



(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)



1-0033254

(51)⁸ A61K 39/00; A61K 39/145; A61K 48/00; C12N 7/06; A61K 9/51; A61P 31/16; C07K 14/005; C12N 7/00; A61K 39/12; A61K 9/127 (13) B

(21) 1-2017-05108

(22) 26/05/2016

(86) PCT/US2016/034316 26/05/2016

(87) WO2016/191553 01/12/2016

(30) 62/166,344 26/05/2015 US

(45) 25/09/2022 414

(43) 26/03/2018 360A

(73) OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (US)

1524 North High Street, Columbus, Ohio 43201, United States of America

(72) GOURAPURA, Renukaradhya (US); DHAKAL, Santosh (NP); HIREMATH, Jagadish (IN); LEE, Chang-Won (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM ĐỂ ĐIỀU TRỊ HOẶC NGĂN NGỪA BỆNH CÚM LỢN VÀ VACCIN CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chế phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa cúm lợn ở đối tượng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa virus cúm lợn A bất hoạt và hạt nano poly(lactit co-glycolit) (PLGA), và các vacxin chứa các chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh cúm lợn ở đối tượng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa virus cúm lợn A bất hoạt và hạt nano poly(lactit co-glycolit) (PLGA), và các vaccin chứa các chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cúm lợn là bệnh truyền nhiễm đường hô hấp cấp tính ở lợn do virus cúm A (IAV) thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra. Hiện tại, các phân lớp H1N1, H1N2 và H3N2 của IAV gây ra đa số bệnh truyền nhiễm ở lợn. Do có sự hiện diện của cả thụ thể IAV ở chim ($\alpha 2,3$ Gal) và thụ thể IAV ở người ($\alpha 2,6$ Gal), cơ thể lợn sẽ có thể là nơi chứa các IAV khác nhau cùng hòa trộn. Các tín hiệu lâm sàng cấp tính ở lợn mắc cúm bao gồm sốt cao, biếng ăn, suy hô hấp, chảy nước mũi, và ho. Bệnh cúm gây tổn thất kinh tế đáng kể trong ngành chăn nuôi lợn do tình trạng mắc bệnh, không tăng trọng, kéo dài thời gian xuất chuồng, khả năng dễ mắc các bệnh lây nhiễm thứ cấp gây ra bởi vi khuẩn và virus như mycoplasma và hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS), chi phí thuốc men và khám chữa bệnh thú y. Một số virus cúm lợn (SwIV) cũng có thể truyền từ lợn sang người gây ra nguy cơ đe dọa sức khỏe cộng đồng. Ví dụ, virus cúm lợn H1N1 năm 2009 lây truyền cho khoảng 20% dân số toàn cầu và dẫn đến khoảng 200.000 ca tử vong, bên cạnh khoảng 500.000 người chết do lây nhiễm cúm hàng năm theo mùa.

Chủng ngừa là một trong những phương pháp kiểm soát bệnh cúm hiệu quả nhất. Ở thời điểm hiện tại, vaccin phòng bệnh cúm lợn để sử dụng cho lợn đã có sẵn trên thị trường. Do tỷ lệ đột biến cao trong các virus cúm đang lưu hành ở động vật nên hiệu quả của các vaccin thương mại trong lĩnh vực này luôn ở mức thấp. Các loại vaccin đa trị thương mại được cho sử dụng đồng thời với chất bổ trợ dùng qua đường tiêm bắp vì phương pháp tiêm nhắc lại tạo được miễn dịch đồng chủng, nhưng miễn dịch dị chủng lại yếu. Chủng ngừa trong bắp không tạo ra các mức đáp ứng miễn dịch tế bào và kháng thể niêm mạc tại chỗ như yêu cầu; hơn nữa, đã có các báo cáo về bệnh hô hấp trở nên mạnh hơn liên quan đến vaccin bất hoạt. Do đó, gánh nặng kinh tế dai

dẫn do cúm lợn gây ra trong ngành chăn nuôi lợn và nguy cơ lây truyền tiềm ẩn bệnh từ động vật sang người là căn cứ đảm bảo cho việc phát triển nền tảng vacxin miễn dịch chéo trên diện rộng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bản mô tả sáng chế bộc lộ các phương pháp và chế phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa cúm lợn ở đối tượng. Cụ thể, bản mô tả sáng chế bộc lộ chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm virus cúm lợn A bất hoạt và hạt nano poly(lactit co-glycolit) (PLGA). Trong một số phương án, chế phẩm và/hoặc hạt nano còn bao gồm chất bổ trợ.

Trong một số phương án, virus cúm lợn A bất hoạt là chủng virus cúm lợn A H1N1, H1N2 hoặc H3N2.

Bản mô tả cũng bộc lộ vacxin chứa chế phẩm sinh miễn dịch đã nêu trong chất mang được dụng.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại virus cúm A ở lợn bao gồm bước cho lợn sử dụng loại vacxin được bộc lộ.

Trong một số phương án, vacxin được cho sử dụng trong mũi.

Chi tiết về một hoặc nhiều phương án của sáng chế được trình bày trong các hình vẽ đi kèm và phần mô tả dưới đây. Các đặc điểm khác, mục đích và lợi ích của sáng chế sẽ được thể hiện rõ ràng trong phần mô tả và các hình vẽ, cũng như trong các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Biểu thị đặc trưng vật lý in vitro của NP PLGA-KAg và vai trò của chúng trong sự trưởng thành của các APC. (A) Hình thái học bề mặt của PLGA-KAg (độ phóng đại 10 Kx). (B) Phân bố kích thước của PLGA-KAg. Tỷ lệ phần trăm được tính dựa trên việc xác định kích thước của 200 NP. (C) Mức phóng thích protein in vitro của PLGA-KAg trong khoảng thời gian 4 tuần. Hiệu quả điều trị của PLGA-KAg dựa trên biểu hiện của phân tử đồng kích thích CD80/86 trên (D) MoDC và (E) đại thực bào ở lợn. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện

kiểm định post-hoc (hậu định) Tukey. Dấu sao biểu thị sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm lợn được chỉ định (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; và *** $p < 0,001$).

Hình 2: Đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg trước thử nghiệm. PBMC (Tế bào đơn nhân máu ngoại vi) phân lập sau khi chủng ngừa nhắc lại vào ngày 35 sau chủng ngừa (PV) (DPV 35)/ ngày 0 sau thử nghiệm (PC) (DPC 0) được tái kích thích và sự tăng sinh lympho bào đặc hiệu được xác định đối với (A) virus vaccin đồng chủng (SwIV H1N2) và (B) virus thử nghiệm dị chủng (SwIV H1N1). Tần suất của (C) tế bào CD3+CD4+CD8 α +, (D) tế bào CD3+CD4+CD8 α β +, và (E) tế bào T CD3+ δ + $\gamma\delta$ trong PBMC được xác định vào ngày 0 PC bằng phương pháp phân tích đếm tế bào theo dòng (flow cytometry). Để đánh giá đáp ứng miễn dịch thể dịch, (F) hiệu giá HI trong huyết tương và (G) đáp ứng kháng thể IgG trong huyết tương với tỷ lệ pha loãng 1:200 được xác định đối với virus vaccin đồng chủng (SwIV H1N2). Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện kiểm định post-hoc (hậu định) Tukey. Dấu sao biểu thị sự chênh lệch về mặt thống kê giữa hai nhóm lợn được chỉ định (* biểu thị $p < 0,05$; ** biểu thị $p < 0,01$; và *** biểu thị $p < 0,001$).

Hình 3: Chủng ngừa vaccin PLGA-KAg trong mũi làm giảm cúm lâm sàng gây ra bởi thử nghiệm virus dị chủng ở lợn. (A) Lợn được chủng ngừa KAg hoặc PLGA-KAg bằng đường trong mũi dưới dạng sương mù bằng dụng cụ dẫn truyền đa liều. (B) Nhiệt độ trực tràng ở lợn được ghi chép lại hàng ngày sau thử nghiệm.

Hình 4: Bệnh tích phổi giảm ở những con lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và virus gây bệnh độc hại được thử nghiệm. Hình ảnh phổi tiêu biểu của các nhóm lợn thử nghiệm được thể hiện: (A) Bệnh tích đại thể ở phổi dạng đông đặc được biểu thị bằng mũi tên; (B) các phần phổi bị bệnh tích vi thể được nhuộm màu bằng H&E; và (C) phân tích hóa mô miễn dịch các phần phổi về các kháng nguyên SwIV.

Hình 5: Biểu đồ tiêu biểu của phương pháp đếm tế bào theo dòng thể hiện mô hình của quy trình đóng mở cổng (gating) của lympho bào của lợn. PBMC phân lập vào ngày 6 PC từ lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus được tái kích thích bằng SwIV H1N1 và được xử lý bằng Golgiplug/khối, và được nhuộm miễn dịch bằng chất đánh dấu bề mặt lympho bào đặc hiệu, sau đó là IFN γ nội bào, và tần suất của các phân nhóm nhỏ lympho bào (IFN γ +) hoạt hóa được ước tính. Mô hình

gating của lớp kháng thể và các chất đánh dấu đặc hiệu lympho bào được nhuộm với CD3 ϵ , CD4 α , CD8 α , CD8 β và IFN γ để xác định tần suất của các tế bào CD3-IFN γ +, CD3-CD4-CD8 α +IFN γ +, CD3+IFN γ +, CD3+CD4+CD8 α -IFN γ +, CD3+CD4+CD8 α +IFN γ và CD3+CD4-CD8 α β +IFN γ được thể hiện.

Hình 6: Đáp ứng nhớ ở lympho bào ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus tăng lên đáng kể. Vào ngày mổ xác (ngày 6 PC) các PBMC đã phân lập được tái kích thích bằng vaccin hoặc virus thử nghiệm và tần suất các lympho bào (IFN γ +) hoạt hóa được xác định bởi phương pháp đếm tế bào theo dòng. Tần suất trung bình của các lympho bào: (A) CD3+IFN γ +, (B) CD3-IFN γ +, (C) CD3+CD4+CD8 α +IFN γ +, (D) CD3+CD4+CD8 α -IFN γ +, (E) CD3+CD4-CD8 α β +IFN γ +, và (F) CD3-CD4-CD8 α +IFN γ từ tất cả các nhóm lợn thử nghiệm được định lượng. Mỗi cột biểu thị tần suất trung bình của tập hợp con lympho bào được xác định của 7 hoặc 9 con lợn $\pm$ SEM. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện kiểm định post-hoc (hậu định) Tukey. Dấu sao biểu thị sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm lợn được chỉ định (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; và *** $p < 0,001$).

Hình 7: Tăng cường tiết IFN γ và đáp ứng tế bào T nhớ ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus. PBMC phân lập vào ngày 6 PC được tái kích thích bằng vaccin hoặc virus thử nghiệm trong 3 ngày. (A) Lốp bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch và xác định mức tiết IFN γ bằng kỹ thuật ELISA. Khả năng đáp ứng tế bào nhớ của PBMC chỉ ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg được tái kích thích (SwIV H1N1 hoặc H1N2) hoặc không được kích thích (đối chứng tế bào, CC) được thể hiện về mặt tần suất lympho bào: (B) CD3+IFN γ +, (C) CD3+CD4-CD8 α β +IFN γ +, và (D) IFN γ được tiết ở lớp bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào. Tỷ lệ phần trăm tế bào thể hiện ở trên đường nét đứt biểu hiện đáp ứng tế bào T nhớ đặc hiệu khi không được kích thích. Mỗi cột biểu thị tần suất trung bình của tập hợp con lympho bào được biểu thị của 7 hoặc 9 con lợn $\pm$ SEM. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện kiểm định post-hoc (hậu định) Tukey. Dấu sao biểu thị sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm lợn được chỉ định (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Hình 8. Đáp ứng miễn dịch thể dịch ở lợn được chủng ngừa và lợn được cho thử nghiệm virus. Đáp ứng kháng thể IgA đối với SwIV H1N1 thử nghiệm ở lợn trong các mẫu (A) dịch phết mũi không pha loãng; (B) dịch BAL và (C) dịch thủy phân tế bào phổi pha loãng theo tỷ lệ 1:200. Đáp ứng IgG đối với SwIV H1N1 trong các mẫu (D) huyết tương và (E) dịch BAL pha loãng theo tỷ lệ 1:200. Hiệu giá HI trong các mẫu (F) dịch BAL và (G) huyết tương, và (H) hiệu giá VN trong các mẫu dịch BAL. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện kiểm định post-hoc (hậu định) Tukey. Dấu sao biểu thị sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm lợn được chỉ định (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Bản mô tả sáng chế bộc lộ các phương pháp và chế phẩm dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa cúm lợn ở đối tượng bao gồm bước kết hợp virus cúm lợn A bất hoạt với hạt nano.

Thuật ngữ “đối tượng” đề cập đến bất kỳ cá nhân nào là mục tiêu của việc sử dụng thuốc hoặc điều trị. Đối tượng có thể là động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú. Do đó, đối tượng có thể là người hoặc đối tượng bị bệnh thuộc ngành thú y. Thuật ngữ “bệnh nhân” đề cập đến đối tượng đang nhận được sự điều trị của bác sĩ khám chữa bệnh, ví dụ, bác sĩ điều trị.

“Chế phẩm sinh miễn dịch” là chế phẩm bao gồm chất phù hợp để sử dụng ở đối tượng là người hoặc động vật (ví dụ, trong hoàn cảnh thử nghiệm) có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, ví dụ, chống lại mầm bệnh, như virus cúm A ở lợn. Như vậy, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên (ví dụ, virus tinh chế toàn phần hoặc các phân đơn vị kháng nguyên, ví dụ, polypeptit của chúng) hoặc epitop kháng nguyên. Chế phẩm sinh miễn dịch cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần bổ sung có khả năng tạo ra hoặc làm tăng đáp ứng miễn dịch, như tá dược, chất mang, và/hoặc chất bổ trợ. Trong một số trường hợp, các chế phẩm sinh miễn dịch được sử dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ đối tượng khỏi các triệu chứng hoặc tình trạng do mầm bệnh gây ra. Trong một số trường hợp, các triệu chứng hoặc bệnh tật do mầm bệnh gây ra được ngăn ngừa (hoặc được điều trị, ví dụ, được làm giảm bớt hoặc giảm nhẹ) bằng cách ức chế mầm bệnh nhân lên sau khi đối tượng phơi nhiễm với mầm

bệnh. Trong ngữ cảnh của bản mô tả này, thuật ngữ chế phẩm sinh miễn dịch sẽ được hiểu là bao gồm các chế phẩm được dự định cho một đối tượng hoặc nhóm đối tượng sử dụng nhằm mục đích tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại virus hoặc làm giảm nhẹ tác hại của virus (đó là các chế phẩm vacxin hoặc vaccin).

“Kháng nguyên” là hợp chất, chế phẩm hoặc chất có thể kích thích sản sinh kháng thể và/hoặc đáp ứng tế bào T ở động vật, bao gồm các chế phẩm được tiêm, hấp thụ hoặc được đưa vào trong động vật bằng hình thức khác. Thuật ngữ “kháng nguyên” bao gồm tất cả các epitop kháng nguyên liên quan. Thuật ngữ “epitop” hoặc “yếu tố quyết định kháng nguyên” đề cập đến vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T đáp ứng. “Epitop kháng nguyên trội” hoặc “epitop trội” là những epitop mà đáp ứng miễn dịch đáng kể ở vật chủ về mặt chức năng, ví dụ, đáp ứng kháng thể hoặc đáp ứng tế bào T, được tạo ra cho chúng. Theo đó, về mặt đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại mầm bệnh, các epitop kháng nguyên trội là các phần kháng nguyên mà khi được nhận diện bởi hệ miễn dịch chủ sẽ dẫn đến khả năng bảo vệ chống bệnh tật do mầm bệnh gây ra. Thuật ngữ “epitop tế bào T” đề cập đến epitop mà khi gắn kết với phân tử MHC thích hợp thì sẽ được liên kết đặc hiệu với tế bào T (thông qua thụ thể tế bào T). “Epitop tế bào B” là epitop được liên kết đặc hiệu với kháng thể (hoặc phân tử thụ thể tế bào B). Kháng nguyên cũng có thể ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch bẩm sinh.

“Đáp ứng miễn dịch” là đáp ứng của tế bào trong hệ miễn dịch, như tế bào B, tế bào T, hoặc bạch cầu đơn nhân, đối với tác nhân kích thích. Đáp ứng miễn dịch có thể là đáp ứng tế bào T, dẫn đến sản sinh ra các kháng thể đặc hiệu, như các kháng thể trung hòa đặc hiệu kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch cũng có thể là đáp ứng tế bào T, như đáp ứng tế bào T CD4+ hoặc đáp ứng tế bào T CD8+. Trong một số trường hợp, đáp ứng mang tính đặc hiệu đối với kháng nguyên cụ thể (đó là “đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên”). Đáp ứng miễn dịch cũng có thể bao gồm đáp ứng bẩm sinh. Nếu kháng nguyên có nguồn gốc từ mầm bệnh, đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên là “đáp ứng đặc hiệu mầm bệnh.” “Đáp ứng miễn dịch bảo vệ” là đáp ứng miễn dịch làm ức chế chức năng hoặc hoạt tính bất lợi của mầm bệnh, làm giảm khả năng gây bệnh của mầm bệnh, hoặc giảm triệu chứng (kể cả tử vong) do bị nhiễm bệnh từ mầm bệnh. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ có thể đo lường được, ví dụ, bằng cách gây ức chế khả năng sao chép của virus hoặc sự hình thành ổ nhiễm virus trong thí nghiệm làm giảm ổ nhiễm

virut hoặc thí nghiệm làm trung hòa ELISA, hoặc bằng cách đo sức đề kháng với mầm bệnh được thử nghiệm trong cơ thể sống.

Các chế phẩm sinh miễn dịch được bọc lộ trong tài liệu này phù hợp để ngăn ngừa, làm giảm nhẹ và/hoặc điều trị bệnh do nhiễm virut gây ra.

“KAg” là từ viết tắt của “killed antigen” (kháng nguyên bị triệt tiêu) và chỉ virut bị triệt tiêu hoặc bất hoạt. Virut bất hoạt bao gồm một hoặc nhiều protein virut sinh miễn dịch và do đó virut bất hoạt có thể được coi là kháng nguyên bị triệt tiêu.

“NP-KAg” là từ viết tắt của “nanoparticle-killed antigen” (kháng nguyên bị hạt nano triệt tiêu). Từ này mô tả virut cúm lợn bất hoạt bị hạt nano bọc kín.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hạt tương tự virut” hoặc “VLP” được dùng để chỉ vỏ virut không có khả năng sao chép. VLP thường bao gồm một hoặc nhiều protein virut liên quan đến cấu trúc vỏ protein bề mặt của virut. VLP có thể hình thành tự phát dựa trên biểu hiện tái tổ hợp của protein trong hệ thống biểu hiện thích hợp. VLP, khi cho động vật sử dụng, có thể sinh miễn dịch và do đó có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ hoặc điều trị ở động vật. Các phương pháp tạo ra VLP thường được biết rõ trong lĩnh vực và được thảo luận đầy đủ hơn ở phần dưới đây. Có thể phát hiện sự hiện diện của VLP sau sự biểu hiện tái tổ hợp của các protein virut bằng các kỹ thuật thông thường được biết đến trong lĩnh vực này, như kính hiển vi điện tử, đặc trưng sinh lý, v.v. Xem, ví dụ, Baker và cộng sự, *Biophys. J.* (Tạp chí lý sinh học) (1991) 60:1445-1456; Hagensee và cộng sự, *J. Virol.* (Tạp chí virut học) (1994) 68:4503-4505. Ví dụ, VLP có thể được phân lập bằng cách ly tâm gradien tỷ trọng và/hoặc được xác định bằng phân dải tỷ trọng đặc trưng.

Thuật ngữ “điều trị” được dùng để chỉ việc can thiệp y tế đối với bệnh nhân nhằm mục đích chữa, giảm nhẹ, làm ổn định hoặc ngăn ngừa bệnh tật, tình trạng bệnh lý hoặc chứng rối loạn. Thuật ngữ này bao gồm điều trị chủ động, nghĩa là điều trị theo hướng cụ thể để cải thiện bệnh tật, tình trạng bệnh lý, hoặc chứng rối loạn, đồng thời bao gồm điều trị theo căn nguyên, nghĩa là điều trị theo hướng loại bỏ nguyên nhân gây bệnh tật, tình trạng bệnh lý, hoặc chứng rối loạn liên quan. Ngoài ra, thuật ngữ này còn bao gồm điều trị giảm nhẹ, nghĩa là điều trị nhằm mục đích giảm nhẹ triệu

chúng hơn là chữa bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc chứng rối loạn; điều trị phòng ngừa, nghĩa là điều trị theo hướng làm giảm thiểu hoặc gây ức chế một phần hoặc toàn bộ sự phát triển của bệnh tật, tình trạng bệnh lý, hoặc chứng rối loạn liên quan; và điều trị hỗ trợ, nghĩa là điều trị bổ sung vào liệu pháp cụ thể khác theo hướng cải thiện bệnh tật, tình trạng bệnh lý, hoặc chứng rối loạn liên quan.

Thuật ngữ “ngăn ngừa” được dùng để chỉ việc điều trị xử lý sớm hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh hoặc tình trạng, hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng. Do đó, nếu việc điều trị có thể điều trị bệnh ở đối tượng có các triệu chứng bệnh thì cũng có thể ngăn ngừa bệnh ở đối tượng chưa có một số hay toàn bộ triệu chứng bệnh.

Các chế phẩm, chế phẩm sinh miễn dịch, và vacxin được mô tả trong tài liệu này có thể bao gồm một hoặc nhiều hạt nano. Ví dụ về hạt nano (có thể sử dụng thay thế cho thuật ngữ “chất mang nano”) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất mang nano bao gồm một hoặc nhiều polyme. Trong một số phương án, một hoặc nhiều polyme là polyme tan trong nước, không kết dính. Trong một số phương án, polyme là polyetylen glycol (PEG) hoặc polyetylen oxit (PEO). Trong một số phương án, polyme là polyalkylen glycol hoặc polyalkylen oxit. Trong một số phương án, một hoặc nhiều polyme là polyme có khả năng phân hủy sinh học. Trong một số phương án, một hoặc nhiều polyme là polyme tương hợp sinh học mà là thể liên hợp giữa polyme tan trong nước, không kết dính với polyme có khả năng phân hủy sinh học. Trong một số phương án, polyme có khả năng phân hủy sinh học là axit polylactic (PLA), axit poly(glycolic) (PGA), hoặc axit poly(lactic/glycolic) (PLGA). Trong một số phương án, chất mang nano bao gồm các polyme PEG-PLGA.

Trong một số phương án, chất mang nano được hình thành bằng cách tự ráp nối. Tự ráp nối chỉ quá trình hình thành chất mang nano sử dụng các thành phần có thể dự đoán là sẽ tự định hướng để hình thành chất mang nano một cách có thể lặp lại và dự đoán được. Trong một số phương án, chất mang nano được tạo thành bởi các vật chất sinh học lưỡng tính tự định hướng với nhau để tạo thành các chất mang nano có kích thước, thành phần, và cách xếp đặt thành phần có thể dự đoán. Trong một số phương án, chất mang nano là vi hạt, hạt nano, hoặc hạt pico. Trong một số phương án, vi hạt, hạt nano, hoặc hạt pico là tự ráp nối.

Trong một số phương án, chất mang nano có điện thế zeta dương. Trong một số phương án, chất mang nano có điện tích dương toàn phần khi pH ở mức trung tính. Trong một số phương án, chất mang nano bao gồm một hoặc nhiều gốc amin tại bề mặt. Trong một số phương án, gốc amin là amin bậc 1, bậc 2, bậc 3, hoặc bậc 4. Trong một số phương án, gốc amin là amin béo. Trong một số phương án, chất mang nano bao gồm polyme chứa amin. Trong một số phương án, chất mang nano bao gồm lipid chứa amin. Trong một số phương án, chất mang nano bao gồm protein hoặc peptit mang điện tích dương khi pH ở mức trung tính. Trong một số phương án, chất mang nano là hạt latec. Trong một số phương án, chất mang nano có một hoặc nhiều gốc amin trên bề mặt có điện tích dương toàn phần khi pH ở mức trung tính.

Các hạt nano có thể hỗ trợ dẫn truyền virus cúm lợn A bất hoạt và/hoặc cũng có thể sinh miễn dịch. Có thể dẫn truyền đến một vùng quan tâm cụ thể, ví dụ, niêm mạc. Trong một số phương án, hạt nano có thể định thời gian giải phóng virus cúm lợn A bất hoạt để tăng cường và/hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch. Trong một số phương án, hạt nano liên kết với virus cúm lợn A bất hoạt để chế phẩm có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch. Sự liên kết này có thể xảy ra, ví dụ, trong trường hợp hạt nano được giữ lại hoặc tạo nang với virus cúm lợn A bất hoạt. Được giữ lại nghĩa là trường hợp bao bọc vật lý virus cúm lợn A bất hoạt trong các hạt nano. Trong một số phương án, virus cúm lợn A bất hoạt được giữ lại trong hạt nano bằng phương pháp tạo nhũ tương trong nước/dầu/nước. Trong một số phương án, hạt nano là poly(lactit co-glycolit) (PLGA). Tùy thuộc vào tỷ lệ giữa lactit với glycolit dùng trong quá trình trùng hợp, có thể thu được và sử dụng các dạng PLGA khác nhau. Các dạng này thường được xác định liên quan đến tỷ lệ của các monome được sử dụng (ví dụ, PLGA 75:25 được xác định là chất đồng trùng hợp có thành phần là 75% axit lactic và 25% axit glycolic). Có thể sử dụng các tỷ lệ khác nhau trong sáng chế này, ví dụ: 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, và các số nằm trên và nằm trong những tỷ lệ này. Ví dụ bổ sung về các hạt nano phù hợp bao gồm chitosin, canxi phosphat, lipid của các vi khuẩn khác nhau như *E. Coli*, mycobacteria, leptospira và các kết hợp giữa chúng. Trong một ví dụ, chế phẩm có thể thu được bằng cách pha trộn 180 mg PLGA với khoảng 5 mg virus cúm lợn A bất hoạt (hoặc khoảng 36 mg PLGA với 1 mg virus cúm lợn A bất hoạt). Hiệu suất của quy trình bao bọc (tạo nang) virus cúm lợn A bất hoạt có thể khác nhau. Trong một phương án, hạt nano được bao bọc /tạo nang 50-55%, tính trên tổng lượng protein virus

cúm lợn A bất hoạt được sử dụng trong quá trình bao bọc. Virut cúm lợn A bất hoạt được giữ lại có thể được sử dụng dưới dạng các hỗn hợp các kháng nguyên được giữ lại/được tạo nang và không được giữ lại/không được tạo nang hoặc các kháng nguyên được giữ lại/được tạo nang có thể được tiếp tục tinh chế.

Trong một số phương án, kháng nguyên có nguồn gốc từ virut cúm lợn A bất hoạt hoặc bị triệt tiêu. Trong một phương án, virut cúm lợn A được làm cho bất hoạt hoặc bị triệt tiêu bởi tia cực tím. Các phương tiện làm bất hoạt khác bao gồm hóa chất, nhiệt, hoặc phóng xạ.

Bất kỳ virut cúm lợn A bất hoạt hoặc kháng nguyên virut cúm lợn A bất hoạt sinh miễn dịch phù hợp nào đều có thể được sử dụng trong chế phẩm này. Ví dụ, kháng nguyên virut cúm lợn A có thể là glycoprotein bề mặt của virut cúm lợn A. Ví dụ về các kháng nguyên sinh miễn dịch bao gồm ngưng kết tố hồng cầu (hemagglutinin) có nguồn gốc từ tái tổ hợp, neuraminidaza, nucleocapsid và các protein nền. Kháng nguyên virut cúm lợn A có thể có nguồn gốc từ tái tổ hợp.

Bản mô tả sáng chế bộc lộ các chế phẩm bao gồm các hạt tương tự virut (VLP) và hạt nano. Các chế phẩm được bộc lộ có thể bao gồm VLP sinh miễn dịch. Các VLP giống virut, nhưng không gây lây nhiễm vì chúng không chứa bất kỳ chất liệu di truyền virut nào. Biểu hiện của các protein cấu tạo virut, như Capsid, có thể dẫn đến quy trình tự ráp nối của các VLP. Có thể tạo ra VLP trong nhiều hệ thống nuôi cấy tế bào bao gồm dòng tế bào động vật có vú, dòng tế bào côn trùng, nấm men, và tế bào thực vật. Ví dụ, có thể tạo ra VLP bằng hệ thực vật hoặc baculovirus. VLP có thể có tính sinh miễn dịch. Có thể sử dụng hạt nano được bộc lộ bất kỳ để giữ lại VLP của virut cúm lợn A. Ví dụ, bản mô tả bộc lộ các VLP của virut cúm lợn A được giữ lại trong các hạt nano PLGA.

Bản mô tả này mô tả các vaccin bao gồm chế phẩm sinh miễn dịch được bộc lộ trong bản mô tả này trong chất mang mà trong đó vaccin mang tính bảo vệ chống lây nhiễm virut cúm lợn A. Thuật ngữ “chất mang sinh miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ polypeptit thứ nhất hoặc đoạn, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó làm tăng khả năng sinh miễn dịch của polypeptit thứ hai hoặc đoạn, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. “Chất mang sinh miễn dịch” có thể được dung hợp, hoặc được

liên hợp/kết hợp với polypeptit mong muốn hoặc đoạn của nó. Xem, ví dụ, Bằng sáng chế châu Âu số EP 0385610 B1, được kết hợp đầy đủ vào đơn đăng ký này bằng cách viện dẫn nhằm mục đích giải thích về việc dung hợp, liên hợp hoặc kết hợp polypeptit với chất mang. Ví dụ về “chất mang sinh miễn dịch” là PLGA. Trong một số phương án, vaccin có thể bao gồm virut cúm lợn A bất hoạt toàn phần, được tạo nang bởi PLGA, và chất mang.

Bản mô tả bộc lộ các ví dụ về chế phẩm sinh miễn dịch, ví dụ, các chế phẩm vaccin. Ngoài ra, các chế phẩm được mô tả trong tài liệu này có thể bao gồm một hoặc nhiều chất kích thích sinh miễn dịch. Chất kích thích sinh miễn dịch về cơ bản đề cập đến bất kỳ chất nào mà tăng cường hoặc tạo khả năng đáp ứng miễn dịch (qua trung gian kháng thể hoặc tế bào) với kháng nguyên ngoại sinh. Một loại chất kích thích sinh miễn dịch ưu tiên khác bao gồm chất bổ trợ. Nhiều chất bổ trợ chứa chất liệu được thiết kế để bảo vệ kháng nguyên khỏi hiện tượng dị hóa nhanh, như nhôm hydroxit hoặc dầu khoáng, và chất kích thích đáp ứng miễn dịch, như lipit A, các protein có nguồn gốc từ vi khuẩn ho gà *Bordetella pertussis* hoặc vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*. Một số chất bổ trợ có sẵn trên thị trường như, ví dụ, chất bổ trợ Freund không hoàn chỉnh và hoàn chỉnh (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); chất bổ trợ Merck 65 (Merck and Company, Rahway, N.J.); AS-2 (GlaxoSmithKline, Philadelphia, Pa.); muối nhôm như gel nhôm hydroxit (nhôm) hoặc nhôm phosphat; muối canxi, sắt hoặc kẽm; huyền phù không tan của tyrosin axyl hóa; đường axyl hóa; polysacarit được dẫn xuất có tính cation hoặc anion; polyphosphazene; các vi cầu có khả năng phân hủy sinh học; monophosphoryl lipit A và quail A. Các cytokin, như GM-CSF, interleukin-2, -7, -12, và các yếu tố tăng trưởng khác cũng có thể được sử dụng làm chất bổ trợ.

Chế phẩm chất bổ trợ có thể là chế phẩm cảm ứng đáp ứng miễn dịch chống viêm (qua trung gian kháng thể hoặc tế bào). Theo đó, các mức cytokin chống viêm cao (cytokin chống viêm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), interleukin 10 (IL-10), và yếu tố tăng trưởng biến nạp beta (TGF β). Tùy chọn, đáp ứng chống viêm có thể qua trung gian tế bào hỗ trợ T CD4⁺. Protein flagellin ở vi khuẩn được chứng minh là có tác động bổ trợ (McSorley và cộng sự, J. Immunol. (Tạp chí miễn dịch học) 169:3914-19, 2002). Bản mô tả cũng bộc lộ các chuỗi

polypeptit mã hóa các protein flagellin mà có thể được sử dụng trong các chế phẩm bổ trợ.

Tùy chọn, các chất bổ trợ sử dụng kết hợp với các chế phẩm được bộc lộ làm tăng tính đáp ứng lipopolysaccharit (LPS). Các chất bổ trợ mang tính minh họa bao gồm nhưng không giới hạn ở monophosphoryl lipid A (MPL), aminoalkyl glucosaminid 4-phosphat (AGP), bao gồm nhưng không giới hạn ở RC-512, RC-522, RC-527, RC-529, RC-544, và RC-560 (Corixa, Hamilton, Mont.).

Ngoài ra, chế phẩm bổ trợ có thể là chế phẩm cảm ứng đáp ứng miễn dịch chủ yếu là của loại Th1. Các mức cytokin loại Th1 (ví dụ, IFN- γ , TNF α , IL-2 và IL-12) cao có xu hướng tạo thuận lợi cho việc cảm ứng đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào với đối với kháng nguyên được sử dụng. Ngược lại, các mức cytokin loại Th2 (ví dụ, IL-4, IL-5, IL-6 và IL-10) cao có xu hướng tạo thuận lợi cho việc cảm ứng đáp ứng miễn dịch thể dịch. Sau khi sử dụng vacxin được cung cấp trong tài liệu này, đối tượng sẽ hỗ trợ đáp ứng miễn dịch bao gồm đáp ứng loại Th1 và Th2. Tùy chọn, mức cytokin loại Th1 sẽ tăng lên đến mức lớn hơn mức cytokin loại Th2. Các mức cytokin này có thể được đánh giá dễ dàng bằng các xét nghiệm tiêu chuẩn. Mức cytokin loại Th2 có thể tăng lên đến mức lớn hơn mức cytokin loại Th1.

Một số chất bổ trợ nhất định để tạo ra chủ yếu là đáp ứng loại Th1 bao gồm, ví dụ, kết hợp monophosphoryl lipid A, tốt hơn là monophosphoryl lipid A 3-de-O-axyl hóa, cùng với các chất bổ trợ là muối nhôm được cung cấp từ Corixa Corporation (Seattle, Wash.; xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 và 4,912,094, được kết hợp vào đơn đăng ký này bằng cách viện dẫn để giải thích). Oligonucleotit chứa CpG (trong đó dinucleotit CpG không được metyl hóa) cũng tạo ra đáp ứng Th1 chủ yếu. Các oligonucleotit này được biết đến rộng rãi và được mô tả, ví dụ, trong WO 96/02555, WO 99/33488 và Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 6,008,200 và 5,856,462. Các trình tự ADN mang tính kích thích sinh miễn dịch cũng được mô tả, ví dụ, bởi Sato và cộng sự, Science (Khoa học) 273:352, 1996. Chất bổ trợ khác bao gồm saponin, như Quil A, hoặc chất dẫn xuất của nó, bao gồm QS21 và QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); Escin; Digitonin; hoặc Gypsophila hoặc các saponin của chenopodium quinoa. Các chế phẩm khác có thể bao gồm nhiều hơn

một saponin trong kết hợp các chất bổ trợ, ví dụ các kết hợp bao gồm ít nhất hai chất trong nhóm sau đây bao gồm QS21, QS7, Quil A, β -escin, hoặc digitonin.

Các chế phẩm saponin cũng có thể được kết hợp với các chất mang vacxin bao gồm chitosan hoặc các polyme mang tính polycation khác, các hạt polylactit và polylactit-co-glycolit, nền polyme gốc poly-N-acetyl glucosamin, các hạt bao gồm polysacarit hoặc polysacarit được thay đổi về mặt hóa học, liposom và các hạt gốc lipid, các hạt bao gồm monoeste glyxerol, v.v. Các saponin cũng có thể được phối chế với sự hiện diện của cholesterol để hình thành các cấu trúc hạt như liposom hoặc các phức chất kích thích miễn dịch (ISCOM). Ngoài ra, các saponin có thể được phối chế cùng với ete hoặc este của polyoxyetylen, dưới dạng dung dịch hoặc huyền phù không chứa hạt, hoặc dưới dạng cấu trúc hạt như liposom paucilamellar hoặc ISCOM. Các saponin cũng có thể được phối chế với các tá dược như CARBOPOL™ (Noveon, Cleveland, Ohio) để tăng độ nhớt, hoặc có thể được phối chế dưới dạng bột khô với tá dược bột như lactoza.

Tùy chọn, hệ thống chất bổ trợ bao gồm kết hợp của monophosphoryl lipid A và dẫn xuất saponin, như kết hợp của QS21 và chất bổ trợ 3D-MPL., như được mô tả trong WO 94/00153, hoặc chế phẩm ít có khả năng gây phản ứng hơn trong trường hợp QS21 được làm nguội bằng cholesterol, như được mô tả trong WO 96/33739. Các chế phẩm khác bao gồm nhũ tương dầu trong nước và tocopherol. Chế phẩm bổ trợ khác sử dụng QS21, chất bổ trợ 3D-MPL.RTM. và tocopherol trong nhũ tương dầu trong nước được mô tả trong WO 95/17210.

Hệ thống bổ trợ tăng cường khác bao gồm kết hợp của oligonucleotit chứa CpG và dẫn xuất saponin, cụ thể là kết hợp giữa CpG và QS21 được bộc lộ trong WO 00/09159. Tùy chọn, chế phẩm ngoài ra còn bao gồm nhũ tương dầu trong nước và tocopherol.

Các chất bổ trợ minh họa bổ sung để sử dụng trong các chế phẩm được bộc lộ Montamide ISA 720 (Seppic, Pháp), SAF (Chiron, California, Hoa Kỳ), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), loạt chất bổ trợ SBAS (ví dụ, SBAS-2 hoặc SBAS-4, được cung cấp bởi GlaxoSmithKline, Philadelphia, Pa.), Detox (Enhanzyn™) (Corixa, Hamilton, Mont.), RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) và các aminoalkyl glucosaminide 4-phosphat (AGP) khác, như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng

sáng chế Hoa Kỳ đang thẩm định số 08/853,826 và 09/074,720, toàn bộ thông tin được bộc lộ của đơn này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, và chất hỗ trợ ete polyoxyetylen như được mô tả trong WO 99/52549A1.

Bản mô tả sáng chế cũng mô tả các phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại virus cúm A ở lợn bao gồm bước cho lợn sử dụng chế phẩm được bộc lộ ở đây. Đáp ứng miễn dịch có thể mang tính bảo vệ. Phương pháp có thể còn bao gồm bước cho lợn sử dụng virus cúm lợn A gây độc hại để theo dõi hiệu quả của vaccin.

Bản mô tả này mô tả các phương pháp làm giảm khả năng không sinh sản hoặc sự suy hô hấp ở lợn bao gồm bước cho lợn sử dụng vaccin hoặc chế phẩm được bộc lộ trong tài liệu này. Phương pháp có thể còn bao gồm bước cho lợn sử dụng virus cúm lợn A gây độc hại để theo dõi hiệu quả của vaccin. Bản mô tả này cũng mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch ở lợn bao gồm: bước cho lợn sử dụng vaccin hoặc chế phẩm được cung cấp trong tài liệu này.

Bản mô tả này cũng mô tả phương pháp và chế phẩm có thể được dùng làm tăng (ví dụ, tăng gấp 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.) đáp ứng miễn dịch thể dịch và miễn dịch qua trung gian tế bào đối với virus cúm lợn A so với kháng nguyên vaccin virus cúm lợn A bị triệt tiêu (K-Ag) ở lợn được thử nghiệm virus đồng chủng được gây miễn dịch. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây có thể được dùng để làm tăng đáng kể (ví dụ, tăng gấp 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.) kháng thể trung hòa virus và đáp ứng IgA ở phổi và máu khi so với kháng nguyên vaccin virus cúm lợn A bị triệt tiêu (K-Ag) ở lợn được thử nghiệm virus đồng chủng được gây miễn dịch. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để cung cấp cho dịch thủy phân tế bào phổi và huyết thanh của lợn được chủng ngừa Nano-KAg IFN- γ và IL-12 với mức cao hơn (ví dụ, tăng gấp 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.), và các chất trung gian ức chế miễn dịch (IL-10 và TGF- β) với mức thấp hơn (ví dụ, giảm xuống 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.) so với nhóm lợn đối chứng. Các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để cung cấp các tế bào đơn nhân từ phổi, máu, BAL, TBLN, và máu của lợn được chủng ngừa Nano-KAg có tần suất các phân đoạn giàu tế bào T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, tế bào T $\gamma\delta$, tế bào dạng tủy, và tế bào tua tăng lên (ví dụ tăng gấp 0,5, 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.). Các phương pháp và chế phẩm cũng có thể được sử dụng để giảm (ví dụ, giảm xuống 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 lần, v.v.) tế bào điều hòa T Foxp3⁺. Các chế phẩm và phương pháp cũng có thể được sử dụng để dẫn truyền qua đường mũi vaccin virus cúm lợn A đã triệt tiêu được bao bọc trong hạt nano PLGA tạo ra đáp ứng miễn dịch ở cả niêm mạc và toàn thân đến mức vừa đủ để loại bỏ tình trạng virus xâm nhập huyết (viremia) ở lợn.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm và phương pháp mà có thể được sử dụng để cung cấp đáp ứng miễn dịch bảo vệ niêm mạc và toàn thân chống lại virus cúm lợn A mà có thể loại bỏ tình trạng virus xâm nhập huyết ở giai đoạn đầu sau khi lây nhiễm, ví dụ ba, hai, và một tuần sau khi lây nhiễm (bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 ngày).

Vaccin hoặc chế phẩm cũng có thể được sử dụng theo liều, ví dụ, trong khoảng từ 100 µg/con lợn đến 1 mg/con lợn. Các ví dụ khác bao gồm các liều 50 µg/con lợn và 500 µg/con lợn. Chế phẩm hoặc vaccin có thể được sử dụng, ví dụ, theo một liều, hoặc theo hai liều trở lên. Trong một phương án, hai liều được sử dụng với khoảng thời gian cách liều là hai tuần. Chế phẩm hoặc vaccin có thể, ví dụ, được sử dụng qua đường trong mũi. Các ví dụ bổ sung về đường chủng ngừa thay thế bao gồm chủng ngừa trong bắp, dưới da, nhỏ trong mũi, và dẫn truyền bằng sol khí trong mũi.

Các chế phẩm và phương pháp cũng có thể được sử dụng với liều vaccin hoặc chất sinh miễn dịch chứa ít hơn 1x10⁸ TCID₅₀ virus cúm lợn A. Sáng chế cũng cung cấp liều chứa ít hơn 1x10⁷, 1x10⁶, và 1x10⁵ TCID₅₀ virus cúm lợn A. Sáng chế cũng bộc lộ rằng mỗi liều có thể có xấp xỉ 5x10⁶ TCID₅₀ virus cúm lợn A. Bản mô tả cũng cung cấp ví dụ về các liều chứa từ 1x10⁸ TCID₅₀ virus cúm lợn A đến 1x10⁵ TCID₅₀ virus cúm lợn A, từ 1x10⁷ đến 1x10⁵ TCID₅₀ virus cúm lợn A, từ 1x10⁶ đến 5x10⁶ TCID₅₀ virus cúm lợn A. Các liều có thể thu được từ virus cúm lợn A được xử lý bằng tia cực tím. Có thể sử dụng các liều dưới dạng liều đơn giảm virus để tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Một số phương án của sáng chế đã được mô tả. Tuy nhiên, cần hiểu rằng có thể có nhiều phương án cải biến sẽ được thực hiện mà không tách rời khỏi tinh thần và phạm

vi của sáng chế này. Theo đó, các phương án khác nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Hạt nano có khả năng phân hủy sinh học dẫn truyền vacxin virus cúm lợn bất hoạt tạo miễn dịch bảo vệ dị chủng qua trung gian tế bào ở lợn

Nguyên liệu và phương pháp

Tế bào và virus: Tế bào biểu mô ở thận chó Madin-Darby ổn định không có mycoplasma (MDCK, CRL-2285, ATCC, VA) được duy trì trong môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (Gibco) được bổ sung huyết thanh thai bò 10% và kháng sinh-chống nấm (Gibco) ở nhiệt độ 37°C trong máy ủ CO₂ 5%. Các dạng phân lập tại hiện trường của virus cúm lợn (SwIV), SW/OH/FAH10-1/10 (dòng H1N2-δ1) (Ali A, và cộng sự 2012. Vet Microbiol (Vi sinh thú y) 158:60-68) và SW/OH/24366/2007 (H1N1-γ) (Yassine HM, và cộng sự 2009. Vet Microbiol (Vi sinh thú y) 139:132-139) được sử dụng lần lượt trong việc điều chế vacxin virus bất hoạt và gây truyền nhiễm thử nghiệm ở lợn. Virus H1N2 (SW/OH/FAH10-1/10) có gen NP và M có nguồn gốc từ đại dịch H1N1 năm 2009 (Ali A, và cộng sự 2012. Vet Microbiol (Vi sinh thú y) 158:60-68), và A/swine/Ohio/24366/07 là virus từ động vật truyền sang người được phân lập từ lợn và đồng thời được thể hiện trong CDC là có trình tự bộ gen 100% đồng nhất với virus ở người liên quan trong hội chợ ở hạt Ohio (Yassine HM, và cộng sự 2009. Vet Microbiol (Vi sinh thú y) 139:132-139). Thu được quần thể SwIV (đoạn 3) từ kho chứa ở FAHRP, Wooster, Ohio. Cả hai loại virus này đều được nhân bản trên tế bào MDCK bằng cách làm lây truyền tại MOI 0,005 và duy trì trong DMEM không chứa huyết thanh được bổ sung TPCK-trypsin 1 µg/ml (Sigma, MO).

Điều chế vacxin: Dịch nuôi cấy SW/OH/FAH10-1/10 (H1N2-δ1) thể phân lập SwIV được thu hoạch và làm sạch để loại bỏ mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm tại 2000 xg trong 30 phút và được tăng nồng độ lên gấp 10 lần bằng cách lọc cassette Pellicon-2 (Millipore, MA) sau đó thực hiện siêu ly tâm bằng máy siêu ly tâm Optima™ L-100XP (Beckman Coulter) với đệm chứa sucroza 20% tại 107.000 xg trong 4 giờ không nghỉ. Viên kết virus được tạo huyền phù trong PBS chứa chất ức chế

protease (Sigma, MO), được chuẩn độ và bảo quản ở nhiệt độ -80°C . Virut được làm bất hoạt bằng etylenimin nhị phân (BEI) (Sigma, MO) bằng cách xử lý bằng BEI 10 mM trong 6 giờ ở 37°C sau khi xử lý bằng natri thiosulphat 10 mM (Sigma, MO) thêm 2 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C để trung hòa BEI không được sử dụng, và việc làm bất hoạt virut được xác nhận trong tế bào MDCK. Tổng nồng độ protein trong viên kết virut được ước tính bằng bộ kit xét nghiệm protein BCA cực nhỏ (Thermo Scientific, MA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kháng nguyên SwIV bất hoạt (KAg) được tạo nang trong NP PLGA bằng kỹ thuật cho bay hơi dung môi tạo nhũ tương kép nước/dầu/nước như mô tả ở trên (Binjawadagi B, và cộng sự 2014. *Int J Nanomedicine* (Tạp chí về y học nano) 9:679-694; Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922). Mô tả ngắn gọn, 5 mg KAg trong 500 μl PBS và 250 μl rượu polyvinyl (PVA) 2% (khối lượng/thể tích) với chất ổn định protein, 50 μl sucroza 20% (khối lượng/thể tích) và 50 μl $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 20% (khối lượng/thể tích), được nhũ hóa trong 180 mg dung dịch polyme PLGA trong 4,5 ml điclorometan sử dụng bộ xử lý siêu âm cường độ cao (Sonics and Materials Inc., CT) trong 30 giây với chu trình hoạt động 30% và điều khiển đầu ra 3. Nhũ tương sơ cấp nước-trong-dầu (w/o) tạo thành được rót vào hỗn hợp 23 ml PVA 2% khối lượng/thể tích (Sigma) và 2 ml polaxmer 188 12,5% (khối lượng/thể tích) (Sigma, MO) để tạo thành dung dịch chứa nước. Hỗn hợp được chia đều vào hai ống và được nhũ hóa lần nữa bằng cách nghiền bằng sóng âm trong 60 giây để thu được nhũ tương nước/dầu/nước thứ cấp, và được nhũ hóa bằng cách khuấy từ qua đêm với vận tốc 400 vòng/phút trong nhiệt độ lạnh (4°C) để các dung môi hữu cơ bay hơi. Các hạt polyme thu được được rửa ba lần bằng nước Milli-Q lạnh vô trùng bằng cách ly tâm với lực 10.976 xg (Beckman Coulter, roto FX6100) trong 30 phút. Cuối cùng, hạt PLGA-NP được tạo huyền phù trong sucroza 5% trong nước milli Q, được làm đông băng ở nhiệt độ -80°C , được sấy lạnh (Labconco, MO) trong 18-20 giờ và các phân ước được bảo quản ở nhiệt độ -20°C . KAg bất hoạt được tạo nang trong PLGA-NP dưới đây được gọi là PLGA-KAg.

Đặc trưng của PLGA-KAg: Kích thước và hình thái hạt được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét FEI Quanta 250 (SEM, Kyoto, Nhật Bản) sau khi phủ 2 nm iridi bằng bằng máy tráng phủ phún xạ Quorum Q150TS (Lewes, Anh). Đặc trưng phân bố kích thước hạt nano được biểu thị bằng phần mềm hình ảnh ImageJ (National Institutes

of Health, MD) với số lượng trung bình 200 hạt nano trên mỗi hình ảnh. Thí nghiệm tán xạ ánh sáng Quasi-elastic (QELS) được sử dụng để đo điện thế ζ của các hạt nano bằng máy Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcester, Anh). 100 μg NP được tạo huyền phù trong nước tinh khiết nano lạnh và được phân tán toàn bộ bằng cách sử dụng máy tạo sóng âm đầu dò (Ultra Sonic Processor VC 130PB, Sonics Vibra Cell, CT) trước khi phân tích. Ba lần đo độc lập được tiến hành để lấy giá trị điện thế ζ trung bình. Hiệu suất tạo nang protein và mức phóng thích protein *in vitro* vào các ngày 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 và 30 được ước tính và thể hiện dưới dạng phần trăm phóng thích tích lũy đối với kháng nguyên SwIV tại mỗi thời điểm sử dụng các phương pháp đã được mô tả (Binjawadagi B, và cộng sự 2014. Int J Nanomedicine (Tạp chí về y học nano) 9:679-694; Hiremath J, và cộng sự 2016. PLoS One 11:e0151922).

Kích hoạt APC in vitro bằng PLGA-KAg: Các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMC) được phân lập và các tế bào trong dung dịch rửa phế quản phế nang (BAL) từ lợn 2 tháng tuổi khoẻ mạnh, không bị cúm được sử dụng trong các thí nghiệm *in vitro* để mô tả đặc trưng của PLGA-KAg. Để tạo ra các DC có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân (MoDC), tế bào CD172⁺ từ PBMC được phân loại và xử lý bằng từ tính bằng cytokin GM-CSF (50 ng/ml) và IL-4 (25 ng/ml) (Kingfisher biotech, MN) trong một tuần. Tế bào BAL (0,5 triệu) và MoDC (0,1 triệu) được nuôi cấy với: (i) một mình RPMI được làm giàu bằng FBS 10% (E-RPMI); (ii) KAg (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) trong E-RPMI; (iii) PLGA-KAg (KAg 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đương lượng NP); hoặc (iv) NP PLGA (khối lượng tương đương NP) trong E-RPMI trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong máy ủ CO₂ 5%. Các tế bào được kích thích được cố định và nhuộm miễn dịch bằng các kháng thể CD172a và CD80/86, và thu được 50.000 trường hợp bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (BD FACS Aria II, BD Pharmingen CA) và được phân tích bằng phần mềm FlowJo (Tree Star, OR).

Thiết kế thử nghiệm, chủng ngừa, thử nghiệm virus và thu thập mẫu: Lợn con (số lượng=32) 4-5 tuần tuổi lai giống Large White-Duroc được sinh bằng phương pháp sinh mổ thiếu sữa non (CDCD) và được nuôi bằng sữa non bò trong cơ sở BSL2 của chủ đơn tại OARDC như mô tả ở trên (Hiremath J, và cộng sự 2016. PLoS One 11:e0151922) và được sử dụng trong nghiên cứu của chủ đơn. Lợn con được xác định huyết thanh âm tính đối với các kháng thể ngưng kết hồng cầu (HI) kháng phân lớp virus cúm H1N1 và H1N2 và được phân chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm thí nghiệm (n= 7-9 con lợn/nhóm) (Bảng 1). Các con

lợn được nuôi giữ, chủng ngừa và cho chết nhân đạo theo các tiêu chuẩn của Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm (Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee) tại trường đại học Ohio State University. Các con vật được tiêm vacxin trong 4-5 tuần, được tiêm mũi nhắc lại sau 3 tuần và được thử nghiệm sau 2 tuần tiêm mũi nhắc. Lợn được chủng ngừa với đương lượng 10^7 TCID₅₀ H1N2 KAg hoặc PLGA-KAg được tạo huyền phù trong 2 ml DMEM và được đưa vào trong mũi dưới dạng phun sương bằng thiết bị dẫn truyền đa liều (Prima Tech USA, NC) (Hình 3A), và được thử nghiệm bằng cách sử dụng H1N1 SwIV dị chủng (6×10^6 TCID₅₀) trong 2 ml, 1 ml được sử dụng bên trong mũi và 1 ml còn lại được sử dụng trong khí quản (Yassine HM, và cộng sự 2009. Vet Microbiol (Vi sinh thú y) 139:132-139).

Các mẫu huyết tương được thu thập vào ngày 0, 21 và 35 sau chủng ngừa (post-vaccination - PV). Từ ngày thử nghiệm đến khi gây chết nhân đạo, lợn được quan sát hai lần mỗi ngày về các dấu hiệu lâm sàng và nhiệt độ trực tràng được ghi lại hàng ngày. Các mẫu dịch phết mũi được thu thập vào ngày 4 và 6 sau thử nghiệm (post-challenge - PC) trong 2 ml DMEM chứa kháng sinh. Lợn được cho chết nhân đạo vào ngày 6 PC và trong khi mổ xác, phổi được kiểm tra và ghi lại bệnh tích đại thể (Khatri M, và cộng sự 2010. J Virol (Tập chí virus học) 84:11210-11218). Các mẫu máu và dịch BAL được thu thập và các phân ước huyết tương và dịch BAL được bảo quản ở -80°C . Dịch BAL được thu thập bằng cách truyền 20 ml PBS (chứa EDTA 2%) qua khí quản và thu thập dịch sau khi xoa bóp nhẹ nhàng tất cả thùy phổi. Để điều chế dịch thủy phân tế bào phổi, 1 gam mô phổi từ thùy đỉnh phải được trộn đều trong 3 ml DMEM (với chất ức chế proteaza) và lớp bề mặt được thu thập sau khi ly tâm và các phân ước được bảo quản ở -80°C như đã mô tả trên đây (Renukaradhya GJ, và cộng sự 2010. Viral Immunol (Miễn dịch học virus) 23:457-466). Các mô phổi được cố định trong formalin đậm trung tính 10% để đánh giá mô bệnh học và hóa mô miễn dịch. Các PBMC được phân lập vào ngày 0 và 6 PC và được sử dụng trong xét nghiệm tăng sinh tế bào sau khi kích thích với SwIV cũng như được sử dụng trong phân tích đếm tế bào theo dòng

Các xét nghiệm tăng sinh tế bào và đếm tế bào theo dòng: Vào ngày 0 PC, sự tăng sinh tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được thực hiện trong các PBMC bằng bộ kit xét nghiệm tăng sinh không phóng xạ chứa nước 96 chuẩn độ tế bào (Promega, WI) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mô tả ngắn gọn, 1×10^6 PBMC/lỗ được đặt trong đĩa có đáy chữ U

gồm 96 lỗ (Greiner bio-one, NC) trong 100 μ l môi trường E-RPMI. Cả SwIV H1N2 và H1N1 lần lượt được sử dụng trong điều chế vacxin và thử nghiệm ở lợn, được sử dụng tại MOI 0,1 trong 100 μ l (1×10^5 TCID₅₀/lỗ) để kích thích. Các đĩa được ủ ở 37°C trong máy ủ CO₂ 5%, và sau 72 giờ, các đĩa được ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong 2 phút và lớp bề mặt được thu thập, và bổ sung 100 μ l E-RPMI và 20 μ l dung dịch MTS + PMS vào viên kết tế bào và được ủ thêm 4 giờ ở 37°C trong máy ủ CO₂ 5%. Mật độ quang (OD) ở 490 nm được ghi lại bằng thiết bị đọc đĩa ELISA (Spectramax plus384, Molecular Devices, CA). Chỉ số kích thích (SI) được xác định bằng cách chia OD của các PBMC được kích thích cho OD của đối chứng tế bào của cùng con lợn, và các giá trị SI trung bình của 7 đến 9 con lợn trong mỗi nhóm được so sánh với nhau. Vào ngày 0 PC, các PBMC chưa được kích thích cũng được đánh giá để xác định tần suất của các tập hợp con tế bào T khác nhau bằng cách phân tích đếm tế bào theo dòng.

Vào ngày 6 PC, các PBMC của lợn được tái kích thích với SwIV H1N2 và H1N1 tại MOI 0,1 và trải qua sự tăng sinh tế bào như đã mô tả trên. Lớp bề mặt thu được từ 72 giờ nuôi cấy PBMC đã được tái kích thích được phân tích về IFN- γ bằng ELISA, và các tế bào được áp dụng phân tích dấu ấn miễn dịch tế bào và được phân tích bằng cách đếm tế bào theo dòng để xác định tần suất của các tập hợp con tế bào T được kích hoạt theo mô tả trên (Hiremath J, và cộng sự 2016. PLoS One 11:e0151922). Mô tả ngắn gọn, các PBMC được phủ lớp huyết thanh lợn 2% lên trên và được đánh dấu bề mặt bằng các kháng thể đơn dòng liên hợp với flocrom hoặc biotin, được tinh chế đặc hiệu lympho bào lợn, tiếp theo là xử lý với kháng thể streptavidin hoặc kháng thể đặc hiệu kháng kháng thể chuột đối chứng được đánh dấu flocrom. Để nhuộm IFN γ nội bào, GolgiPlugTM (BD Biosciences, CA) và Brefeldin A (Sigma, MO) được bổ sung trong 6 giờ cuối của quá trình ủ PBMC được xử lý có hoặc không có chất kích thích chỉ định. Các tế bào được nhuộm miễn dịch bề mặt được cố định với paraformaldehyt 1% và được tạo tính thấm với dung dịch đệm tạo tính thấm tế bào (85,9% nước được khử ion, 11% PBS không có Ca²⁺ hoặc Mg²⁺, 0,1% dung dịch formaldehyt, và saponin) qua đêm ở 4°C. Các tế bào được rửa và nhuộm miễn dịch bằng kháng thể đơn dòng kháng IFN γ lợn liên hợp với flocrom hoặc kháng thể đơn dòng kháng kháng thể đối chứng của nó (BD Biosciences, CA) trong saponin 0,1% chứa dung dịch đệm phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Các tế bào được

nhuộm miễn dịch thu được bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng BD Aria II (BD Biosciences, CA) và được phân tích bằng phần mềm FlowJo (Tree Star, OR). Tất cả tần suất quần thể tế bào đặc hiệu được trình bày dưới dạng phần trăm tổng lympho bào CD3⁺/CD3. Các kháng thể được sử dụng trong phân tích đếm tế bào theo dòng là: kháng thể kháng CD3 lợn (Southernbiotech, AL), CD4 α (Southernbiotech, AL), CD8 α (Southernbiotech, AL), CD8 β (BD Biosciences, CA), δ -chain (BD Pharmingen, CA), kháng thể bạch cầu đơn nhân/bạch cầu hạt (CD172a, Southernbiotech, AL) và CD152-muIg (Ancell, MN).

Chuẩn độ virus: Pha loãng gấp 10 lần theo tuần tự các mẫu thử nghiệm trong DMEM không có huyết thanh chứa TPCK-trypsin (1 μ g/ml) làm bốn bộ được chuyển đến lớp đơn của các tế bào MDCK được nuôi cấy qua đêm trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ. Các đĩa được ủ trong 48 giờ ở 37°C trong máy ủ CO₂ 5% và được cố định bằng 80% axeton trong nước và được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể sơ cấp đặc hiệu nucleoprotein IAV (#M058, CalBioReagents, CA) tiếp theo là kháng thể kháng IgG chuột (H+L) nguồn gốc từ dê liên hợp với Alexa Fluor 488 (Life technologies, OR). Miễn dịch huỳnh quang được ghi lại bằng kính hiển vi huỳnh quang (Olympus, NY) và hiệu giá virus lây nhiễm được tính bằng phương pháp Reed và Muench (Reed LJ, và cộng sự 1938. The American Journal of Hygiene (Tập chí Mỹ về vệ sinh học) 27(3):493-497).

Chuẩn độ kháng thể: Hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) và các mức kháng thể đặc hiệu được xác định theo mô tả trên đây (Hiremath J, và cộng sự, 2016. PLoS One 11:e0151922). Mô tả ngắn gọn, các đơn vị HA của SwIV H1N1 trước hết được xác định và quần thể virus được pha loãng để thu 8 đơn vị HA trong thể tích 50 μ l và được sử dụng trong xét nghiệm HI chuẩn. Các mẫu huyết tương và dịch BAL được ủ ở 56°C trong 30 phút để bất hoạt hoạt tính bề mặt mầm sinh. Tỷ lệ pha loãng huyết tương và dịch BAL ban đầu cho xét nghiệm HI là 1:2. Các kháng thể IgG và IgA đặc hiệu SwIV trong các mẫu dịch phết mũi, dịch BAL, dịch thủy phân tế bào phổi và huyết tương được xác định bằng kỹ thuật ELISA. Mô tả ngắn gọn, các đĩa 96 lỗ đáy bằng liên kết chặt chẽ với nhau (Greiner bio-one, NC) được phủ các kháng nguyên (5 μ g/ml) SwIV H1N1 hoặc H1N2 được chuẩn độ trước và được bán tinh chế và được ủ ở 4°C qua đêm. Các đĩa được phủ lớp bằng sữa gầy (skim milk) 5% trong PBST

trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng và được rửa ba lần với PBST. Các mẫu được pha loãng trong sữa gầy 2,5% được bổ sung 50 μ l/lỗ hai lần và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau ba lần rửa, kháng thể kháng IgA lợn nguồn gốc từ dê liên hợp với HRP (Bethyl Laboratories Inc., TX) hoặc kháng thể kháng IgG (γ) lợn nguồn gốc từ dê liên hợp với HRP (KPL, MD) được bổ sung với lượng 50 μ l/lỗ (cả hai kháng thể đều được pha loãng với tỷ lệ 1:1000 trong sữa gầy 2,5% trong PBST) và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Phản ứng Ag-Ab được phát triển bằng cách đo nhiệt lượng bằng cách bổ sung hỗn hợp dung dịch chất nền peroxidaza B và chất nền peroxidaza TMB (KPL, MD) theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ 50 μ l/lỗ. Phản ứng dừng sau 10-20 phút bằng cách bổ sung axit phosphoric 1 M (50 μ l/lỗ). Mật độ quang (OD) được đo tại 450 nm bằng thiết bị đọc vi đĩa Spectramax, và giá trị OD được chỉnh sửa thu được sau khi trừ OD trống từ OD trung bình của các nhóm điều trị khác nhau. Hiệu giá trung hòa virus (VNT) trong dịch BAL được xác định bằng cách sử dụng các quy trình theo mô tả trước đây (Hiremath J, và cộng sự 2016. PLoS One 11:e0151922).

Phân tích mô bệnh học và hóa mô miễn dịch: Các phần, mỗi phần là 5 μ m, của thùy đỉnh, thùy tim và thùy hoành của phổi lợn được nhuộm với hematoxylin và eosin và được kiểm tra bằng kính hiển vi về các thay đổi mô bệnh học theo mô tả trên (Khatri M, và cộng sự 2010. J Virol (Tạp chí virus học) 84:11210-11218). Sự tích tụ các tế bào viêm đơn nhân (MNC) quanh phế quản và quanh mạch cũng như dịch tiết phế quản bao gồm các tế bào biểu mô chết bị bong tróc và các MNC được ghi lại như sau: 0, không thay đổi so với bình thường; 0,5, có thay đổi nhưng rất ít; 1, thay đổi nhỏ so với bình thường; 2, thay đổi vừa phải so với bình thường; và 3, thay đổi rõ rệt so với bình thường. Điểm số bệnh lý phổi cuối cùng cho mỗi con lợn được xác định bằng cách tính trung bình các điểm số từ ba thùy phổi và so sánh các số điểm trung bình theo nhóm.

Kháng nguyên đặc hiệu SwIV trong phổi được phát hiện bằng phương pháp IHC theo mô tả trước đây (Dwivedi V, và cộng sự 2012. PLoS One 7:e51794; Richt JA, và cộng sự 2006. J Virol (Tạp chí virus học) 80:11009-11018) với một số cải biến. Mô tả ngắn gọn, các phần mô 5 μ m được loại bỏ parafin và được hydrat hóa trong PBS của Dulbecco (D-PBS) và được ủ trong dung dịch natri borohydrua 0,05% trong 10 phút để phá vỡ các liên kết aldehyt, được rửa hai lần và được ủ trong Proteaza VII (được pha loãng với tỷ lệ 1:6,5 với D-PBS) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng để thu hồi kháng nguyên. Các lam kính được

rửa ba lần và được làm nguội trong dung dịch H₂O₂ 3% trong 5 phút, tiếp theo là ba lần rửa, các lam kính được phủ lớp bằng cách ủ với huyết thanh ngựa thông thường 4% trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Ngoài ra, các lam kính được ủ với kháng thể đặc hiệu nucleoprotein SwIV (#MO58, CalBioReagents, CA) trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, được rửa ba lần, và được ủ với kháng thể thứ cấp được biotin hóa trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Để phát hiện các tín hiệu dương, các lam kính được ủ trong thuốc thử VECTASTAIN elite ABC (#PK-7100, Vector Lab., CA), tiếp theo là xử lý với chất nền ImmPACT™ DAB (#SK-4105, Vector Lab., CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các lam kính được rửa sạch bằng nước máy, được nhuộm tương phản với hematoxylin, được rửa kỹ bằng nước máy, được khử nước và được lắp. Các tín hiệu IHC dương trên biểu mô phế quản của các thùy phổi đỉnh, tim và hoành được cho điểm theo các tiêu chí sau: 0, không có thay đổi so với đối chứng giả - bình thường; 0,5, có biểu hiện nhưng không rõ ràng; 1, thay đổi nhỏ so với bình thường; 2, thay đổi vừa phải so với bình thường; và 3, thay đổi rõ rệt so với bình thường. Điểm số IHC cho mỗi con lợn được xác định bằng cách tính trung bình các điểm số từ tất cả ba thùy phổi và các số điểm trung bình của nhóm lợn điều trị được so sánh. Các lam kính hiển vi và IHC được đọc bởi nhà nghiên cứu bệnh học thú y có chứng nhận của hội đồng chuyên khoa, người này không được biết về thiết kế thí nghiệm và tình trạng nhiễm SwIV.

Tiêu chuẩn đạo đức: Nghiên cứu này được thực hiện nghiêm ngặt theo các yêu cầu của Public Health Service Policy (Chính sách dịch vụ y tế công cộng), USDA Regulations (Quy định USDA), National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Hướng dẫn của Hội đồng nghiên cứu quốc gia về chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm) và Federation of Animal Science Societies' Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (Hướng dẫn của Liên minh các hiệp hội khoa học động vật về chăm sóc và sử dụng động vật trong nông nghiệp trong nghiên cứu và giảng dạy về nông nghiệp). Tất cả lợn được nuôi giữ, các mẫu được thu thập và lợn được cho chết nhân đạo, và mọi nỗ lực được thực hiện để giảm thiểu sự đau đớn của lợn theo quy định và chính sách đã được phê chuẩn của viện, tiểu bang và liên bang về việc chăm sóc động vật tại trường đại học Ohio State University về Đạo đức thí nghiệm trên động vật (Đề cương nghiên cứu số: 2014A00000099).

Phân tích thống kê: Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn trung bình (SEM) của 7-9 con lợn. Đối với hiệu giá virus, các hiệu giá 10^0 được sử dụng cho các giá trị nhỏ hơn 10^1 ; được chuyển sang thang đo $\log_{10}$ và được phân tích (Dwivedi V, và cộng sự 2013. *Vet Microbiol* (Vi sinh thú y) 166:47-58). Trong mỗi xét nghiệm, sự chênh lệch giữa các giá trị trung bình trong các nhóm được xác định bằng cách phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), tiếp theo là thử nghiệm so sánh post-hoc (hậu định) Tukey trong GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA). Giá trị p nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Đặc trưng in vitro của các NP PLGA-KAg. Hiệu suất tạo nang KAg trong các NP PLGA là 57%. Kết quả này tương đương với các kết quả trước về sự tạo nang PLGA các peptit cũng như PRRSV bất hoạt với hiệu suất tạo nang 50-60% (Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922; Dwivedi V, và cộng sự 2013. *Vet Microbiol* (Vi sinh thú y) 166:47-58). Hình thái của PLGA-KAg được xác định bằng kính hiển vi điện tử tán xạ và sự phân bố kích thước được tính bằng cách phân tích 200 NP bằng phần mềm ImageJ. PLGA-KAg có hình cầu (Hình 1A) với đường kính trung bình là 313 nm và độ lệch chuẩn là 105 nm. Hầu hết các NP đều nằm trong khoảng kích thước có đường kính 200-300 nm. Để các APC và tế bào M ở bề mặt niêm mạc hấp thu hiệu quả các NP, kích thước hạt lý tưởng là ≤ 500 nm (Foged C, và cộng sự 2005. *Int J Pharm* (Tạp chí quốc tế về dược) 298:315-322; Gregory AE, và cộng sự 2013. *Front Cell Infect Microbiol* (Các giới hạn trong vi sinh tế bào và gây nhiễm trùng) (3:13), và xấp xỉ 95% hạt PLGA-KAg là ≤ 500 nm (Hình 1B). Điện tích của các NP được xác định bằng thí nghiệm tán xạ ánh sáng chuẩn đàn hồi và được tìm thấy là $-18 \pm 0,56$ mV. Kích thước hạt và điện tích tương đương với các NP PLGA trước (Binjawadagi B, và cộng sự 2014. *Int J Nanomedicine* (Tạp chí về y học nano quốc tế) 9:679-694; Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922; Dwivedi V, và cộng sự 2013. *Vet Microbiol* (Vi sinh thú y) 166:47-58). Khi tạo nang kháng nguyên virus trong các NP, đoạn kháng nguyên luôn luôn liên kết với bề mặt của các hạt, được phóng thích ngay lập tức (≤ 30 phút) sau khi hoàn nguyên trong dung dịch đệm sinh lý như PBS và được gọi là phóng thích ô ạt (Rawat A, và cộng sự 2008. *J Control Release* (Tạp chí về sự phóng thích có kiểm soát) 128:224-232). Có sự phóng thích ô ạt 22%, và sau 24 giờ là 27% số lượng KAg tích lũy đã được tạo nang. Ngoài ra, quan sát thấy có sự phóng thích

kháng nguyên chậm và kéo dài trong khoảng thời gian 4 tuần và tổng lượng phóng thích KAg tích lũy là xấp xỉ 50% sau một tháng (Hình 1C). Kết quả này tương đương với các chế phẩm NP PLGA được tạo nang trước với các peptit và PRRSV bất hoạt (Binjawadagi B, và cộng sự 2014. *Int J Nanomedicine* (Tập chí về y học nano quốc tế) 9:679-694; Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922).

Các NP PLGA-KAg cảm ứng sự trưởng thành của các tế bào trình diện kháng nguyên in vitro. Các Mφ và DC là các APC chính. Như ở các loài khác, các tế bào BAL lợn chứa > 90% Mφ (Ganter M, Hensel A. 1997. *Res Vet Sci* 63:215-217), và vì vậy các tế bào BAL được sử dụng làm nguồn Mφ cùng với các MoDC để nghiên cứu các đặc tính hỗ trợ của PLGA-KAg *in vitro*. Các tế bào BAL và MoDC được xử lý chỉ bằng môi trường, KAg (2 µg/ml) hoặc PLGA-KAg (chứa 2 µg/ml KAg) và được phân tích về biểu hiện của chỉ thị trưởng thành APC, phân tử đồng kích thích CD80/86. Các MoDC cũng được xử lý bằng các NP PLGA trống có cùng nồng độ khối lượng/thể tích hiện diện trong PLGA-KAg để xác định vai trò hỗ trợ của riêng NP PLGA. Các kết quả cho thấy trong MoDC được xử lý bằng PLGA-KAg, biểu hiện của CD80/86 cao hơn đáng kể (40%) so với xử lý bằng đối chứng môi trường, riêng KAg và NP PLGA trống (< 25%) (Hình 1D). Tương tự, trong Mφ, biểu hiện của CD80/86 cũng cao hơn đáng kể trong xử lý bằng PLGA-KAg so với xử lý bằng đối chứng môi trường. Phần trăm biểu hiện CD80/86⁺ trong Mφ được xử lý bằng PLGA-KAg (14%) cao hơn chỉ xử lý bằng KAg (8,5%) (Hình 1E). Xu hướng này cũng tương tự khi các tế bào BAL và các MoDC được xử lý với nồng độ KAg (20 µg/ml) cao hơn. Ngoài ra, các NP PLGA trống và riêng KAg cũng khiến cho biểu hiện CD80/86 tăng nhẹ trong các MoDC (26%) so với đối chứng môi trường (21%) (Hình 1D). Các NP PLGA so với các hạt PLGA-KAg có hiệu quả hỗ trợ cao hơn đáng kể đối với các MoDC được xử lý, cho thấy là khả năng hỗ trợ của KAg tăng lên khi được tạo nang trong các NP.

Vaccine NP PLGA-KAg cảm ứng đáp ứng tế bào đặc hiệu kháng nguyên ở lợn trước khi thử nghiệm. Chỉ số kích thích (SI) của lợn được chủng ngừa PLGA-KAg cao hơn đáng kể so với các con vật được chủng ngừa giả và chủng ngừa bằng KAg được kích thích với SwIV H1N2 (Hình 2A) hoặc H1N1 (Hình 2B), cho thấy lợn được chủng ngừa PLGA-KAg có tế bào miễn dịch nhạy cảm ngay cả với SwIV dị chủng. Phân tích đếm tế bào theo dòng với các PBMC vào ngày 35 PV (không có bất kỳ sự kích thích SwIV nào) đã chứng minh

rằng sự chủng ngừa PLGA-KAg đã cảm ứng việc tạo tần suất tế bào T $CD3^+CD4^+CD8\alpha^+$ (Hình 2C) cao hơn đáng kể, được gọi là tế bào hỗ trợ T ghi nhớ/hoạt hóa ở lợn (Zuckermann FA. 1999. Vet Immunol Immunopathol (Miễn dịch học và bệnh lý miễn dịch thú y) 72:55-66), và tế bào T gây độc tế bào ($CD3^+CD4^+CD8\alpha\beta^+$) so với nhóm lợn nhận được KAg (Hình 2D). Tần suất tế bào T $\gamma\delta$ cũng gia tăng đáng kể ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg so với nhóm KAg (Hình 2E).

Hiệu giá HI cao hơn đáng kể được quan sát ở cả hai nhóm lợn được chủng ngừa KAg và PLGA-KAg so với nhóm được chủng ngừa giả. Tuy nhiên, không quan sát thấy có sự chênh lệch thống kê về hiệu giá HI giữa các nhóm tiếp nhận KAg và PLGA-KAg (Hình 2F). Điều thú vị là đáp ứng kháng thể IgG huyết tương cao hơn đáng kể ở lợn được chủng ngừa KAg so với lợn được chủng ngừa PLGA-KAg (Hình 2G). Không có sự chênh lệch đáng kể trong hiệu giá kháng thể IgA trong các mẫu dịch phết mũi được thu thập vào ngày 35 PV/ngày 0 PC trong các nhóm vacxin khác nhau. Dữ liệu trước khi thử nghiệm đã chứng minh rằng sự tạo nang PLGA cho SwIV bất hoạt được dẫn truyền trong mũi ở lợn đã cảm ứng đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào bất xứng với đáp ứng miễn dịch thể dịch mức độ vừa đến yếu.

Vacxin NP PLGA-KAg đã cứu lợn khỏi các triệu chứng cúm lâm sàng, bệnh lý phổi, tải lượng virus ở phổi sau khi thử nghiệm.

Lợn được chủng ngừa bên trong mũi bằng thiết bị sol khí đa liều, cung cấp các hạt sương rất nhỏ (Hình 3A). Lợn được chủng ngừa giả và KAg, được thử nghiệm SwIV đã bị sốt với nhiệt độ trực tràng trung bình cho đến ngày 4 PC vẫn $>104^\circ\text{F}$, và đồng thời hầu hết những con lợn đó đều bị biếng ăn và ngủ lịm trong bốn ngày sau thử nghiệm (Hình 3B). Trong khi đó lợn được chủng ngừa PLGA-KAg chỉ bị sốt đến ngày 1 PC (Hình 3B) với các triệu chứng cúm nhẹ, và từ ngày 2 PC trở đi, rõ ràng lợn đã bình thường và có thể so sánh với lợn được chủng ngừa giả.

Vào ngày mổ xác (ngày 6 PC), phổi được kiểm tra và cho điểm về phần trăm đông đặc do nhiễm cúm. Điểm số bệnh tích đại thể phổi ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg (trung bình=12,1) thấp hơn nhóm chủng ngừa bằng KAg (trung bình=20,8) và thấp hơn đáng kể so với các con bị nhiễm được chủng ngừa giả (trung bình=23,9) (Bảng 2). Hình ảnh phổi đại diện minh họa bệnh tích đại thể ở phổi (Hình 4A). Bệnh

tích vi thể ở phổi cho thấy phần trăm thâm nhiễm tế bào viêm quanh tiểu phế quản và biểu mô phế quản thấp hơn của lợn được chủng ngừa PLGA-KAg, cho thấy là vaccin đã tạo ra sự bảo vệ trong phổi của lợn được thử nghiệm SwIV dị chủng (Hình 4B; Bảng 2).

Khối kháng nguyên ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus thấp hơn đáng kể so với các con vật được chủng ngừa giả cũng như chủng ngừa KAg và được thử nghiệm virus (Bảng 2). Các điểm số IHC và kết quả H&E cho biết phổi của lợn được chủng ngừa PLGA-KAg ít nhất bị nhiễm virus thử nghiệm dị chủng độc hại, và chúng tương đương với lợn không bị nhiễm được chủng ngừa giả vào ngày 6 PC về khối kháng nguyên cúm. Hình ảnh IHC đại diện từ mỗi nhóm lợn tương ứng được minh họa (Hình 4C).

Hiệu giá virus SwIV H1N1 lây nhiễm trong dịch BAL vào ngày 6 PC được xác định, và tất cả lợn được chủng ngừa giả và được thử nghiệm virus được phát hiện dương tính với virus (8/8), trong khi 5 trong số 8 con lợn được chủng ngừa KAg và chỉ 2 trong số 9 con lợn được chủng ngừa PLGA-KAg là dương tính với SwIV H1N1. Mặc dù cả KAg và PLGA-KAg đều làm giảm đáng kể hiệu giá virus trong dịch BAL so với lợn bị nhiễm được chủng ngừa giả, sự tạo nang PLGA cho KAg dẫn đến việc giảm thêm hơn 2 log trong hiệu giá virus phổi lây nhiễm so với chủng ngừa KAg ở lợn. Nhìn chung, ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg, quan sát được tổng lượng giảm 5 log trong hiệu giá virus so với các con bị nhiễm được chủng ngừa giả (Bảng 2). Ngoài ra, sự phóng thích virus cũng được thử nghiệm trong các dịch phết mũi vào ngày 4 và 6 PC, nhưng điều ngạc nhiên là không như trong dịch BAL, sự phóng thích virus ở mũi vào ngày 4 PC là như nhau trong tất cả nhóm lợn được chủng ngừa và bị nhiễm được chủng ngừa giả; và vào ngày 6 PC, sự phóng thích virus giảm như nhau trong tất cả các nhóm. Nhìn chung, không có sự chênh lệch trong việc phóng thích virus ở mũi giữa lợn được chủng ngừa KAg và lợn được chủng ngừa PLGA-KAg (Bảng 2). Dữ liệu cho thấy việc đưa SwIV KAg được tạo nang PLGA vào trong mũi đã tạo ra sự bảo vệ lâm sàng chống lại virus dị chủng thử nghiệm và làm giảm bệnh lý phổi và tải lượng virus lây nhiễm nhân bản trong phổi.

Việc chủng ngừa PLGA-KAg cảm ứng tăng cường sự tiết IFN γ và đáp ứng tế bào T nhớ hoạt hóa ở lợn được thử nghiệm virus. Vào ngày 0 PC trước khi thử nghiệm,

phát hiện đáp ứng miễn dịch tế bào tăng cường ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg trong các PBMC (Hình 2), vì vậy phân tích tương tự được thực hiện sau thử nghiệm vào ngày 6 PC trong các nhóm lợn. Để phát hiện đáp ứng tế bào nhớ, các PBMC được kích thích *ex vivo* với vacxin SwIV (H1N2) hoặc SwIV thử nghiệm (H1N1) và được phân tích về các tập hợp con lympho bào T ($\text{IFN}\gamma^+$) hoạt hóa. Biểu đồ đại diện trình bày mẫu gating được theo dõi để phân tích các tập hợp con tế bào T khác nhau ở lợn bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng được minh họa (Hình 5).

Tổng tế bào T (CD3^+) tạo ra $\text{IFN}\gamma$ cao hơn đáng kể trong nhóm lợn tiếp nhận PLGA-KAg so với các con tiếp nhận KAg được kích thích với virus vacxin và cả virus thử nghiệm (Hình 6A). Các tế bào $\text{CD3}^+\text{IFN}\gamma^+$ cao hơn đáng kể trong các nhóm lợn được chủng ngừa KAg so với lợn được chủng ngừa PLGA-KAg, bất kể các điều kiện tái kích thích virus (Hình 6B). Các tế bào (ghi nhớ/T hỗ trợ hoạt hóa) $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha^+\text{IFN}\gamma^+$ cao hơn đáng kể trong nhóm lợn thử nghiệm giả đáp ứng sự kích thích *ex vivo* với virus thử nghiệm, nhưng không phải với virus vacxin, cho thấy sự hoạt hóa các tế bào ghi nhớ ở lợn (Hình 6C). Các tế bào (T hỗ trợ hoạt hóa) $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha^+\text{IFN}\gamma^+$ cao hơn đáng kể trong nhóm lợn được chủng ngừa PLGA-KAg so với các tế bào của cả hai nhóm thử nghiệm giả và tiếp nhận KAg được kích thích với virus thử nghiệm, nhưng tăng lên đáng kể so với nhóm thử nghiệm giả về kích thích với virus vacxin (Hình 6D). Các tế bào (T gây độc tế bào hoạt hóa) $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha\beta^+\text{IFN}\gamma^+$ tạo $\text{IFN}\gamma$ tăng lên đáng kể trong nhóm lợn được chủng ngừa PLGA-KAg so với các con được thử nghiệm giả và chủng ngừa KAg được kích thích với cả virus vacxin và virus thử nghiệm (Hình 6E). Phù hợp với sự đáp ứng của tập hợp con tế bào $\text{CD3}^+\text{IFN}\gamma^+$ gia tăng quan sát được trong nhóm lợn được chủng ngừa KAg, các tập hợp con tế bào NK tạo $\text{IFN}\gamma$ ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha^+\text{IFN}\gamma^+$) cũng cao hơn đáng kể so với các con được thử nghiệm giả (Hình 6F).

Phù hợp với dữ liệu đếm tế bào theo dòng, sự tiết $\text{IFN}\gamma$ do PBMC được tái kích thích cũng cao hơn đáng kể ở những con lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus so với các con được thử nghiệm giả và được chủng ngừa KAg (Hình 7A). Vì PLGA-KAg đã cảm ứng đáp ứng tế bào T quá mạnh, đáp ứng nhớ đặc hiệu kháng nguyên riêng ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg còn được xác định bằng cách so sánh tần suất tế bào $\text{IFN}\gamma^+$ trong các PBMC không được kích thích (đối chứng tế bào, CC) hoặc được kích thích với SwIV H1N1 hoặc H1N2. Các kết quả cho thấy tần suất tăng (nhưng không đáng kể)

của cả tế bào $CD3^+IFN\gamma^+$ và tế bào $CD3^+CD4^+CD8\alpha\beta^+IFN\gamma^+$ được kích thích với cả hai SwIV (Hình 7B và C). Ngoài ra, sự tiết $IFN\gamma$ vào trong lớp bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào cao hơn đáng kể trong các PBMC được kích thích bằng H1N2 của nhóm lợn được chủng ngừa PLGA-KAg so với các tế bào không được kích thích (Hình 7D), biểu thị sự xuất hiện đáp ứng Th1 nhớ đặc hiệu kháng nguyên. Lưu ý rằng do phân tích đáp ứng tế bào T nhớ chỉ sau 6 ngày sau thử nghiệm ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg, nên đã tìm thấy các tế bào T thực thi (kích thích CC) với mức phần trăm cao (Hình 7B và C). Vì vậy, để hiểu cụ thể về đáp ứng tế bào T ghi nhớ đặc hiệu SwIV ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg, cần thực hiện phân tích tương tự ít nhất 3 đến 6 tháng sau khi chủng ngừa. Nhìn chung, dữ liệu phân tích đáp ứng lympho bào cả trước và sau thử nghiệm ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg cho thấy sự cảm ứng đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh.

Chủng ngừa KAg so với PLGA-KAg đã cảm ứng đáp ứng IgA và IgG cao hơn, nhưng hiệu giá HI và hiệu giá trung hòa virus là tương đương. Việc dẫn truyền vaccin trong mũi được cho là cảm ứng miễn dịch niêm mạc tại chỗ. Vì vậy, đáp ứng IgA được xác định trong các mẫu dịch phết mũi, dịch BAL và dịch thủy phân tế bào phổi, cho thấy đáp ứng đối với SwIV H1N1 cao hơn đáng kể trong lợn được chủng ngừa KAg so với lợn được chủng ngừa PLGA-KAg và được thử nghiệm virus (Hình 8A-C). Các mức kháng thể IgG đặc hiệu kháng SwIV H1N1 cũng được kiểm tra. Không tìm thấy sự khác nhau trong huyết tương trong tất cả các nhóm lợn thí nghiệm (Hình 8D), nhưng phát hiện các mức cao hơn đáng kể trong dịch BAL của lợn được chủng ngừa KAg (Hình 8D-E). Đáp ứng kháng thể IgA và IgG đối với virus vaccin (SwIV H1N2) cũng có xu hướng cao hơn tương tự ở lợn được chủng ngừa KAg hơn là lợn được chủng ngừa PLGA-KAg. Không có sự chênh lệch thống kê về hiệu giá HI kháng SwIV H1N1 trong dịch BAL và huyết tương giữa các nhóm lợn được chủng ngừa KAg và PLGA-KAg (Hình 8F-G). Tương tự, không có sự chênh lệch về hiệu giá HI kháng SwIV H1N2 trong huyết tương, nhưng hiệu giá HI trong dịch BAL kháng SwIV H1N2 cao hơn đáng kể trong các nhóm lợn được chủng ngừa PLGA-KAg so với các nhóm lợn được chủng ngừa KAg. Điều ngạc nhiên là bất kể đáp ứng kháng thể IgG và IgA cao hơn đáng kể được phát hiện ở lợn được chủng ngừa KAg, hiệu giá trung hòa virus của chúng lại tương đương với hiệu giá của các con được chủng ngừa PLGA-KAg (Hình 8H). Nhìn chung, dữ liệu đáp ứng miễn dịch tế bào và thể dịch cho thấy sự chủng ngừa bên trong mũi với cả KAg và PLGA-KAg đều không

tạo ra đáp ứng kháng thể trung hòa virus và HI mạnh tại chỗ ở phổi cũng như toàn thân trong máu của lợn. Tuy nhiên, sự tạo nang PLGA cho SwIV KAg đã tạo ra sự miễn dịch chéo mạnh qua trung gian tế bào .

Thảo luận

Polyme PLGA được sử dụng riêng trong nghiên cứu về dẫn truyền thuốc và vaccin do các tính chất không độc hại, có thể phân hủy sinh học và tương hợp sinh học (Danhier F, và cộng sự 2012. *J Control Release* (Tập chí về sự phóng thích có kiểm soát) 161:505-522). Các vaccin virus ứng viên nền PLGA được dẫn truyền trong mũi trong các mẫu loài gặm nhấm với việc không có bất kỳ chất bổ trợ nào đã cho thấy khả năng tuyệt vời của chúng trong việc chống lại viêm gan B, viêm não ngựa, bệnh cúm và parainfluenza (virus gây bệnh khó thở ở trẻ em) bằng cách cảm ứng đáp ứng miễn dịch tế bào và thể dịch mạnh (Thomas C, và cộng sự 2011. *Mol Pharm* (Dược học phân tử) 8:405-415; Greenway TE, và cộng sự 1998. *Vaccine* (Vaccin) 16:1314-1323; Shephard MJ, và cộng sự 2003. *Res Vet Sci* (Nghiên cứu trong khoa học thú y) 74:187-190; Yassine HM, và cộng sự 2015. *Nat Med* (Y học tự nhiên) 21:1065-1070; Liu Q, và cộng sự *J Med Virol* (Virus y học) 87:1807-1815; Singh M, và cộng sự 2001. *J Control Release* (Tập chí về sự phóng thích có kiểm soát) 70:267-276). Quan sát thấy đáp ứng kháng thể đặc hiệu virus được tăng cường ở bê sữa được chủng ngừa qua đường mũi với virus parainfluenza bò được tạo nang PLGA (Mansoor F, và cộng sự 2015. *BMC Veterinary Research* (Nghiên cứu thú y) 11:1-11). Các nghiên cứu ở lợn cho thấy sự dẫn truyền PRRSV bất hoạt nền NP PLGA trong mũi chỉ cảm ứng tăng cường đáp ứng bảo vệ chéo khi cùng sử dụng với chất bổ trợ hiệu lực, được hỗ trợ với đáp ứng miễn dịch tế bào và thể dịch mạnh (Binjawadagi B, và cộng sự 2014. *Int J Nanomedicine* (Tập chí về y học nano quốc tế) 9:679-694; Dwivedi V, và cộng sự 2012. *PLoS One* 7:e51794; Binjawadagi B, và cộng sự 2014. *Int J Nanomedicine* (Tập chí về y học nano quốc tế) 9:1519-1535). Ở lợn được chủng ngừa bên trong mũi với hỗn hợp peptit tế bào B và T IAV bảo toàn được tạo nang NP PLGA, đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu peptit được tăng cường, nhưng đáp ứng miễn dịch thể dịch lại yếu; tuy nhiên lợn không bị cúm lâm sàng và virus thử nghiệm nhân bản trong phổi được loại bỏ vào ngày 7 PC (Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922). Trong nghiên cứu này, mục tiêu là cải thiện đáp ứng thể dịch niêm mạc và hệ thống

đặc hiệu virus và để minh chứng hiệu lực bảo vệ chéo của các NP PLGA chứa SwIV bất hoạt, mà chúng có thể cung cấp số lượng epitop tế bào B tiềm năng lớn hơn so với một số peptit đã chọn cho hệ miễn dịch của lợn.

Để ngăn chặn sự lây truyền và bảo vệ hiệu quả chống lại virus cúm gây nhiễm trùng các tế bào biểu mô đường hô hấp, việc cảm ứng đáp ứng kháng thể niêm mạc thỏa đáng rất quan trọng, và sự dẫn truyền vaccin qua đường mũi có khả năng đó (Zaman M, và cộng sự 2013. *Methods (Các phương pháp)* 60:226-231; Almeida AJ, và cộng sự 1996. *J Drug Target (Tập chí về mục tiêu của thuốc)* 3:455-467). Trong nghiên cứu được bọc lộ, hiệu giá HI đặc hiệu tăng ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg kháng virus vaccin, nhưng không kháng virus dị chủng thử nghiệm. Điều thú vị là các đáp ứng IgA và IgG trong dịch BAL và đáp ứng IgG trong huyết tương cao hơn đáng kể trong lợn được chủng ngừa KAg so với lợn được chủng ngừa PLGA-KAg ở cả trước và sau thử nghiệm, nhưng hiệu giá trung hòa virus kháng virus thử nghiệm trong dịch BAL là tương đương ở lợn được chủng ngừa KAg và lợn được chủng ngừa PLGA-KAg. Sự loại bỏ virus sao chép trong 40% phổi lợn ở lợn được chủng ngừa KAg so với lợn bị nhiễm được chủng ngừa giả có thể là do các kháng thể và các tế bào NK bẩm sinh gia tăng, nhưng bệnh lâm sàng và bệnh lý phổi không giảm. Vì vậy, việc cảm ứng đáp ứng miễn dịch mạnh qua trung gian tế bào ở lợn được chủng ngừa SwIV bất hoạt là cần thiết để hạn chế mức độ nghiêm trọng của bệnh cúm ở lợn. Vì vậy, các phương pháp chủng ngừa đổi mới phải nghiên cứu sự miễn dịch tế bào T để tạo ra đáp ứng bảo vệ diện rộng (Moss P. 2003. *Developments in biologicals (Sự phát triển trong sinh học)* 115:31-37; La Gruta NL, và cộng sự 2014. *Trends in Immunology (Các xu hướng trong miễn dịch học)* 35:396-402). Các lympho bào hoạt hóa tạo ra IFN- γ , là yếu tố đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ virus cúm (Hiremath J, và cộng sự 2016. *PLoS One* 11:e0151922; Bot A, và cộng sự 1998. *Journal of Virology (Tập chí virus học)* 72:6637-6645). Chủng ngừa PLGA-KAg cảm ứng đáp ứng kháng thể IgA và IgG ít hơn chủng ngừa KAg ở các vị trí niêm mạc và toàn thân, nhưng hiệu giá HI và VN vẫn tương đương.

Tóm lại, sự dẫn truyền vaccin SwIV bất hoạt nền PLGA bên trong mũi đã cảm ứng đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh, cứu lợn khỏi bệnh lâm sàng, làm giảm bệnh lý phổi và tải lượng virus thử nghiệm dị chủng trong phổi. Ngoài ra, các mức đáp ứng kháng thể được chủng ngừa bằng PLGA-KAg tạo ra cao hơn nhiều so với chủng ngừa

bằng peptit H1N1 được bao trong NP ở lợn (Hiremath J, và cộng sự 2016. PLoS One 11:e0151922).

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong tài liệu này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của người có trình độ trong lĩnh vực mà sáng chế này liên quan tới. Các công bố được trích dẫn trong bản mô tả này và các tài liệu có các công bố được trích dẫn được kết hợp đầy đủ vào đơn này bằng cách viện dẫn.

Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu, hoặc có thể biết rõ bằng cách thực hiện thí nghiệm thường xuyên, các phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Các phương án tương đương này được bao gồm trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Bảng 1: Thiết kế thí nghiệm thể hiện sự phân bố lợn ở mỗi nhóm				
Nhóm thí nghiệm	Số lợn	Chế phẩm vacxin		
		Chủng ngừa thứ nhất (DPV 0 / DPC -35)	Chủng ngừa thứ hai (DPV 21 / DPC -14)	Ngày thử nghiệm (DPV 35 / DPC 0)
Chủng ngừa giả	7	Chất chủng ngừa giả	Chất chủng ngừa giả	Chất chủng ngừa giả
Chủng ngừa giả + Thử nghiệm	8	Chất chủng ngừa giả	Chất chủng ngừa giả	SwIV OH7 (H1N1)
KAg + Thử nghiệm	8	SwIV OH10 (H1N2) bất hoạt	SwIV OH10 (H1N2) bất hoạt	SwIV OH7 (H1N1)
PLGA-KAg + Thử nghiệm	9	SwIV OH10 (H1N2) bất hoạt được tạo nang PLGA	SwIV OH10 (H1N2) bất hoạt được tạo nang PLGA	SwIV OH7 (H1N1)

Bảng 2: Tổng hợp điểm số điểm bệnh tích phổi theo bệnh lý và hiệu giá virus thử nghiệm^a

Nhóm điều trị	Điểm số bệnh tích đại thể ở phổi	Điểm số H&E ^b	Điểm số IHC ^b	Hiệu giá virus ^c	Dịch phết mũi	
				Dịch BAL (Ngày 6 PC)	Ngày 4 PC	Ngày 6 PC
Chủng ngừa giả	0,0±0,0 C (0/7)	0,1±0,0 A (6/7)	0,1±0,1 A (1/7)	0,0±0,0 A (0/7)	0,0±0,0 A (0/7)	0,0±0,0 A (0/7)
Chủng ngừa giả + Thử nghiệm	23,9±3,1 B (8/8)	1,5±0,2 B (8/8)	2,2±0,4 B (8/8)	5,3±0,3 B (8/8)	5,1±0,1 B (8/8)	2,3±0,6 B (6/8)
KAg + Thử nghiệm	20,8±3,7 AB (8/8)	1,3±0,1 B (8/8)	1,3±0,3 B (7/8)	2,4±0,7 C (5/8)	5,0±0,4 B (8/8)	1,8±0,5 AB (5/8)
PLGA-KAg + Thử nghiệm	12,1±2,3 A (9/9)	1,0±0,1 B (9/9)	0,3±0,1 A (5/9)	0,8±0,5 AB (2/9)	4,7±0,1 B (9/9)	1,6±0,5 AB (5/9)

Phổi của lợn được chủng ngừa và thử nghiệm virus được kiểm tra về bệnh tích đại thể ở phổi, bệnh tích vi thể ở phổi, các điểm số hóa mô miễn dịch (IHC) và hiệu giá virus trong dịch BAL và các mẫu dịch phết mũi.

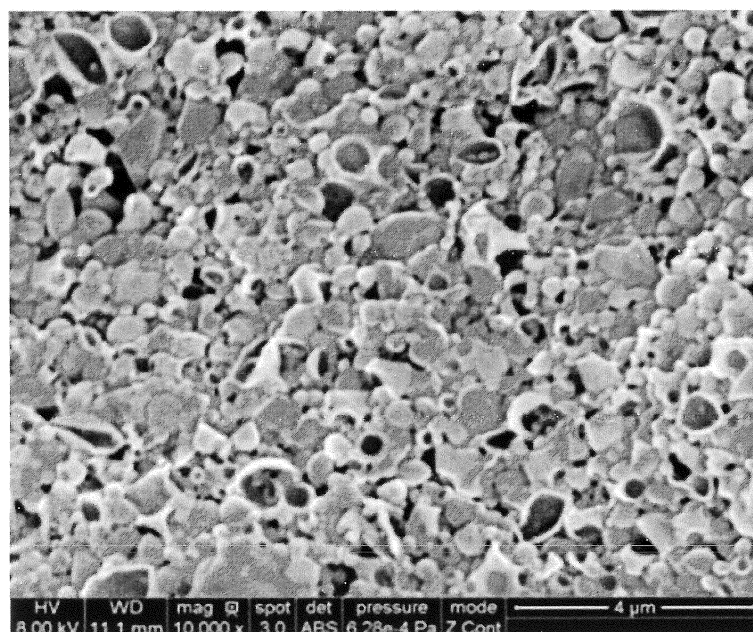
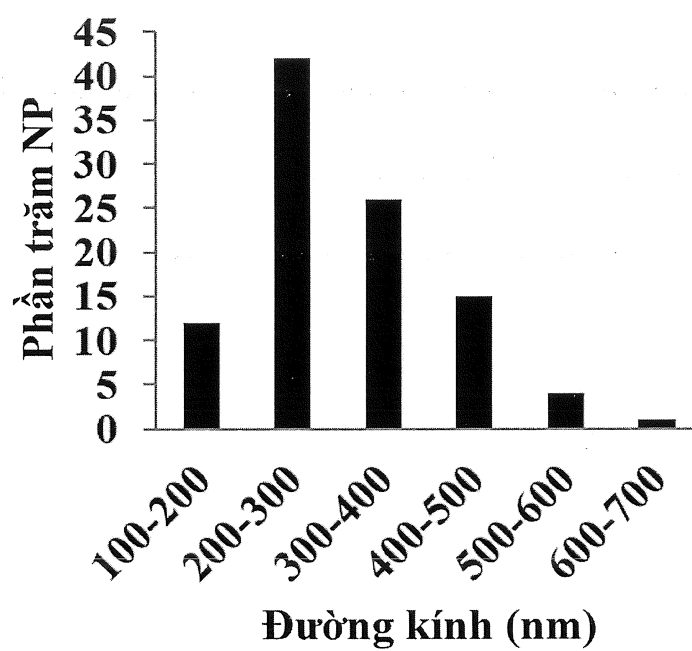
^aCác giá trị trung bình của 7 hoặc 9 con lợn ± SEM được trình bày, trong ngoặc là số lợn dương tính/tổng số con lợn. ^bCác thùy đỉnh bên phải, thùy tim và thùy hoành được kiểm tra ở mỗi con lợn và điểm số trung bình của 7 hoặc 9 con lợn trong nhóm lợn được chỉ định. ^cCác giá trị được chuyển sang thang đo log₁₀. Các mẫu tự A, B và C đại diện các nhóm của các giá trị trung bình theo mỗi thông số chênh lệch đáng kể giữa các nhóm với nhau (P < 0,05). Các giá trị trung bình được đánh dấu bằng cùng mẫu tự không có sự

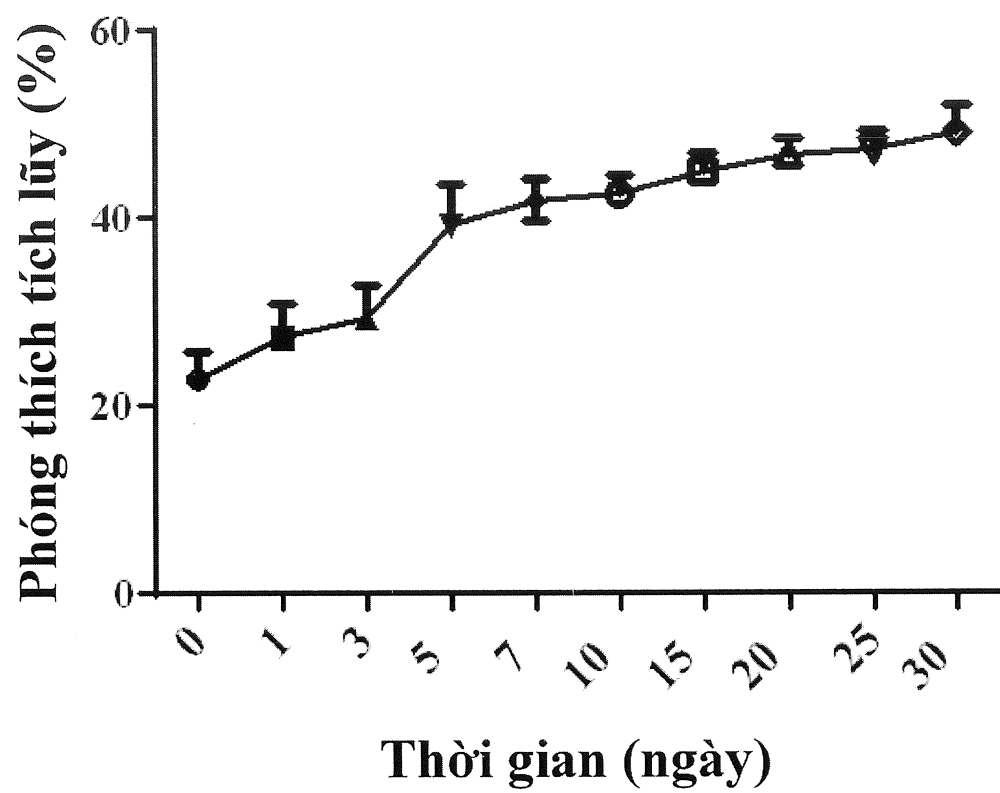
chênh lệch đáng kể, trong khi các giá trị trung bình được đánh dấu bằng những mẫu tự khác nhau có sự chênh lệch đáng kể. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một yếu tố, sau đó thực hiện kiểm định post-hoc Tukey.

YÊU CẦU BẢO HỘ

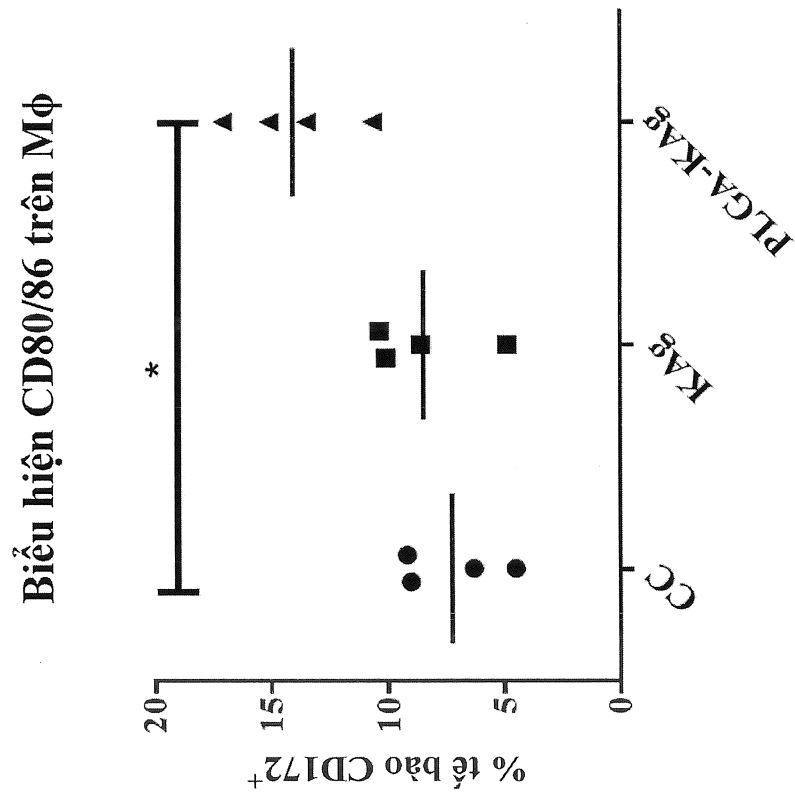
1. Chế phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh cúm lợn, chứa virus cúm lợn A bất hoạt và hạt nano, trong đó hạt nano được liên kết với virus cúm lợn A bất hoạt, và chế phẩm này còn chứa chất bổ trợ.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hạt nano có tính sinh miễn dịch.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hạt nano được liên hợp với virus cúm lợn A bất hoạt.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hạt nano được chọn từ nhóm bao gồm chitosin, canxi phosphat, và các lipid của các vi khuẩn khác nhau.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó virus cúm lợn A bất hoạt là chủng virus cúm lợn A H1N1, H1N2 hoặc H3N2.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó virus cúm lợn A bất hoạt được làm bất hoạt bởi tia cực tím.
7. Vaccine chứa chế phẩm theo điểm 1 trong chất mang được dụng.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hạt nano chứa poly(lactit co-glycolit) (PLGA).
9. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó các vi khuẩn khác nhau có thể là *E. coli*, mycobacteria, leptospira và các hỗn hợp của chúng.
10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất bổ trợ chứa sản phẩm phân giải *Mycobacterium*.
11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất bổ trợ chứa sản phẩm phân giải toàn bộ tế bào *Mycobacterium smegmatis*.
12. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất bổ trợ chứa sản phẩm phân giải toàn bộ tế bào *Mycobacterium tuberculosis*.
13. Vaccine theo điểm 7, trong đó chế phẩm chứa từ 1×10^8 đến 1×10^5 TCID₅₀ virus cúm lợn A trước khi bất hoạt.
14. Chế phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh cúm lợn, chứa virus cúm lợn A bất hoạt và hạt nano, trong đó hạt nano được liên kết với virus cúm lợn A bất hoạt, và chế

phẩm này còn chứa chất bổ trợ, trong đó chế phẩm này chứa từ 1×10^8 đến 1×10^5 TCID₅₀ virut cúm lợn A trước khi bất hoạt.

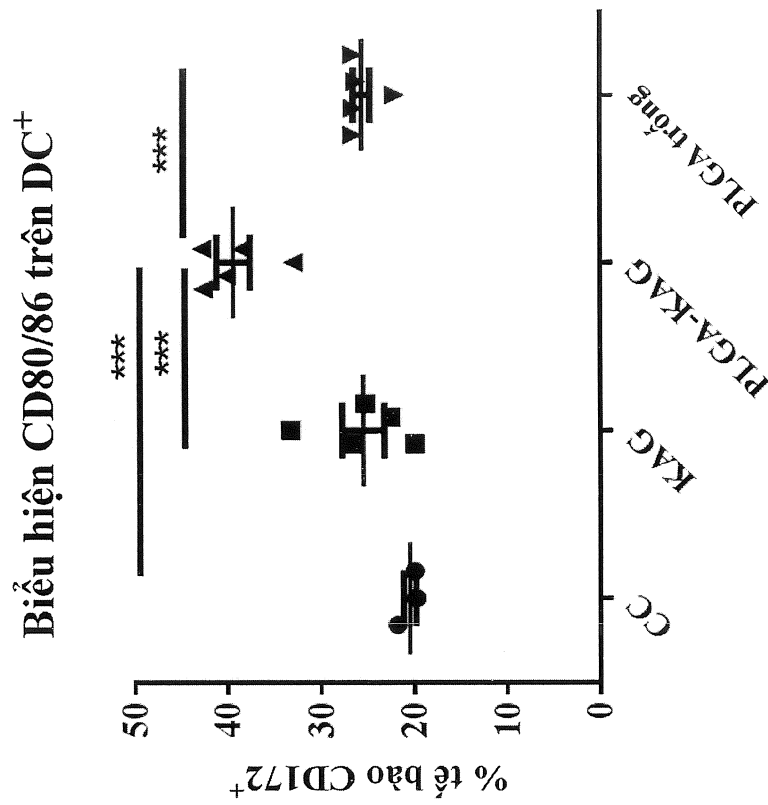
**HÌNH 1A****HÌNH 1B**



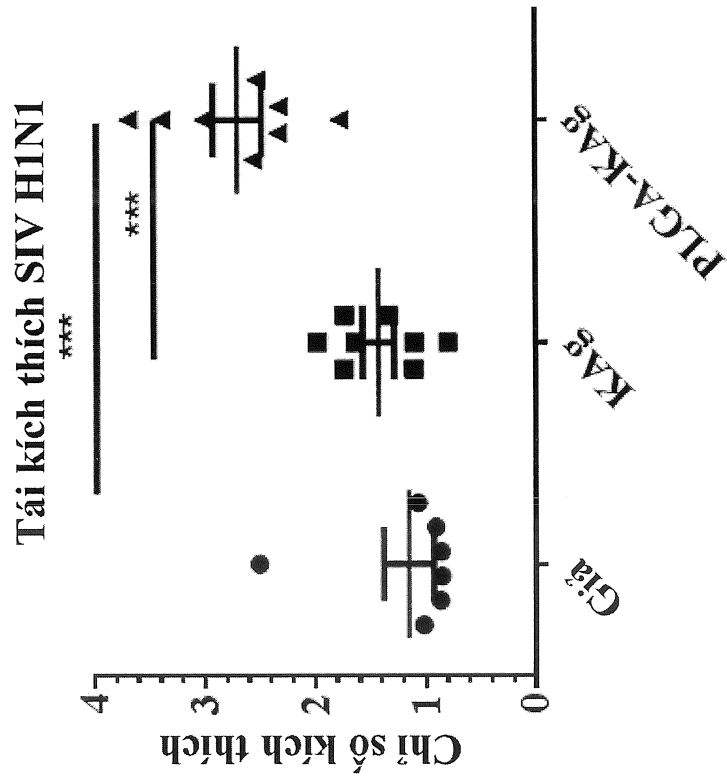
HÌNH 1C



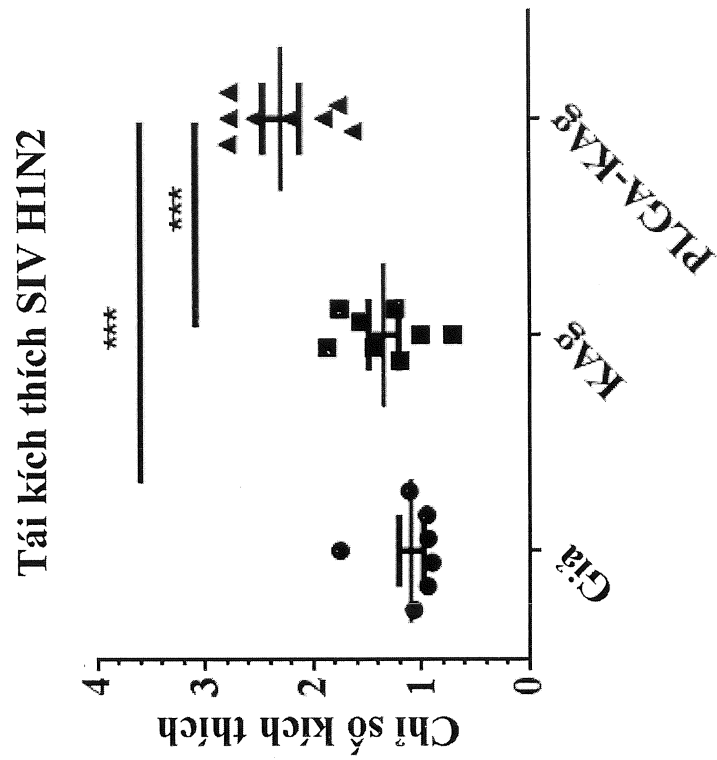
HÌNH 1E



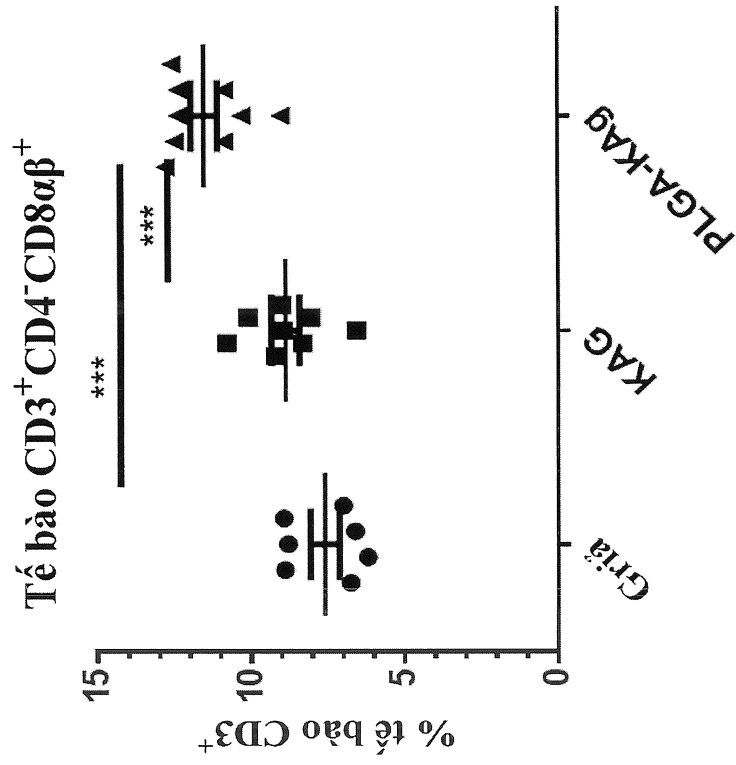
HÌNH 1D



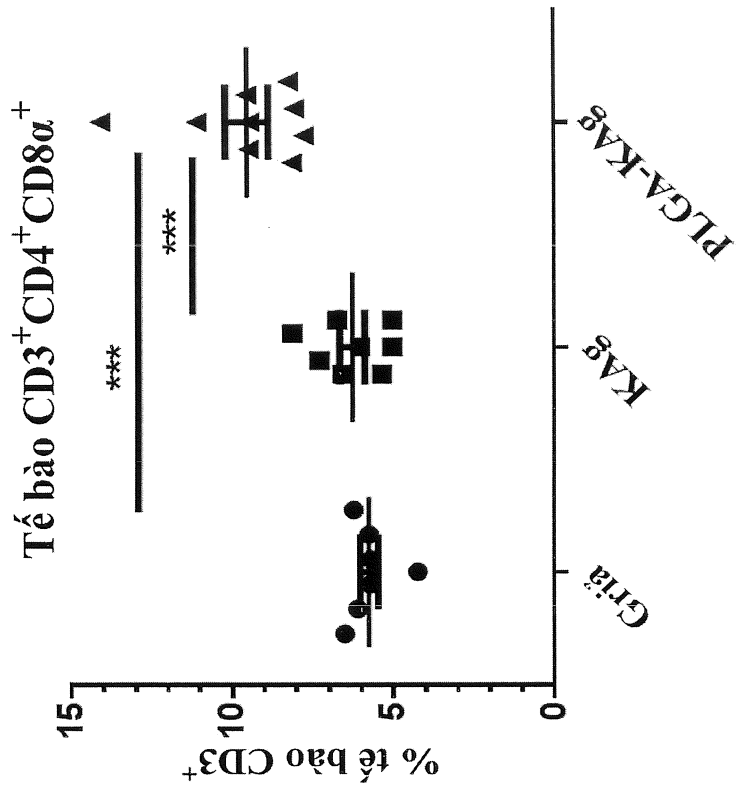
HÌNH 2B



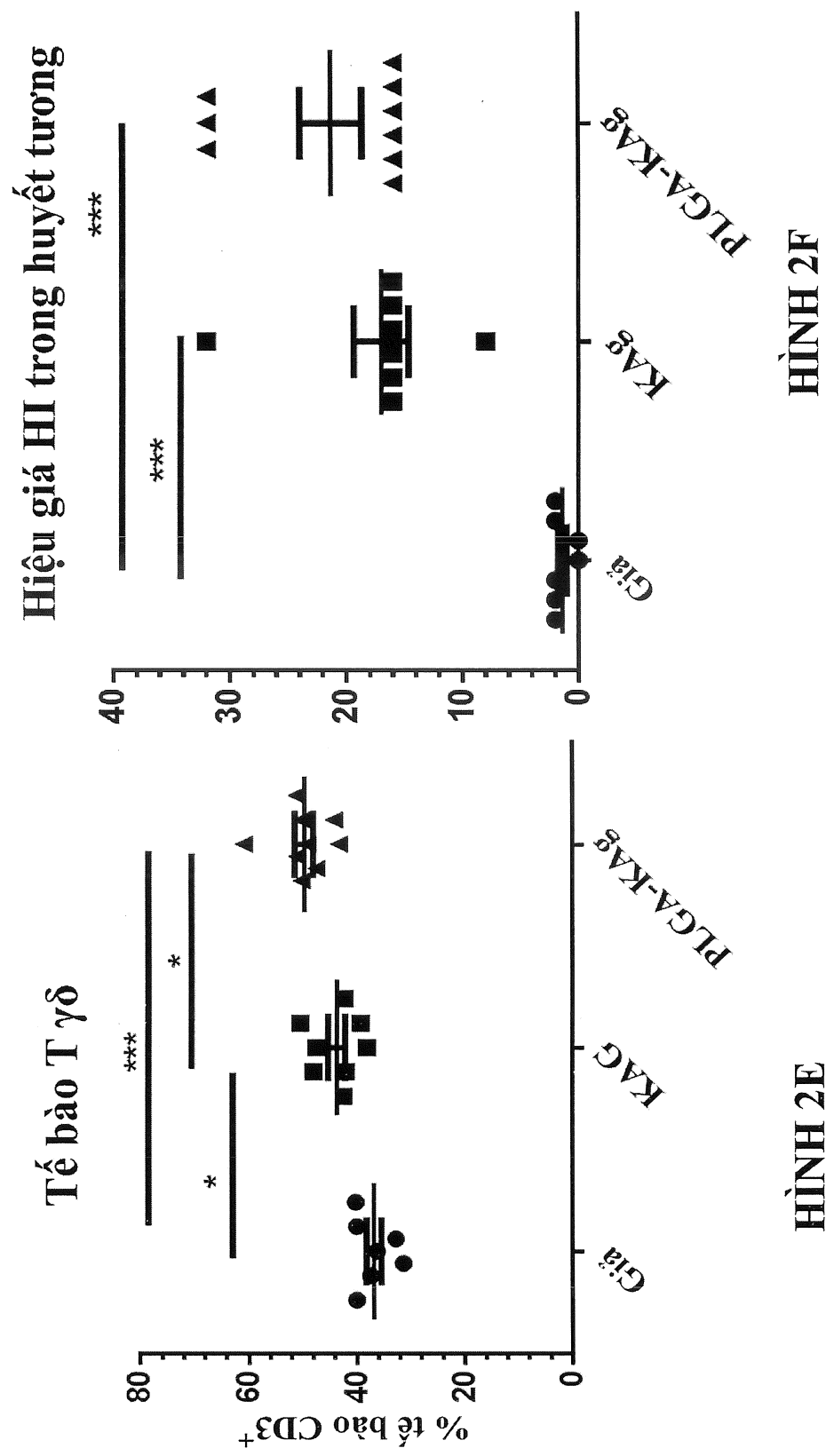
HÌNH 2A

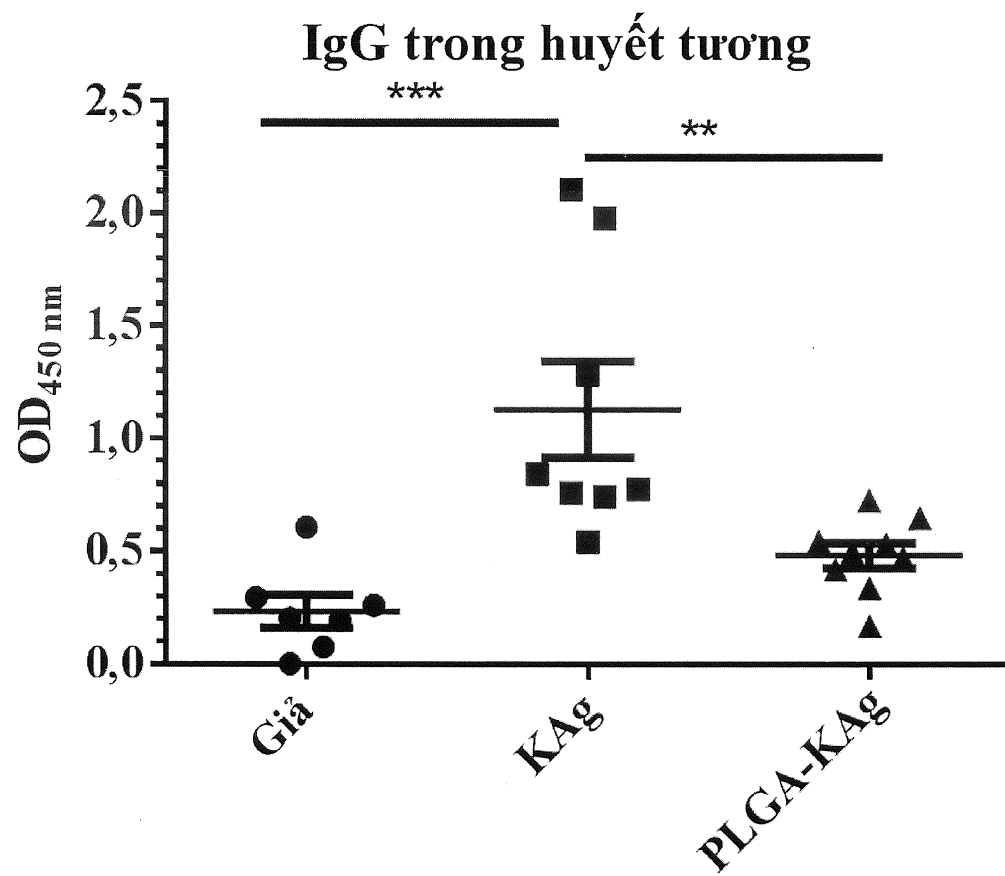


HÌNH 2D

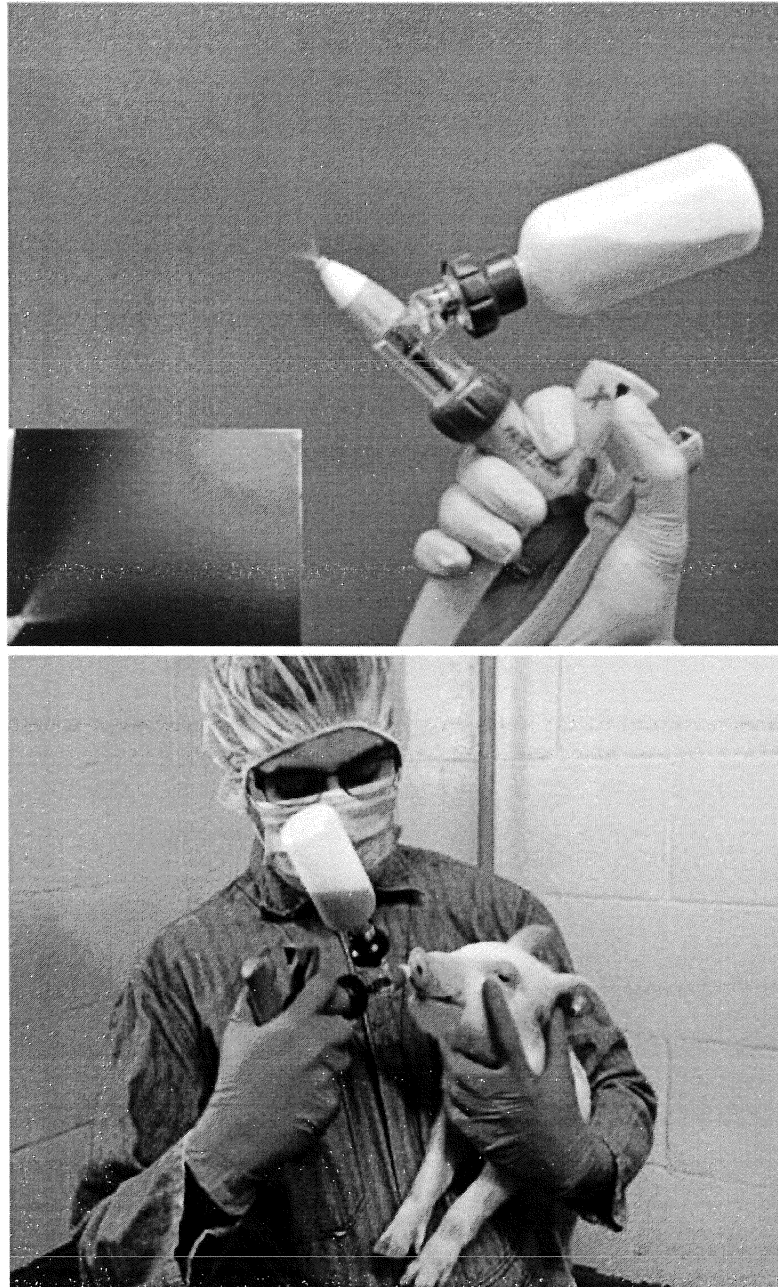


HÌNH 2C

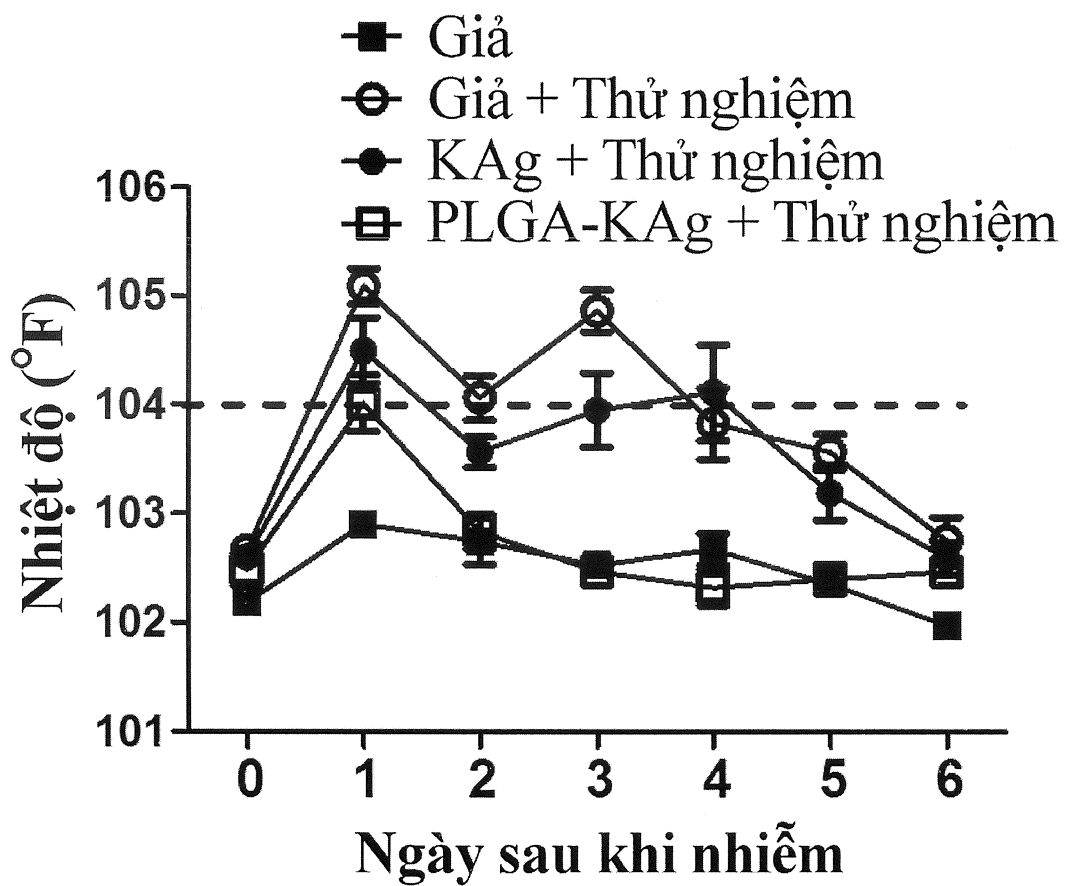




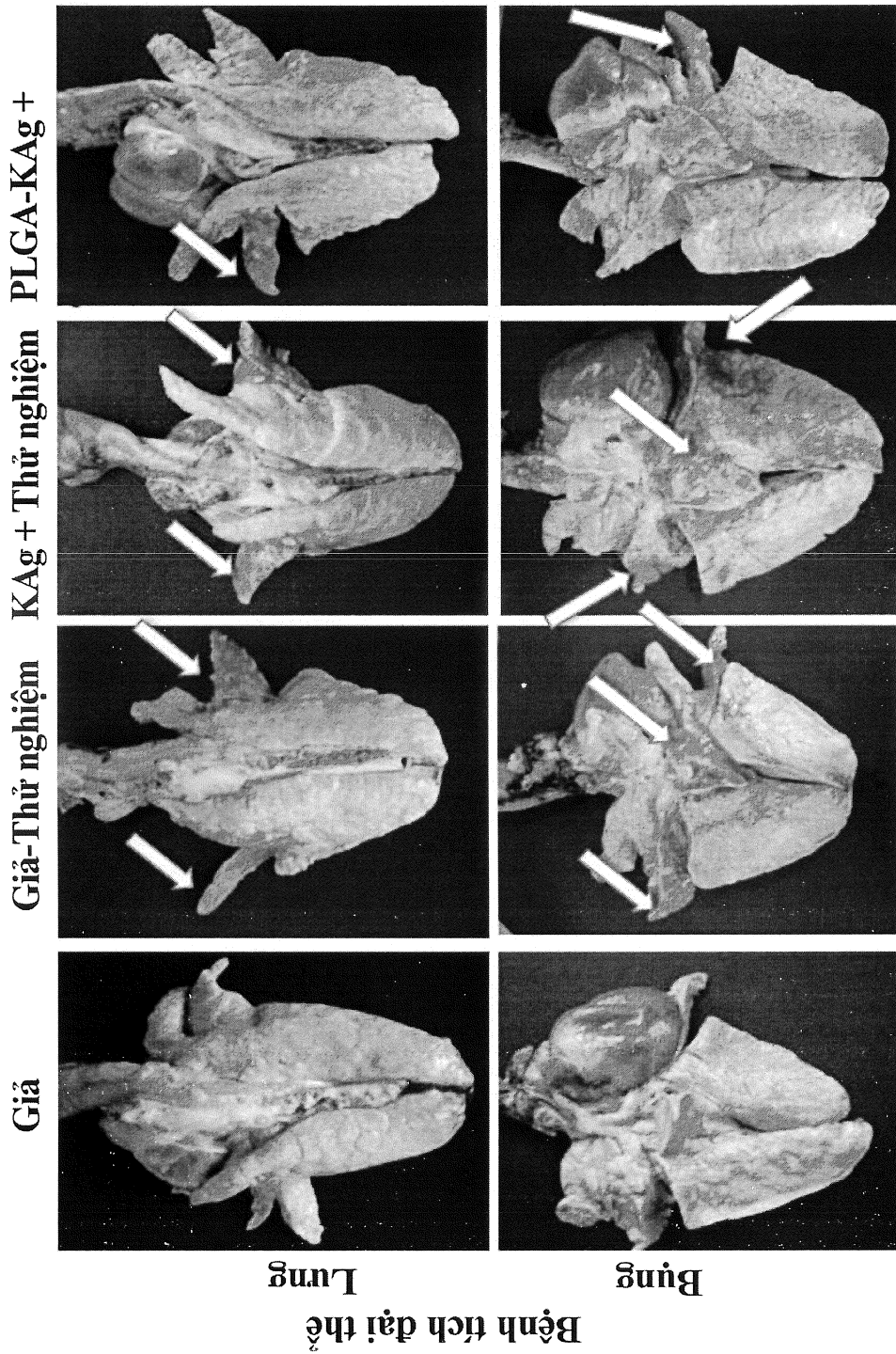
HÌNH 2G



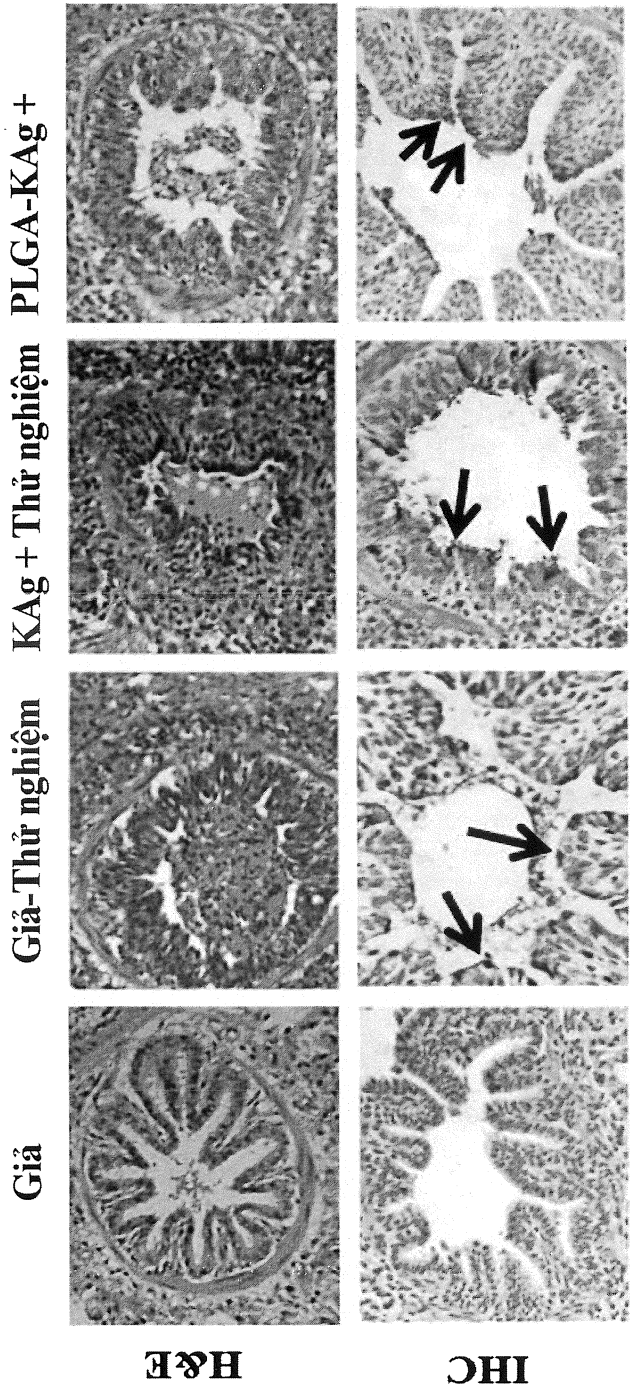
HÌNH 3A



HÌNH 3B

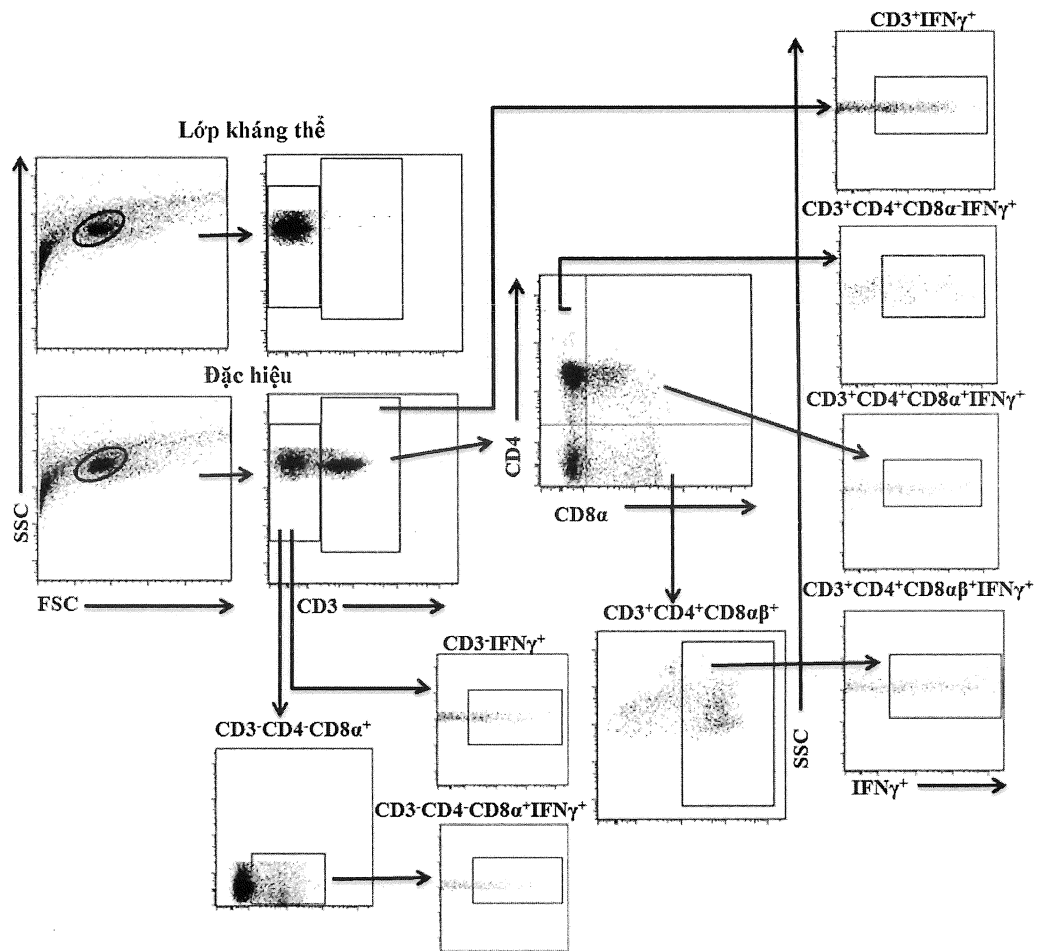


HÌNH 4A

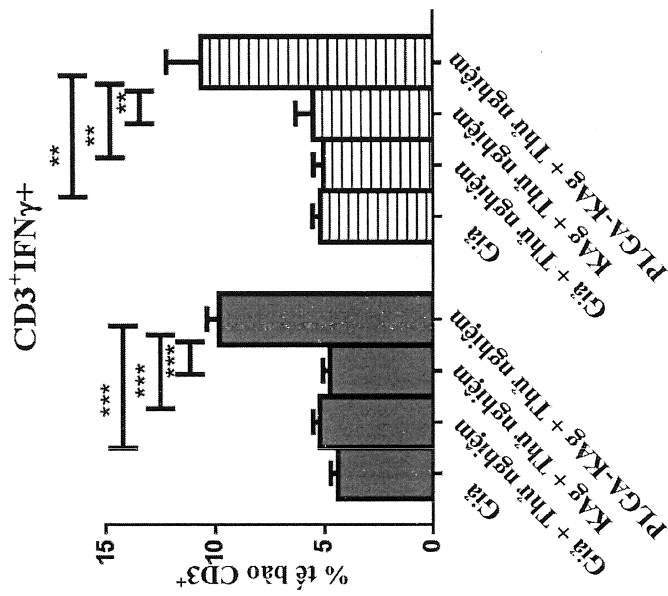
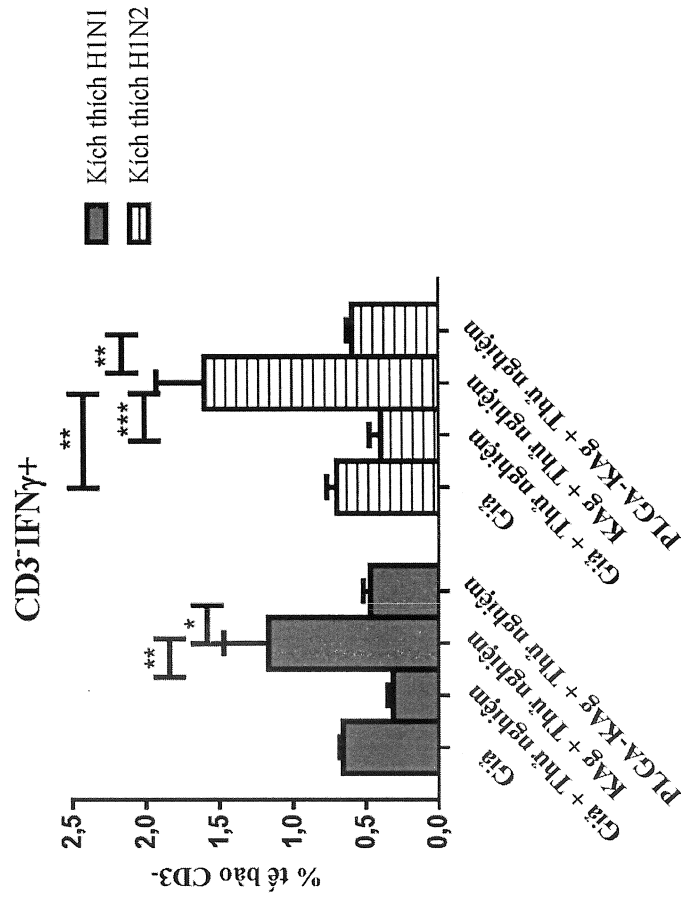


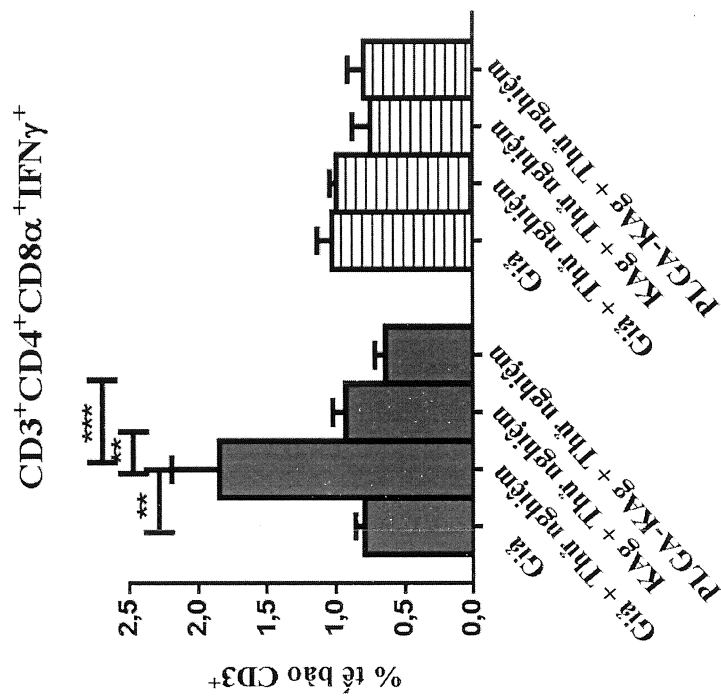
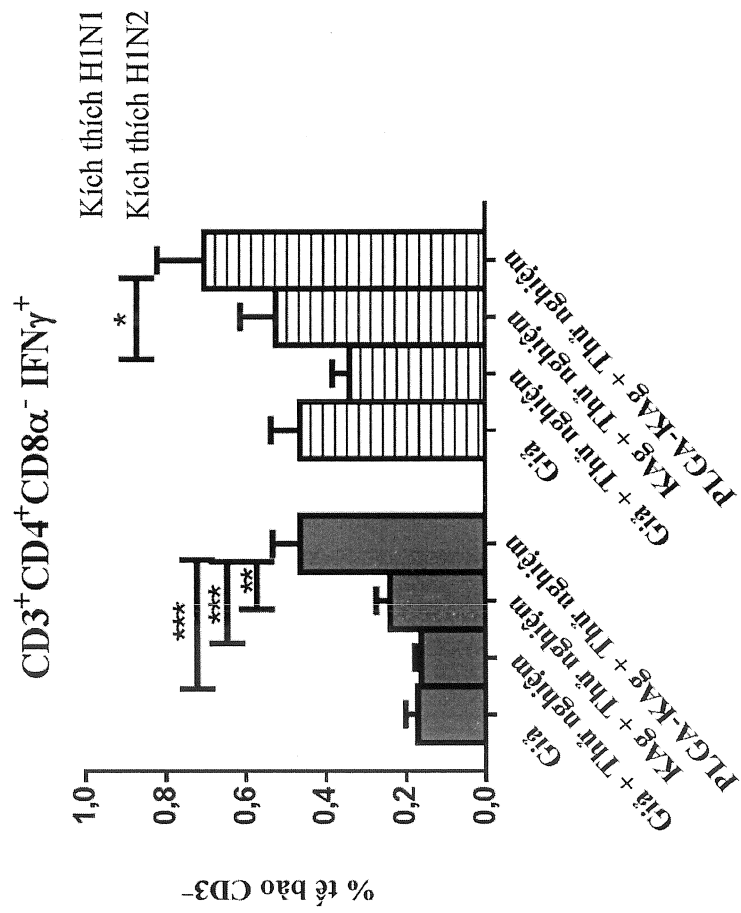
HÌNH 4B

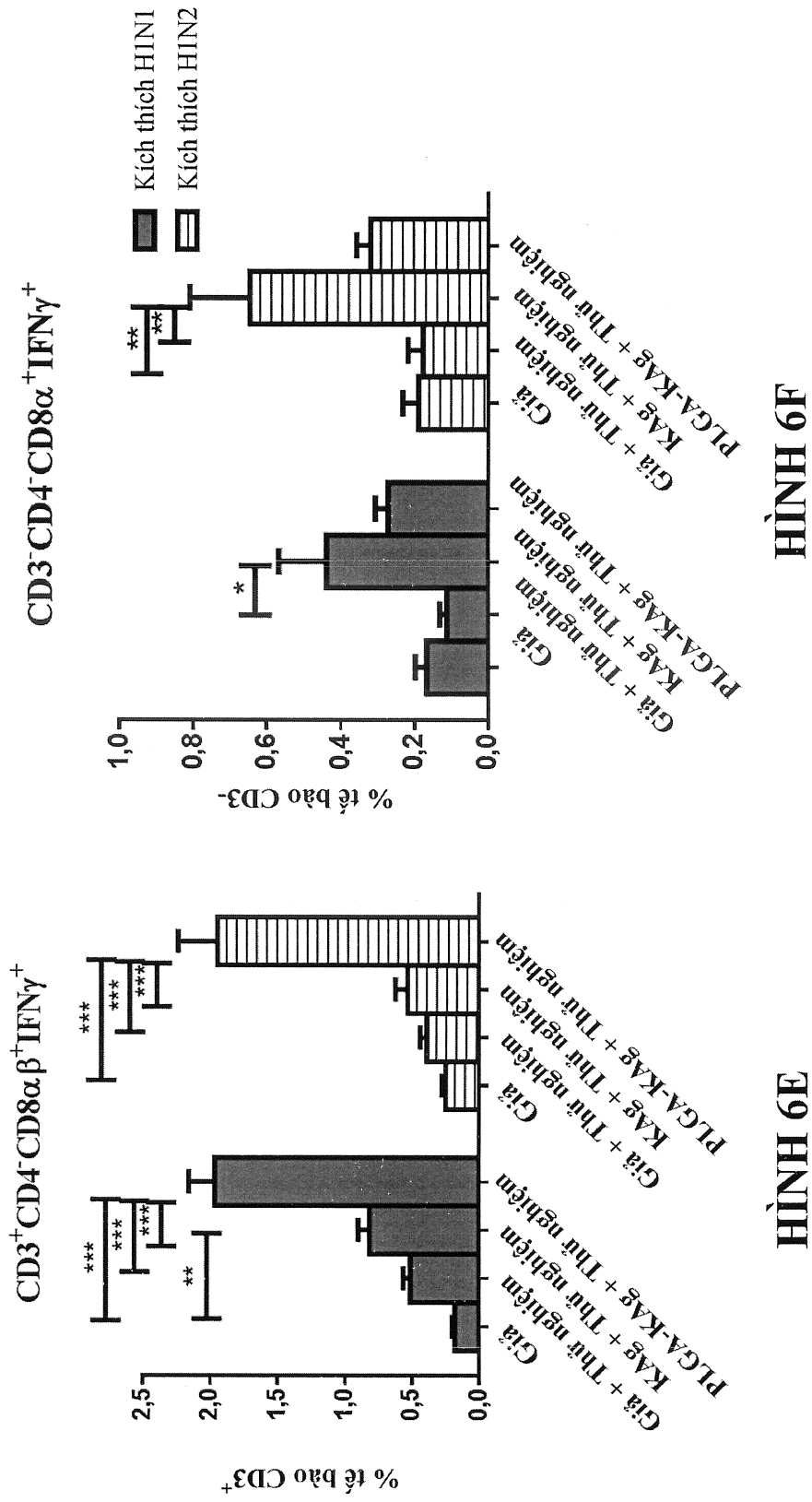
HÌNH 4C



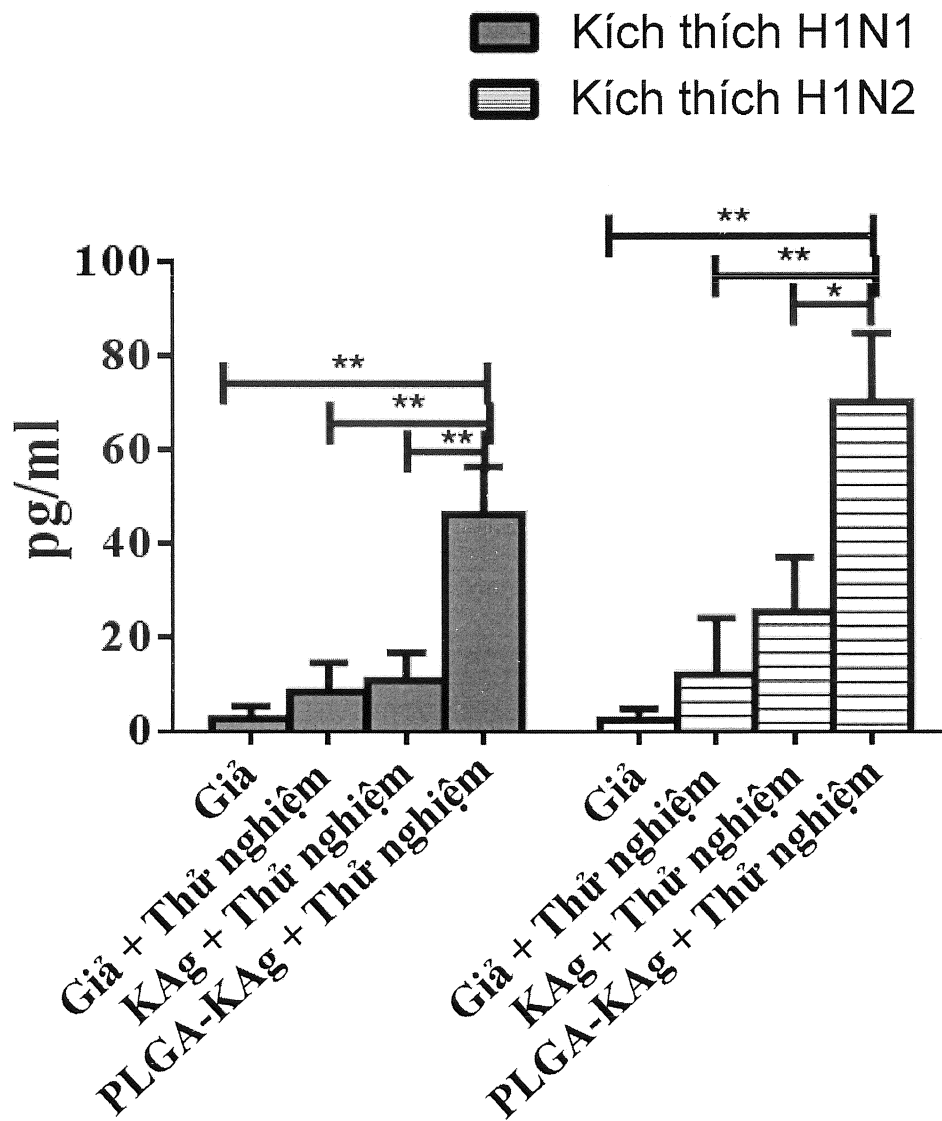
HÌNH 5





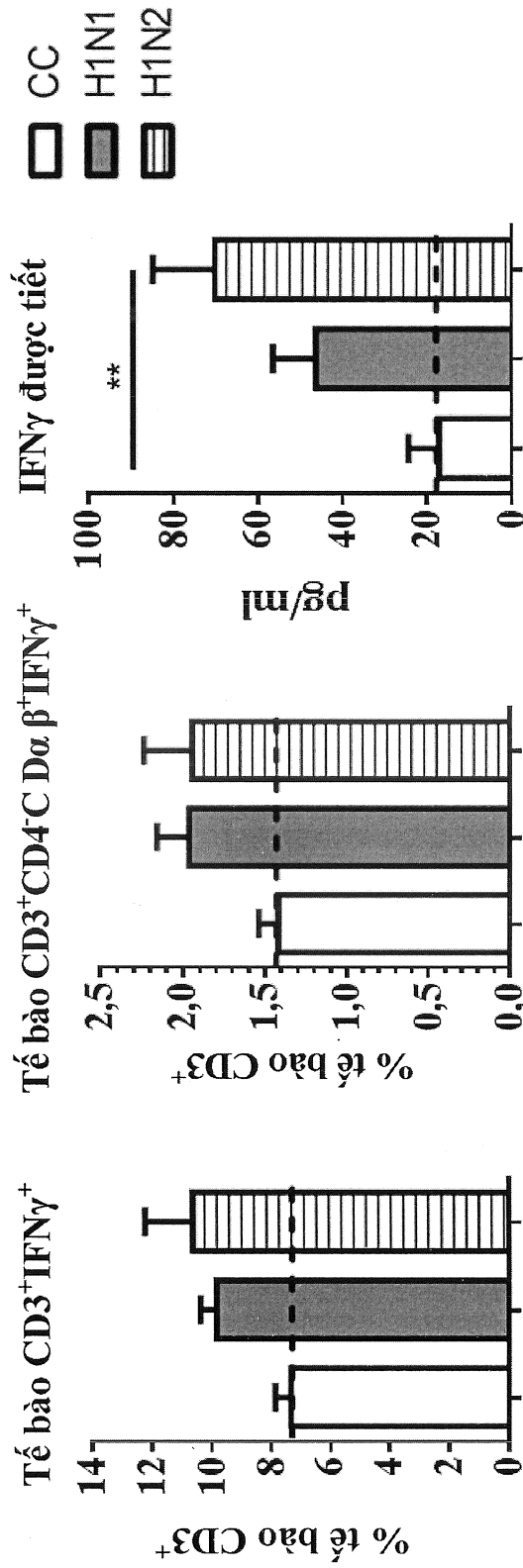


Đáp ứng IFN γ nhớ

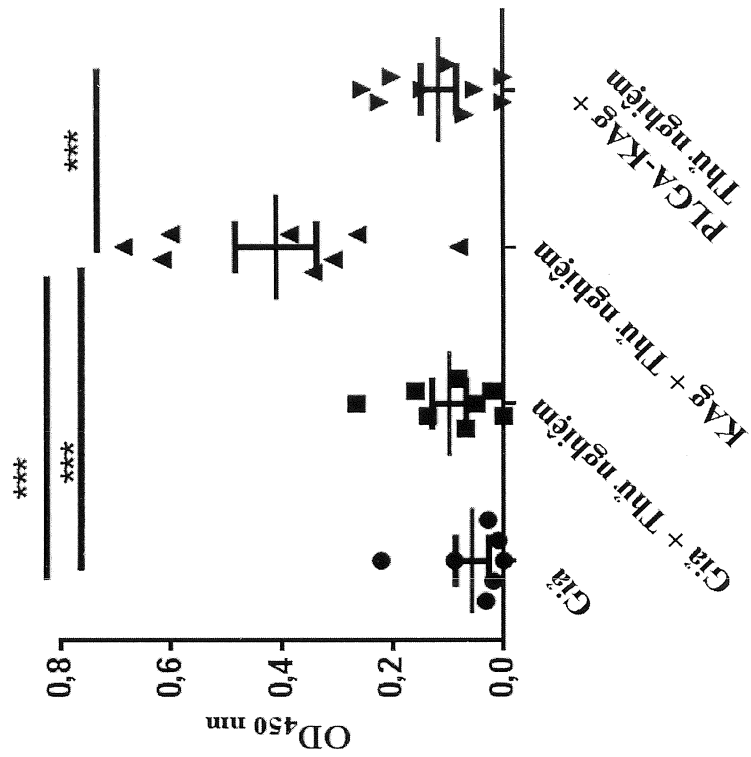


HÌNH 7A

Đáp ứng $\text{IFN}\gamma$ nhớ ở lợn được chủng ngừa PLGA-KAg

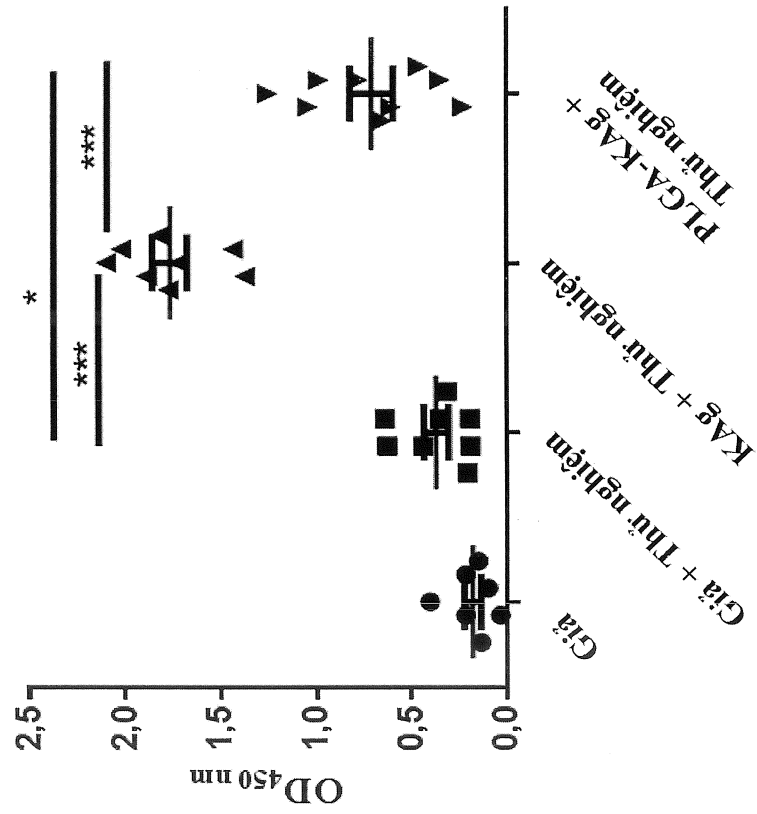


IgA trong dịch phết mũi



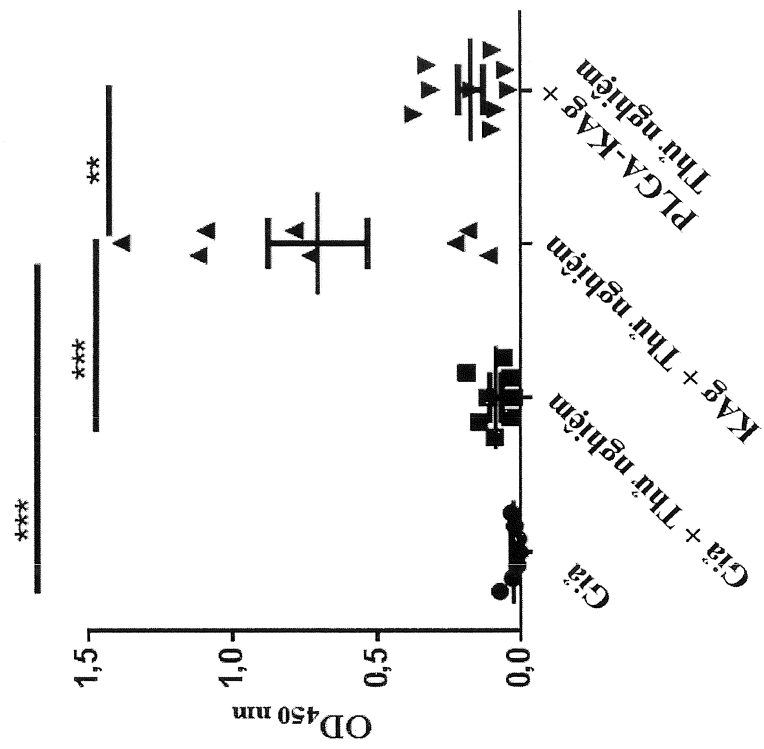
HÌNH 8A

IgA trong BAL



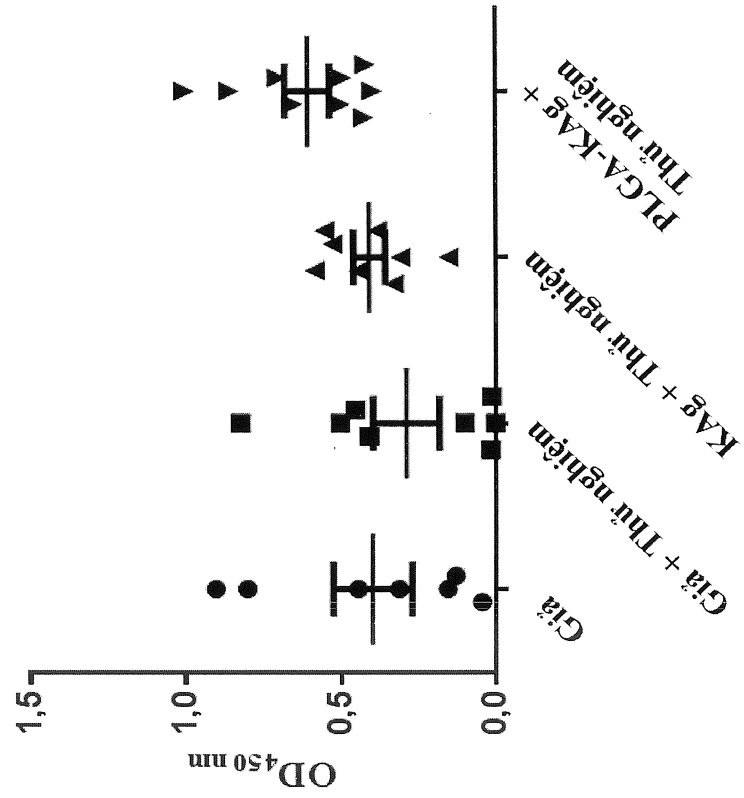
HÌNH 8B

IgA trong dịch thủy phân tế bào phổi



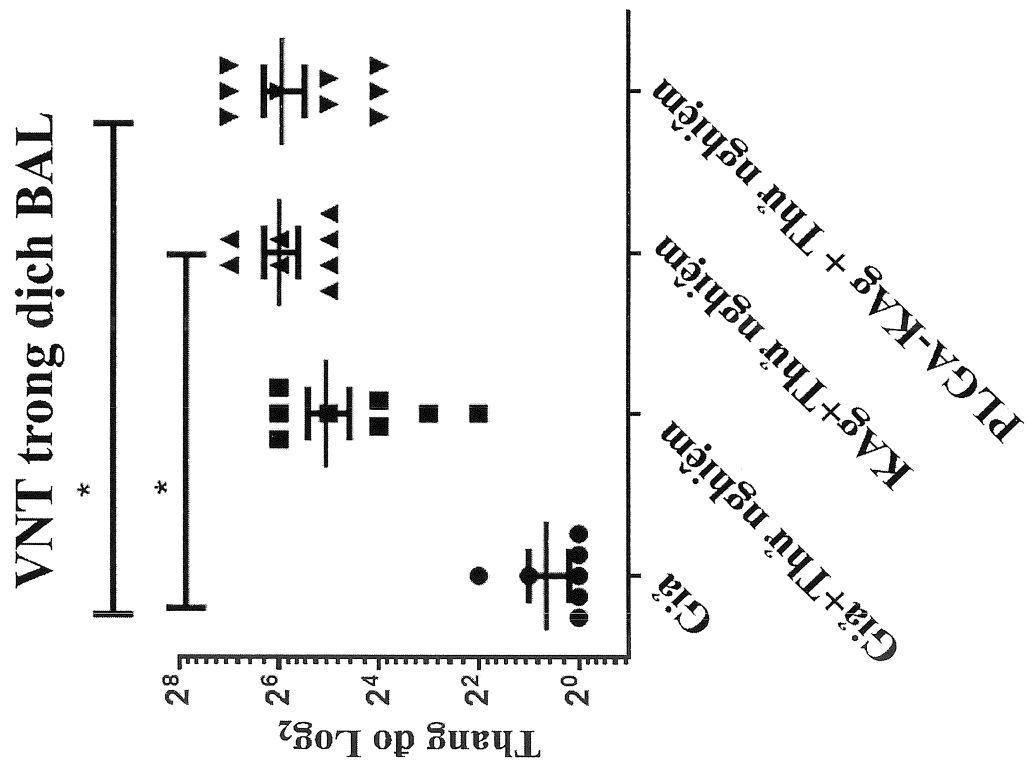
HÌNH 8C

IgG trong huyết tương



HÌNH 8D

HÌNH 8



HÌNH 8G

