUMD có hiệu lực lâm sàng kháng lại các tự KN chưa đột biến. Trên Bảng 10.1 cũng chỉ rõ những hạn chế về mặt lâm sàng của các phương pháp đang được hiện hành.

Hai thử nghiệm lâm sàng pha I về vaccin DNA kháng trực tiếp các bệnh ác tính liên quan tới HPV đã được báo cáo. Việc điều trị các bệnh ác tính liên quan tới HPV có lợi thế là kháng nguyên HPV ngoại lai có thể được biểu hiện trong các tế bào ác tính. DNA plasmid mã hóa các epitop HLA-A2 có nguồn gốc từ protein HPV16 E7 được đóng gói trong các vi hạt chất dẻo dễ phân hủy PLG đã được chuyển vào trong cơ. Thử nghiệm trị liệu này được áp dụng cho những người bị loạn sản hậu môn cho kết quả là tăng đáp ứng tế bào T (phát hiện bằng đốm miễn dịch liên kết enzym (enzym-linked immunospot – ELISPOT) ở 10 trong số 12 bệnh nhân, một số đối tượng ở các nhóm liều cao hơn thì có đáp ứng phần nào về tổ chức học. Sử dụng chất phản ứng (reagent) cùng loại được chuyển giao dưới da hoặc trong cơ cho các phụ nữ bị tạo u nội biểu mô tử cung, kết quả là phát hiện thấy ĐUMD với HPV E7 ở hầu hết các bệnh nhân (73%) và đáp ứng tổ chức học đầy đủ ở 33% phụ nữ. Không có tác dụng phụ nghiêm trọng liên quan tới vaccin được báo cáo. Những nghiên cứu này cho thấy vaccin DNA hướng vào các kháng nguyên HPV có thể có vai trò quan trọng trong việc quản lý các bệnh ác tính liên quan tới HPV.

KẾT LUẬN VÀ CÁC ĐỊNH HƯỚNG TƯƠNG LAI

Nhịp độ định loại KN khối u đã tăng nhanh trong mấy năm qua cùng với các kỹ thuật mới được nâng cao không ngừng như trắc diện biểu hiện (expression profiling), SEREX và phân tích proteomic đã cho phép xác định các đích tiềm năng mới cho trị

liệu miễn dịch chủ động. Việc sử dụng các vaccin DNA trong các mô hình tiền lâm sàng có thể cung cấp các phương thức đánh giá tương đối nhanh khả năng ứng dụng tiềm tàng của các KN ứng cử viên với vai trò trung gian thải loại khối u. Ngoài các KN liên kết khối u truyền thống, các vaccin polynucleotid cũng có một vai trò trong các chiến lược vaccin kháng trực tiếp hệ mạch khối u.

Các nghiên cứu về vaccin polynucleotid điều trị các bệnh truyền nhiễm mạn tính vẫn phải tiếp tục khảo sát để phát triển các chiến lược mới, hợp nhất nó vào các vaccin ung thư, chẳng hạn như xây dựng các nghiên cứu tiền lâm sàng thật “quả cảm”, các nghiên cứu lâm sàng nhằm vào các bệnh truyền nhiễm để chứng minh được rằng DNA môi và virus cũng thúc đẩy rất tiềm năng ĐUMD trên người.

Mặc dầu các bằng chứng lâm sàng về hiệu quả của các vaccin polynucleotid trong trị liệu ung thư đã rất rõ ràng, nhưng vẫn cần phải làm rõ hơn nữa, lý do là chúng ta cần phải nghĩ tới tiềm năng của chúng trong việc quản lý các bệnh ác tính. Vì là cách trị liệu không có độc tính nên việc tiêm chủng polynucleotid cuối cùng cũng đã được áp dụng trong lâm sàng với tư cách là một chất bổ trợ có lượng dư thừa tối thiểu trong trị liệu. Điều đó rất hữu ích trong việc phòng ngừa sự tái phát bệnh. Cuối cùng là việc sử dụng các vaccin polynucleotid mở rộng tới lĩnh vực phòng ngừa ung thư. Lợi thế đáng quý của tiêm chủng polynucleotid là độ an toàn của nó cao. Vì vậy nó còn được quan tâm trong cả lĩnh vực quản lý các bệnh ác tính.