



(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)



1-0029410

(51)⁷ A61K 39/39; A61K 31/722; A61K 39/00; A61K 39/02; A61K 39/08; C12N 7/00; A61K 39/112; A61K 39/145; C08B 37/08; C08L 5/08; A61K 31/7004; A61K 39/085 (13) B

(21) 1-2015-01830

(22) 29/10/2013

(86) PCT/US2013/067212 29/10/2013

(87) WO 2014/070709 08/05/2014

(30) 61/719,713 29/10/2012 US

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/02/2016 335A

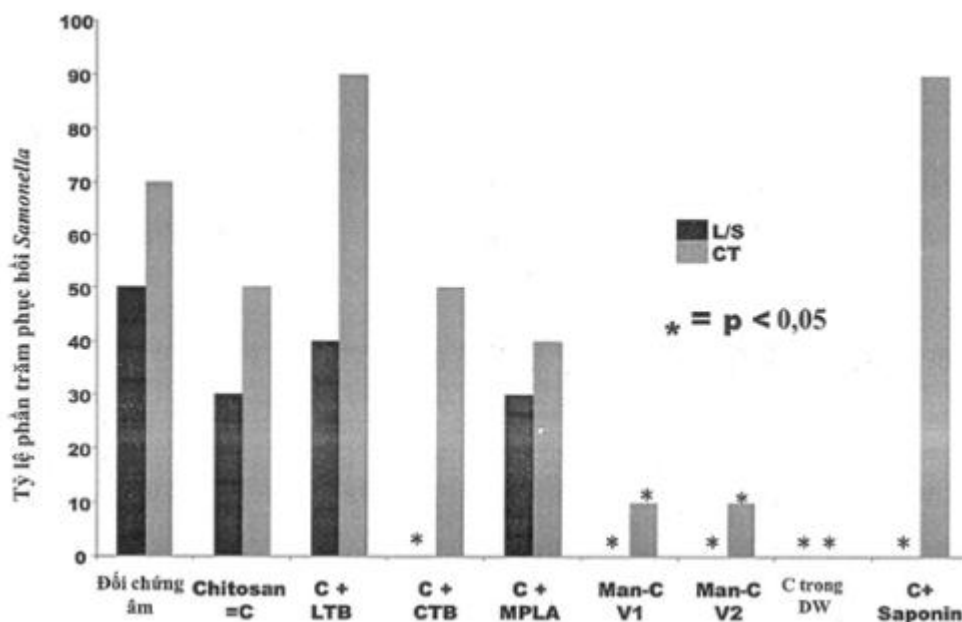
(73) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (US)
2404 North University Avenue, Little Rock, AR 72207, United States of America

(72) HARGIS, Billy, M. (US); PUMFORD, Neil, R. (US); MORGAN, Marion (US); SHIVARAMAIAH, Srichaitanya (IN); TELLEZ, Guillermo (US); WOLFENDEN, Amanda (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM VACCIN CHỨA HYDRAT CACBON LIÊN KẾT VỚI CHITOSAN VÀ KHÁNG NGUYÊN VI KHUẨN

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa chất phù trợ chứa chitosan được liên kết ngang với aldehyt hoặc chitosan được manosyl hóa. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp điều chế các chất phù trợ, các phương pháp kết hợp hoặc liên kết các chất phù trợ với các kháng nguyên. Sự kết hợp chất phù trợ-kháng nguyên có thể được sử dụng trong các chế phẩm vaccin và các chế phẩm vaccin này có thể được sử dụng trong các phương pháp để chủng ngừa cho động vật kháng lại nguồn kháng nguyên này hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm phù trợ chứa chitosan liên kết ngang với aldehyt hoặc chitosan được manosyl hóa, phương pháp bào chế chế phẩm phù trợ này và chế phẩm vacxin chứa chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất phù trợ là chất có tác dụng được lý hoặc miễn dịch mà cải biến tác dụng của chất khác, như thuốc hoặc vacxin. Các chất phù trợ thường được đưa vào trong vacxin để làm tăng đáp ứng miễn dịch ở đối tượng nhận đối với kháng nguyên được cung cấp. đồng thời giữ cho các nguyên liệu ngoại sinh được tiêm vào ở mức tối thiểu.

Bản thân các chất phù trợ không tạo ra tính miễn dịch. Các chất phù trợ có thể tác động theo nhiều cách khác nhau khi trình diện kháng nguyên với hệ miễn dịch. Các chất phù trợ có thể có tác dụng làm nguồn chứa kháng nguyên, trình diện kháng nguyên trong một thời gian dài, do đó chúng tối đa hóa đáp ứng miễn dịch trước khi cơ thể đào thải hết kháng nguyên. Các ví dụ về chất phù trợ kiểu nguồn chứa là nhũ tương dầu, giống như chất phù trợ Freund. Các chất phù trợ cũng có thể tác động như là chất kích thích làm cho cơ thể huy động và khuếch đại đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Vacxin phòng bệnh uốn ván, bệnh bạch cầu, và ho gà, ví dụ, chứa lượng nhỏ độc tố được tạo ra bởi các vi khuẩn mong muốn nêu trên, ngoài ra còn chứa nhôm hydroxit. Các muối nhôm là các chất phù trợ phổ biến trong vacxin được bán ở Mỹ và đã được dùng trong vacxin trong hơn 70 năm qua.

Chitosan là polysacarit thẳng được cấu thành từ các D-glucosamin liên kết β -1,4 (đơn vị được loại nhóm axetyl) và N-axetyl-D-glucosamin (đơn vị được axetyl hóa) được phân bố ngẫu nhiên. Nó được tạo ra bằng cách xử lý vỏ tôm và các loại vỏ của các loài giáp xác khác bằng kiềm natri hydroxit. Chitosan đã được sử dụng làm chất mang cho cả vacxin dùng qua đường miệng lẫn vacxin dùng dưới da với mức độ thành công nhất định. Do đó, các tác giả sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa chất phù trợ dựa trên chitosan mà là chất phù trợ hoạt động tốt hơn so với các chất phù trợ nhôm được sử dụng theo truyền thống. Cụ thể, các chất phù trợ dựa trên chitosan được đề xuất trong sáng chế kích thích đáp ứng IgA hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm phù trợ, chế phẩm vaccin chứa chế phẩm phù trợ này. Cụ thể, chitosan và kháng nguyên có thể được liên kết ngang sử dụng aldehyt. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa 0,5% đến 2% chitosan liên kết ngang với aldehyt và kháng nguyên. Nồng độ cuối cùng của aldehyt trong chế phẩm vaccin nhỏ hơn 0,5%.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm phù trợ chứa chitosan liên kết với hydrat cacbon để tạo ra bazơ Schiff. Chế phẩm phù trợ có thể được kết hợp với kháng nguyên. Hydrat cacbon có thể là manosa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin. Các chế phẩm vaccin có thể chứa các chế phẩm phù trợ được đề xuất ở đây và kháng nguyên. Các kháng nguyên có thể có bản chất là protein hoặc vi sinh vật, các vi sinh vật thích hợp bao gồm vi khuẩn, nấm men, hoặc các loại nấm khác, các ký sinh trùng nhân chuẩn và các virus và chúng có thể được làm giảm độc lực, tái tổ hợp, giết hoặc theo cách khác, được bất hoạt.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế các chế phẩm phù trợ và phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin. Chitosan được hòa tan trong dung dịch axit axetic, và kháng nguyên được bổ sung vào chitosan đã hòa tan. Cuối cùng, kháng nguyên và chitosan được kết hợp với aldehyt sao cho nồng độ cuối cùng của aldehyt nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,5%. Dung dịch đệm Tris có thể được bổ sung vào chế phẩm phù trợ để tiêu thụ hết các aldehyt tự do và tạo ra chế phẩm phù trợ ổn định hơn.

Chế phẩm phù trợ dựa trên chitosan có thể là chitosan liên kết ngang với aldehyt hoặc chitosan liên kết với hydrat cacbon.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện đáp ứng của kháng thể IgG kháng β -galactosidaza ở các con gà tây sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.2 là đồ thị thể hiện đáp ứng của kháng thể IgG kháng *Clostridium septicum* ở các con gà tây sau khi chủng lần đầu và chủng tăng cường bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.3 là bộ đồ thị thể hiện đáp ứng của kháng thể IgG (Fig.3A) và IgA (Fig.3B) ở các con gà vào các thời điểm khác nhau sau khi chủng ngừa và chủng ngừa tăng cường bằng chế phẩm vaccin cúm gia cầm vectơ *Bacillus*-chất phù trợ đã nêu.

Fig.4 là đồ thị thể hiện mức kháng thể IgG kháng *Salmonella* sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức kháng thể IgA kháng *Salmonella* sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.6 là bộ đồ thị thể hiện mức kháng thể IgG (Fig.6A) và IgA (Fig.6B) kháng vi khuẩn *Salmonella* sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.7 là đồ thị thể hiện tỷ lệ phần trăm phục hồi của *Salmonella* trong gan và lá lách (L/S) hoặc các hạch manh tràng (CT) vào ngày thứ 22 sau khi chủng ngừa lần đầu (ngày thứ ba sau khi gây nhiễm). Quy trình chủng ngừa là giống với quy trình được sử dụng trên Fig.6 và a * thể hiện $P < 0,05$.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mức kháng thể IgA kháng *Salmonella* vào ngày thứ 22 sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường (ngày thứ 12) bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu qua các đường sử dụng đã nêu như đo được bằng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.9 là đồ thị thể hiện đáp ứng miễn dịch IgG kháng *Salmonella* sau khi chủng ngừa cho các con gà con bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu như đo được bằng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.10 là đồ thị thể hiện đáp ứng miễn dịch IgGA kháng *Salmonella* sau khi chủng ngừa cho các con gà con bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu như đo được bằng thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.11 là đồ thị thể hiện đáp ứng miễn dịch IgG kháng *Bordetella avium* sau khi chủng ngừa cho gà tây liều đơn ngoài đường tiêu hóa bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Fig.12 là đồ thị thể hiện đáp ứng miễn dịch IgG kháng *Bordetella avium* sau khi chủng ngừa dưới da bằng chế phẩm vaccin-chất phù trợ đã nêu ở gà tây mới nở 1 ngày tuổi sau đó sử dụng nước uống chứa cùng chế phẩm kết hợp vaccin-chất phù trợ vào ngày thứ 14. Đáp ứng này được đo vào ngày 21. Các ký tự khác nhau thể hiện các khác biệt có ý nghĩa ($p \leq 0,05$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chất phù trợ bao gồm chitosan, các chế phẩm vaccin chứa các chất phù trợ này, phương pháp điều chế các chất phù trợ và phương pháp sử dụng các chất phù trợ và các chế phẩm vaccin này. Tóm lại, hệ chất phù trợ mới có thể được sử dụng trong các phương pháp tương tự với các chất phù trợ khác như các chất phù trợ được sử dụng ngoài đường tiêu hóa (tiêm) được mô tả ở đây. Phân tử bazơ bao gồm chitosan, là dạng đã được loại nhóm axetyl của chitin, là bộ xương ngoài của nhiều động vật không có xương sống (tôm, cua, côn trùng, v.v.). Chitosan được coi là hợp chất đã được công nhận là an toàn (generally recognized as safe - GRAS) và được dùng cho việc giảm cân, giảm cholesterol, chứng mất ngủ, và tăng cường chức năng của thận. Chitosan cũng được dùng làm chất phù trợ được sử dụng với nhiều vaccin khác nhau dùng qua niêm mạc (Jabbal-Gill *et al.*, 2012), nhưng các chitosan được mô tả ở đây là mới và có chức năng tốt hơn so với chitosan truyền thống như được thể hiện trong các ví dụ.

Chitosan-protein liên kết ngang với formaldehyt và chitosan liên kết với hydrat cacbon tạo ra chất phù trợ đặc trưng để phân phối các kháng nguyên trong vaccin qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Chitosan đã được sử dụng làm chất mang cho cả vaccin dùng qua đường miệng và dưới da. Trong một số chế phẩm, kháng nguyên này liên kết đồng hóa trị với chitosan nhờ xử lý bằng formaldehyt. Trong một số chế phẩm khác, hệ phù trợ được cải thiện bằng cách bổ sung hydrat cacbon (manosa, fucoza, và galactosa) liên kết với chitosan, cho phép gắn đích các thụ thể manosa trên các tế bào trình diện kháng nguyên, do đó tăng cường đáp ứng miễn dịch với phức hợp chitosan-kháng nguyên. Cả chitosan-protein liên kết ngang với formaldehyt và phức hợp chitosan-protein được manosyl hóa, tạo ra đáp ứng miễn dịch tăng cường bằng cả đường phân phối

ngoài đường tiêu hóa và đường miệng (hoặc niêm mạc khác), mà đặc trưng cho vacxin đã bị bất hoạt.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chất phù trợ chứa hydrat cacbon được liên kết với chitosan để tạo ra bazơ Schiff. Chất phù trợ này có thể được kết hợp với kháng nguyên. Hydrat cacbon có thể là manozơ, manobiozơ, glucozơ, galactozơ hoặc fructozơ. Các hydrat cacbon thích hợp khác có thể được sử dụng. Không ràng buộc bởi lý thuyết này, hydrat cacbon được bổ sung vào chitosan với mục đích gắn đích chitosan đến thụ thể của các hydrat cacbon này trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên.

Hydrat cacbon-chitosan được sử dụng ở đây được tạo ra như được mô tả đầy đủ hơn trong các ví dụ dưới đây. Phương pháp của các tác giả sáng chế dựa trên phương pháp của Jayasree (Jayasree et al., 2011) sử dụng hydrat cacbon vòng mở có nhóm cacbonyl sẵn có phản ứng với nhóm amino trên chitosan để tạo ra bazơ Schiff. Bazơ Schiff này có thể được làm ổn định bằng cách khử bằng natri xyanobohydrua (NaCNBH_4). Các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng bước khử là không cần thiết để làm tăng khả năng gây miễn dịch trên Fig.6 trong đó dạng được khử (Man-C V1) được so sánh với dạng không được khử (Man-C V2) của chitosan. Dạng không được khử tạo ra đáp ứng IgA tốt nhất, do đó mỗi dạng này có thể được sử dụng. Ngoài ra, dạng không được khử của chitosan được manosyl hóa không cần bổ sung hóa chất độc hại (NaCNBH_4). Tóm lại, hydrat cacbon, thích hợp là manozơ ($10\mu\text{M}$), được hòa tan trong natri axetat $0,1\text{M}$, độ $\text{pH}=4,0$ ở 60°C trong 2 giờ và chitosan ($0,2\text{-}2\%$) được hòa tan trong axit axetic $1,5\%$. Manozơ đã hòa tan và chitosan đã hòa tan sau đó được kết hợp lại và ủ ở nhiệt độ phòng để cho phép nhóm amin trên chitosan phản ứng với cacbonyl trên đường để tạo ra bazơ Schiff. Bước khử bazơ Schiff là không cần thiết đối với chất phù trợ để thực hiện chức năng và thực vậy, các ví dụ cho thấy bazơ Schiff không khử là chất phù trợ tốt hơn (xem Fig.6). Theo các phương án khác, bazơ Schiff có thể được khử.

Theo phương án khác, chitosan và kháng nguyên có thể được liên kết ngang sử dụng aldehyt. Theo một khía cạnh, chế phẩm chứa $0,5\%$ đến 2% chitosan liên kết ngang với aldehyt và kháng nguyên. Chế phẩm vacxin cuối cùng thích hợp nếu chứa từ $0,5$ đến $1,5\%$ chitosan. Chất phù trợ có thể chứa từ $0,5\%$ đến 3% chitosan, thích hợp là từ $0,5\%$ đến 2% chitosan, thích hợp là từ $0,5\%$ đến $1,5\%$ chitosan, thích hợp là từ $0,5\%$ đến $1,2\%$ chitosan. Nồng độ cuối cùng của aldehyt trong chế phẩm vacxin thích hợp là nhỏ hơn $0,5\%$. Nồng độ tối đa của aldehyt được tính dựa trên mức nồng độ tối đa của aldehyt dư

được cho phép trong vaccin. Mức aldehyt cao hơn có thể được sử dụng để liên kết ngang chitosan, nhưng chế phẩm vaccin cuối cùng thích hợp nếu chứa ít hơn 0,5% aldehyt. Trong các ví dụ, formaldehyt được sử dụng làm aldehyt để liên kết ngang chitosan. Các aldehyt khác, như formalin, glutaraldehyt, axetaldehyt, propionaldehyt, hoặc butyraldehyt, cũng có thể được sử dụng. Các aldehyt liên kết ngang các nhóm amino trên chitosan với các nhóm amino trên các phân tử chitosan khác hoặc trên các kháng nguyên.

Phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin chứa chitosan liên kết ngang với aldehyt và kháng nguyên cũng được đề xuất ở đây. Phương pháp này bao gồm hòa tan chitosan trong dung dịch chứa axit axetic. Chitosan đã liên kết với hydrat cacbon cũng có thể được sử dụng làm chitosan trong phương pháp này. Thích hợp nếu axit axetic được sử dụng ở nồng độ cuối cùng là 1,5% trong nước hoặc trong 15mL axit axetic hòa tan trong 1L nước. Thích hợp nếu lượng chitosan nằm trong khoảng từ 0,5% đến 2%, thích hợp là từ 0,5% đến 1,5%. Kháng nguyên được bổ sung vào chitosan đã hòa tan ở mức thích hợp. Lượng và dạng kháng nguyên được sử dụng trong các chế phẩm vaccin có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Cuối cùng, kháng nguyên và chitosan được kết hợp với aldehyt sao cho nồng độ cuối cùng của aldehyt nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,5%. Aldehyt có khả năng liên kết ngang hóa học chitosan với các phân tử chitosan khác và chitosan với kháng nguyên. Tris-HCl có thể được bổ sung vào để tiêu thụ hết các aldehyt tự do. Dung dịch Tris có thể được bổ sung đến nồng độ cuối cùng là 0,5g/L.

Mỗi chế phẩm phù trợ được mô tả ở đây có thể được kết hợp với các phân tử tăng cường, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, saponin, các thụ thể giống thụ thể toll, tiểu đơn vị B của độc tố vi khuẩn, các độc tố vi khuẩn, biến độc tố uốn ván, motif CpG, các liposom hoặc monophosphoryl lipid A. Thích hợp nếu các phân tử tăng cường đóng vai trò làm các chất kích thích bổ sung cho hệ miễn dịch và tăng cường đáp ứng miễn dịch được tạo ra sau khi sử dụng chế phẩm vaccin cho đối tượng.

Các chế phẩm vaccin được đề xuất ở đây chứa các chất phù trợ dựa trên chitosan được mô tả ở đây và các kháng nguyên. Các kháng nguyên có thể là kháng nguyên bất kỳ có sẵn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng nguyên như protein, các peptit tổng hợp, các peptit được dung hợp với các chất mang, hoặc các vi sinh vật có thể được sử dụng trong vaccin này. Các vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, nấm men, các ký sinh trùng, nấm, virus, giun sán hoặc các sinh vật gây ra bệnh

khác. Các vi sinh vật bao gồm sinh vật sống, đã chết, giảm độc lực, tái tổ hợp, hoặc bị bất hoạt. Các ví dụ về các vi sinh vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Influenza*, và *Eimeria*. Các vi sinh vật có thể được bất hoạt hoặc giết trước khi sử dụng bằng cách xử lý bằng nhiệt, metanol hoặc các chất kìm hãm khác như formaldehyt hoặc các aldehyt khác. Các aldehyt có thể được tiêu thụ hết bằng cách bổ sung tiếp Tris-HCl đến nồng độ cuối cùng bằng 0,5g/L. Các kháng nguyên thích hợp có thể cũng bao gồm các kháng nguyên peptit như *Influenza* M2e, Hemagglutinin, Neuraminidaza, hoặc các protein nhân; *Eimeria* TRAP hoặc MPP; *Clostridium* sialidaza, SagA, độc tố alpha, độc tố NetB, hoặc protein vận chuyển sắt. Các ví dụ về các kháng nguyên peptit khác có thể được tìm thấy, ít nhất trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/441,851; 12/740,631; 12/740,608; 13/574,504; và 13/702,827, tất cả các đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các chất phù trợ dựa trên chitosan có thể được sử dụng để làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với vacxin đã có sẵn hoặc vacxin mới phát triển hoặc vacxin tự sinh.

Có hai cải tiến đáng kể đối với việc chủng ngừa theo sáng chế. Thứ nhất, khi chitosan cải biến được sử dụng đồng thời với vacxin bất hoạt bằng đường ngoài đường tiêu hóa thì các tác giả sáng chế quan sát thấy đáp ứng miễn dịch là tốt hơn đáp ứng miễn dịch quan sát được đối với các chất phù trợ khác, như nhôm, với phản ứng tại chỗ tiêm là tối thiểu. Nhiều chất phù trợ hoạt động bằng cách gây ra đáp ứng viêm ở vị trí tiêm hoặc làm chậm quá trình hấp thu từ vị trí tiêm hoặc cả hai. Một trong số các nhược điểm của các chất phù trợ truyền thống là chúng thường gây ra phản ứng nhất định, đau nhức, và trong một số trường hợp chúng gây thương tổn lâu dài, làm giảm thứ hạng hoặc phải cắt bỏ các động vật nuôi lấy thịt khi giết mổ. Chitosan cải biến có thể làm giảm các vấn đề phát sinh liên quan đến việc sử dụng chất phù trợ vacxin khác. Nó có chi phí sản xuất rẻ và dễ dàng đưa được vào vacxin thương phẩm.

Ngoài ra, các đáp ứng miễn dịch cũng được tăng cường khi các kháng nguyên chết có mặt đồng thời qua đường miệng bằng ống thông từ miệng vào dạ dày hoặc đưa vào nước uống. Điều này thực sự quan trọng đối với các vật nuôi - nhất là gia cầm, do việc xử lý để tiêm ngoài đường tiêu hóa thường rất tốn nhân công và làm cho các con chim và các động vật khác sợ hãi. Ngoại trừ các gia cầm chuyên dùng để gây giống, còn lại việc sử dụng vacxin đã bất hoạt cho gia cầm thường là rất đắt do chi phí sử dụng. Khả năng phân

phối vaccin qua đường miệng làm thay đổi cách thức có thể chủng ngừa cho động vật. Có hai ưu điểm chính của vaccin sống (được gọi là vaccin sống cải biến hoặc vaccin giảm độc lực) khi sử dụng với quy mô lớn. Đầu tiên là, có thể áp dụng quy mô lớn bằng cách sử dụng cho nước uống hoặc phun. Thứ hai, vaccin sống này cũng tạo ra tính miễn dịch ở niêm mạc khu trú (đường hô hấp và đường ruột, nơi mà phần lớn các mầm bệnh gây nhiễm). Như vậy, vaccin chết hoặc vaccin sống đều có thể phòng ngừa được bệnh nhưng vaccin sống về mặt lịch sử thường hiệu quả hơn trong việc ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng thực tế và do đó, chúng được ưu tiên hơn.

Vaccin chết có ưu điểm lớn là chúng có thể được sản xuất nhanh chóng với nguy cơ lây nhiễm và gây bệnh rất thấp, và chúng không có khả năng thay đổi về mặt di truyền trở về typ bố mẹ gây bệnh, và chúng có các vấn đề về quản lý ít hơn nhiều do các lý do này. Tương tự, có số lượng các bệnh mô côi (bệnh hiếm gặp hoặc bệnh phổ biến nhưng chưa được phát hiện ra) rất lớn và phát triển chưa từng có, đây là các bệnh chưa đủ phổ biến để công ty vaccin phát triển vaccin đã được cấp phép /lixiăng, và trong luật của Mỹ (và nhiều quốc gia khác) cũng có các điều khoản quy định việc sản xuất vaccin “tự sinh”, cụ thể là được sản xuất từ mầm bệnh quan tâm, đã bị giết, và được sử dụng trên các quần thể nguồn (quần thể động vật hoặc người). Tại các nước đang phát triển, các bệnh mô côi xảy ra, cần có vaccin mà quá đắt để mua được hoặc kỹ thuật của họ không thể sản xuất một cách nhanh chóng và tại chỗ, đủ để giải quyết bệnh dịch. Các chất phù trợ được sáng chế đề xuất có thể chấp nhận được và về mặt công nghệ chúng được sản xuất dễ dàng. Chúng có thể kết hợp dễ dàng với vi sinh vật đã bị giết hoặc bị bất hoạt để tạo ra vaccin.

Một số ứng dụng tiềm năng cho công nghệ được mô tả ở đây là sẵn có. Đáp ứng toàn thân đối với vaccin chết có thể được cải thiện bằng cách kết hợp chitosan cải biến dưới dạng chất phù trợ để tiêm. Có thể ngăn ngừa một số bệnh bằng cách sử dụng qua đường miệng vaccin chết có nền là chất phù trợ này. Nền chất phù trợ này khi được sử dụng qua đường miệng, có thể được hướng đích để kích thích đáp ứng toàn thân và/hoặc đáp ứng niêm mạc – nghĩa là nó có nhiều ưu điểm của vaccin sống nhưng loại bỏ được các vấn đề của vaccin sống được mô tả ở trên.

Các chất phù trợ và các chế phẩm vaccin được mô tả ở đây có thể được kết hợp với các chất mang được dụng khác. Chất mang được dụng là chất mang bất kỳ thích hợp để sử dụng *in vivo*. Các ví dụ về các chất mang được dụng thích hợp để sử dụng trong các chế phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, các dung dịch đệm, các dung dịch

glucoza, các dịch nuôi cấy nền dầu hoặc dịch nuôi cấy vi khuẩn. Các thành phần khác của các chế phẩm này có thể thích hợp bao gồm, ví dụ, các tá dược như các chất làm ổn định, các chất bảo quản, các chất pha loãng, các chất nhũ hóa và các chất làm trơn. Các ví dụ về các chất mang được dụng hoặc các chất pha loãng bao gồm các chất làm ổn định như hydrat cacbon (ví dụ, sorbitol, manitol, tinh bột, sucroza, glucoza, dextran), các protein như albumin hoặc casein, các chất chứa protein như huyết thanh bò hoặc sữa gầy hoặc các chất đệm (ví dụ, đệm phosphat). Nhất là khi các chất làm ổn định này được bổ sung vào các chế phẩm, chế phẩm này thích hợp để làm đông khô hoặc sấy phun. Chế phẩm này cũng có thể được nhũ hóa.

Các chế phẩm được mô tả ở đây có thể cũng được kết hợp với các dược phẩm khác và các chế phẩm này có thể được sử dụng tuần tự, đồng thời hoặc dưới dạng từng phần của một chế phẩm duy nhất. Hai chế phẩm này có thể được sử dụng sao cho một chế phẩm được sử dụng trước chế phẩm còn lại với thời gian sử dụng cách nhau 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 20 giờ, 1 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 2 tuần, 4 tuần hoặc lâu hơn.

Lượng hữu hiệu hoặc lượng có tác dụng điều trị của các chế phẩm vacxin như được sử dụng ở đây chỉ lượng chế phẩm mà, khi được sử dụng cho đối tượng để tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng này với bệnh mong muốn, có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch, như đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào hoặc qua trung gian kháng thể để hạn chế khả năng tử vong hoặc tỷ lệ nhiễm bệnh do nhiễm trùng hoặc phơi nhiễm với bệnh quan tâm. Thích hợp, nếu đáp ứng miễn dịch được tăng cường đến mức sao cho việc sử dụng này là đủ để tạo ra hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa sự tử vong do bệnh hoặc tỷ lệ nhiễm bệnh.

Lượng có tác dụng điều trị sẽ thay đổi phụ thuộc vào vacxin, công thức hoặc chế phẩm, bệnh và mức độ trầm trọng của bệnh, và độ tuổi, cân nặng, tình trạng thể chất và tính đáp ứng của đối tượng. Ví dụ, mức kháng thể được tạo ra đáp ứng với việc chủng ngừa có thể tăng gấp hai lần, ba lần, bốn lần hoặc nhiều hơn bằng cách đưa vào chất phù trợ được mô tả ở đây so với việc sử dụng cùng kháng nguyên mà không dùng chất phù trợ hoặc dùng nhôm làm chất phù trợ. Đáp ứng miễn dịch được tăng cường có thể là đáp ứng IgA, hoặc đáp ứng IgG. Chất phù trợ cũng có thể làm giảm tỷ lệ nhiễm hoặc tử vong do tình trạng lây nhiễm sau đó. Như được thể hiện trong các ví dụ, việc sử dụng các chất phù trợ được mô tả ở đây kết hợp với kháng nguyên có thể làm giảm tốc độ lây nhiễm

sau đó hoặc mức độ nghiêm trọng của việc lây nhiễm tiếp vi sinh vật mà kháng nguyên này tạo ra đáp ứng miễn dịch cho nó so với việc chỉ chủng ngừa bằng một mình kháng nguyên hoặc chủng ngừa bằng kháng nguyên và chất phụ trợ khác. Mức độ trầm trọng của việc lây nhiễm có thể được xác định bằng khả năng của vi sinh vật trong việc xâm lấn mô ngoài vị trí đi vào, sao chép và/hoặc tồn tại dai dẳng trong sinh vật theo thời gian, hoặc gây tử vong hoặc gây ra nhiễm bệnh. Các động vật đã chủng ngừa, sau đó, có thể bị nhiễm mầm bệnh. Trong các trường hợp này, sự phát triển của mầm bệnh ở đối tượng sau khi gây nhiễm giảm ít nhất $1 \log_{10}$, $2 \log_{10}$ hoặc thậm chí là $3 \log_{10}$ ở các đối tượng được sử dụng vacxin theo sáng chế so với các đối tượng sử dụng đối chứng.

Chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng bằng cách thức bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, qua đường miệng, trong mũi, trong màng bụng, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, qua mũi họng, hoặc hấp thu qua niêm mạc. Do đó, các hợp chất này có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm tiêu hóa được, phun được và tiêm được. Ví dụ, việc sử dụng qua đường miệng có thể cần phải bổ sung vào nước uống, phun vào thực phẩm, phun lên động vật, (như gà hoặc gà tây mà sẽ tiêu hóa vacxin đã phun khi chúng liếm lông). Các đối tượng này có thể là động vật có vú, bao gồm người, bò, lợn, mèo, chó, hoặc các vật nuôi khác hoặc các loài động vật không phải động vật có vú như gia cầm, nghĩa là, gà hoặc gà tây.

Cần hiểu rằng liều cụ thể được sử dụng và lịch sử dụng (nghĩa là, chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường) trong trường hợp bất kỳ nhất định sẽ được điều chỉnh theo chế phẩm được sử dụng, bệnh nhắm đến, nguy cơ phơi nhiễm, tình trạng của đối tượng, và các yếu tố y tế khác mà có thể làm thay đổi đáp ứng của đối tượng hoặc tính khả thi của việc cung cấp chế phẩm cho đối tượng. Ví dụ, liều cụ thể cho đối tượng phụ thuộc vào loại đối tượng, độ tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe chung, chế độ ăn, lịch sử dụng và cách sử dụng, tốc độ bài tiết, các thuốc được sử dụng kết hợp và mức độ trầm trọng của rối loạn cụ thể mà vacxin nhắm vào. Ví dụ, việc chủng ngừa ban đầu và chủng ngừa tăng cường có thể được sử dụng bằng các cách thức khác nhau. Ví dụ, việc chủng ngừa ban đầu qua đường dưới da có thể được tăng cường bằng cách đưa phức hợp chất phụ trợ-kháng nguyên vào qua nước uống hoặc thực phẩm. Tỷ lệ phần trăm chitosan trong các chế phẩm vacxin thường nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2%, thích hợp là 0,5-1,5%. Tổng lượng chitosan được sử dụng có thể từ nhỏ hơn 1mg mỗi lần chủng ngừa đến

100mg, thích hợp là 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 50, 75 hoặc 100 mg chitosan. Trong các ví dụ, 2-5mg chitosan được sử dụng cho một liều. Khi được kết hợp với kháng nguyên vi sinh vật, vi sinh vật này có thể được đưa vào ở khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^9 vi sinh vật trong mỗi liều. Trong các ví dụ, 1×10^7 đến 1×10^8 vi sinh vật được sử dụng cho mỗi liều. Kháng nguyên có thể đưa vào ở lượng từ 10 μ g đến 10mg cho mỗi liều. Trong các ví dụ, 100 μ g mỗi liều được sử dụng.

Các ví dụ dưới đây chỉ được dùng để minh họa và không được làm giới hạn phạm vi sáng chế hoặc các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm. Tất cả các tài liệu viện dẫn được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ I: Đáp ứng miễn dịch với β -galactosidaza sau khi chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường

Thử nghiệm đầu tiên để thử nghiệm vaccin chứa chitosan-protein liên kết ngang với formaldehyt sử dụng protein β -galactosidaza cổ điển (β -Gal) làm protein mẫu. Gà tây con được chủng ngừa bằng β -Gal, như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây, với sáu nhóm xử lý và một nhóm đối chứng. Các con gà được chủng ngừa bằng nước muối hoặc 100 μ g β -Gal (0,25 ml) trong một trong số nước muối, 15% nhôm, 1% chitosan liên kết ngang (3 nhóm) với formaldehyt (Form), hoặc 1,5% chitosan không liên kết ngang với formaldehyt bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa dưới da (sq) vào ngày mới nở. Tất cả các nhóm được chủng ngừa tăng cường bằng cùng chế phẩm, dưới da vào các ngày 14 và 25 ngoại trừ hai nhóm chitosan 1%, một nhóm được chủng ngừa tăng cường cả hai ngày bằng chitosan- β -Gal 1% bằng ống thông từ miệng vào dạ dày và một nhóm được chủng ngừa tăng cường bằng cách phun chitosan- β -Gal 1% (2 mL).

Đáp ứng miễn dịch với β -Galactosidaza được xác định bằng cách sử dụng huyết thanh trong thử nghiệm ELISA đối với β -galactosidaza và các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Các mức đáp ứng miễn dịch được báo cáo dưới dạng tỷ lệ hấp thụ của mẫu so với đối chứng dương trong thử nghiệm ELISA gián tiếp. Các tỷ lệ S/P cao hơn thể hiện hiệu giá của kháng thể kháng- β -galactosidaza cao hơn. Khả năng phản ứng chéo rất yếu xuất hiện trong thử nghiệm ELISA sử dụng huyết thanh từ gà tây được chủng ngừa bằng nước muối và chỉ tăng giá trị vừa phải khi được chủng ngừa bằng β -Gal trong nước muối. Chất phụ trợ thương mại thông thường hiện được sử dụng là nhôm 15% và cho đáp ứng miễn dịch tốt khi nó được sử dụng. Khi sử dụng hệ vaccin liên kết ngang với formaldehyt và

được kích thích miễn dịch bằng chitosan (được đánh dấu là chitosan 1%), có sự tăng đáng kể đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên mẫu, β -Gal. Khi chỉ sử dụng một mình chitosan, thậm chí ở nồng độ cao hơn 1,5% thì đáp ứng miễn dịch thấp hơn đáng kể. Ngoài ra, khi kháng nguyên được chủng ngừa tăng cường kèm theo chất phụ trợ đã xử lý bằng chitosan-formaldehyt 1% bằng cách phun hoặc dùng qua đường miệng, có đáp ứng tương đương với chất phụ trợ tiêu chuẩn, 15% nhôm, được sử dụng dưới da.

Bảng 1: Nhóm xử lý

Nhóm	Chất gây miễn dịch	Chủng ngừa lần đầu vào ngày nở VX (100 μ g/0,25ml)	Chủng ngừa tăng cường vào ngày thứ 14 sau khi nở
Nước muối	Không	SQ	SQ (100 μ g/0,5ml)
β G trong nước muối	β -Galactosidaza	SQ	SQ (100 μ g/0,5ml)
Nhôm 15%	β -Galactosidaza	SQ	SQ (100 μ g/0,5ml)
Chitosan 1%	β -Galactosidaza	SQ	SQ (100 μ g/0,5ml)
Chitosan 1,5% không có Form	β -Galactosidaza	SQ	SQ (100 μ g/0,5ml)
Chitosan 1%, chủng ngừa lần hai qua đường miệng,	β -Galactosidaza	SQ	Dùng qua ống thông từ miệng vào dạ dày (100 μ g/0,5ml)
Chitosan 1%, chủng ngừa lần hai bằng cách phun	β -Galactosidaza	SQ	Phun (100 μ g/ml) phun sương 50 ml cho mỗi 20 con gà trong phòng có diện tích 20 feet ²

Ví dụ II: Đáp ứng miễn dịch với *Clostridium* sau khi chủng ngừa với các chất phụ trợ khác nhau

Thử nghiệm tương tự với thử nghiệm được mô tả ở trên được thực hiện bằng cách sử dụng 4×10^8 cfu/ml hỗn dịch *Clostridium septicum* (CS) chết hoặc nhược độc trong nhôm hoặc chitosan liên kết ngang với formalin sao cho liều cuối cùng cho mỗi con gà là 1×10^8 cfu/con gà cho gà con mới nở, và dùng dưới da (trong 0,25 mL) hoặc một mình hoặc kết hợp với nhôm 12% hoặc chitosan liên kết ngang với formalin 0,5%. Tất cả các con gà được chủng ngừa tăng cường vào ngày thứ 14 bằng cùng một vacxin và bằng cùng đường sử dụng. Các mức đáp ứng miễn dịch thu được được đo bằng thử nghiệm ELISA

gián tiếp và được báo cáo dưới dạng tỷ lệ hấp thụ của mẫu so với đối chứng dương (S/P). Các tỷ lệ S/P cao hơn cho thấy mức kháng thể kháng CS cao hơn.

Các con gà được chủng ngừa bằng vaccin không chứa chất phù trợ tạo ra đáp ứng kháng thể có thể phát hiện được bằng thử nghiệm ELISA với tỷ lệ S/P bằng 0,16 như được thể hiện trên Fig.2. Mức kháng thể này không khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức của CS có chất phù trợ là nhôm. Sau một liều chủng ngừa tăng cường (14 ngày sau khi chủng ngừa lần đầu), các con gà con được chủng ngừa bằng hỗn dịch vi khuẩn CS chết hoặc nhược độc có chất phù trợ là chitosan liên kết ngang với formalin 0,5% thể hiện các mức IgG mà tạo ra tỷ lệ S/P gấp khoảng hai lần so với của hỗn dịch vi khuẩn CS chết hoặc nhược độc không chứa chất phù trợ, lần lượt là 0,4 và 0,16. Hỗn dịch vi khuẩn CS chết hoặc nhược độc cùng với chất phù trợ nhôm hydroxit tạo ra các mức IgG thấp hơn khoảng 30% các mức IgG được tạo ra bởi CS cùng với chitosan được so sánh bằng các tỷ lệ S/P, lần lượt là 0,27 và 0,4. (Xem Fig. 2). Quan trọng là, các tổn thương tại vị trí tiêm là ít rõ ràng hơn ở 72 giờ (hoặc muộn hơn) do sử dụng chitosan trong khi đó nhôm luôn gây ra tình trạng viêm và u hạt cục bộ, mà thường tiến triển thành mô sẹo được bao nang.

Ví dụ III: Thử nghiệm chủng ngừa vaccin cúm gia cầm.

Cúm gia cầm (AI) là vấn đề sức khỏe cộng đồng quan trọng và là mối đe dọa kinh tế nghiêm trọng đối với ngành công nghiệp chăn nuôi gia cầm trên thế giới. Các số liệu trước đây chỉ ra rằng các vaccin vectơ *Salmonella* biểu hiện M2e kết hợp với CD154 có hiệu quả chống lại AI. Các cấu trúc mới sử dụng *Bacillus subtilis* làm vectơ và các epitop M2e cùng với các phân tử kích thích miễn dịch đã được thử nghiệm. IgG huyết thanh đặc hiệu M2e và các mức kháng thể IgA niêm mạc được xác định bằng thử nghiệm ELISA vào các ngày 11, 15 và 21 sau khi nở. Vào ngày nở, các con gà con được chủng ngừa bằng ống thông từ miệng tới dạ dày hoặc tiêm dưới da bằng một trong số vaccin cúm gia cầm vectơ *Bacillus* (BSAI), *Bacillus* kiểu hoang (BSBB) làm vaccin sống, BSAI sau khi bất hoạt bằng formalin, BSAI sau khi bất hoạt bằng formalin, làm đông khô và hoàn nguyên bằng nước muối hoặc BSAI sau khi bất hoạt bằng formalin và liên kết ngang với chitosan 1%. Mỗi vaccin được sử dụng ở liều 10^6 cfu/gà con trong 0,25ml hoặc 0,25ml nước muối. Vào ngày 10 sau khi nở, gà con trong hai nhóm (BSAI sống, BSAI đã bị bất

hoạt và làm đông khô) được chủng ngừa tăng cường bằng cùng chế phẩm đã chủng ngừa cho chúng vào ngày 0 và tất cả các nhóm khác không nhận được liều vacxin thứ 2.

Sau đó, các mẫu IgG huyết thanh và IgA niêm mạc thu được từ các con gà ở tất cả các nhóm vào các ngày 11, 15 và 21 sau khi nở và được sử dụng trong thử nghiệm ELISA bẫy kháng thể. Các đĩa được phủ bằng M2e được liên hợp với BSA (10 µg/ml), được phong bế, được ủ với huyết thanh từ mỗi nhóm xử lý được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 trong 2% FBS/PBS, sau đó ủ với kháng thể thứ hai được liên hợp với HRP đã pha loãng theo tỷ lệ 1:7.500, và được hiện màu bằng cách sử dụng cơ chất TMB. Các kết quả được trình bày dưới dạng tỷ lệ S/P trung bình (trung bình mẫu – trung bình đối chứng âm)/(trung bình đối chứng dương – trung bình đối chứng âm) $\pm$ SEM (n=20).

So với đối chứng khung *Bacillus* (BSBB) thấy có sự tăng đáng kể của các đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu M2e trong mỗi nhóm được chủng ngừa tại mỗi thời điểm được thử nghiệm. Tuy nhiên, không quan sát thấy sự khác biệt ở mỗi thời điểm giữa bất kỳ trong sáu nhóm được chủng ngừa về đáp ứng kháng thể IgG tăng (Xem Fig. 3A). Sự khác biệt thực sự về đáp ứng miễn dịch là rõ ràng khi xem xét đáp ứng kháng thể đặc hiệu IgA niêm mạc (Xem Fig. 3B). BSAI+1% chitosan thể hiện sự tăng rõ ràng về đáp ứng kháng thể IgA đặc hiệu so với nhóm đối chứng hoặc năm nhóm xử lý khác được chủng ngừa ở cả ba thời điểm lấy mẫu.

Tóm lại, trong các thử nghiệm sử dụng chitosan liên kết ngang, các tác giả sáng chế đã chứng minh ở trên rằng sự cải biến chitosan này là chất phù trợ tốt hơn so với nhôm hydroxit ở cả đường sử dụng ngoài đường tiêu hóa và đường miệng (Fig.1 và Fig.2). Chitosan đã được xử lý bằng formaldehyt là tác nhân liên kết ngang được chỉ ra là hiệu quả hơn so với chitosan mà không có formaldehyt (Fig.1). Khi được sử dụng qua đường miệng, chitosan làm tăng sự sản sinh IgA (Fig.3B) nhiều hơn so với IgG (Fig.3A).

Ví dụ IV: Tăng cường chất phù trợ chitosan

Chất phù trợ còn được tăng cường thêm qua một loạt các thử nghiệm được thiết kế để cải tiến chất phù trợ dựa trên chitosan bằng cách bổ sung các phân tử có khả năng tăng cường hoặc phương pháp phân phối thay thế. Các chất kích thích miễn dịch có thể cải thiện các đáp ứng khi được sử dụng cùng với các chất phù trợ và một vài hợp chất đã được nghiên cứu trước đây; xem tài liệu (Guy, 2007; Mutwiri et al., 2011). Các chất phù trợ tiềm năng bao gồm các saponin, các thành phần của vi khuẩn, các hợp chất mà tương

tác với hệ miễn dịch bẩm sinh như các thụ thể giống thụ thể toll, các axit nucleic như motif CpG, các virus, các nhũ tương bao gồm liposom, hoặc sự kết hợp của bất kỳ trong số các thành phần nêu trên. Một số phân tử kích thích miễn dịch triển vọng hơn mà tương tác với hệ miễn dịch bẩm sinh là biến độc tố uốn ván (TT), tiểu đơn vị độc tố đường ruột B không bền nhiệt (LTB), và tiểu đơn vị độc tố tả B (CTB). Các hợp chất khác được chỉ ra là có tác dụng tăng cường hệ miễn dịch theo kinh nghiệm nhờ các tính chất hóa học vốn có bao gồm saponin và monophosphoryl lipid A (MPLA). Việc sử dụng manosa hoặc các đường khác để hướng đích sự liên kết với thụ thể đại thực bào có thể tăng cường chức năng miễn dịch. Các kết hợp của các chất phụ trợ khác nhau có thể tác động hiệp đồng như với IL-12 hoặc các cytokin khác để kích thích đáp ứng miễn dịch.

Thử nghiệm đầu tiên để cải tiến chất phụ trợ so với chất phụ trợ chitosan liên kết ngang với formaldehyt, mà bao gồm kháng nguyên quan tâm liên kết ngang với chitosan 0,5%, sử dụng formaldehyt để tạo ra số liệu được nêu trong Fig.1-3 nêu trên. Hệ chất phụ trợ này sau đó được sử dụng làm đối chứng hoặc đường cơ sở để chọn các kết hợp tốt nhất của các phân tử tăng cường miễn dịch ứng viên đã chọn. Chất gây miễn dịch thử nghiệm là hỗn dịch vi khuẩn *Salmonella enteritidis* (SE) chết hoặc nhược độc được nuôi cấy đến 10^8 cfu/ml và được bất hoạt bằng formaldehyt. Để xác định chất phụ trợ chitosan liên kết ngang có thể cải tiến được nữa không, chất gây miễn dịch thử nghiệm (hỗn dịch vi khuẩn *Salmonella* chết hoặc nhược độc với chitosan là 4×10^7 cfu/ml với liều cuối cùng là 1×10^7 cfu/gà con) được trộn theo tỷ lệ 2:1 với một mình chitosan liên kết ngang hoặc được tăng cường bằng biến độc tố uốn ván (TT), tiểu đơn vị B của độc tố đường ruột không bền với nhiệt (heat-labile enterotoxin B subunit - LTB), hoặc chitosan được manosyl hóa và được sử dụng hoặc trong nước uống hoặc trong thức ăn. Các kết quả được trình bày trên Fig.4.

TT có thể là phân tử tăng cường miễn dịch tiềm năng và đã được sử dụng rộng rãi trong phát triển vacxin. Độc tố đường ruột không bền nhiệt từ *E. coli* đã được chỉ ra là phân tử kích thích miễn dịch mạnh nhưng rất độc, và do đó, nó không thích hợp là chất phụ trợ. Độc tố đường ruột không bền nhiệt chứa hai tiểu đơn vị, một nhân trung tâm LTA và năm tiểu đơn vị LTB (da Hora *et al.*, 2011). Tiểu đơn vị LTB giữ được các tính chất điều biến miễn dịch và cũng không độc. Do đó, nó là một thành phần điều biến miễn dịch tiềm năng và an toàn. Manosa và một số hydrat cacbon khác (như galactosa và fucosa) là các phối tử cho thụ thể hoạt hóa đại thực bào. Chitosan được manosyl hóa

được điều chế bằng phương pháp tương tự với phương pháp đã được mô tả trước đó bởi Yalpani và Hall (1980 và 1985) và Jayasree *et al.*, (2011) mà không cần bổ sung kẽm. Nói ngắn gọn, hai đương lượng mol manosa trong một thể tích natri axetat 0,1M được gia nhiệt ở 60°C trong hai giờ. Sau đó dung dịch này được bổ sung vào hai thể tích của một đương lượng mol của chitosan 2% trong axit axetic 0,15% và để cho phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để tạo ra chitosan được manosyl hóa 1,5%. Hỗn dịch vi khuẩn SE chết hoặc nhược độc sau đó được bổ sung vào chitosan được manosyl hóa 1,5% ở tỷ lệ 2/1. Bazo Schiff được tạo ra sau đó được khử bằng natri xyanobohydrat (NaCNBH_4).

Ngoài ra, đối với các phân tử tăng cường miễn dịch, các hệ phân phối khác nhau cũng được nghiên cứu như nêu trên. Hệ thống phân phối qua nước uống thông thường được sử dụng trong ngành công nghiệp chăn nuôi gia cầm pha loãng một phần thuốc hoặc hóa chất trong 128 phần nước. Chế phẩm chitosan ban đầu được sử dụng trên Fig.1-3 được pha loãng theo tỷ lệ 1:128 trong nước uống làm hệ thống phân phối tiềm năng. Nhóm thử nghiệm cuối cùng là chitosan 0,5% liên kết ngang với formaldehyt với hỗn dịch vi khuẩn SE chết hoặc nhược độc (công thức chitosan ban đầu) được bao nang bằng cách bổ sung từng giọt vào tripolyphosphat (TPP), sau đó làm khô, và nghiền thành bột để bổ sung vào thức ăn ở tỷ lệ 0,5% (khối lượng/khối lượng).

Gà siêu thịt mới nở 1 ngày tuổi được mỗi bằng 0,25 ml các chế phẩm nêu trên, dùng dưới da như nêu trên. Các nhóm này được mỗi giống như nhóm chỉ dùng chitosan. Các con gà này được chủng ngừa tăng cường bằng ống thông từ miệng vào dạ dày 12 ngày tuổi ngoại trừ các nhóm nước uống và nhóm TPP được chủng ngừa tăng cường trong nước uống ở tỷ lệ pha loãng 1:128 hoặc trong thức ăn ở tỷ lệ 0,5% (khối lượng/khối lượng) trong 8 giờ tương ứng. Mức kháng thể vào ngày thứ 22 trong huyết thanh (IgG) và niêm mạc hồi tràng (IgA) được đo bằng kit thử nghiệm ELISA cạnh tranh (IDEXX). Các mức hấp thụ hoặc tỷ lệ mẫu so với đối chứng giảm cho thấy mức kháng thể nhận biết các đĩa được phủ SE flagellin cao hơn.

Như được lưu ý trên Fig.1 và 2 ở trên, chất phù trợ chitosan là tốt hơn so với nhôm trong việc gây ra đáp ứng miễn dịch tăng cường. Do đó, mọi chất phù trợ dựa trên chitosan đều có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch tăng cường đối với hỗn dịch vi khuẩn SE chết hoặc nhược độc, với mức IgG và IgA đều cao hơn đáng kể so với khi sử dụng dưới da một mình chitosan (Fig.4 và 5, tương ứng). Nhóm TT và nhóm TPP bột khô có đáp ứng miễn dịch cao hơn đáng kể so với chất phù trợ chitosan được mỗi dưới da kèm

theo tăng cường dưới da (Fig.4 và 5). Ba nhóm còn lại, chitosan với LTB, chitosan được manosyl hóa, và tăng cường chitosan trong nước uống, đều tốt hơn về khả năng sản sinh kháng thể so với chitosan được sử dụng một mình dưới da (Fig.4 và 5).

Trong bộ thử nghiệm tiếp theo, ba nhóm tốt nhất từ thử nghiệm trước (LTB, chủng tăng cường bằng chitosan trong nước uống (DW), và chitosan đã khử và được manosyl hóa) được lặp lại kèm theo đối chứng âm (nước muối) và đối chứng chuẩn là chitosan được liên kết ngang với formaldehyt 0,5% được sử dụng dưới da để chủng ngừa lần đầu và chủng ngừa tăng cường, mà trước đó đã được chỉ ra là tốt hơn so với nhôm. Trong thử nghiệm này, các tác giả sáng chế bổ sung thêm ba nhóm xử lý mới sử dụng đối chứng chuẩn là chitosan liên kết ngang với formaldehyt 0,5% được tăng cường miễn dịch bằng tiểu đơn vị B của độc tố tả (Cholera toxin B subunit - CTB), Lipit A từ *Salmonella* (MPLA), hoặc saponin. Cũng được đưa vào trong thử nghiệm này là nhóm xử lý khác mà tương tự với nhóm xử lý chitosan được manosyl hóa, mà được chỉ ra là chất phụ trợ rất tốt trong thử nghiệm trước đó (Chitosan được manosyl hóa dạng 1, Man-C V1), nhưng nhóm này không được khử bằng NaCNBH_4 (Man-C V2).

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh SE flagellin một lần nữa lại cho thấy là các con gà được chủng ngừa dưới da bằng chitosan (C) 0,5% cho cả lần chủng ngừa đầu tiên và chủng ngừa tăng cường đều có mức globulin miễn dịch trong huyết thanh cao hơn (Fig.6A). Những con gà được chủng ngừa bằng chitosan 0,5% cùng với CTB (C +CTB), Man-C V2 và chitosan cùng với saponin (C + saponin) cho đáp ứng IgG tốt nhất (Fig.6A). Man-C V2 tạo ra đáp ứng IgA tốt nhất về mặt số học (Fig.6B). Cả ba nhóm xử lý này đều khác biệt đáng kể với nhóm tiêu chuẩn (0,5% chitosan được chủng ngừa dưới da cho cả lần chủng ngừa ban đầu và chủng ngừa tăng cường) (Fig.6).

Ngoài ra, các con gà bị gây nhiễm vào ngày thứ 19 bằng *Salmonella* sống ở liều 5×10^7 cfu/gà con. Ba ngày sau khi gây nhiễm, các con gà được nuôi cấy *Salmonella* trong hạch manh tràng (CT) và gan/lá lách (L/S). Chitosan cùng với CTB, cả hai dạng chitosan được manosyl hóa, chitosan khi chủng tăng cường qua nước uống, và chitosan cộng với saponin làm giảm đáng kể lượng *Salmonella* xuống dưới giới hạn phát hiện được trong gan/lá lách (L/S) so với đối chứng âm (chủng ngừa bằng nước muối) (Fig.7; $p < 0,05$). Trong ruột (CT), mức *Salmonella* giảm đáng kể khi sử dụng một trong hai dạng chitosan được manosyl hóa và trong nhóm được chủng ngừa tăng cường bằng chitosan 0,5% được pha loãng theo tỷ lệ 1:128 trong nước uống. Mức giảm đáng kể ở nhóm chitosan được

manosyl hóa cho thấy việc gắn đích trực tiếp đại thực bào với phổi tử của thụ thể manosa sẽ làm tăng tính hiệu quả của chất phù trợ chitosan. Ngoài ra, rất quan trọng là chế phẩm bazơ Schiff không khử của chitosan được manosyl hóa chỉ hiệu quả như chitosan được manosyl hóa được khử bằng NaCNBH_4 mà không có sự bổ sung hóa chất có thể gây hại. Bất ngờ lớn nữa là chitosan 0,5% được pha loãng theo tỷ lệ 1:128 trong nước uống mà được sử dụng để chủng ngừa tăng cường cho các kết quả tốt hơn trong việc làm giảm sự cư trú của *Salmonella* so với chỉ chủng ngừa ngoài đường tiêu hóa (Fig.7).

Ví dụ V: Đường chủng

Đường sử dụng tốt nhất và sự kết hợp chất phù trợ tốt nhất cho việc chủng ngừa được nghiên cứu. Gà con vừa mới nở được sử dụng 0,25mL nước muối hoặc vacxin cùng với hỗn hợp chất phù trợ tương ứng như được nêu trên Fig.8. Các chất phù trợ được so sánh bao gồm chitosan liên kết ngang với formaldehyt, chitosan được manosyl hóa được khử (Man C V1), chitosan được manosyl hóa không khử (Man C V2), và mỗi chất phù trợ được kết hợp với kháng nguyên và được sử dụng vào ngày nở 1 hoặc dưới da hoặc trong nước uống. Các con gà này được chủng ngừa tăng cường bằng cách sử dụng lần thứ hai với cùng sự kết hợp chất phù trợ-kháng nguyên hoặc dưới da, hoặc trong nước uống hoặc qua ống thông từ miệng xuống dạ dày. Các nhóm đã được chủng ngừa qua nước uống (DW) được pha loãng theo tỷ lệ 1:128 trong nước. Các nhóm được chủng ngừa tăng cường qua ống thông từ miệng xuống dạ dày được nhận 0,25ml. Đáp ứng IgA niêm mạc được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm SE flagellin ELISA cạnh tranh (IDEXX) như được mô tả ở trên. Mặc dù 5 nhóm xử lý cuối cùng trên Fig.8 không khác nhau đáng kể, nhưng nhóm có giá trị số thấp nhất là chitosan được manosyl hóa V2 được phân phối dưới da trong lần chủng ngừa đầu tiên và pha loãng theo tỷ lệ 1:128 trong DW cho lần chủng ngừa tăng cường. Nhóm này có mức IgA trong hồi tràng cao hơn đáng kể so với nhóm sử dụng chitosan 0,5% khi chủng ngừa lần đầu dưới da và chủng ngừa tăng cường dưới da hoặc qua nước uống. Không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể giữa dạng được khử và không được khử của chitosan được manosyl hóa hoặc khi chủng ngừa tăng cường được thực hiện qua đường nước uống hoặc thông qua ống thông từ miệng vào dạ dày.

Ví dụ VI: So sánh với chất phù trợ nền dầu khoáng

Sau đó chitosan được manosyl hóa được so sánh và kết hợp với chất phù trợ nền dầu khoáng đã có trên thị trường. Hỗn dịch vi khuẩn *Salmonella enteritidis* (SE) chết hoặc nhược độc được nuôi đến 10^8 cfu/ml và được bất hoạt bằng formaldehyt được sử dụng làm kháng nguyên. Hỗn dịch vi khuẩn *Salmonella* chết hoặc nhược độc được trộn với chitosan, chitosan được manosyl hóa, chất phù trợ dầu khoáng, hỗn hợp của chitosan và chất phù trợ dầu khoáng hoặc PBS ở 4×10^7 cfu/ml với liều cuối cùng là 1×10^7 cfu/gà con theo tỷ lệ 2:1. Gà con siêu thịt vừa mới nở được môi bằng 0,25 ml chế phẩm đã nêu dưới da như được nêu trên. Các con gà này được chủng ngừa tăng cường bằng ống thông từ miệng đến dạ dày ở 12 ngày tuổi. Mức kháng thể vào ngày thứ 22 trong huyết thanh (IgG) và niêm mạc hồi tràng (IgA) được xác định bằng kit ELISA cạnh tranh (IDEXX) và các kết quả được thể hiện trên Fig.9 và 10, tương ứng. Các tỷ lệ về mức hấp thụ của mẫu so với đối chứng giảm cho thấy mức kháng thể nhận biết các đĩa được phủ SE flagellin cao hơn. Việc chủng ngừa chitosan được manosyl hóa và quy trình chủng ngừa tăng cường sản sinh các mức IgG và IgA tăng đáng kể so với mỗi nhóm còn lại.

Ví dụ VII: Đáp ứng IgG sau khi dùng một lần

Để nghiên cứu đáp ứng miễn dịch IgG khi chủng ngừa một lần ngoài đường tiêu hóa, gà mới nở được chủng ngừa dưới da bằng $2,5 \times 10^8$ cfu/gà con hỗn dịch vi khuẩn *Bordetella avium* chết hoặc nhược độc kết hợp với nước muối, chitosan thông thường hoặc chitosan được manosyl hóa. Huyết thanh được lấy vào ngày thứ 14 và mức IgG đặc hiệu *Bordetella* được đo được bằng thử nghiệm ELISA. Các kết quả được thể hiện trên Fig.11 và các kết quả này cũng thể hiện tỷ lệ hấp thụ của mẫu so với đối chứng dương cho các xử lý đã nêu. Các mức hấp thụ cao hơn là dấu hiệu cho thấy mức Ig đặc hiệu tăng. Chitosan được manosyl hóa kết hợp với kháng nguyên *Bordetella* tạo ra mức IgG cao nhất.

Ví dụ VIII: Đáp ứng IgG sau khi chủng ngừa tăng cường qua nước uống

Để nghiên cứu đáp ứng miễn dịch IgG sau khi sử dụng hỗn dịch vi khuẩn *Bordetella avium* chết hoặc nhược độc dưới da, sau đó chủng ngừa tăng cường qua nước uống ở ngày thứ 14. Gà con mới nở được chủng ngừa dưới da bằng $2,5 \times 10^8$ cfu/gà con hỗn dịch vi khuẩn *Bordetella avium* chết hoặc nhược độc được đưa vào nước muối, chitosan thông thường hoặc chitosan được manosyl hóa. Vào ngày thứ 14, $7,8 \times 10^6$

cfu/mL hỗn dịch vi khuẩn *Bordetella avium* chết hoặc nhược độc được đưa vào nước uống được dùng để chủng ngừa tăng cường. Vào ngày thứ 21, 7 ngày sau khi chủng ngừa tăng cường, huyết thanh được lấy và đáp ứng IgG đặc hiệu được đo bằng ELISA. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12 và cho thấy tỷ lệ hấp thụ của mẫu so với đối chứng dương đối với các xử lý đã nêu. Mức hấp thụ cao hơn là dấu hiệu cho thấy mức Ig đặc hiệu tăng. Chitosan được manosyl hóa kết hợp với kháng nguyên *Bordetella* tạo ra các mức IgG cao hơn đáng kể so với đối chứng hoặc chitosan chưa được cải biến.

Phương pháp điều chế chất phù trợ:

Bào chế vaccin chứa chitosan-protein liên kết ngang với formaldehyt:

Thành phẩm của chitosan không chứa manosa có thể thay đổi từ nồng độ cuối cùng nhỏ nhất là chitosan 0,5% đến nồng độ cuối cùng lớn nhất là chitosan 2% trong chế phẩm vaccin. Chitosan được hòa tan trong dung dịch chứa 15 ml axit axetic bằng trong mỗi lít nước khử ion ở nồng độ thích hợp (1,5% axit axetic trong nước). Thông thường đối với môi trường canh thang, 2 thể tích môi trường nuôi cấy được trộn với 1 thể tích chitosan 1,5% (chitosan 0,5% trong chế phẩm vaccin cuối cùng). Các kháng nguyên khác được pha loãng ít nhất có thể tạo ra nồng độ cuối cùng lên đến chitosan 1,5%. Sau đó formaldehyt được bổ sung vào hỗn hợp chitosan được hòa tan kháng nguyên sao cho nồng độ cuối cùng là formaldehyt 0,2% hoặc formaldehyt 0,008M. Trong các ví dụ nêu trên, dung dịch formaldehyt 37% được sử dụng. Dung dịch Tris-HCl có thể được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng là 0,5g/L.

Điều chế chitosan được manosyl hóa:

Hai đương lượng mol manosa trong 1 thể tích natri axetat 0,1M, độ pH=4,0 được gia nhiệt ở 60°C trong hai giờ. Sau đó dung dịch này được bổ sung vào hai thể tích chứa 1 đương lượng mol chitosan 2% trong axit axetic 0,15% và để cho phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để tạo ra dung dịch 1,5% của chitosan được manosyl hóa. Sau đó dung dịch này có thể được trộn với môi trường canh thang sao cho 2 thể tích môi trường nuôi cấy được trộn với 1 thể tích dung dịch chitosan được manosyl hóa 1,5%. Các kháng nguyên đậm đặc có thể được pha loãng ít nhất có thể hoặc như mong muốn. Dung dịch Tris-HCl có thể được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng 0,5g/L.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vacxin chứa chế phẩm, trong đó chế phẩm này chứa hydrat cacbon liên kết với chitosan để tạo ra bazơ Schiff, và kháng nguyên vi khuẩn, và trong đó hydrat cacbon này là gốc manosa vòng mở và trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng trong thực phẩm hoặc nước uống.
2. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó bazơ Schiff không bị khử.
3. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó bazơ Schiff bị khử.
4. Chế phẩm vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này còn chứa phân tử tăng cường.
5. Chế phẩm vacxin theo điểm 4, trong đó phân tử tăng cường này là saponin, thụ thể giống thụ thể toll, tiểu đơn vị B của độc tố vi khuẩn, độc tố vi khuẩn, motif CpG, liposom hoặc monophosphoryl lipid A.
6. Chế phẩm vacxin theo điểm 4, trong đó phân tử tăng cường là biến độc tố uốn ván, tiểu đơn vị B của độc tố tả, tiểu đơn vị B độc tố đường ruột không bền nhiệt, hoặc tripolyphosphat.
7. Chế phẩm vacxin theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng nguyên vi khuẩn là *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Influenza*, hoặc *Eimeria*.
8. Chế phẩm vacxin theo điểm 7, trong đó kháng nguyên vi khuẩn bị bất hoạt hoặc bị giết.
9. Chế phẩm vacxin theo điểm 8, trong đó kháng nguyên vi khuẩn bị giết bằng cách sử dụng formaldehyt, glutaraldehyt hoặc formalin.

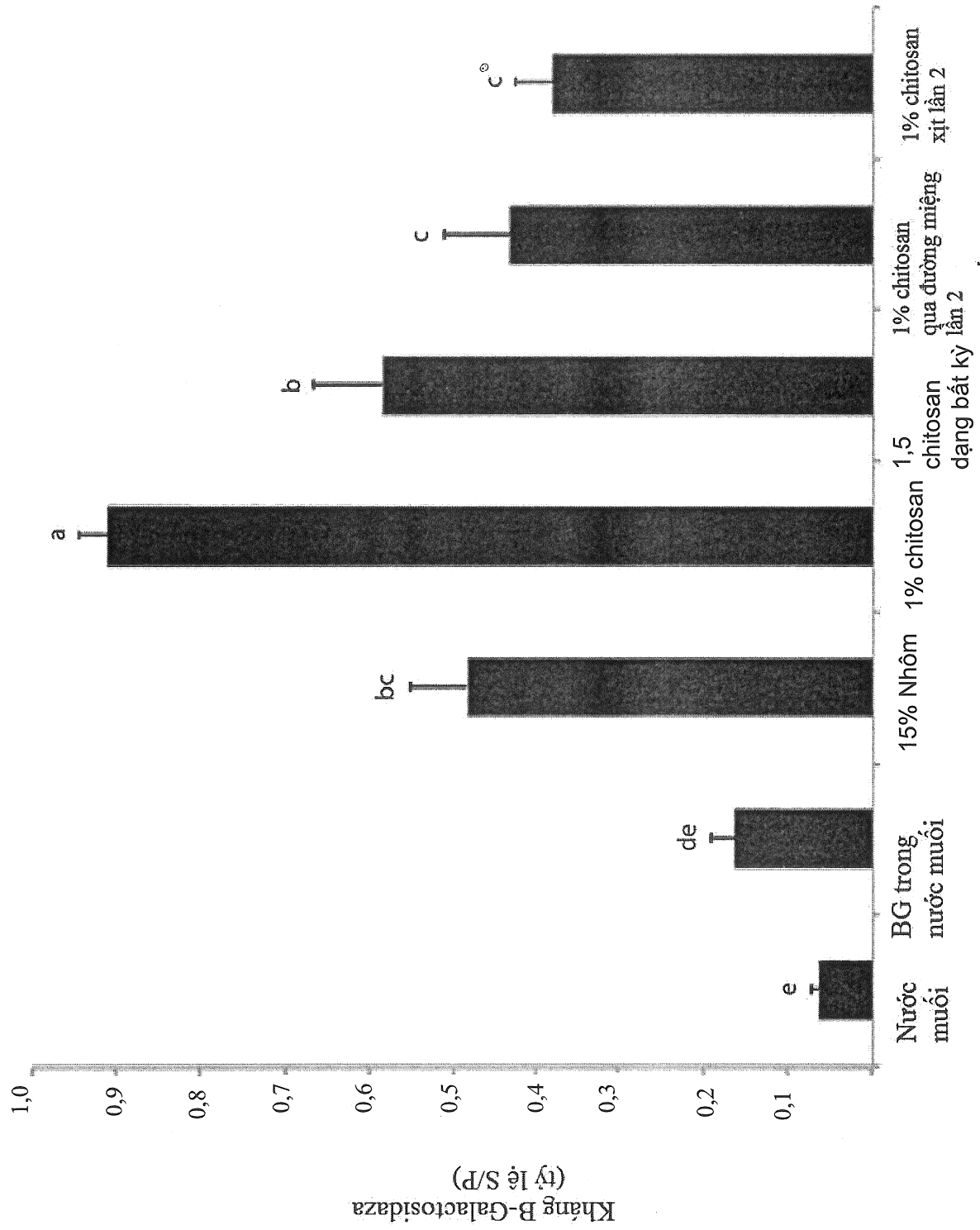


Fig. 1

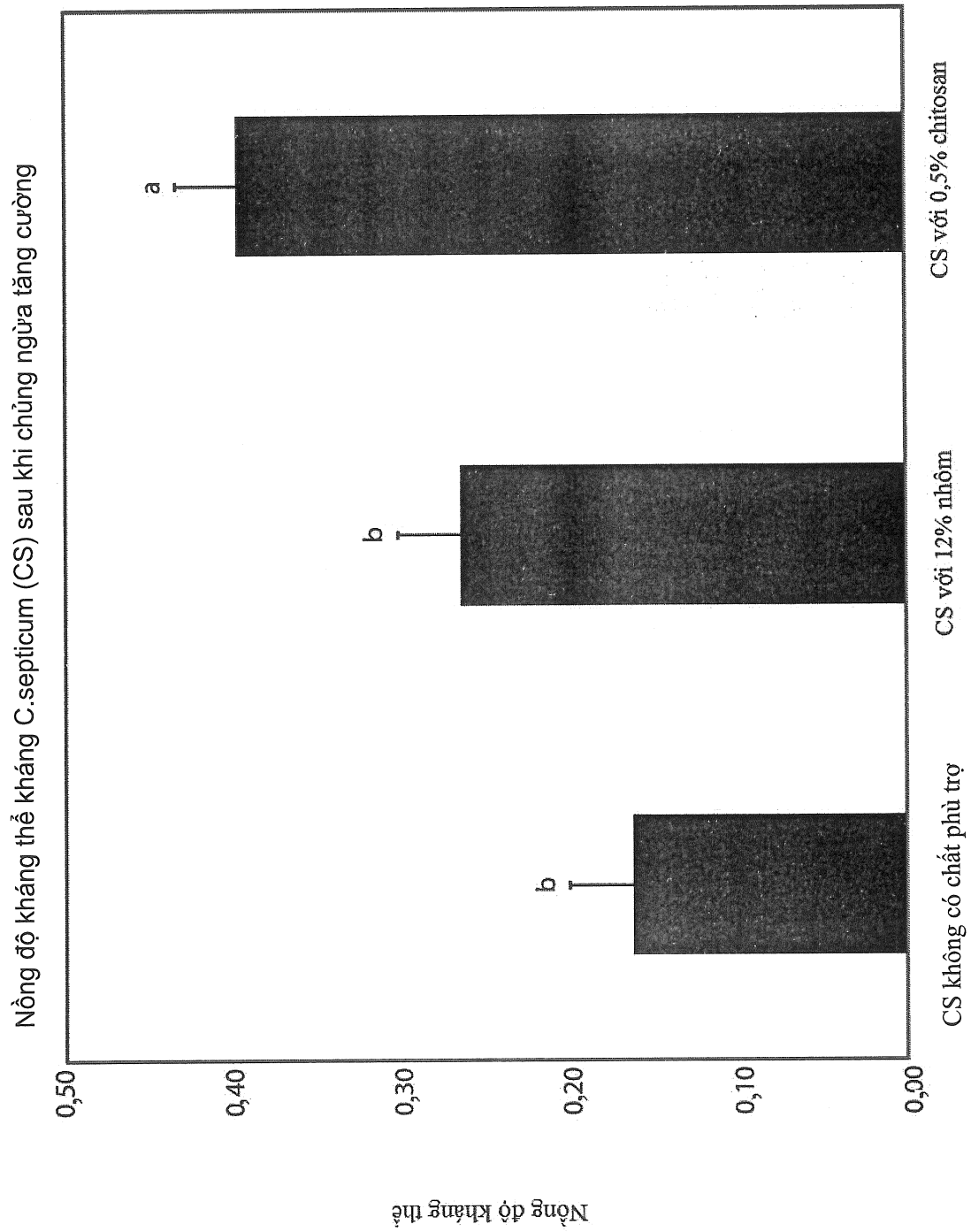


Fig. 2

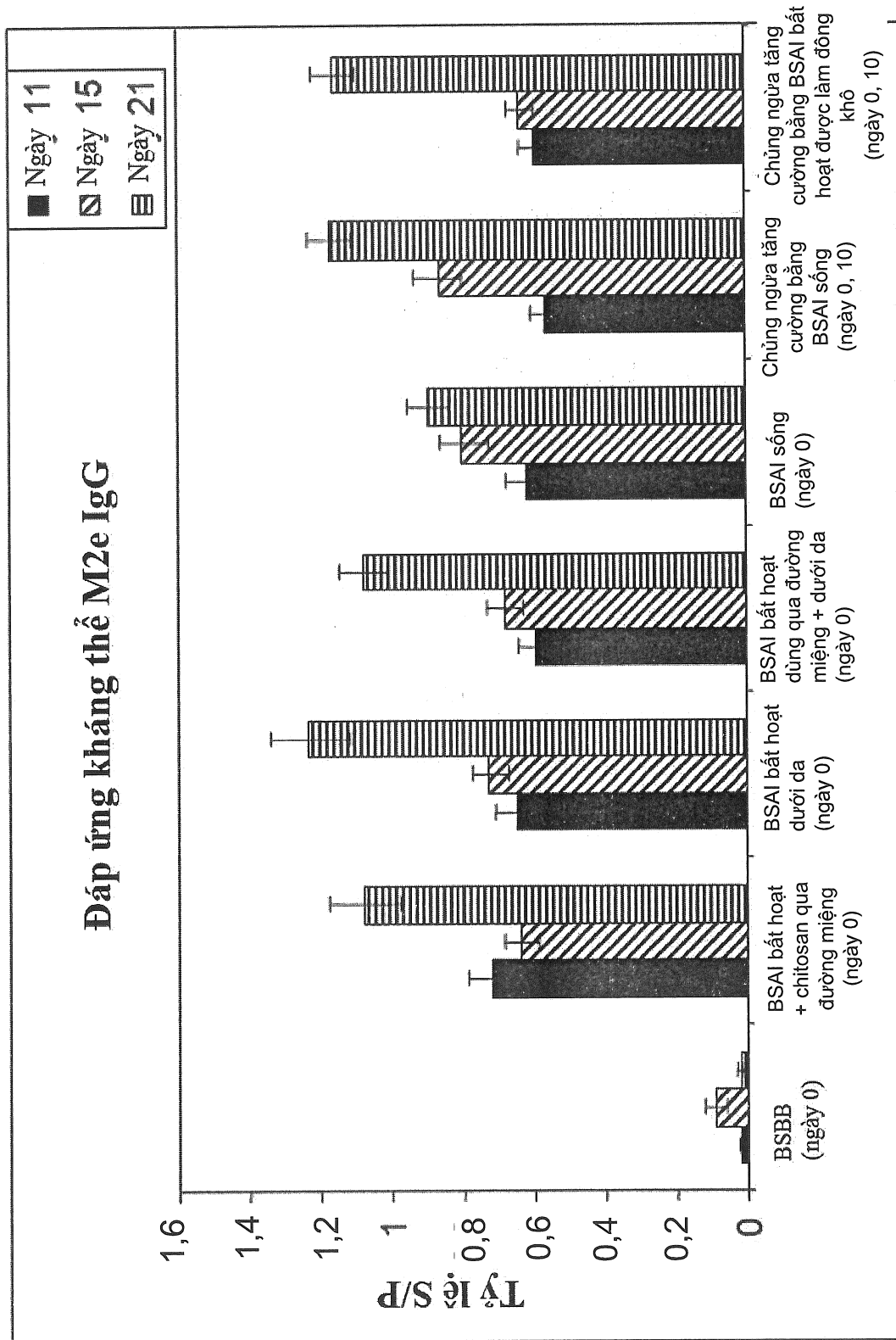


Fig. 3A

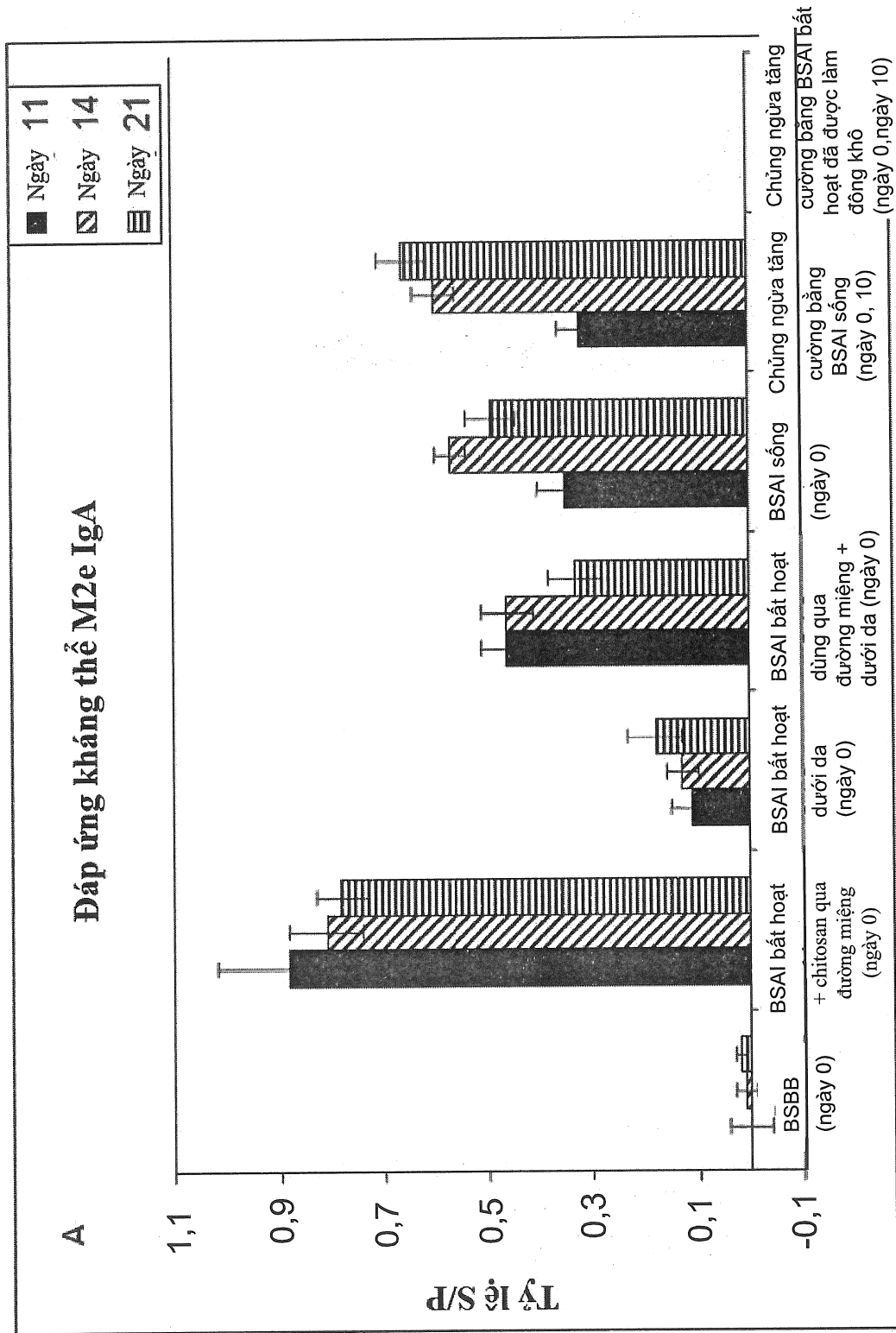


Fig. 3B

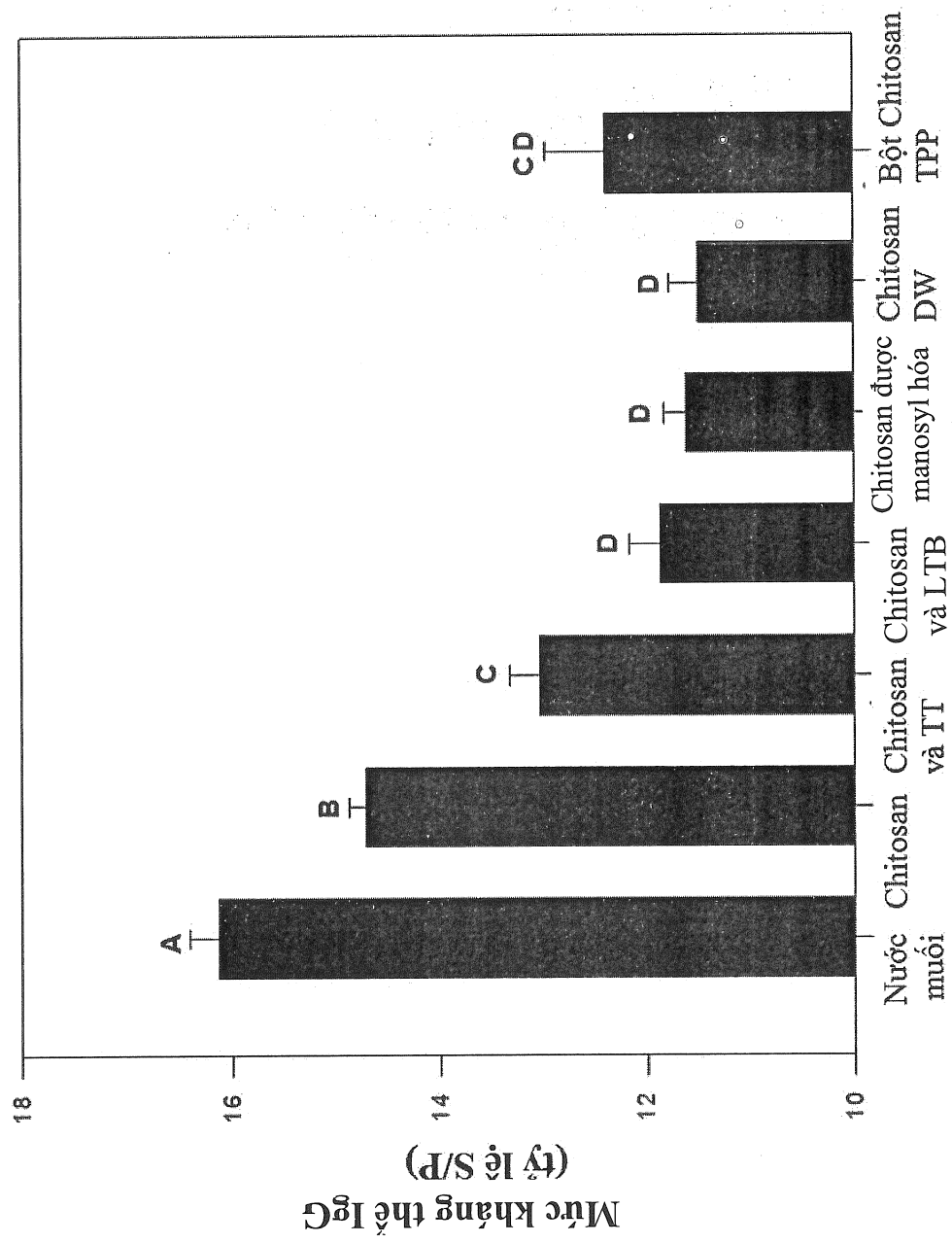


Fig. 4

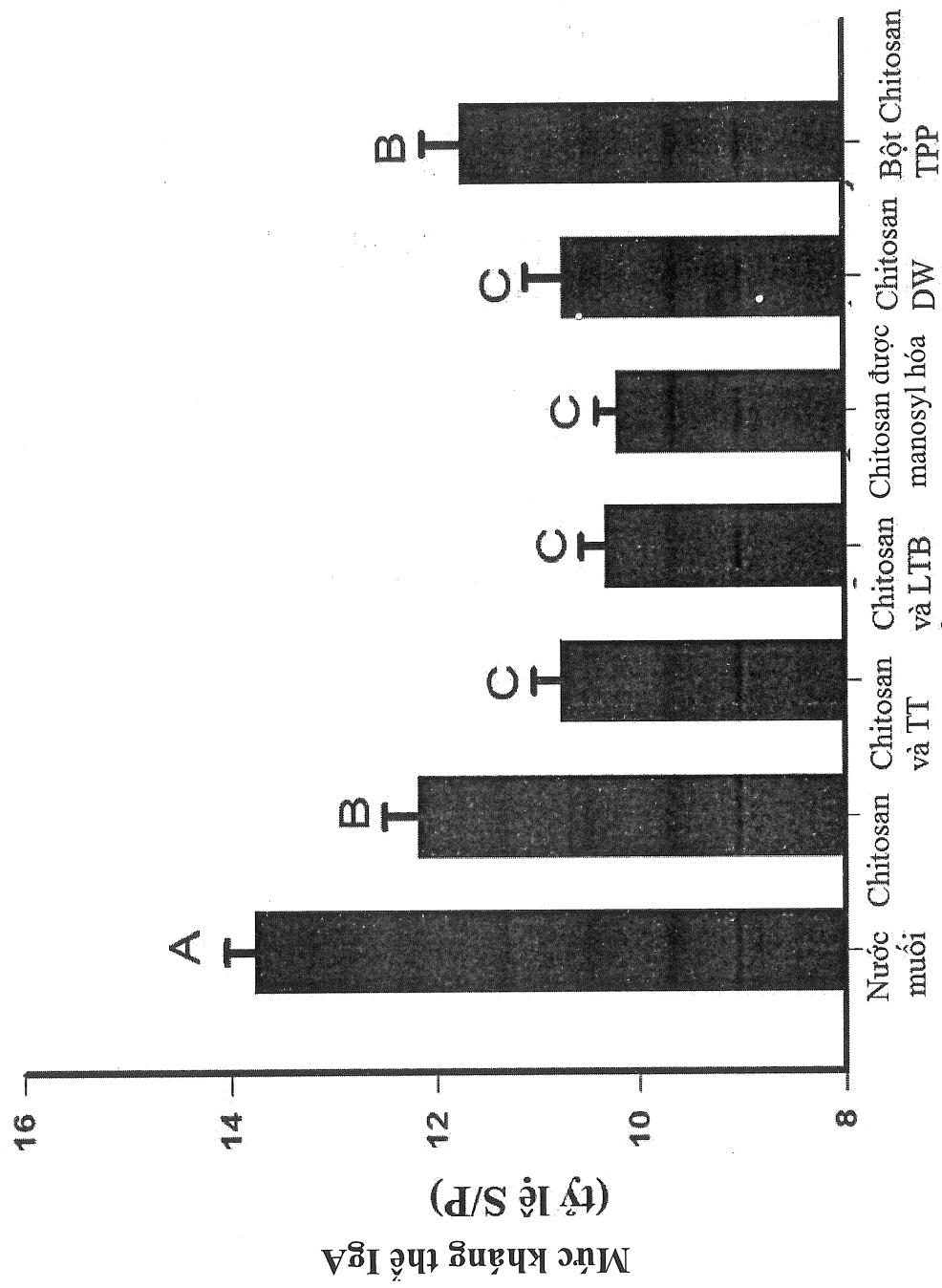


Fig. 5

**ELISA cạnh tranh đối với IgG huyết thanh
ngày 22 sau khi chủng ngừa lần một**

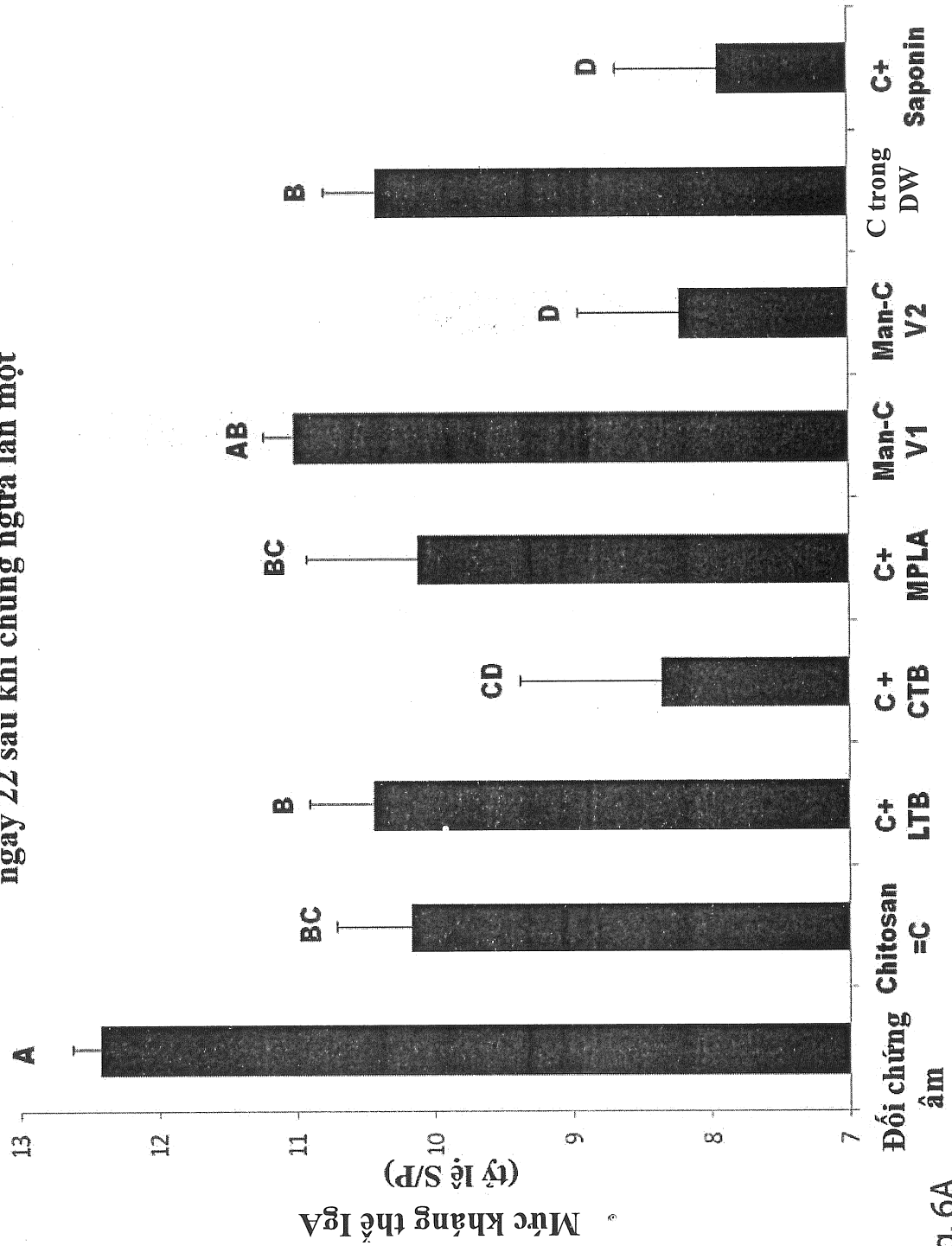


Fig. 6A

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh đối với sIgA
hồi tràng 22 ngày sau khi chủng ngừa lần 1

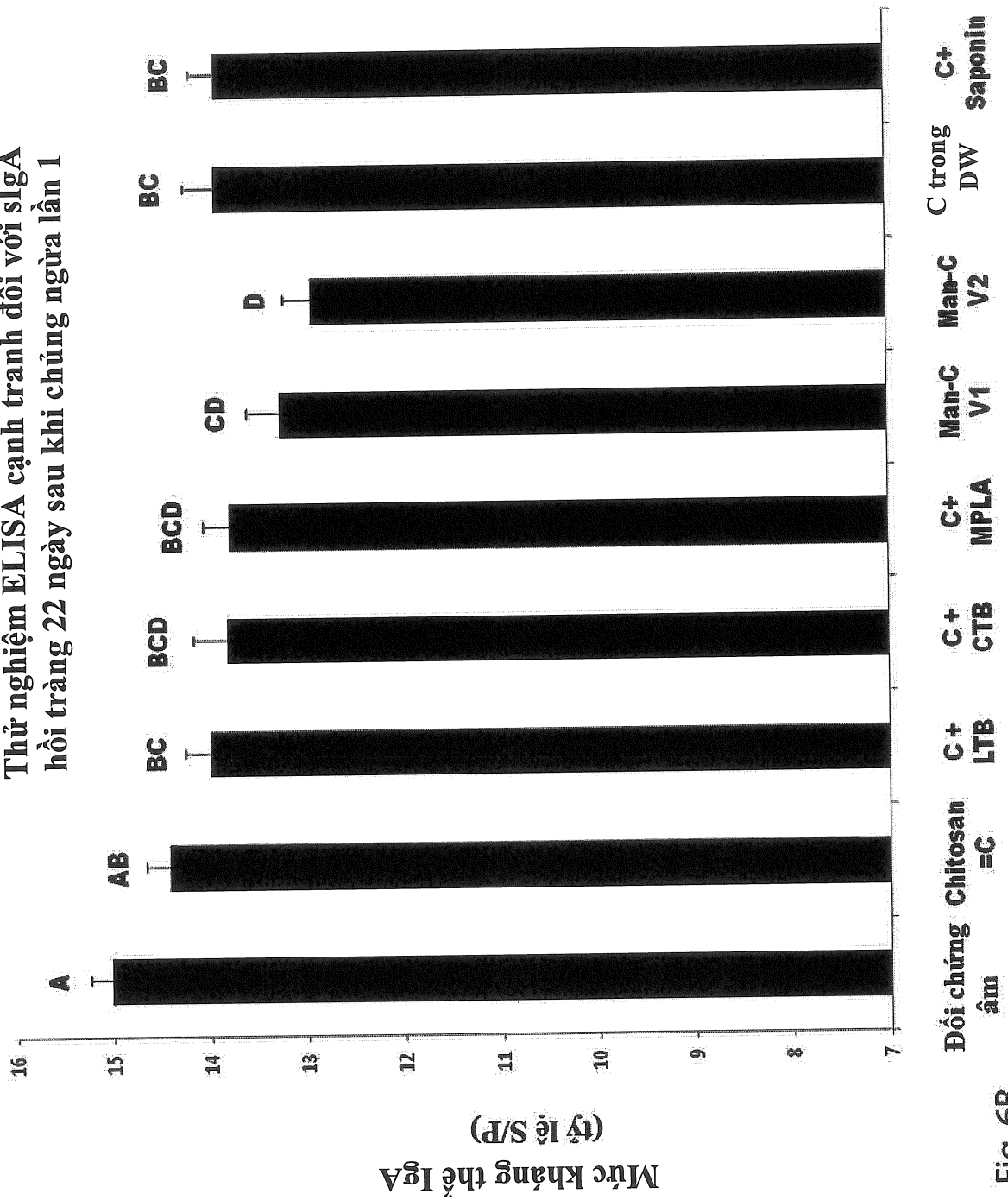


Fig. 6B

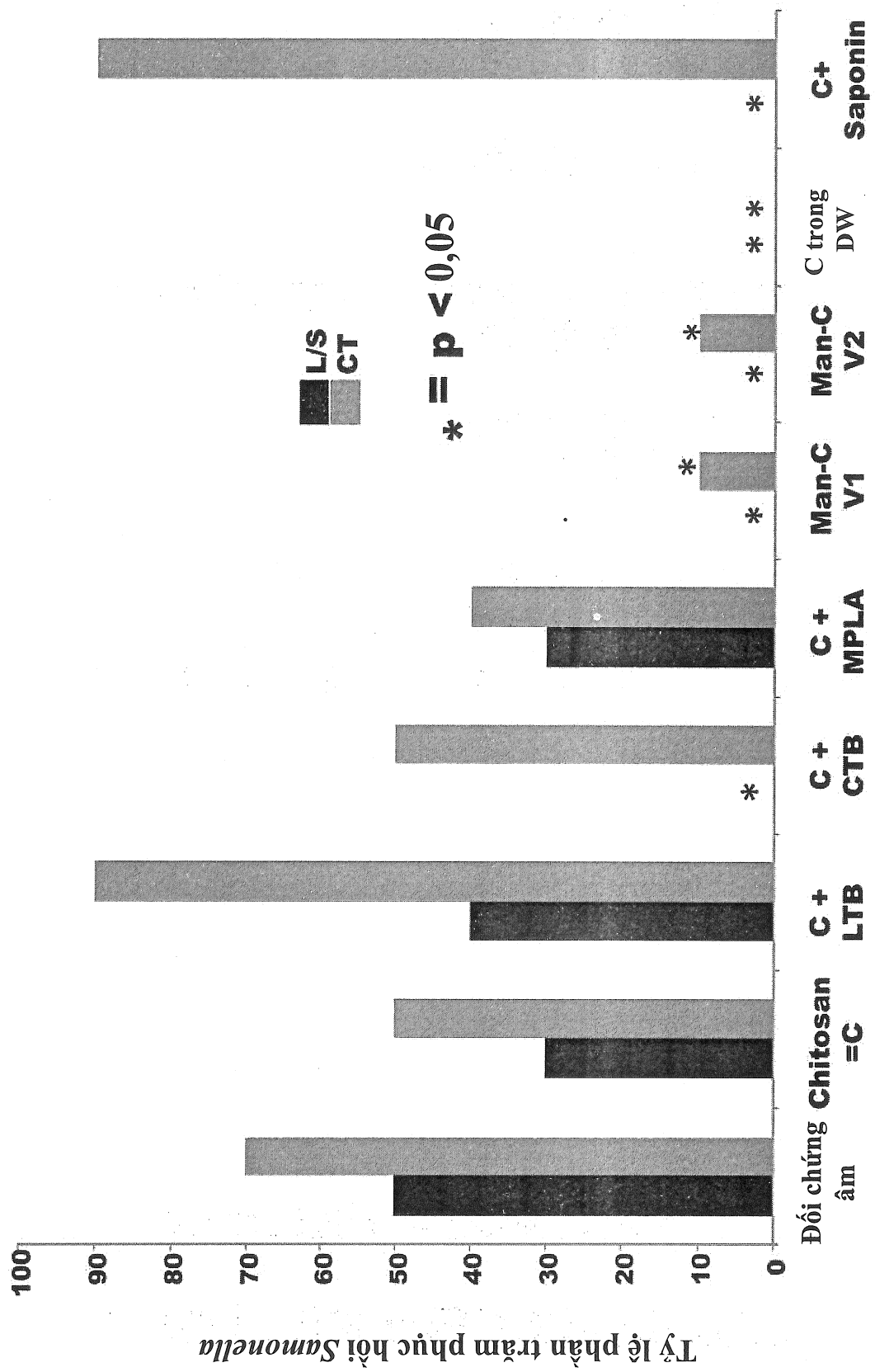


Fig. 7

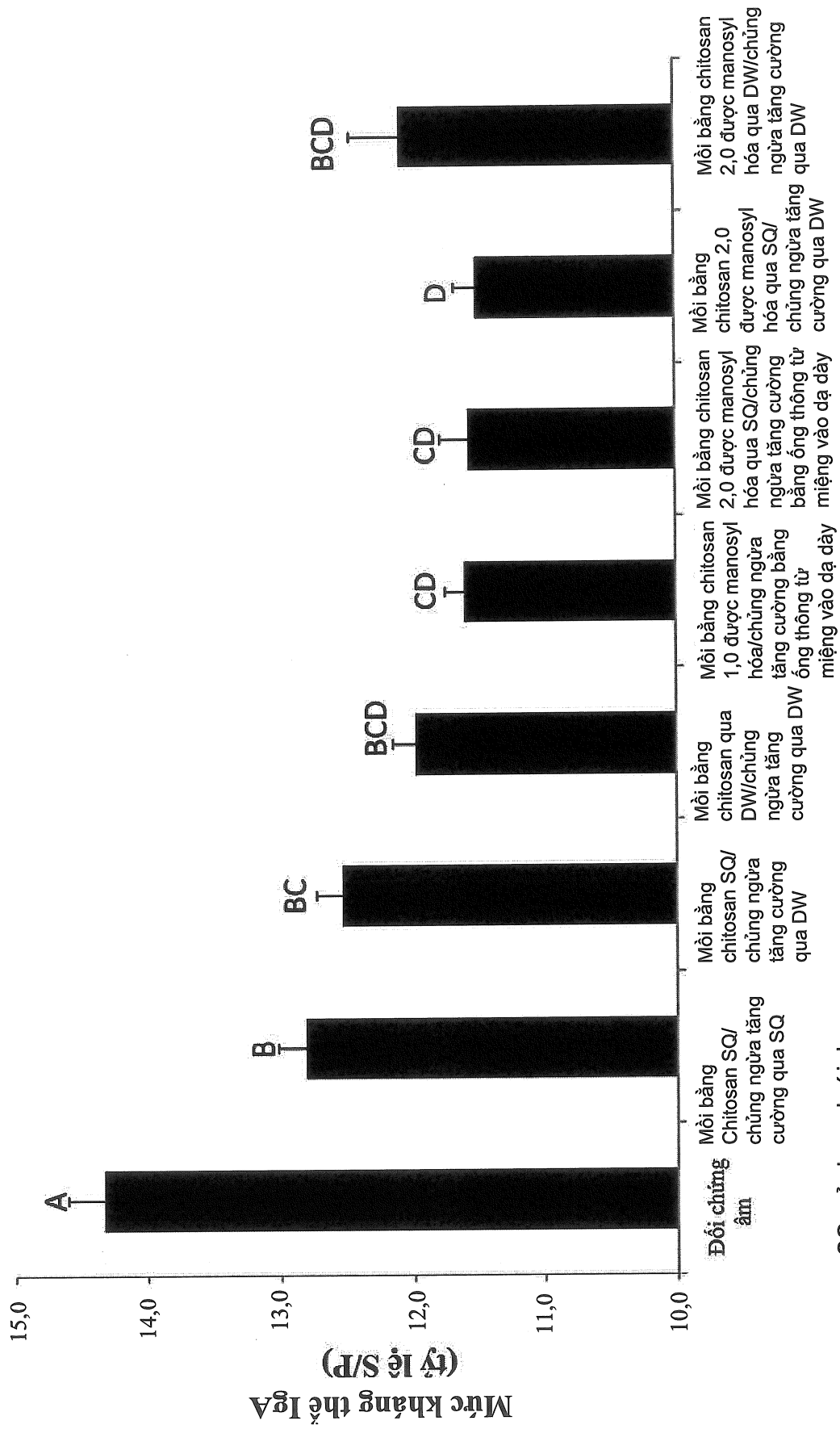


Fig. 8

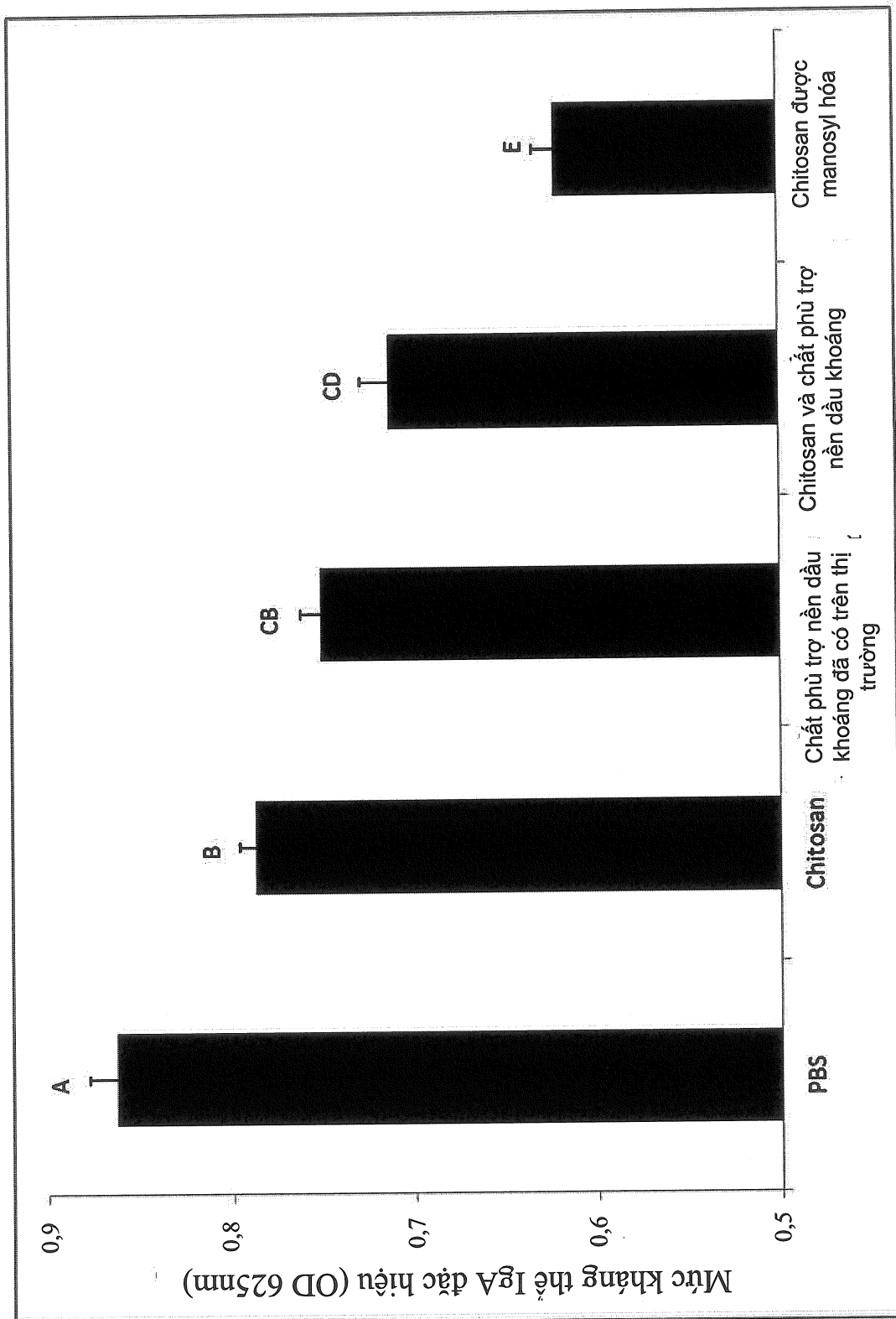


Fig. 9

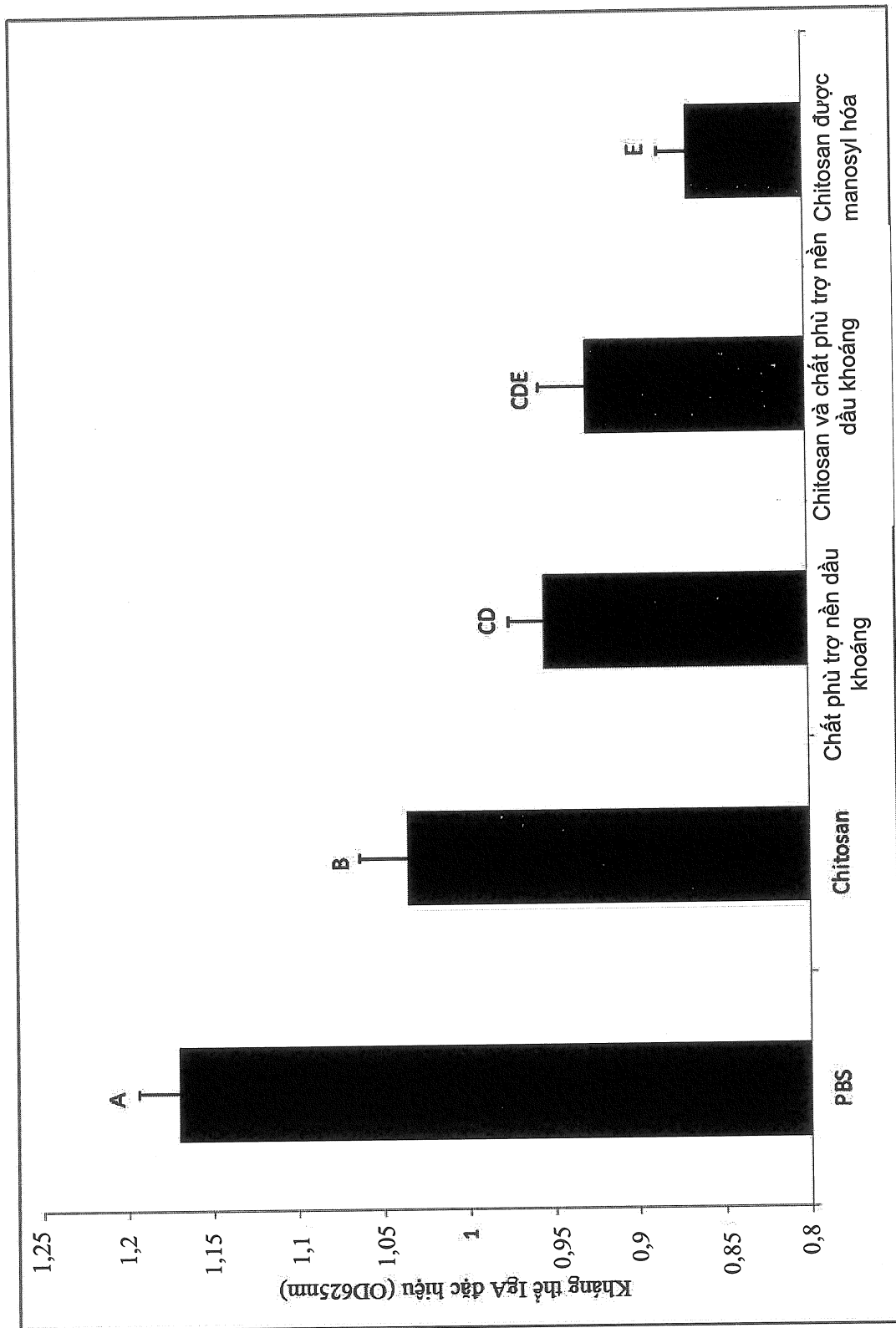


Fig. 10

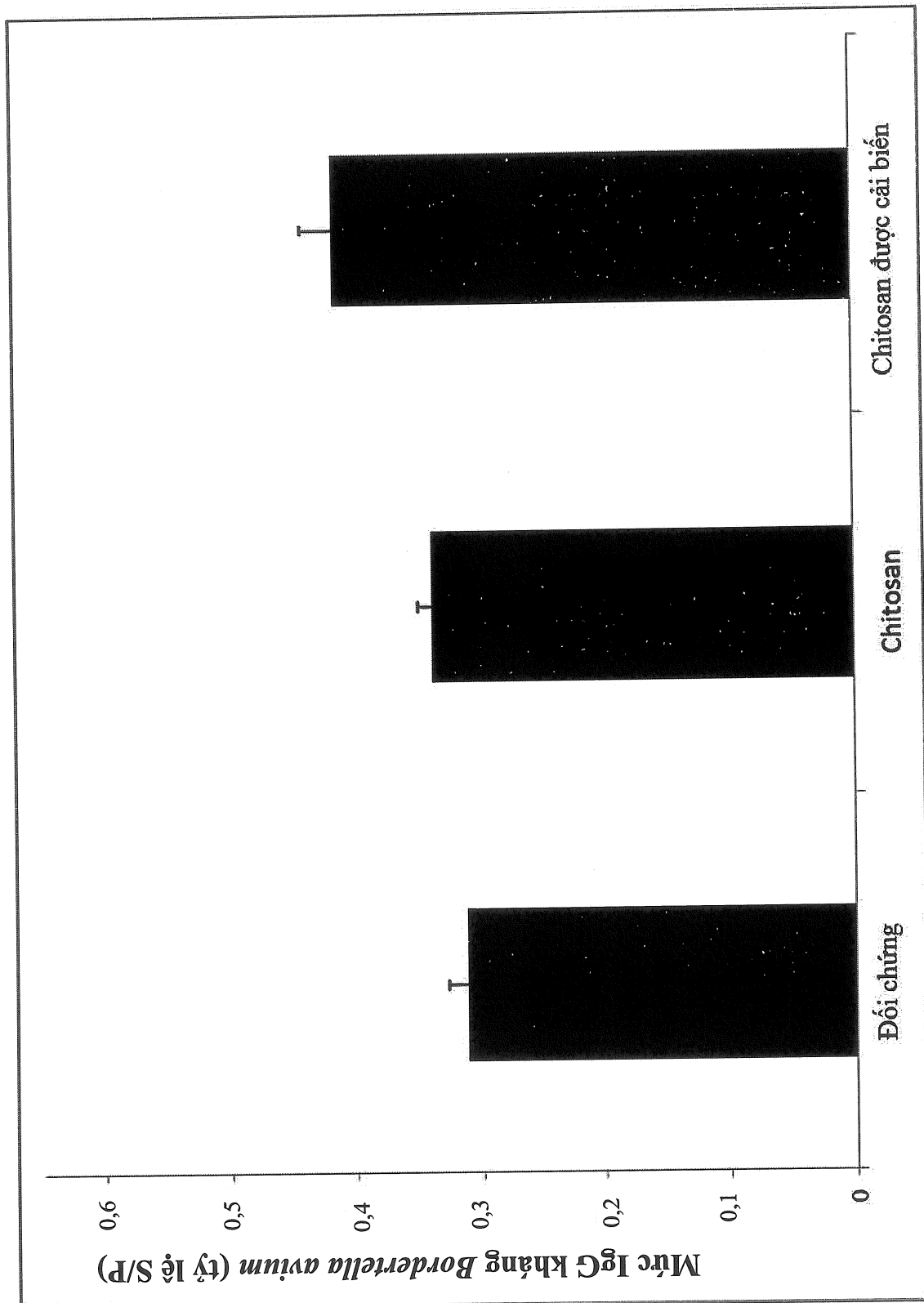


Fig. 11

