



(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)



1-0034501

(51)⁷ A61K 9/16; A61K 9/08; A61K 47/30; (13) B
A61K 47/38

(21) 1-2016-02489

(22) 20/11/2014

(86) PCT/US2014/066510 20/11/2014

(87) WO 2015/084594 11/06/2015

(30) 61/912,958 06/12/2013 US

(45) 25/01/2023 418

(43) 27/02/2017 347A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Körverstraat 35, 5831 AN, Boxmeer, the Netherlands

(72) HAREL, Moti (US); KAMBALAPALLY, Swetha (US).

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

(54) CHẾ PHẨM DỪNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG CHỨA CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chất có hoạt tính sinh học cho các loài sống dưới nước hoặc sống trên cạn bao gồm các hạt mà mỗi hạt này chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán trong giọt dầu, giọt dầu được phân tán trong chất nền bao gồm polyme tan trong ruột, trong đó mỗi hạt còn chứa polyme bám dính niêm mạc. Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất có hoạt tính sinh học cho các loài sống dưới nước hoặc sống trên cạn và phương pháp điều chế chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc dùng thuốc và vacxin qua đường miệng có một vài ưu điểm. Liều dùng có thể được dùng cho số lượng lớn động vật thông qua thức ăn hoặc nước uống với điều kiện hạn chế thấp và số lượng nhân công nhỏ. Điều kiện hạn chế cũng gây áp lực cho động vật làm giảm hiệu quả của việc dùng thuốc hoặc chủng ngừa và tăng nguy cơ mắc bệnh truyền nhiễm. Đối với động vật sản xuất thịt, việc dùng qua đường miệng có một ưu điểm khác đó là nó tránh được phản ứng tại vị trí tiêm. Việc gây kim tiêm, nhiễm khuẩn tại vị trí tiêm, hoặc sử dụng tá dược có khả năng phản ứng cao có thể tạo ra các khối áp-xe gây tổn thương thịt và da. Các phản ứng này làm giảm giá trị của động vật khi giết mổ. Đây cũng là vấn đề xuất hiện trong chương trình chủng ngừa cho cá khi cá được thu hoạch từ bể nuôi hoặc các lồng mở ở các vùng biển và được tiêm riêng rẽ. Việc chủng ngừa qua đường miệng diễn ra nhanh chóng và hiệu quả mà không phải xử lý động vật nhiều lần để chủng ngừa nhắc lại sau đó. Các phản ứng miễn dịch bất lợi sau khi dùng qua đường miệng cũng ít có khả năng xảy ra và vì thế an toàn hơn.

Việc chủng ngừa qua đường miệng là cách thức đặc biệt có hiệu quả về mặt chi phí để chủng ngừa hoặc điều trị cho số lượng lớn cá cùng lúc trong hệ thống nuôi cá, với áp lực hoặc nhân công nhỏ. Điều này đặc biệt đúng do việc sử dụng vacxin qua đường miệng có thể có hiệu quả thông qua quá trình tiêu hóa trong thời gian ăn/uống. Hơn nữa, vacxin dùng qua đường miệng có thể được sản xuất với hiệu quả về mặt chi phí cao hơn so với chế phẩm vacxin dạng tiêm do quy trình sản xuất vacxin dùng qua đường miệng cần ít bước tinh chế. Việc chủng ngừa qua đường miệng cũng có ưu điểm là ít tạo ra tác dụng phụ như áp lực hoặc các phản ứng khác so với khi tiêm.

Mặc dù việc sử dụng thuốc và đặc biệt là vacxin qua đường miệng có các ưu điểm, nhưng việc phát triển công nghệ sản xuất dạng dùng này vẫn bị trì hoãn do thiếu

hệ thống phân phối thích hợp để đưa vacxin vào cơ thể. Do không có hệ thống phân phối phù hợp nên hầu hết vacxin dùng qua đường miệng đều bị phân giải trong đường dạ dày ruột (GI), đặc biệt là trong điều kiện pH thấp của dạ dày, dẫn đến việc hấp thụ bị hạn chế, kết quả là tạo ra đáp ứng miễn dịch không đủ.

Trước đây, việc tạo miễn dịch thường dựa vào việc gây ra tính miễn dịch thể dịch thông qua việc dùng vacxin ngoài đường tiêu hóa. Tuy nhiên, kháng thể được tạo ra thông qua việc dùng ngoài đường tiêu hóa không nhất thiết phải đi đến bề mặt niêm mạc, một vị trí của hầu hết các tác nhân lây nhiễm. Khả năng miễn dịch của niêm mạc xuất hiện ở bề mặt niêm mạc bao gồm ruột, phổi, miệng, mắt, tuyến vú, và đường sinh dục, cũng như da và mang ở cá, là kết quả của việc tiếp xúc giữa kháng nguyên với mô niêm mạc, là tuyến phòng thủ đầu tiên quan trọng chống lại các tác nhân lây nhiễm.

Các chất dẫn khác nhau được phát triển để phân phối thuốc hoặc vacxin tới mô niêm mạc ở ruột. Polyme có thể phân hủy sinh học, như poly-(DL-lactit) và poly-(DL-lactit-co-glycolit), được sử dụng để sản xuất chế phẩm dùng kháng nguyên qua đường miệng. Tuy nhiên, việc sản xuất các phần tử polyme này cần sử dụng dung môi mà có thể ảnh hưởng đến các kháng nguyên dễ bị phá hủy. Hơn nữa, việc sử dụng dung môi sẽ hạn chế việc kết hợp các sinh vật sống đã làm giảm độc lực, như virus hoặc vi khuẩn, vào trong các chế phẩm này.

Các khó khăn khác gặp phải khi phát triển hệ thống phân phối qua đường miệng thích hợp bao gồm nhu cầu lựa chọn loại hợp chất và tá dược dùng trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi và có khả năng phân giải sinh học, và cần đáp ứng miễn dịch trong thời gian dài và mạnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chất có hoạt tính sinh học và phương pháp điều chế chế phẩm này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chất có hoạt tính sinh học cho các loài sống dưới nước hoặc sống trên cạn, bao gồm các hạt mà mỗi hạt này chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán trong giọt dầu, giọt dầu này được phân tán trong chất nền bao gồm polyme tan trong ruột, trong đó mỗi hạt còn chứa polyme bám dính niêm mạc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm được mô tả ở trên để phân phối chất có hoạt tính sinh học sau khi đi qua dạ dày của động vật, trong đó chế phẩm này được dùng cho động vật qua đường miệng, và trong đó chất có hoạt tính sinh học là chất tạo miễn dịch.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm được mô tả ở trên được dùng để bào chế vaccin để chủng ngừa cho các loài sống dưới nước hoặc sống trên cạn, trong đó chế phẩm này là chất dẫn dùng để phân phối vaccin và trong đó chế phẩm này được dùng cho các loài này qua đường miệng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm. Phương pháp này bao gồm các bước, theo thứ tự:

(a) tạo ra hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan;

(b) làm đồng nhất hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trong dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu;

(c) tạo ra huyền phù đặc của sản phẩm ở bước (b) trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột; và

(d1) phun, nhỏ giọt hoặc bơm huyền phù đặc ở bước (c) vào trong dung dịch nước chứa chất tạo liên kết ngang cho polyme tan trong ruột để tạo ra hạt, trong đó hỗn hợp chứa nước ở bước (a) còn chứa polyme bám dính niêm mạc, hoặc

(d2) tạo ra hạt từ huyền phù đặc ở bước (c), trong đó bước (b) còn bao gồm bước tạo ra các giọt nhũ tương trong polyme bám dính niêm mạc và tạo liên kết ngang polyme bám dính niêm mạc để tạo ra các hạt trung gian.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế sẽ có nghĩa như được hiểu thông thường và được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Đồng thời, như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "ít nhất một" và "một hoặc nhiều" có nghĩa giống nhau và bao gồm một, hai, ba hoặc nhiều hơn ba. Trừ khi có quy định khác, tỷ lệ phần trăm hoặc phần của các thành phần trong chế phẩm được tính theo trọng lượng. Thuật ngữ "được phân tán" có nghĩa là được tạo

huyền phù và/hoặc được hòa tan.

"Việc chũng ngừa qua đường miệng" được xác định là việc dùng qua đường miệng thông qua chế độ ăn chứa vật liệu tạo miễn dịch để kích thích hệ thống miễn dịch toàn thân của động vật nhằm tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với mầm bệnh.

"Liên kết ngang" và các biến thể của nó để chỉ việc liên kết của hai hay nhiều vật liệu và/hoặc chất, bao gồm các liên kết bất kỳ trong số các liên kết được nêu trong bản mô tả này, thông qua một hoặc nhiều liên kết cộng hóa trị và/hoặc không cộng hóa trị (ví dụ, ion). Liên kết ngang có thể được tạo ra một cách tự nhiên (ví dụ, liên kết disulfua của các gốc xystin) hoặc thông qua con đường tổng hợp hoặc bán tổng hợp. Việc liên kết ngang của các polyme tích điện có thể bị ảnh hưởng bởi liên kết ion với ion trái dấu đa hóa trị có điện tích trái dấu. Các cấu trúc màng chắc, rắn, ví dụ gel nước, có thể được điều chế bằng cách tạo liên kết ngang này.

"Bảo vệ trong dạ dày" để chỉ việc bảo vệ chất có hoạt tính sinh học không bị phá hủy trong dạ dày và mất hoạt tính.

Chế phẩm theo sáng chế chứa vật liệu hạt bao gồm chất có hoạt tính sinh học và polyme bám dính niêm mạc, trong đó chất có hoạt tính sinh học được phân tán trong dầu. Giọt dầu được bao trong, hoặc được bao bằng, nền bên ngoài là polyme tan trong ruột. Nền bên ngoài bao quanh giọt dầu bảo vệ các thành phần không bị tiếp xúc với điều kiện độ pH thấp trong dạ dày của động vật, do polyme vẫn không bị hòa tan ở độ pH thấp và giữ nguyên vẹn dưới dạng lớp hoặc lớp phủ bảo vệ. Hạt thường có kích thước hình học trung bình (đôi khi được gọi là đường kính) nằm trong khoảng từ 10 đến 5000 μm , và có thể trực tiếp được tạo ra với khoảng kích thước này hoặc được giảm kích thước bằng cách nghiền, xay, hoặc các cách khác. Thông thường, hạt có đường kính nhỏ hơn 100 μm , tốt hơn là nhỏ hơn 50 μm .

Theo một số phương án, polyme bám dính niêm mạc và chất có hoạt tính sinh học được trộn với nhau và tiếp xúc với nhau, liên kết với nhau trong hạt mà sẽ được phân tán trở lại trong giọt dầu. Một hoặc nhiều trong số các hạt này có mặt trong giọt dầu đơn lẻ, và một hoặc nhiều giọt dầu có mặt trong nền bên ngoài. Polyme bám dính niêm mạc và/hoặc polyme tan trong ruột có thể được tạo liên kết ngang hoặc không.

Theo các phương án khác, chất có hoạt tính sinh học được phân tán như trên trong giọt dầu, và sau đó chúng được bao trong polyme bám dính niêm mạc. Các hạt

tạo thành sau đó được bao trở lại trong nền bên ngoài của polyme tan trong ruột. Polyme bám dính niêm mạc và/hoặc polyme tan trong ruột có thể được tạo liên kết ngang hoặc không.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng qua đường miệng chứa vaccin để kích thích đáp ứng miễn dịch ở các loài sống dưới nước và sống trên cạn đối với bệnh cụ thể. Chế phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng nguyên làm chất có hoạt tính sinh học. Chế phẩm theo sáng chế được thiết kế để khiến cho vật liệu có hoạt tính sinh học tiếp xúc được với niêm mạc ruột của động vật để kích thích sự hấp thu và tính miễn dịch niêm mạc. Chế phẩm theo sáng chế được dùng qua đường miệng, thông thường với thức ăn hoặc chất mang được dụng, bao gồm, ví dụ, nước (ví dụ, nước uống cho động vật), viên nén, viên nang, viên dạng liều, viên thức ăn hoặc là chất phụ gia thức ăn để đưa chế phẩm tới ruột của loài mục tiêu.

Chế phẩm theo sáng chế có một vài ưu điểm trong việc phân phối chất có hoạt tính sinh học cho đối tượng. Thứ nhất, phương pháp tạo ra hệ thống phân phối không cần sử dụng dung môi hữu cơ hoặc nhiệt độ cao và độ pH thường được yêu cầu để điều chế hạt bằng các phương pháp khác. Bằng cách duy trì môi trường nước ở điều kiện pH nhẹ và nhiệt độ thấp trong suốt quá trình điều chế chế phẩm theo sáng chế, các chất có hoạt tính sinh học nhạy như vi khuẩn hoặc virus sống bị làm giảm độc lực có thể được phân phối qua đường miệng. Thứ hai, lớp polyme tan trong ruột bổ sung bảo vệ chất có hoạt tính sinh học chống lại sự phân giải trong đường dạ dày ruột. Trong trường hợp chất tạo miễn dịch, lớp polyme này cho phép kích thích đáp ứng miễn dịch tương tự với lượng kháng nguyên/vaccin nhỏ hơn. Thứ ba, thể phân tán dầu bao quanh chất có hoạt tính sinh học, ngăn chặn phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học như protein, peptit và dược chất không bị rò rỉ vào môi trường nước trong quá trình điều chế, cũng như trong quá trình tiếp xúc với môi trường trong dạ dày. Hơn nữa, chính polyme bám dính niêm mạc cũng tạo ra hiệu quả cho tá dược. Cuối cùng, hệ thống phân phối có thể dễ dàng được bào chế để phân phối hiệu quả cho cả các loài sống dưới nước và sống trên cạn.

Thông thường, tất cả các thành phần được sử dụng trong quá trình điều chế chế phẩm theo sáng chế là loại dùng trong thực phẩm, không độc và có thể phân giải sinh học, và thường có trong tự nhiên. Phần mô tả về vật liệu có thể sử dụng để điều chế chế phẩm được trình bày dưới đây.

Chất có hoạt tính sinh học

Chất có hoạt tính sinh học có thể là nguyên liệu có trong tự nhiên, tổng hợp, hoặc bán tổng hợp (ví dụ, hợp chất, sản phẩm lên men, chiết phẩm, cấu trúc tế bào) có khả năng gây ra, theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp, một hoặc nhiều tác dụng vật lý, hóa học, và/hoặc sinh học. Chất có hoạt tính sinh học có thể có khả năng ngăn chặn, giảm bớt, điều trị, và/hoặc chữa trị tình trạng bất thường và/hoặc bệnh lý của cơ thể sống, như bằng cách tiêu diệt sinh vật ký sinh, hoặc bằng cách hạn chế ảnh hưởng của bệnh hoặc sự không bình thường. Phụ thuộc vào hiệu quả và/hoặc ứng dụng của nó, chất có hoạt tính sinh học có thể là dược chất (như chất phòng bệnh hoặc chất trị bệnh), chất chẩn đoán, và/hoặc chất làm đẹp, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vaccin, dược chất, tiền dược chất, phân tử ái lực, phân tử hữu cơ tổng hợp, hormon, kháng thể, polyme, enzym, hợp chất chứa protein phân tử trọng lượng thấp, peptit, vitamin, steroid, chất tương tự steroid, lipid, axit nucleic, hydrat cacbon, tiền chất của chúng, và dẫn xuất của chúng. Chất có hoạt tính sinh học cũng có thể là chất bổ sung dinh dưỡng. Các chất bổ sung dinh dưỡng không giới hạn bao gồm protein, hydrat cacbon, vitamin tan chứa nước (ví dụ, vitamin C, vitamin nhóm B, và các chất tương tự), vitamin tan trong chất béo (ví dụ, các vitamin A, D, E, K, và các vitamin tương tự), khoáng chất, và chiết phẩm thảo mộc. Chất có hoạt tính sinh học có thể có bán trên thị trường và/hoặc được điều chế bằng các kỹ thuật đã biết.

Chất có hoạt tính sinh học theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vaccin (vaccin cũng có thể được phân phối như là một phần của phức hợp kích thích miễn dịch, thể liên hợp của kháng nguyên với độc tố tả và tiểu phần B của nó, lectin và tá dược), kháng sinh, phân tử ái lực, phân tử hữu cơ tổng hợp, polyme, hợp chất chứa protein trọng lượng phân tử thấp, peptit, vitamin, steroid, chất tương tự steroid, lipid, axit nucleic, hydrat cacbon, tiền chất của chúng, và dẫn xuất của chúng. Chất có hoạt tính sinh học cũng có thể là chất diệt loài gây hại, ví dụ chất diệt loài gặm nhấm.

Chất có hoạt tính sinh học có thể là chất tạo miễn dịch, tức là, vật liệu có thể gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở động vật. Ví dụ về chất tạo miễn dịch bao gồm kháng nguyên và vaccin. Ví dụ, chất tạo miễn dịch có thể bao gồm peptit, protein hoặc protein tái tổ hợp tạo miễn dịch, bao gồm hỗn hợp chứa peptit và/hoặc protein và vi khuẩn (ví dụ, bacterin) tạo miễn dịch; hạt virus bị bất hoạt hoàn toàn, bị làm giảm độc lực, và lây nhiễm; sinh vật nhân sơ bị tiêu diệt hoàn toàn, bị làm giảm độc lực, và lây

nhễm; động vật nguyên sinh bị tiêu diệt hoàn toàn, bị làm giảm độc lực, và lây nhiễm bao gồm giai đoạn bất kỳ trong chu kỳ sống của chúng, và nguồn gây bệnh đa bào bị tiêu diệt hoàn toàn, bị làm giảm độc lực, và lây nhiễm, vaccin cấu trúc siêu phân tử tái tổ hợp, và vectơ tái tổ hợp để phân phối và biểu hiện gen mã hóa protein tạo miễn dịch (ví dụ, vaccin ADN).

Một hoặc nhiều chất có hoạt tính sinh học thông thường cấu thành ít nhất là 0,1% trọng lượng của hạt, ngoại trừ nước, hoặc ít nhất là 1%, hoặc ít nhất là 5%. Thông thường, chúng cấu thành nhiều nhất là 40%, hoặc nhiều nhất là 20%, hoặc nhiều nhất là 10%.

Polyme bám dính niêm mạc

Polyme bám dính niêm mạc là polyme liên kết đặc hiệu với mô niêm mạc, và giúp giữ lại chất có hoạt tính sinh học khi gần niêm mạc, nhờ đó cải thiện việc sử dụng. Các ví dụ thích hợp bao gồm polyme tổng hợp như poly(axit acrylic), hydroxypropyl methylxenluloza và poly(metyl acrylat), polyme được bổ sung nhóm chức carboxylic, polyme được bổ sung nhóm chức sulfat, polyme được bổ sung nhóm chức amin, và dẫn xuất hoặc dạng cải biến của chúng, cũng như polyme có trong tự nhiên như caragenan, axit hyaluronic, chitosan, guar cation và alginat. Các dạng được tạo dẫn xuất hoặc được cải biến của polyme có trong tự nhiên cũng có thể được sử dụng, và nhiều polyme này đã biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ không giới hạn bao gồm propylen glycol alginat và pectin, carboxymetyl chitosan, carboxymethylchitin, metyl glycol chitosan, trimetyl chitosan và chất tương tự.

Polyme bám dính niêm mạc được ưu tiên là chitosan và chitosan cải biến hoặc được tạo dẫn xuất, mà có thể thu được thông qua việc khử axetyl chitin, hợp chất chính của bộ xương ngoài ở giáp xác. Chitosan [α -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-6-D-glucan], mucopolysacarit có liên quan mật thiết với xenluloza, biểu hiện đặc tính hóa học có thể được xác định bằng trọng lượng phân tử, mức độ khử axetyl, và độ nhớt. Chitosan có thể tạo ra vi hạt và hạt nano mà có thể liên kết với lượng lớn kháng nguyên bằng phản ứng hóa học với các chất tạo liên kết ngang như ion phosphat, ion glutaraldehyt hoặc ion sulfat.

Mặc dù chitosan được sử dụng trong một số phương án ưu tiên, nhưng các polyme khác có thể được sử dụng để đạt được chức năng bám dính niêm mạc tương

tự. Các polyme này bao gồm nhưng không giới hạn ở gelatin, alginat, dextran, axit hyaluronic, thạch, và tinh bột ổn định.

Một hoặc nhiều polyme bám dính niêm mạc thường chiếm ít nhất là 1% trọng lượng của hạt, ngoại trừ nước, hoặc ít nhất là 10%, hoặc ít nhất là 15%. Thông thường, chúng chiếm nhiều nhất là 50%, hoặc nhiều nhất là 30%, hoặc nhiều nhất là 20%.

Dầu

Trong các sản phẩm truyền thống điển hình, lượng đáng kể chất có hoạt tính sinh học bị thất thoát vào môi trường nước do rò rỉ hạt trong quá trình điều chế nó và trong khi di chuyển qua dạ dày, đặc biệt là chất có hoạt tính sinh học có kích thước phân tử nhỏ như virus, protein, dược chất, kháng sinh, chất diệt loài gây hại và các dạng tương tự. Theo sáng chế, việc rò rỉ chất có hoạt tính sinh học khỏi hạt phần lớn được loại bỏ bởi các hạt rời rạc, các vùng hoặc các pha chứa chất được phân tán trong, hoặc được bao bằng, dầu. Loại dầu bất kỳ, bao gồm dầu và mỡ thực vật, động vật hoặc tổng hợp ở dạng lỏng hoặc rắn, hoặc sáp, có thể được sử dụng để bao chất có hoạt tính sinh học. Dầu có nguồn gốc thực vật được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dầu thầu dầu, dầu dừa, bơ ca cao, dầu ngô, dầu hạt bông, dầu oliu, squalan ô liu, dầu cọ, dầu lạc, dầu hạt nho, dầu cây rum, dầu mè, dầu đậu nành, dầu hướng dương, stearat, sáp carnauba và hỗn hợp của chúng. Dầu có nguồn gốc động vật được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dầu cá, squalan cá mập, chất béo của sữa, sáp ong, lanolin, mỡ lợn và chất tương tự. Trong một số trường hợp dầu phân tán là hỗn hợp của ô liu hoặc squalan cá mập với loại dầu, mỡ hoặc sáp bất kỳ. Thông thường, khối lượng của dầu lớn hơn khối lượng kết hợp của chất có hoạt tính sinh học và polyme bám dính niêm mạc.

Trong quy trình thông thường, dung dịch nước chứa chất có hoạt tính sinh học và polyme bám dính niêm mạc được làm đồng nhất với dầu ở tỷ lệ theo trọng lượng là một phần dung dịch trên 1,1-5 phần dầu cho đến khi tạo ra nhũ tương đồng nhất. Để hỗ trợ việc tạo thành nhũ làm đồng nhất và ổn định, chất hoạt động bề mặt không ion có thể được bổ sung. Chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp, nhưng không giới hạn ở, bao gồm rượu béo được etoxyl hóa, chất hoạt động bề mặt polyoxyetylen và este carboxylic, v.v. Khi nhũ tương ổn định được tạo ra, thì các giọt nước được phân tán trong dầu được hóa rắn bởi phản ứng hóa học hoặc vật lý của polyme bám dính

niêm mạc. Ví dụ, gelatin và polyme thạch được hóa rắn bằng cách giảm nhiệt độ hoặc thay đổi độ pH của nhũ tương; trong khi chitosan được hóa rắn bằng cách nâng độ pH của nhũ tương lên trên 6,5 và/hoặc bằng cách bổ sung ion trái dấu như natri tripolyphosphat (TPP).

Một hoặc nhiều dầu thường cấu thành ít nhất là 1,5% trọng lượng của hạt, ngoại trừ nước, hoặc ít nhất là 10%, hoặc ít nhất là 20%. Thông thường, chúng cấu thành nhiều nhất là 40%, hoặc nhiều nhất là 30%, hoặc nhiều nhất là 25%.

Polyme tan trong ruột

Các giọt thể phân tán dầu, chứa hoặc được bao bằng polyme bám dính niêm mạc, được phân tán trong chất nền polyme tan trong ruột tạo ra sự bảo vệ trong dạ dày và giải phóng nguyên vẹn sau khi đi qua dạ dày hoặc phân phối chất có hoạt tính sinh học, tức là, giải phóng trong ruột.

Polyme tan trong ruột được lấy làm ví dụ bao gồm polyme tan trong nước ở độ pH đủ cao, nhưng không tan ở độ pH thấp. Thông thường, chúng tan ở độ pH lớn hơn 5,0, và không tan ở độ pH nhỏ hơn 4,0. Polyme thích hợp về cơ bản tan hoặc có thể được tiêu hóa trong điều kiện pH tương đối nhẹ của ruột động vật, nơi vật liệu có hoạt tính sinh học được giải phóng, nhưng không tan và không được tiêu hóa trong dạ dày, nơi nền bên ngoài của polyme tan trong ruột bảo vệ chất có hoạt tính sinh học nhạy khỏi sự hư hại. Trong một số trường hợp, polyme tan trong ruột được tạo liên kết ngang, ví dụ với cation hóa trị hai, để ngăn chặn sự hòa tan hoặc tiêu hóa trong dạ dày.

Polyme tan trong ruột thích hợp có thể được chọn từ phạm vi rộng polyme ưa nước bao gồm, ví dụ, axit polyacrylic, poly(met)acrylat, carboxymetyl xenluloza, methyl xenluloza, xenluloza axetat phtalat và gồm polysacarit tự nhiên hoặc tổng hợp tan trong nước. Một polyme tan trong ruột tổng hợp được lấy làm ví dụ là EUDRAGIT® FS30D (Evonik Industries). Natri alginat và pectin là gồm tan trong nước được ưu tiên, do điều kiện liên kết ngang nhẹ của chúng.

Alginat tạo ra nền mang ưa nước được ưu tiên đối với chất có hoạt tính sinh học nhạy trong dạ dày, cụ thể là dễ dàng sử dụng chúng để tạo ra chế phẩm gel rắn. Dung dịch alginat tạo ra gel rắn khi được kết hợp hoặc được trộn với cation hóa trị hai. Tuy nhiên, theo một số phương án, alginat không được tạo liên kết ngang, nhưng không được tiêu hóa và không tan trong môi trường dạ dày và vì thế bảo vệ được các thành

phần của hạt dưới điều kiện độ pH thấp của dạ dày động vật.

Alginate chứa các tỷ lệ khác nhau của axit β -D-mannuronic được liên kết 1,4 (M), axit L-guluronic (G), và khối biến đổi (MG). Độ nhớt của dung dịch alginate hầu hết được xác định bằng tỷ lệ phân tử của khối M/G. Alginate có độ nhớt thấp thường chứa tối thiểu là 50% đơn vị manuronat và độ nhớt của chúng nằm trong khoảng từ 20-200 mPa. Alginate có độ nhớt trung bình và cao chứa tối thiểu là 50% đơn vị axit guluronic và độ nhớt của chúng thường lớn hơn >200 mPas.

Theo một số phương án, polyme tạo nền là alginate, pectin hoặc hỗn hợp của chúng. Loại alginate có độ nhớt và pectin metoxy thấp được ưu tiên. Pectin metoxy thấp điển hình có mức độ metyl hóa dưới 50%, và chúng thường được tạo liên kết ngang với cation hóa trị hai như Ba, Ca, Mg, Sr hoặc Zn.

Một hoặc nhiều polyme tan trong ruột thường cấu thành ít nhất là 10% trọng lượng của hạt, ngoại trừ nước, hoặc ít nhất là 20%, hoặc ít nhất là 30%. Thông thường, chúng cấu thành nhiều nhất là 70%, hoặc nhiều nhất là 50%, hoặc nhiều nhất là 40%.

Các thành phần tùy ý

Theo một số phương án, chế phẩm tùy ý bao gồm các chất dinh dưỡng, dược thực phẩm, chất dẫn dụ dùng cho thức ăn chăn nuôi và/hoặc hợp chất che giấu vị, ngoài các chất có hoạt tính sinh học chính. Chất tăng thấm hoặc tá dược cũng có thể được bao gồm, để gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ và cải thiện kháng nguyên được hấp thụ bởi lympho bào niêm mạc. Một tá dược được lấy làm ví dụ là beta glucan.

Điều chế chế phẩm

Phương pháp tạo hạt thứ nhất như sau. Hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán và polyme bám dính niêm mạc được làm đồng nhất với dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu. Thông thường, tỷ lệ 1 phần hỗn hợp chứa nước trên 1,1-5 phần dầu theo trọng lượng được sử dụng trong sản xuất nhũ tương. Sau đó, nhũ tương được tạo huyền phù đặc trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột, và huyền phù đặc được phun, được nhỏ giọt hoặc được bơm vào trong dung dịch nước chứa chất tạo liên kết ngang cho polyme tan trong ruột, nhờ đó tạo ra hạt.

Trong phương pháp tổng quát thứ hai, hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt

tính sinh học được phân tán được làm đồng nhất với dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu. Thông thường, tỷ lệ của 1 phần hỗn hợp chứa nước trên 1,1-5 phần dầu theo trọng lượng được sử dụng để tạo ra nhũ tương. Sau đó, các giọt nhũ tương được phân tán trong polyme bám dính niêm mạc chứa nước, được tạo liên kết ngang để tạo ra các hạt trung gian có thể tùy ý được tách ra khỏi dung dịch liên kết ngang. Sau đó, các hạt trung gian được phân lập hoặc không được phân lập được tạo huyền phù đặc trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột. Hạt được tạo ra bằng cách sấy phun, hoặc bằng cách đông khô và nghiền.

Theo một phương pháp cụ thể để sản xuất chế phẩm, dầu chứa các hạt được phân tán của chất có hoạt tính sinh học được liên kết với polyme bám dính niêm mạc được tạo huyền phù đặc trong dung dịch natri alginat loại có độ nhớt thấp 5-15%, tùy ý bao gồm 1-3% pectin metoxy thấp, và huyền phù đặc được bơm, được nhỏ giọt hoặc được phun mù vào trong dung dịch nước của cation hóa trị hai như canxi clorua. Kích thước của hạt nền tạo thành có thể được điều chỉnh bằng tốc độ và phương pháp phân phối thể phân tán alginat trong dung dịch canxi clorua. Theo một phương án khác, huyền phù đặc được làm khô mà không cần tạo liên kết ngang alginat, bằng cách sử dụng phương pháp làm khô bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ sấy phun hoặc làm khô trong chân không. Thông thường, hạt thu được có kích thước nằm trong khoảng từ 20 μm đến khoảng 8 milimet, tốt hơn là từ khoảng 50 μm đến khoảng 1000 μm .

Theo một phương án cụ thể khác, 0,5-2% nguồn cation hóa trị hai không tan như CaCO_3 được bổ sung vào huyền phù đặc của giọt dầu chứa chất có hoạt tính sinh học trong dung dịch natri alginat, sau đó bổ sung 0,5-1% axit hữu cơ yếu như glucono-delta-lacton (GDL) làm chất axit hóa để giải phóng chậm cation, như ion canxi. Các cation liên kết ngang alginat để tạo ra gel bánh rắn, có thể được cắt hoặc nghiền nhỏ thành khúc hoặc hạt nhỏ. Thông thường, các khúc hoặc hạt thu được có kích thước nằm trong khoảng từ 50 μm đến khoảng 10 milimet, tốt hơn nữa là từ khoảng 100 μm đến khoảng 5000 μm . Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết được rằng các polyme tự nhiên hoặc tổng hợp, tốt hơn là polyme anion, có thể được sử dụng bằng cách sử dụng ái lực trên cơ sở tương tác ion, tạo ra nền tảng của chế phẩm theo sáng chế.

Sử dụng chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bảo quản trong thể huyền phù trong nước hoặc được làm khô bằng phương pháp làm khô đã biết bất kỳ trong lĩnh vực này, và được bảo quản ở trạng thái khử hydrat trong thời gian dài mà không bị mất hoạt tính đáng kể.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng như một thành phần của nước uống, làm chất phụ gia thực phẩm, hoặc là một phần của chế phẩm vaccin chứa chất mang được dụng hoặc tá được tùy ý. Theo cách khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được chứa trong dạng liều dùng qua đường miệng tiêu chuẩn khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá được rằng có nhiều loại thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, dược thực phẩm hoặc dạng liều dụng và chất mang được dụng đã biết trong lĩnh vực, thích hợp để phân phối chế phẩm cho động vật mục tiêu.

Việc dùng chế phẩm theo sáng chế có thể bị ảnh hưởng do cách dùng một liều hoặc nhiều liều. Theo một phương án, chế phẩm tạo miễn dịch được dùng theo quy trình nhiều liều được dùng trong khoảng thời gian khoảng 3 ngày đến khoảng 10 ngày hoặc dài hơn, và có thể được lặp lại định kỳ khi loài mục tiêu có bằng chứng mất tính miễn dịch.

Để sử dụng trong nước uống dùng cho lợn, gia cầm, gia súc hoặc động vật thủy sản, dầu hoặc hạt polypropylen hoặc polyeste trơ bổ sung có thể được kết hợp vào trong chế phẩm để tăng độ nổi (tức là, giảm tỷ trọng) sao cho thiết bị cung cấp nước để phân phối trong bể nuôi cá có thể được sử dụng để phân phối chế phẩm theo sáng chế.

Vì thế, chế phẩm có thể được dùng cho động vật như là một thành phần trong thức ăn hàng ngày của chúng hoặc là một thành phần trong nước uống của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1a: Điều chế chế phẩm theo sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế được điều chế như sau. Ba gam polyme bám dính niêm mạc (Chitosan, FMC Biopolymer Inc.) được hòa tan trong 100ml dung dịch axit axetic băng 0,5N ở nhiệt độ 50°C. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 5,8 bằng natri hydroxit và dung dịch được phép làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng. Tween 80 (0,2%, Sigma, St Louis, MO) và chất chống tạo bọt (0,5%, Sigma, St Louis, MO)

được bổ sung và dung dịch chitosan được giữ ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng. 30ml dung dịch chứa 300 mg albumin trứng ("OVA", một loại vacxin) được bổ sung vào dung dịch chitosan để tạo ra hỗn hợp. Dung dịch tạo thành được bổ sung vào 195g dầu oliu chứa 5% Span-80 (Sigma) và được làm đồng nhất ở 10.000 vòng/phút trong 30 phút trong bể nước đá để tạo ra nhũ tương nước trong dầu. 20 ml dung dịch natri tripolyphosphat chứa nước (5%) và NaOH 0,5N được bổ sung từ từ trong khi trộn với nhũ tương chất có hoạt tính sinh học chứa albumin trứng và vi hạt chitosan được tạo liên kết ngang trong pha dầu liên tục. Hạt được làm cứng lại trong ít nhất là 2 giờ nhưng không được lấy ra khỏi pha dầu.

Thể phân tán của hạt trong dầu được khuấy trong 330 ml dung dịch nước 9% của natri alginat loại có độ nhớt thấp (FMC Biopolymer Inc.) cũng chứa 66g oligosacarit (inulin dùng ngay, Cargill, Minneapolis, MN), 10g lexitin và 3g Tween-80. Thể phân tán chứa nước tạo thành được bơm vào trong dung dịch tạo liên kết ngang chứa CaCl_2 5% để tạo ra hạt nền alginat, mỗi hạt chứa nhiều giọt dầu mà mỗi giọt dầu chứa vi hạt albumin trứng và chitosan được tạo liên kết ngang. Hạt nền được làm đông khô và được nghiền thành hạt có kích thước nhỏ hơn 150 μm để thu được chế phẩm khô theo sáng chế.

Ví dụ 1b

Một phương pháp khác để tạo ra chế phẩm theo sáng chế là sử dụng nhũ tương của dung dịch nước có hoạt tính sinh học trong dầu. 10 ml dung dịch nước chứa 100 mg albumin trứng được kết hợp với 15g dầu cây cải dầu chứa 5% Span-80 và được làm đồng nhất để tạo ra nhũ tương nước trong dầu mịn. Nhũ tương được trộn với 100 ml dung dịch chitosan chứa nước 3%, và thể phân tán được bơm vào trong dung dịch tạo liên kết ngang chứa dung dịch tripolyphosphat 5% (5% TPP). Hạt được làm cứng lại trong thời gian ít nhất là 2 giờ. Hạt chitosan được tạo liên kết ngang dạng rắn tạo thành chứa giọt dầu được bao, và mỗi giọt dầu này lại chứa giọt dung dịch albumin trứng nhỏ hơn 10 μm được phân tán. Các hạt rắn được phân lập bằng cách lọc và được phân tán đều trong 400 ml dung dịch nước của alginat loại độ nhớt thấp 9%. Thể phân tán chứa nước tạo thành được bơm vào trong dung dịch tạo liên kết ngang chứa CaCl_2 5% để tạo ra hạt nền alginat. Hạt nền được làm đông khô và được nghiền thành hạt có kích thước dưới 150 μm để thu được chế phẩm khô theo sáng chế.

Ví dụ 2: Điều chế chế phẩm tạo miễn dịch

Chitosan (3 g, FMC Biopolymer) được hòa tan trong 100 ml dung dịch axit axetic băng 0,5N ở nhiệt độ 50°C. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 5,8 bằng natri hydroxit và dung dịch được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. 10 ml dung dịch chứa 100 mg albumin trứng (OVA) là một loại vacxin được trộn với 50 mg chất kích thích miễn dịch (beta glucan, AHD International, Atlanta, GA) và được bổ sung vào dung dịch chitosan. Hỗn hợp tạo thành được nhũ hóa trong 150 g dầu squalan cá mập (Jedwards International) chứa 5% trọng lượng Span-80 ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút để tạo ra nhũ tương của giọt OVA nước, chitosan và beta glucan trong pha dầu liên tục. Nhũ tương được bổ sung trong khi khuấy vào 400 ml dung dịch nước của natri alginat loại có độ nhớt thấp 9% trong NaOH 0,5N cũng chứa oligosacarit (40g, inulin dùng ngay). Nhũ tương tạo thành được bơm vào trong dung dịch CaCl_2 5% để tạo liên kết ngang alginat, thu được chế phẩm tạo miễn dịch theo sáng chế. Chế phẩm được làm đông khô và được nghiền thành hạt có kích thước nhỏ hơn 250 μm .

Ví dụ 3: Điều chế chế phẩm để điều trị/phòng ngừa nhiễm ký sinh ở cá

Chế phẩm chứa kháng nguyên protein hoặc hợp chất diệt ký sinh trùng để điều trị nhiễm ký sinh trùng ở cá được điều chế. 10 mg chất có hoạt tính sinh học được hòa tan trong 10 ml dung dịch chitosan chứa nước 3% được mô tả trong ví dụ 2 nêu trên, và được nhũ hóa trong 15 g hỗn hợp dầu 75% dầu oliu, 20% dầu squalan và 5% Span-80.

1ml dung dịch natri tripolyphosphat 5%, dung dịch NaOH 0,5N được nhũ hóa trong 1g dầu oliu vào được trộn trong nhũ tương có hoạt tính sinh học, thu được thể phân tán trong dầu của các hạt chứa chất có hoạt tính sinh học và chitosan được tạo liên kết ngang. Thể phân tán được để yên trong 2 giờ để hóa rắn chitosan được tạo liên kết ngang. Thể phân tán của hạt trong dầu tạo thành được bổ sung trong khi khuấy vào 20 ml dung dịch chứa natri alginat loại có độ nhớt thấp 9%, metoxypectin thấp 1%, 30% trọng lượng inulin dùng ngay và Tween-80 1%. Hỗn hợp tạo thành được bơm vào trong dung dịch tạo liên kết ngang chứa CaCl_2 3% để tạo ra hạt nền alginat-pectin chứa giọt dầu phân tán được bao trong đó mỗi giọt dầu chứa vi hạt của chitosan có hoạt tính sinh học và được tạo liên kết ngang. Hạt được làm đông khô và được nghiền

đến kích thước nhỏ hơn 150 μm để thu được chế phẩm khô theo sáng chế.

Ví dụ 4: Điều chế chế phẩm chứa dược chất

Chế phẩm chứa dược chất (glucocorticoit như dexametason hoặc methyl prednisolon) để điều trị bệnh kết tràng được điều chế. Dược chất được bổ sung vào dung dịch chitosan được mô tả trong ví dụ 1 hoặc 2 nêu trên, và được nhũ hóa trong hỗn hợp của 95% dầu squalan và 5% Span-80. Nhũ tương kiềm chứa natri tripolyphosphat 5% trong NaOH 0,5N trong dầu squalan được điều chế và được trộn từ từ (20% trọng lượng) vào nhũ tương có hoạt tính sinh học để tạo liên kết ngang chitosan, và hỗn hợp được để yên trong thời gian ít nhất là 2 giờ để hóa rắn hạt được tạo liên kết ngang. Thể phân tán dầu của vi hạt chitosan được trộn vào trong chất lỏng chứa polyme tan trong ruột (30% trọng lượng EUDRAGIT® FS30D, Evonik Industries) ở tỷ lệ là 1:3 nhũ tương/chất lỏng Eudragit và được sấy phun để tạo ra chế phẩm dạng hạt khô theo sáng chế.

Ví dụ 5: Tác dụng bao nang của chất có hoạt tính sinh học trong chế phẩm theo sáng chế

Tác dụng của thể phân tán dầu và lớp chất nền polyme tan trong ruột bổ sung trong chế phẩm theo sáng chế được đánh giá bằng cách albumin trứng (OVA) để mô phỏng dược chất protein hoặc vacxin điển hình. Ba OVA (Sigma) chứa chế phẩm được điều chế. Chế phẩm 1 chứa vi hạt chitosan được liên kết OVA, được điều chế bằng cách hòa tan 100 mg OVA trong 10 ml dung dịch chitosan 3% và bơm dung dịch vào trong dung dịch TPP 10% để tạo ra hạt được tạo liên kết ngang, để yên sau 2 giờ để hóa rắn hạt và sau đó đông khô và nghiền. Chế phẩm 2 được tạo ra bằng cách nhũ hóa 10 ml dung dịch nước chứa 100 mg OVA trong 15 g dầu squalan chứa 3% Span-80, và trộn nhũ tương tạo thành trong 20 ml dung dịch chitosan 3%. Sau đó, huyền phù đặc tạo thành được bơm vào trong dung dịch TPP 10% để tạo ra hạt, sau đó hóa rắn, đông khô và nghiền như trên. Chế phẩm 3 chứa vi hạt chitosan được liên kết OVA theo sáng chế, được điều chế như trong ví dụ 2.

Tác dụng bao nang của OVA trong ba loại chế phẩm được xác định như sau. 500 mg mỗi chế phẩm được phân tán trong 10 ml chất đệm RIPA và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Thể huyền phù được cuộn xoáy trong 5 phút và sau đó được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi được thử nghiệm về

lượng OVA bằng phân tích thẩm tách Western, như sau.

Thẩm tách Western: chế phẩm được dung giải bằng đệm RIPA như được mô tả ở trên, và lượng đã tính toán tương đương với 12 μ g protein trong mỗi mẫu được nạp lên gel gradien SDS-polyacrylamit 10% (SDS-PAGE, Bio-Rad, Hercules, CA). Protein được chuyển lên màng PVDF (Bio-Rad) và được phong bế trong 1 giờ bằng sữa không béo 5% trong PBS chứa Tween-20 0,5% (PBS-T). Các đốm được ủ với kháng thể sơ cấp thích hợp ở độ pha loãng 1:5000 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS-T (3 x 10 mL, 5 phút mỗi lần), màng được ủ với kháng thể thứ cấp được liên hợp HRP thích hợp (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) ở độ pha loãng 1:5000 trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng PBS-T (3 x 10 mL, 5 phút mỗi lần), màng phát quang bằng phản ứng hóa học được hiển bằng cơ chất ECL (Amsheram Biosciences). Tác dụng bao nang của OVA (% lưu lại của lượng OVA ban đầu) được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1

Chế phẩm	Tác dụng bao nang (%)
1	70
2	95
3	95

Kết quả này chứng tỏ tác dụng bảo vệ của thể phân tán dầu trong chế phẩm 2 và 3 trong việc ngăn chặn việc rò rỉ (thất thoát) chất có hoạt tính sinh học vào môi trường nước đơn giản. Tuy nhiên, sự khác biệt đáng kể giữa chế phẩm so sánh 2 và chế phẩm theo sáng chế 3 được phát hiện khi được thử nghiệm ở điều kiện trong dạ dày, như được mô tả dưới đây trong ví dụ 7.

Ví dụ 6: Phân giải hoạt tính kháng nguyên protein không được bảo vệ trong dịch dạ dày được mô phỏng

Để đánh giá việc mất hoạt tính của kháng nguyên protein sau khi tiếp xúc với dạ dày, OVA không được bao nang (10 mg) được ủ trong 10 ml dịch dạ dày được mô phỏng chứa pepsin 0,08% ở độ pH 2 trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C trên máy lắc. Môi trường được lấy ra vào các thời điểm ủ được 15 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút, và lượng OVA còn lại được phân tích bằng cách sử dụng phân tích thẩm tách Western như được mô tả ở trên. Bảng 2 thể hiện sự phân giải của OVA trong 2 giờ tiếp xúc

trong dịch dạ dày được mô phỏng, được thể hiện là % hoạt tính còn lại so với hoạt tính trước khi tiếp xúc.

Bảng 2

Thời gian (phút)	Hoạt tính còn lại (%)
15	61
30	55
60	38
120	2

Các kết quả này chứng tỏ rằng hoạt tính của kháng nguyên gốc protein hoặc chất có hoạt tính sinh học không được bảo vệ sẽ được phân giải hoàn toàn trong đường tiêu hóa của động vật.

Ví dụ 7: Sự bảo vệ trong dạ dày của chất có hoạt tính sinh học trong chế phẩm theo sáng chế

Để đánh giá hoạt tính còn lại của kháng nguyên protein sau khi tiếp xúc với dạ dày, ba chế phẩm được điều chế được mô tả trong ví dụ 5. 500 mg mỗi chế phẩm trong số ba chế phẩm được ủ trong 10 ml dịch dạ dày được mô phỏng chứa pepsin 0,08% ở độ pH 2 trong 2 giờ ở nhiệt độ 37⁰C trên máy lắc. Khi kết thúc 2 giờ tiếp xúc, dịch dạ dày được lấy ra và hoạt tính còn lại của OVA trong chế phẩm được đo được mô tả trong ví dụ 5. Bảng 3 thể hiện hoạt tính còn lại của OVA trong mỗi chế phẩm sau 2 giờ tiếp xúc với dịch dạ dày được mô phỏng.

Bảng 3

Chế phẩm	Hoạt tính còn lại (%)
1	10
2	20
3	90

Các kết quả này chứng tỏ rõ ràng tác dụng bảo vệ dạ dày vượt trội của chế phẩm theo sáng chế 3 so với chế phẩm 1 và 2 trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ 8: Tác dụng của độ nhớt của alginat trong chế phẩm đối với sự bảo vệ trong dạ dày

Ba chế phẩm lần lượt chứa 9% alginat có độ nhớt thấp (50cP), 6% alginat có độ nhớt trung bình (300cP) và 1% alginat có độ nhớt cao (800cP) được điều chế theo ví

dự 2 nêu trên. Ba chế phẩm này được cho tiếp xúc dịch dạ dày được mô phỏng được mô tả trong ví dụ 7 và hoạt tính còn lại của OVA 10 trong chế phẩm được đo được mô tả trong ví dụ 5. Bảng 4 thể hiện hoạt tính còn lại của OVA trong mỗi chế phẩm sau 2 giờ tiếp xúc với dịch dạ dày được mô phỏng.

Bảng 4

Độ nhớt của alginat	Hoạt tính còn lại (%)
Cao (800 cp)	25
Trung bình (300 cp)	40
Thấp (50 cp)	90

Các kết quả này chứng tỏ rằng chế phẩm chứa alginat có độ nhớt thấp hơn có khả năng bảo vệ kháng nguyên gốc protein hoặc chất hoạt tính sinh học cao hơn trong đường tiêu hóa của động vật được mô phỏng.

Ví dụ 9: Cỡ hạt tối ưu của chế phẩm theo sáng chế

Trong ví dụ này tác dụng bảo vệ của cỡ hạt của chế phẩm theo sáng chế được làm khô và được nghiền trong môi trường dạ dày được mô phỏng được đánh giá. Chế phẩm OVA được điều chế được mô tả trong ví dụ 5, sau đó tách bột khô theo 2 cỡ hạt: hạt nhỏ đi qua sàng 50 μ m, và hạt lớn được giữ lại trên sàng 50 μ m nhưng đi qua sàng 100 μ m. Bảng 5 thể hiện hoạt tính còn lại của OVA trong mỗi cỡ hạt của chế phẩm sau 2 giờ tiếp xúc trong dịch dạ dày được mô phỏng.

Bảng 5

Cỡ hạt	Hoạt tính còn lại (%)
50-100 pm	90
<50 pm	40

Các kết quả này cho thấy rằng sự bảo vệ tối ưu trong dạ dày đạt được khi chế phẩm khô được nghiền đến cỡ hạt trên 50 μ m.

Ví dụ 10: Dùng qua đường miệng chế phẩm OVA cho chuột

Albumin trứng được dùng qua đường miệng cho chuột để kiểm tra hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế trong việc gây đáp ứng miễn dịch.

Động vật: chuột cái BALB/C từ 10-12 tuần tuổi được sử dụng. Chuột được ăn tùy thích. Mỗi nhóm thử nghiệm được nhốt trong một lồng riêng.

Chế phẩm albumin trứng: Albumin trứng (1 mg/g albumin trứng, Sigma, St. Louis, Mo.) được kết hợp vào trong chế phẩm theo sáng chế được mô tả trong ví dụ 5. Ba nhóm trong đó mỗi nhóm gồm 4 con chuột được chủng ngừa như sau: 1) albumin trứng (OVA) trong chế phẩm, được dùng qua đường miệng, 2) dung dịch OVA, được dùng dưới da (SC), 3) chế phẩm không chứa kháng nguyên được dùng qua đường miệng. Chuột được chủng ngừa ở các tuần 0 và 3. Mỗi liều chứa tổng số 100 mg chế phẩm khô được trộn với dầu ngô ở tỷ lệ giữa chế phẩm khô và dầu là 1:2 theo trọng lượng, được phủ lên viên thức ăn. Ở tuần 4, mỗi con chuột bị giết và huyết thanh và tế bào lách được thu gom.

Thử nghiệm miễn dịch: Huyết thanh được thử nghiệm với IgG và IgA bằng ELISA. ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng OVA được hấp thụ trên đĩa polystyren. Các mẫu được đặt vào trong các giếng lặp lại 3 lần ở tỷ lệ pha loãng huyết thanh là 1:25. Kháng thể dê kháng chuột được liên hợp với peroxidaza cải ngựa được sử dụng, sau đó là cơ chất orthophenylendiamin (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.). Mật độ quang của mỗi giếng được xác định bằng cách đặt đĩa trong quang phổ kế đĩa vi chuẩn và đọc đĩa ở 490 nm. Tế bào lách được thử nghiệm về tế bào tiết kháng thể (ASC) đặc hiệu với OVA, bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở trên.

Kháng thể IgG và IgA đặc hiệu OVA được định lượng bằng cách xác định sự gia tăng mật độ quang qua thời gian. Huyết thanh và IgA IgG và tế bào tiết kháng thể đặc hiệu với OVA đối với mỗi con chuột được chủng ngừa bằng OVA được dự kiến là tăng đều ở các con chuột được tiêm OVA và được ăn chế phẩm theo sáng chế qua đường miệng. Không có kháng thể IgG hoặc IgA đặc hiệu OVA được dự kiến là được phát hiện ở con chuột được ăn chế phẩm không chứa kháng nguyên. Vì thế, chế phẩm được mong đợi là có hiệu quả trong việc gây đáp ứng miễn dịch khi dùng qua đường miệng.

Ví dụ 11: Dùng qua đường miệng chế phẩm chứa kháng nguyên cho gà

Salmonella enteritidis là nguyên nhân chính gây bệnh ở gà đẻ trứng. Việc lây nhiễm vi khuẩn này làm giảm sản lượng và tăng tỷ lệ tử vong trong đàn. Hơn nữa, *S. enteritidis* có thể thông qua trứng để nhiễm vào gà con, lây nhiễm cho các thế hệ sau hoặc người tiêu thụ trứng bị lây nhiễm. Do việc lây nhiễm bắt đầu bằng việc vi khuẩn này gắn và xâm chiếm niêm mạc ruột, và việc lây nhiễm trong thời gian dài dẫn đến

việc lây nhiễm vào mô bạch huyết đường ruột, nên sự kích thích khả năng miễn dịch niêm mạc là bắt buộc để kiểm soát bệnh này.

Để đánh giá hiệu quả của việc chủng ngừa cho gà bằng chế phẩm vacxin theo sáng chế, flagelin của *Salmonella enteritidis*, chất tạo miễn dịch quan trọng, được kết hợp vào trong chế phẩm theo ví dụ 2, ngoại trừ nhũ tương vacxin được trộn trong pha natri alginat kiềm ở tỷ lệ trọng lượng là 1:2 và huyền phù đặc được sấy phun. Chế phẩm khô được phủ lên trên thức ăn và được dùng qua đường miệng cho gà. Gà mười tuần tuổi nhận 3 liều dùng qua đường miệng chế phẩm được bổ sung 300 µg kháng nguyên flagelin của *S. enteritidis* hoặc albumin huyết thanh bò với khoảng cách 2 tuần một lần. Một tuần sau liều kháng nguyên dùng qua đường miệng cuối cùng, huyết thanh và dịch ruột được thu gom và được thử nghiệm kháng thể đặc hiệu với flagelin bằng ELISA. Kết quả được dự kiến là thể hiện rằng gà được chủng ngừa qua đường miệng có kháng thể đặc hiệu với flagelin tăng đáng kể trong huyết thanh.

Ví dụ 12: Dùng qua đường miệng chế phẩm chứa kháng nguyên cho bê

Hiệu quả của chế phẩm chứa albumin trứng được dùng qua đường miệng được điều chế theo sáng chế để kích thích đáp ứng miễn dịch trong phổi của bê được chứng tỏ.

Albumin trứng được kết hợp vào trong chế phẩm được mô tả trong ví dụ 1a. Để dùng qua đường miệng cho bê, chế phẩm chứa liều bao gồm 40 µg albumin trứng trong mỗi mg được dùng trong thức ăn. Bốn con bê được sử dụng cho mỗi nhóm thử nghiệm và mỗi con bê nhận 5 mg albumin trứng trong mỗi liều 5 ngày liên tiếp.

Hai nhóm bê được sử dụng để đánh giá hiệu quả của albumin trứng được dùng qua đường miệng để gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Nhóm 1 được dùng 2 liều albumin trứng trong tá được Freund không đầy đủ chỉ bằng cách tiêm dưới da (SC) 3 tuần. Nhóm này sử dụng làm đối chứng dùng ngoài đường tiêu hóa, phương pháp chủng ngừa thường sử dụng vacxin bất kỳ. Nhóm 2 tiếp nhận 2 chế độ dùng liều qua đường miệng của chế phẩm chứa albumin trứng trong 3 tuần. Huyết thanh được đánh giá đáp ứng kháng thể isotyp với albumin trứng.

Kết quả được dự kiến là thể hiện lượng đáng kể của IgG và IgA đặc hiệu với OVA được tạo ra ở bê được ăn chế phẩm chứa OVA qua đường miệng. Nồng độ IgA trong huyết thanh rất cao được mong đợi dự đoán chế phẩm theo sáng chế rất hữu hiệu

trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch toàn thân ở gia súc.

Ví dụ 13: Dùng qua đường miệng chế phẩm chứa kháng nguyên phẩy khuẩn cho cá

Vibrio alginolyticus là vi khuẩn lây nhiễm nghiêm trọng trong nuôi trồng thủy sản, cụ thể là nghiêm trọng ở cá hồi vân. Hiện nay nó đặc hữu ở tất cả các quốc gia nuôi cá hồi nơi mà nó có thể gây tổn thất kinh tế nghiêm trọng. Nó cũng trở thành mầm bệnh quan trọng hơn của cá hồi nuôi, chủ yếu trong pha tăng trưởng nước ngọt, nhưng nó cũng đã được báo cáo là gây thiệt hại cho cả cá hồi biển. Việc chủng ngừa có thể ngăn chặn *V. alginolyticus* tác động đáng kể ở giai đoạn bất kỳ trong chu kỳ nuôi cá hồi. Một chương trình chủng ngừa tiêu biểu bao gồm chủng ngừa ban đầu cho cá hồi nhỏ nặng từ 2-5 gam và chủng ngừa nhắc lại qua đường miệng từ 4 đến 6 tháng sau khi chủng ngừa ban đầu. Tuy nhiên, chương trình chủng ngừa lý tưởng sẽ bao gồm chỉ một loại chủng ngừa được cung cấp định kỳ cho cá để duy trì hiệu giá kháng thể hữu hiệu trong huyết thanh cá trong toàn bộ thời gian nuôi.

Thiết kế thí nghiệm: Hiệu quả của vaccin ERM được dùng qua đường miệng chứa chế phẩm được điều chế theo sáng chế để kích thích đáp ứng miễn dịch trong huyết thanh cá hồi được chứng tỏ.

V. alginolyticus được làm giảm độc lực được kết hợp vào trong chế phẩm như được mô tả trong ví dụ 1b. Để dùng qua đường miệng cho cá, chế phẩm chứa liều bao gồm 2 µg vaccin *V. alginolyticus* trong mỗi mg được dùng trong thức ăn. 20 con cá có kích thước trung bình là 5g được sử dụng cho mỗi nhóm thử nghiệm và mỗi con cá nhận 1 liều vaccin *V. alginolyticus* trong chế độ thức ăn trong 5 ngày liên tiếp.

Ba nhóm cá được sử dụng để đánh giá hiệu quả của vaccin *V. alginolyticus* được dùng qua đường miệng để gây đáp ứng miễn dịch so với cách chủng ngừa tiêu chuẩn bằng cách tiêm. Nhóm 1 được chủng ngừa bằng cách sử dụng chủng ngừa bằng cách tiêm. Nhóm này dùng làm đối chứng dùng ngoài đường tiêu hóa, phương pháp chủng ngừa thường sử dụng vaccin bất kỳ. Nhóm 2 nhận một chế độ dùng qua đường miệng của chế phẩm chứa vaccin *V. alginolyticus*. Nhóm 3 nhận một chế độ dùng qua đường miệng của chế phẩm không chứa vaccin. Huyết thanh được đánh giá về đáp ứng kháng thể isotyp với *V. alginolyticus* 6 tuần sau khi chủng ngừa. Kết quả được dự kiến là thể hiện lượng đáng kể của IgA đặc hiệu với *V. alginolyticus* được tạo ra ở cá được ăn chế phẩm chứa *V. alginolyticus* qua đường miệng. Đáp ứng miễn dịch trong

huyết thanh của cá được chủng ngừa qua đường miệng và tiêm được dự kiến là tương đương. Nồng độ IgA trong huyết thanh rất cao được mong đợi dự đoán là chế phẩm theo sáng chế rất hữu hiệu trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch toàn thân ở cá.

Ví dụ 14: Chế phẩm chứa thuốc diệt loài gặm nhấm

Warfarin là thuốc diệt loài gặm nhấm rất thông dụng được sử dụng để kiểm soát sự phá hoại của chuột cống và chuột nhắt. Động vật gặm nhấm ăn bả chứa Warfarin thể hiện các triệu chứng ngộ độc rõ rệt trong thời gian từ 15 đến 30 phút và trở nên bất tỉnh trong thời gian từ 1 đến 2 giờ. Tuy nhiên, do tác dụng nhanh của nó, động vật gặm nhấm thường ăn Warfarin với lượng dưới liều gây chết và phục hồi trong vòng 8 giờ. Việc bao nang Warfarin có thể làm chậm sự khởi phát của các triệu chứng, cho phép tiêu thụ liều gây chết hoàn toàn.

Phương pháp thí nghiệm: Chuột cái BALB/C 10-12 tuần tuổi được sử dụng. Chuột được ăn tùy thích. Mỗi nhóm thử nghiệm được nhốt trong một lồng riêng biệt.

Chế phẩm Warfarin theo sáng chế: Warfarin (400mg/g chế phẩm, Sigma, St. Louis, Mo.) được kết hợp vào trong chế phẩm được mô tả tổng quát trong ví dụ 3.

Ba nhóm gồm 4 con chuột, mỗi nhóm được ăn tùy thích như sau: 1) chế phẩm Warfarin theo sáng chế, được trộn trong bả ở 4% hoạt tính Warfarin, 2) Warfarin không được bao nang, được trộn trong bả ở 4% hoạt tính, 3) bả chứa chế phẩm như trong ví dụ 3, không chứa Warfarin hoặc chất có hoạt tính sinh học khác. Tác dụng tiêu thụ thức ăn và tiêu diệt trên chuột được theo dõi.

Kết quả cho thấy rằng sự tiêu thụ thức ăn của các nhóm 1 và 3 giống nhau trong khi sự tiêu thụ thức ăn trong nhóm 2 (Warfarin không được bao nang) là nhỏ hơn 25%. Dự kiến là tất cả các con chuột trong nhóm 1 chết sau 8 giờ kể từ khi ăn trong khi toàn bộ chuột nhóm 2 vẫn sống sau 8 giờ kể từ khi ăn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chất có hoạt tính sinh học cho các loài sống dưới nước hoặc sống trên cạn, bao gồm các hạt mà mỗi hạt này chứa chất có hoạt tính sinh học trong hỗn hợp chứa nước của polyme bám dính niêm mạc;

trong đó hỗn hợp chứa nước của polyme bám dính niêm mạc này và chất có hoạt tính sinh học được phân tán trong dầu, nhờ đó tạo ra nhũ tương nước trong dầu; và

trong đó nhũ tương nước trong dầu này được phân tán trong chất nền bao gồm polyme tan trong ruột.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polyme tan trong ruột được tạo liên kết ngang.

3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chất tạo liên kết ngang cho polyme tan trong ruột bao gồm cation kim loại hóa trị hai.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polyme bám dính niêm mạc được tạo liên kết ngang.

5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó các liên kết ngang trong polyme bám dính niêm mạc được tạo ra bằng cách liên kết với tripolyphosphat.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hạt có đường kính lớn hơn 50 μm .

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất có hoạt tính sinh học là chất tạo miễn dịch.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polyme bám dính niêm mạc là một hoặc nhiều polyme được chọn từ nhóm bao gồm caragenan, chitosan, axit hyaluronic, alginat, dẫn xuất hoặc dạng cải biến hoặc chất bất kỳ trong số các chất nêu trên, polyme được bổ sung nhóm chức carboxylic, polyme được bổ sung nhóm chức sulfat và polyme được bổ sung nhóm chức amin.

9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polyme tan trong ruột là một hoặc nhiều polyme được chọn từ nhóm bao gồm poly(met)acrylat, alginat, pectin, carboxymetyl xenluloza, methyl xenluloza và xenluloza axetat phtalat.

10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất nền polyme tan trong ruột bao gồm alginat loại độ nhớt thấp, pectin metoxy thấp hoặc tổ hợp của chúng.

11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó dầu là một hoặc nhiều dầu được chọn từ nhóm

bao gồm mỡ, dầu và sáp.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó dầu là dầu thực vật hoặc mỡ động vật.

13. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó polyme bám dính niêm mạc được tạo liên kết ngang.

14. Phương pháp điều chế chế phẩm theo điểm 2, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tạo ra hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan;

(b) làm đồng nhất hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trong dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu ở tỷ lệ theo trọng lượng là một phần hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trên 1,1-5 phần dầu cho đến khi tạo ra nhũ tương đồng nhất;

(c) tạo ra huyền phù đặc của sản phẩm ở bước (b) trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột; và

(d) phun, nhỏ giọt hoặc bơm huyền phù đặc ở bước (c) vào trong dung dịch nước chứa chất tạo liên kết ngang cho polyme tan trong ruột để tạo ra hạt, trong đó hỗn hợp chứa nước ở bước (a) còn chứa polyme bám dính niêm mạc.

15. Phương pháp điều chế chế phẩm theo điểm 4, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tạo ra hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan;

(b) làm đồng nhất hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trong dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu ở tỷ lệ theo trọng lượng là một phần hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trên 1,1-5 phần dầu cho đến khi tạo ra nhũ tương đồng nhất;

(c) tạo ra huyền phù đặc của sản phẩm ở bước (b) trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột; và

(d) tạo ra hạt từ huyền phù đặc ở bước (c), trong đó bước (b) còn bao gồm bước tạo ra các giọt nhũ tương trong dung dịch polyme bám dính niêm mạc và tạo

liên kết ngang polyme bám dính niêm mạc để tạo ra các hạt trung gian.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó bước tạo ra hạt bao gồm bước làm đông khô và nghiền sản phẩm ở bước (c).

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó bước tạo ra hạt bao gồm bước sấy phun sản phẩm ở bước (c).

18. Phương pháp điều chế chế phẩm theo điểm 13, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tạo ra hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan và tạo ra hỗn hợp chứa nước của polyme bám dính niêm mạc một cách riêng rẽ;

(b) trộn hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan với hỗn hợp chứa nước của polyme bám dính niêm mạc;

(c) làm đồng nhất hỗn hợp chứa nước ở bước (b) trong dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu ở tỷ lệ theo trọng lượng là một phần hỗn hợp chứa nước ở bước (b) trên 1,1-5 phần dầu cho đến khi tạo ra nhũ tương đồng nhất;

(d) tạo liên kết ngang polyme bám dính niêm mạc trong nhũ tương ở bước (c) bằng cách bổ sung chất tạo liên kết ngang cho polyme bám dính niêm mạc vào nhũ tương ở bước (c);

(e) tạo ra huyền phù đặc của sản phẩm ở bước (d) trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột; và

(f) phun, nhỏ giọt hoặc bơm huyền phù đặc ở bước (e) vào trong dung dịch nước chứa chất tạo liên kết ngang của polyme tan trong ruột để tạo ra hạt.

19. Phương pháp điều chế chế phẩm theo điểm 13, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tạo ra hỗn hợp chứa nước chứa chất có hoạt tính sinh học được phân tán hoặc được hòa tan;

(b) làm đồng nhất hỗn hợp chứa nước ở bước (a) trong dầu để tạo ra nhũ tương của hỗn hợp chứa nước trong dầu ở tỷ lệ theo trọng lượng là một phần hỗn

hộp chứa nước ở bước (a) trên 1,1-5 phần dầu cho đến khi tạo ra nhũ tương đồng nhất;

(c) tạo ra giọt nhũ tương ở bước (a) trong dung dịch polyme bám dính niêm mạc chứa nước;

(d) tạo liên kết ngang polyme bám dính niêm mạc trong nhũ tương ở bước (c) bằng cách bổ sung chất tạo liên kết ngang cho polyme bám dính niêm mạc vào nhũ tương ở bước (c);

(e) tạo ra huyền phù đặc của sản phẩm ở bước (d) trong dung dịch nước chứa polyme tan trong ruột; và

(f) tạo ra hạt từ huyền phù đặc ở bước (e).