



(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)



1-0026946

(51)⁷ C12N 7/04

(13) B

(21) 1-2013-03323

(22) 04/04/2008

(62) 1-2009-02359

(86) PCT/US2008/059472 04/04/2008

(87) WO2009/014774 29/01/2009

(30) 60/910,579 06/04/2007 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 26/04/2010 265A

(73) TAKEDA VACCINES, INC. (US)

75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, United States of America

(72) STINCHCOMB, Dan T. (US); OSORIO, Jorge E. (US); WIGGAN, O'Neil (CA).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM VIRUT GÂY BỆNH DANGA SỐNG ĐƯỢC LÀM GIẢM ĐỘC LỰC,
PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT ĐỂ LÀM GIẢM SỰ BẤT HOẠT CỦA CHẾ PHẨM
VIRUT SỐNG ĐƯỢC LÀM GIẢM ĐỘC LỰC

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm virus gây bệnh danga sống, được làm giảm độc lực bao gồm một hoặc nhiều virus gây bệnh danga sống, đã được làm giảm độc lực, một hoặc nhiều albumin được chọn từ nhóm bao gồm các lactalbumin và các albumin huyết thanh, và trehaloza. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm giảm sự bất hoạt của một hoặc nhiều virus gây bệnh danga sống được làm giảm độc lực và kit làm giảm sự bất hoạt của chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và các phương pháp làm ổn định các virus sống đã được làm giảm độc lực. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm và các phương pháp làm giảm sự thoái biến của các virus sống đã được làm giảm độc lực. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng các chế phẩm này trong các kit dùng cho các phương pháp và ứng dụng di động.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các vaccin bảo vệ chống lại các virus gây bệnh do virus đã được sử dụng một cách có hiệu quả để làm giảm tỉ lệ mắc bệnh ở người. Một trong số các phương pháp thành công nhất đối với các vaccin virus là phương pháp tạo miễn dịch cho người hoặc động vật bằng chủng virus đã được giảm độc lực hoặc làm giảm độc lực (“virus sống đã được làm giảm độc lực”). Do mức độ sao chép hạn chế sau khi tạo miễn dịch, chủng virus đã được giảm độc lực không gây ra bệnh. Tuy nhiên, mức độ sao chép hạn chế của virus cũng đủ để biểu hiện đầy đủ các kháng nguyên của virus và tạo ra các đáp ứng miễn dịch lâu dài và hiệu nghiệm đối với virus. Do đó, sau này, khi bị phơi nhiễm chủng gây bệnh của virus, cá nhân đã được tạo miễn dịch sẽ được bảo vệ không bị nhiễm bệnh. Những vaccin virus sống được làm giảm độc lực này nằm trong số các vaccin thành công nhất được sử dụng trong y tế.

Mười trong số mười sáu vaccin virus được cấp phép lưu hành ở Mỹ là các virus sống đã được làm giảm độc lực. Các vaccin virus sống được sử dụng thành công bao gồm các vaccin virus 17D gây bệnh sốt vàng, vaccin virus bại liệt Sabin typ 1, 2 và 3, các vaccin virus gây các bệnh sởi, bệnh quai bị, bệnh sởi rubella, bệnh thủy đậu và bệnh đậu mùa. Việc sử dụng vaccin virus vaccinia để kiểm soát sự bùng phát của bệnh đậu mùa dẫn tới việc lần đầu tiên và duy nhất loại trừ được một căn bệnh ở người. Vaccin virus gây bệnh bại liệt Sabin đã giúp phòng bệnh bại liệt trên toàn thế giới và được sử dụng trong các nỗ lực loại bỏ bệnh bại liệt. Trên bình diện quốc tế, việc chủng

ngừa cho trẻ em với các vaccin sởi, quai bị, sởi rubella và thủy đậu đã giúp cho hàng triệu người tránh được nguy cơ mắc bệnh và tử vong.

Những tiến bộ về kỹ thuật gần đây, như các kỹ thuật tái sắp xếp vật liệu di truyền, di truyền ngược và kỹ thuật tạo thích ứng lạnh, đã dẫn tới việc cho phép sử dụng các virus sống đã được làm giảm độc lực để làm vaccin phòng bệnh cúm và bệnh do rotavirus gây ra. Nhiều vaccin virus sống được phát triển bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp trong xét nghiệm lâm sàng ở người, bao gồm các vaccin phòng các bệnh “sốt tây sông Nile” (West Nile), virus gây bệnh danga, bệnh sốt rét, bệnh lao và vaccin phòng HIV. Các vaccin virus tái tổ hợp này dựa trên việc thao tác các vaccin virus đã được giảm độc lực đã được mô tả đặc điểm rõ, ví dụ, adenovirus, virus vaccinia, virus gây bệnh sốt vàng 17D hoặc virus gây bệnh danga, DEN-2 PDK-53. Các virus đã được giảm độc lực, an toàn được xử lý theo kỹ thuật di truyền để biểu hiện các kháng nguyên bảo vệ đối với các mầm bệnh do virus khác hoặc các mầm bệnh do vi khuẩn gây ra. Một số vaccin virus tái tổ hợp được cấp phép sử dụng cho động vật, bao gồm virus tái tổ hợp từ virus canarypox/virus gây bệnh bạch cầu ở mèo, virus tái tổ hợp từ virus canarypox/virus gây bệnh ở chó, virus tái tổ hợp từ virus canarypox/virus Tây sông Nile và virus tái tổ hợp từ virus gây bệnh sốt vàng/virus Tây sông Nile. Với tư cách là một nhóm, các vaccin virus sống được làm giảm độc lực nằm trong số các biện pháp can thiệp y học thành công nhất trong lịch sử con người, chỉ đứng thứ hai sau thuốc kháng sinh và có triển vọng nâng cao sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới.

Để các vaccin virus sống được làm giảm độc lực có hiệu quả, chúng phải có khả năng sao chép sau khi tạo miễn dịch. Do đó, các yếu tố bất kỳ làm bất hoạt virus cũng có thể phá hủy vaccin. Ví dụ việc phân phối và sử dụng rộng rãi vaccin bệnh đậu mùa trước chiến tranh thế giới II bị hạn chế do virus bị bất hoạt chỉ sau vài ngày ở nhiệt độ trong phòng. Trong những năm của thập niên 1920, các nhà khoa học Pháp đã chứng minh rằng vaccin được làm khô đông lạnh có độ ổn định trong thời gian dài và các kỹ thuật để sản xuất vaccin được làm khô đông lạnh trên quy mô lớn được phát triển vào những năm của thập niên 1940 (ví dụ, xem tài liệu Collier 1955). Ngoài việc làm khô đông lạnh, đã xác định được nhiều chất phụ gia khác nhau có thể giúp làm ổn định các virus trong các vaccin virus sống được làm giảm độc lực (ví dụ, xem Burke, Hsu và các đồng tác giả 1999). Các chất ổn định này thường bao gồm một hoặc nhiều thành

phần dưới đây: các cation hóa trị hai, các dung dịch muối đậm, các chất tạo phức cang cua, ure, đường (ví dụ, sucroza, lactoza, trehaloza), các polyol (ví dụ, glyxerol, manitol, sorbitol, polyetylen glycol), các axit amin, các sản phẩm thủy phân của protein (ví dụ, sản phẩm thủy phân của casein, sản phẩm thủy phân của lactalbumin, pepton), các protein (ví dụ, gelatin, albumin huyết thanh người) hoặc các polyme (ví dụ, dextran).

Tuy nhiên, thậm chí với các chất ổn định này, nhiều vacxin thường được sử dụng vẫn cần phải được bảo quản lạnh để đảm bảo ổn định. Các vacxin thông dụng khác thường nhạy với nhiệt độ quá cao; cả nhiệt dư cũng như việc làm lạnh đột ngột đều có thể làm bất hoạt vacxin. Việc đảm bảo “chuỗi bảo quản lạnh” trong suốt quá trình phân phối là công việc đặc biệt khó khăn ở các nước đang phát triển. Do đó, cần phải cải thiện độ ổn định của cả các vacxin virus sống được làm giảm độc lực đang tồn tại và đã phát triển gần đây.

Các flavivirus nằm trong số các virus không ổn định nhất. Chúng là các virus có vỏ với hệ gen ARN có xấp xỉ 11.000 bazơ. Phần lớn các flavivirus được lây truyền bởi sinh vật truyền bệnh là động vật chân đốt, thường là muỗi. Có hơn 70 flavivirus khác nhau được nhóm thành ba nhóm chính căn cứ theo phân loại huyết thanh học: nhóm bệnh danga, nhóm gây viêm não Nhật Bản và nhóm gây bệnh sốt vàng. Trong số các flavivirus đã được biết đến, 40 virus được truyền bởi muỗi, 16 virus được truyền bởi ve và 18 virus không có côn trùng truyền bệnh xác định. Do đó, hầu hết các flavivirus phát triển bằng cách sao chép trong cả vật chủ truyền bệnh là động vật chân đốt và các loại vật chủ là động vật có xương sống (thường là chim và động vật có vú). Quá trình đô thị hóa, du lịch trên toàn thế giới và biến đổi môi trường (như hiện tượng chặt phá rừng hoặc thay đổi biểu đồ mưa) dẫn đến sự xuất hiện của nhiều flavivirus là những mối đe dọa đối với sức khỏe của con người. Các virus như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các virus gây bệnh sốt vàng, các virus gây bệnh danga, virus Tây sông Nile, virus gây bệnh viêm não Nhật Bản, và virus gây bệnh viêm não do ve truyền.

Nhờ các nỗ lực chủng ngừa và phòng trừ muỗi mạnh mẽ, bệnh sốt vàng đã được loại trừ tại nhiều vùng ở Nam, Bắc và Trung Mỹ, Caribê và Châu Âu. Tuy nhiên, trong 20 năm gần đây, nhiều nước báo cáo số lượng các ca mắc bệnh đã tăng lên. Virus gây bệnh sốt vàng hiện tại là bệnh địa phương ở các vùng chủ yếu tại Châu Phi và

Nam Mỹ và một số đảo ở Caribê. Tổ chức y tế thế giới (WHO) ước đoán rằng hàng năm có khoảng 200000 ca mắc bệnh sốt vàng, trong đó có 30000 ca tử vong. Kể từ đại chiến thế giới II, các flavivirus gây bệnh danga đã phổ biến ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới trên toàn thế giới và hiện đang đe dọa sức khỏe của trên 3,5 tỷ người, tức khoảng một nửa dân số thế giới. WHO ước đoán rằng mỗi năm có khoảng 50-100 triệu ca mắc bệnh danga. 500000 ca trong số này là các ca bệnh danga nặng, có nguy cơ tử vong, dẫn tới hơn 25000 ca tử vong hàng năm. Dạng cực kỳ nguy hại của virus Tây sông Nile đã thâm nhập vào tây bán cầu, có lẽ bằng con đường du lịch, vào New York năm 1999. Các con chim bị nhiễm virus được truyền qua muỗi là vật truyền thứ nhất, nhưng cũng đã gây bệnh và tử vong cho người và ngựa. Virus Tây sông Nile đã phát tán khắp nước Mỹ và thâm nhập vào cả Canada và Mexico. Kể từ khi thâm nhập vào nước Mỹ, virus Tây sông Nile đã gây ra 20000 ca mắc bệnh sốt Tây sông Nile theo như báo cáo, trong đó có 950 ca tử vong. Virus gây bệnh viêm não Nhật Bản gây ra từ 30000 tới 50000 ca bệnh lý về thần kinh mỗi năm, chủ yếu ở Đông và Nam Châu Á. 25-30% số ca theo báo cáo là ở tình trạng nguy hiểm đến tính mạng. Virus viêm não do ve truyền là bệnh địa phương ở một số nơi ở châu Âu và châu Á và tiếp tục bùng phát ảnh hưởng đến hàng ngàn người. Các virus liên quan với phạm vi phổ biến về mặt địa lý hạn chế hơn bao gồm virus Kunjin (một loài tương đối gần với virus Tây sông Nile) và virus gây bệnh viêm não Murray Valley ở Úc và New Guinea, virus gây bệnh viêm não St. Louis ở Bắc và Nam Mỹ, các virus Usutu, Koutango, và Yaonde ở châu Phi, và virus Cacipacore ở Nam Mỹ.

Vaccine virus sống được làm giảm độc lực được phát triển là an toàn và bảo vệ chống lại các bệnh do flavivirus gây ra, như bệnh sốt vàng và virus gây bệnh viêm não Nhật Bản. Vaccine virus sống được làm giảm độc lực, 17D, đã được sử dụng rộng rãi để phòng bệnh sốt vàng. Các vaccine flavivirus hiện nay được làm khô đông lạnh với sự có mặt của các chất ổn định. Tuy nhiên, các vaccine cần phải được bảo quản và vận chuyển ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, yêu cầu này khó có thể đáp ứng được ở các nước đang phát triển và nhiều vùng xa xôi hẻo lánh của các quốc gia phát triển. Ngoài ra, khi được hoàn nguyên trong nước, vaccine nhanh chóng mất đi hiệu lực ngay cả khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Vaccin sởi là ví dụ khác của virus đã được làm giảm độc lực không ổn định được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới để phòng bệnh. Virus gây bệnh sởi là virus ARN sợi âm không phân đoạn, có màng bao thuộc họ Paramyxovirut. Bệnh sởi là bệnh thay đổi theo mùa, có tính dễ lây cao, nó hầu như có thể tác động tới mỗi trẻ em trước tuổi dậy thì khi thiếu sự chủng ngừa. Ở các nước đang phát triển, tỷ lệ tử vong ở trẻ em bị nhiễm bệnh sởi nằm trong khoảng từ 2 tới 15%. Thực vậy, mặc dù đã nỗ lực trong công tác chủng ngừa trên toàn thế giới, bệnh sởi vẫn gây ra hơn 7000 ca tử vong ở trẻ em mỗi năm. Vaccin sởi là virus sống đã được làm giảm độc lực được sản xuất trong các tế bào nguyên bào sởi gà sơ cấp. Vaccin được làm ổn định bằng gelatin và sorbitol và sau đó được làm khô đông lạnh. Vaccin đã được làm khô đông lạnh và làm ổn định có thời hạn sử dụng là 2 năm hoặc lâu hơn nếu được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Tuy nhiên, vaccin đã làm khô đông lạnh vẫn cần phải có chuỗi bảo quản lạnh vốn là vấn đề khó khăn ở các nước đang phát triển. Ngoài ra, khi hoàn nguyên trong nước, vaccin bị mất đi 50% hiệu lực của nó trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 25°C).

Do đó, cần phải nghiên cứu để đưa ra các chế phẩm vaccin cải tiến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phương pháp và các chế phẩm để làm giảm hoặc phòng ngừa sự thoái hóa hoặc bất hoạt của chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực. Một số chế phẩm được bộc lộ có thể chứa hỗn hợp gồm các thành phần mà làm giảm sự thoái hóa của virus sống đã được làm giảm độc lực. Các phương án khác ở đây đề xuất các tổ hợp tá dược nhằm cải thiện ở mức cao độ ổn định của các virus sống đã được làm giảm độc lực. Các chế phẩm khác và các phương pháp khác theo sáng chế được nhằm làm giảm nhu cầu về các nhiệt độ thấp (ví dụ, được để lạnh hoặc bảo quản đông lạnh) trong khi làm tăng thời hạn sử dụng của virus sống đã được làm giảm độc lực trong nước và/hoặc được hoàn nguyên trong nước.

Theo các phương án này, các virus sống đã được làm giảm độc lực được quan tâm là các flavivirus. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm, mà có thể chứa nhưng không chỉ giới hạn ở một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực, như một hoặc nhiều flavivirus sống đã được làm giảm độc lực kết hợp với một

hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao, các protein và các hydrat cacbon.

Các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể làm tăng sự ổn định và/hoặc làm giảm sự bất hoạt và/hoặc sự thoái biến của các virus sống đã được làm giảm độc lực bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, virus ecpet, hoặc Poxvirus sống đã được làm giảm độc lực.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa virus sống đã được làm giảm độc lực và các phương pháp tạo ra các chế phẩm vaccin có khả năng làm giảm hoặc phòng ngừa sự khởi phát bệnh do một hoặc nhiều virus được đề cập ở đây gây ra. Theo các phương án này, các bệnh có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh Tây sông Nile, bệnh danga, bệnh viêm não Nhật Bản, bệnh rừng Kyasanur, bệnh viêm não vùng thung lũng Murray, bệnh danga Alkhurma, bệnh viêm não St. Louis, bệnh viêm não virus do ve truyền, bệnh sốt vàng và bệnh viêm gan do virus viêm gan C.

Theo một số phương án, các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể được hydrat hóa hoặc loại nước toàn bộ hoặc một phần. Theo các phương án khác, các chất protein được đề xuất sử dụng trong các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lactalbumin, albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người (rHSA), albumin huyết thanh bò (BSA), các albumin huyết thanh khác hoặc các thành viên họ gen albumin. Các sacarit hoặc các polyol có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, monosacarit, disacarit, các rượu đường, trehaloza, sucroza, maltoza, isomaltoza, xelibioza, gentiobioza, laminariboza, xylobioza, manobioza, lactoza, fructoza, sorbitol, manitol, lactitol, xylitol, erythritol, rafinoza, amylaza, các xyclodextrin, chitosan, hoặc xenluloza. Theo một số phương án, các chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt không phải ion như alkyl poly(etylen oxit), các copolyme của poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit) (các copolyme khối EO-PO), poly(vinylpyrrolidon) các alkyl polyglucosit (như sucroza monostearat, lauryl diglucosit, hoặc sorbitan monolaureat,

octyl glucosit và dexyl maltosit), các rượu béo (rượu xetylic hoặc rượu olelylic), hoặc các cocamit (cocamit MEA, cocamit DEA và cocamit TEA).

Theo các phương án khác, các chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, copolyme poloxame 407 (Pluronic F127[®]), (poloxame 188 (Pluronic F68[®]), copolyme poloxame 403 (Pluronic P123[®]), hoặc các copolyme khối EO-PO khác có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 3000 đến 4000.

Theo một số phương án, các chế phẩm vacxin có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chất protein là albumin huyết thanh; một hoặc nhiều chất sacarit là trehaloza; và một hoặc nhiều chất polyme làm chất hoạt động bề mặt như copolyme khối EO-PO, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®].

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực được loại nước toàn bộ hoặc một phần. Theo các phương án này, chế phẩm có thể được loại bỏ nước ít nhất là 20%; ít nhất là 30%; ít nhất là 40%; ít nhất là 50%; ít nhất là 60%; ít nhất là 70%; ít nhất là 80%; hoặc ít nhất là 90%.

Theo các phương án khác, các phương pháp làm giảm sự bất hoạt của các virus sống đã được làm giảm độc lực bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước kết hợp một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực với chế phẩm có khả năng làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chất protein; một hoặc nhiều chất sacarit hoặc polyol; và một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao, trong đó chế phẩm này làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực. Theo các phương án này, virus sống đã được làm giảm độc lực có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, virus ecpet, hoặc Poxvirus. Ngoài ra, các phương pháp và các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể bao gồm các phương pháp làm khô đông lạnh hoặc các phương pháp loại nước khác cho hỗn hợp trên. Theo các phương pháp và các chế phẩm này, các phương pháp và các chế phẩm làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực mà đã được làm khô đông lạnh hoặc được loại nước toàn bộ

hoặc một phần. Theo các phương pháp khác, các chế phẩm làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực có thể bao gồm chế phẩm dạng nước hoặc có thể bao gồm chế phẩm được tái hydrat hóa sau khi loại nước. Các chế phẩm được mô tả ở đây có khả năng làm tăng thời hạn sử dụng của virus sống đã được làm giảm độc lực trong nước hoặc đã được tái hydrat hóa.

Theo một số phương án, virus sống đã được làm giảm độc lực để sử dụng cho chế phẩm vaccin được đề xuất theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều vaccin flavivirus sống đã được làm giảm độc lực, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các virus gây bệnh sốt vàng (như 17D), virus gây viêm não Nhật Bản được làm giảm độc lực, (như SA 14-14-2), virus gây bệnh dengue (như DEN-2/PDK-53 hoặc DEN-4Δ30) hoặc các flavivirus khả năng tái tổ hợp.

Theo một số phương án, các chế phẩm được đề xuất có khả năng làm giảm sự bất hoạt và/hoặc sự thoái biến của virus sống đã được làm giảm độc lực đã được hydrat hóa trong khoảng thời gian hơn 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ nằm trong khoảng từ 20° đến 25°C) hoặc ở nhiệt độ lạnh (ví dụ, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0° đến 10°C). Trong các phương án cụ thể hơn, chế phẩm tổ hợp có khả năng duy trì khoảng 100% virus sống đã được làm giảm độc lực trong khoảng thời gian hơn 24 giờ. Ngoài ra, các chế phẩm tổ hợp được đề xuất theo sáng chế có khả năng làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực và đã được hydrat hóa trong ít nhất hai chu kỳ làm lạnh và rã đông. Các phương pháp khác đề xuất các chế phẩm tổ hợp có khả năng làm giảm sự bất hoạt của virus sống đã được làm giảm độc lực và đã được hydrat hóa trong khoảng thời gian từ khoảng 24 giờ đến khoảng 50 ngày ở nhiệt độ lạnh (ví dụ nằm trong khoảng từ 0° đến 10°C). Các chế phẩm được đề xuất trong các phương pháp này, có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chất protein là albumin huyết thanh; một hoặc nhiều chất sacarit là trehalose; và một hoặc nhiều chất copolyme khối EO-PO là copolyme poloxamer 407, Pluronic F127®. Theo một số phương án, chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực với hiệu giá của virus được duy trì ở mức khoảng 100% sau 7 ngày ở nhiệt độ khoảng 21°C và hiệu giá của virus khoảng 100% sau 50 ngày ở nhiệt độ lạnh khoảng 4°C. Các phương án khác theo sáng chế đề xuất chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực với hiệu giá của virus được duy trì ở khoảng 90%, hoặc khoảng 80% sau 7 ngày ở nhiệt độ khoảng 21°C và

khoảng 90%, hoặc khoảng 80% sau 50 ngày ở nhiệt độ lạnh khoảng 4°C. Các phương án khác theo sáng chế bao gồm các chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực với nồng độ được duy trì ở mức nằm trong khoảng từ khoảng 3 lần đến khoảng 10 lần hiệu giá của virus sau vài giờ (ví dụ 20 giờ) ở nhiệt độ khoảng 37°C so với các chế phẩm khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem, các Fig.4 và 5). Các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế làm giảm sự thoái biến của virus sống đã được làm giảm độc lực khi chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 37°C.

Các phương án khác của sáng chế đề cập đến các kit để làm giảm sự bất hoạt của chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vật chứa; và chế phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều protein, một hoặc nhiều sacarit hoặc các chất polyol, và một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO, trong đó chế phẩm làm giảm sự mất sự hoạt tính và/hoặc thoái biến virus sống đã được làm giảm độc lực. Theo các phương án này, chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất protein là albumin huyết thanh; một hoặc nhiều chất sacarit là trehaloza; và một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO. Ngoài ra, chế phẩm cho kit được đề xuất theo sáng chế có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, virus ecpet, hoặc Poxvirus. Theo một số phương án, các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm trehaloza làm chất sacarit. Theo các phương án này, nồng độ trehaloza có thể bằng hoặc lớn hơn 5% trọng lượng/thể tích. Theo một số phương án, các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất copolyme poloxame 407, Pluronic F127® làm chất copolyme khối EO-PO. Theo các phương án này, nồng độ copolyme poloxame 407, Pluronic F127® có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 4 % trọng lượng/thể tích.

Theo các phương án khác, các chế phẩm được đề xuất có thể chứa các cation hóa trị hai ở mức vi lượng hoặc không chứa các cation hóa trị hai. Ví dụ, các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể chứa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ở mức vi lượng hoặc không chứa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ dưới đây được sử dụng để minh họa sáng chế và để làm rõ thêm cho một số phương án của sáng chế. Các phương án có thể được hiểu rõ hơn khi xem các hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết ở đây.

Fig.1 là biểu đồ mẫu của các thử nghiệm sử dụng các chế phẩm khác nhau để kiểm tra độ ổn định của virus mẫu, flavivirus DEN-2 PDK 53, trong các chế phẩm.

Fig.2 là đồ thị mẫu phân tích động lực học của virus mẫu, flavivirus DEN-2 PDK 53, đối với sự bất hoạt của virus ở nhiệt độ 37° C trong các chế phẩm mẫu khác nhau.

Fig.3 là biểu đồ mẫu phân tích của virus mẫu, virus DEN-2 PDK 53, được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 21 giờ. Các trị số được thể hiện là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus còn lại sau khi ủ so với hiệu giá ban đầu. Các tỷ lệ phần trăm của chế phẩm là theo tỉ lệ trọng lượng/thể tích của tá được tương ứng.

Fig.4 thể hiện biểu đồ mẫu phân tích của virus mẫu, virus DEN-2 PDK 53, được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 23 giờ trong các chế phẩm khác nhau. Các trị số được thể hiện là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus còn lại sau khi ủ so với hiệu giá ban đầu.

Fig.5 thể hiện biểu đồ mẫu phân tích virus mẫu, virus DEN-2 PDK 53, được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 23 giờ trong các chế phẩm khác nhau. Các trị số được thể hiện là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus còn lại sau khi ủ so với hiệu giá ban đầu. Hai cột cho mỗi chế phẩm thể hiện mức độ sao chép trong thực nghiệm này.

Fig.6 thể hiện sự phân tích biểu đồ mẫu của virus mẫu, virus DEN-2 PDK 53, sau các chu kỳ làm lạnh - rã đông khi được bảo quản trong các chế phẩm khác nhau. Các trị số được thể hiện là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus còn lại sau các chu kỳ làm lạnh - rã đông so với hiệu giá ban đầu.

Fig.7 là đồ thị mẫu phân tích động lực học của virus mẫu, flavivirus tái tổ hợp DEN-2 PDK 53/WN, trong các chế phẩm mẫu khác nhau đối với sự bất hoạt của virus ở nhiệt độ 25°C qua thời gian vài tuần.

Fig.8 là đồ thị mẫu phân tích động lực học của virut mẫu, flavivirut tái tổ hợp DEN-2 PDK 53/WN, trong các chế phẩm mẫu khác nhau đối với sự bất hoạt của virut ở nhiệt độ 4° C qua thời gian vài tuần.

Fig.9 là phân tích biểu đồ mẫu của virut mẫu, virut DEN-2 PDK-53, sau khi làm khô đông lạnh trong các chế phẩm mẫu khác nhau. Mức độ bất hoạt của virut được đánh giá như đã mô tả ở trên sau hai tuần ở các nhiệt độ khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, từ số ít có thể bao hàm cả nghĩa số nhiều.

Như được sử dụng ở đây, “khoảng” có thể là khoảng giá trị bao gồm cả các trị số cộng hoặc trừ năm phần trăm, ví dụ, “khoảng” 100 thì có nghĩa là có thể nằm trong khoảng từ 95 đến 105.

Như được sử dụng ở đây, các chất “sacarit” có thể nghĩa là một hoặc nhiều monosacarit, (ví dụ, glucoza, galactoza, riboza, manosa, rhamnoza, taloza, xyloza, hoặc allose arabinoza.), một hoặc nhiều disacarit (ví dụ, trehaloza, sucroza, maltoza, isomaltoza, xenlibioza, gentiobioza, laminariboza, xylobioza, manobioza, lactoza, hoặc fructoza.), các trisacarit (ví dụ, acarboza, raffinosa, melizitoza, panoza, hoặc cellotrioza) hoặc các polyme đường (ví dụ, dextran, xanthan, pullulan, các xyclodextrin, amyloza, amylopectin, tinh bột, xenlooligosacarit, xenluloza, maltooligosacarit, glycogen, chitosan, hoặc chitin).

Như được sử dụng ở đây, các chất “polyol” có thể nghĩa là bất kỳ rượu đường nào (ví dụ, manitol, sorbitol, arabitol, erythritol, maltitol, xylitol, glycol, polyglyxitol, polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc glyxerol). Như được sử dụng ở đây, “các chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao” có nghĩa là phân tử lưỡng tính, có hoạt tính bề mặt có trọng lượng phân tử lớn hơn 1500.

Như được sử dụng ở đây, “copolyme khối EO-PO” có thể nghĩa là copolyme bao gồm các khối poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit). Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, “Pluronic” có thể nghĩa là các copolyme khối EO-PO theo cấu trúc EOx-

POy-EOx. Cấu hình này của copolyme khối EO-PO còn được gọi là “Poloxame” hoặc “Synperonic”.

Như được sử dụng ở đây, “virus được làm yếu đi” có thể nghĩa là virus gây biểu hiện dấu hiệu lâm sàng yếu hoặc không gây biểu hiện dấu hiệu lâm sàng khi được đưa vào động vật.

Trong các phần dưới đây, các chế phẩm và các phương pháp mẫu khác nhau được mô tả để thể hiện chi tiết các các phương án khác nhau của sáng chế. Rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là, việc thực hiện các phương án khác nhau của sáng chế không cần phải sử dụng tất cả hoặc thậm chí một số chi tiết cụ thể được mô tả ở đây, mà các trị số về nồng độ, thời gian và các chi tiết cụ thể khác có thể thay đổi thông qua thực nghiệm thông thường. Trong một số trường hợp, các phương pháp hoặc các thành phần đã biết rõ không được đề cập đến ở đây.

Độ ổn định của các vaccin flavivirus được đánh giá đối với các virus sống đã được làm giảm độc lực gây bệnh sốt vàng và viêm não Nhật Bản đang hiện hữu. Khi được kiểm tra trong năm 1987, chỉ 5 trong 12 vaccin bệnh sốt vàng được sản xuất khi đó đáp ứng được các tiêu chuẩn tối thiểu về độ ổn định. Sau đó, việc thêm vào hỗn hợp của đường, axit amin và cation hóa trị hai được chứng minh là có tác dụng làm ổn định vaccin đã làm khô đông lạnh, để mức độ tổn thất vaccin ít hơn 1 loga của độ hiệu lực sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 14 ngày. Việc làm ổn định các chế phẩm được làm khô đông lạnh cho vaccin bệnh sốt vàng đã được bộc lộ (ví dụ xem patent Mỹ số 4,500,512). Patent Mỹ số 4,500,512, mô tả sự kết hợp của lactoza, sorbitol, các cation hóa trị hai, canxi và magie, và ít nhất một axit amin. Trong khi chế phẩm này có thể giúp làm ổn định vaccin đã làm khô đông lạnh, nó lại không thể làm ổn định vaccin dạng nước. Nghiên cứu khác đã khảo sát khả năng của vài chế phẩm khác nhau bao gồm các chế phẩm đã mô tả ở trên và tác động của sucroza, trehaloza và lactalbumin lên độ ổn định của vaccin bệnh sốt vàng được làm khô đông lạnh. Các chế phẩm bao gồm sucroza đơn 10%, sorbitol 2% với inositol 4%, hoặc sucroza 10% với lactalbumin 5%, CaCl_2 0,1g/l và MgSO_4 0,076 g/l được thấy tạo ra độ ổn định tốt nhất (ví dụ, xem Adebayo, Sim-Brandenburg và các đồng tác giả. 1998). Tuy nhiên, trong tất cả các trường hợp sau khi tạo lại hỗn dịch, vaccin phòng bệnh sốt vàng vẫn rất không ổn định và phải được loại bỏ chỉ sau khoảng một giờ (ví dụ, xem Monath

1996; Adebayo, Sim-Brandenburg và các đồng tác giả. 1998). Điều này dẫn tới sự lãng phí vaccin và khả năng việc cung cấp vaccin không hiệu quả ở các điều kiện thực địa, nếu vaccin không ổn định được sử dụng.

Các vaccin flavivirut sống đã được làm giảm độc lực khác để bảo vệ chống lại virut gây bệnh viêm não Nhật Bản được cấp phép và sử dụng phổ biến ở Trung Quốc (ví dụ, xem Halstead và Tsai 2004). Dạng vaccin viêm não Nhật Bản, SA 14-14-2, được phát triển đầu tiên trên các tế bào thận của chuột đồng và dịch nổi tế bào được thu lại và được lọc thô. Một chế phẩm đã biết bao gồm gelatin 1% và sorbitol 5% được thêm vào làm chất ổn định. Sử dụng các chất ổn định này, vaccin được làm khô đông lạnh và sau đó là ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 tới 8°C trong khoảng thời gian ít nhất là 1,5 năm, nhưng chỉ ổn định trong khoảng thời gian 4 tháng ở nhiệt độ trong phòng và trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ 37°C. Như với vaccin bệnh sốt vàng, vaccin được hoàn nguyên trong nước lại rất không bền và chỉ ổn định trong khoảng thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, xem Wanf, Yang và các đồng tác giả 1990). Theo một số phương án, các chế phẩm flavivirut sống được làm giảm độc lực để làm ổn định hoặc làm giảm mức độ thoái biến của vaccin viêm não Nhật Bản được đề xuất.

Không có chế phẩm nào cho vaccin flavivirut sống đã được làm giảm độc lực mà tạo ra độ ổn định trong thời gian dài cho các chế phẩm được làm khô đông lạnh ở các nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ 2 - 8° C. Ngoài ra, không có chế phẩm nào đã được bộc lộ nào mà có khả năng ngăn tổn thất hiệu giá, làm ổn định hoặc làm giảm sự thoái biến của các vaccin dạng nước trong khoảng thời gian lớn hơn vài giờ.

Các chế phẩm cho các virut sống đã được làm giảm độc lực khác cũng đã được mô tả (ví dụ, xem Burke, Hsu và các đồng tác giả. 1999). Một chất ổn định thông thường khác, có tên là SPGA, là hỗn hợp của sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 10%, phosphat, kali glutamat và albumin huyết thanh có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2% (ví dụ, xem Bovarnick, Miller và các đồng tác giả. 1950). Các biến thể khác nhau của chế phẩm cơ bản này đã được xác định bằng việc sử dụng các cation khác nhau, thay sucroza bằng sản phẩm thủy phân tinh bột hoặc dextran, thay albumin huyết thanh bằng sản phẩm thủy phân casein hoặc poly-vinyl pyrolidon. Các chế phẩm khác sử dụng gelatin bị thủy phân thay cho albumin huyết thanh để làm

nguồn protein (Burke, Hsu và các đồng tác giả 1999). Tuy nhiên, gelatin có thể gây các phản ứng dị ứng cho trẻ em đã được miễn dịch và có thể gây các trường hợp bất lợi liên quan tới vaccin. Patent Mỹ số 6,210,683 mô tả sự thay thế albumin được tinh chế từ huyết thanh của người trong các chế phẩm vaccin bằng albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người.

Các phương án theo sáng chế bộc lộ các chế phẩm làm tăng độ ổn định và/hoặc làm giảm sự thoái biến của các vaccin virus sống đã được làm giảm độc lực so với các vaccin đã biết. Một số chế phẩm được bộc lộ trong bản sáng chế này tạo ra độ ổn định cho các virus trong nước trong khoảng thời gian đến 2 giờ; đến 3 giờ; đến 4 giờ; và trong khoảng thời gian lớn hơn 4 giờ ở nhiệt độ khoảng 37°C. Một số chế phẩm được bộc lộ trong bản sáng chế này tạo ra độ ổn định cho các virus trong nước trong khoảng thời gian lên đến 1 ngày, cho đến trong khoảng thời gian khoảng 1 tuần hoặc lâu hơn, ở nhiệt độ khoảng nhiệt độ trong phòng (ví dụ, 25°C). Các phương án theo sáng chế đề xuất việc tăng mức độ bảo vệ các virus sống đã được làm giảm độc lực, ví dụ, làm đông lạnh và/hoặc rã đông, và/hoặc ở các nhiệt độ cao. Theo một số phương án, các chế phẩm theo sáng chế có thể làm ổn định, làm giảm sự thoái biến và/hoặc ngăn sự bất hoạt của các sản phẩm virus sống được làm giảm độc lực đã được loại nước ở các điều kiện nhiệt độ trong phòng (ví dụ, khoảng 25°C). Theo các phương án khác, các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể làm ổn định, làm giảm sự thoái biến và/hoặc ngăn sự bất hoạt của các sản phẩm virus sống được làm giảm độc lực ở nhiệt độ khoảng 25°C hoặc lên đến nhiệt độ khoảng 37°C. Các chế phẩm và các phương pháp được bộc lộ ở đây có thể tạo thuận lợi cho sự bảo quản, phân phối và sử dụng các vaccin virus ở các khu vực đang phát triển và chậm phát triển.

Các phương án khác của sáng chế có thể bao gồm các chế phẩm cho các vaccin chống virus giảm độc lực sống bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các Picornavirus (ví dụ, virus gây bệnh nhiễm khuẩn, virus gây bệnh chân tay miệng), Calicivirus (ví dụ, virus SARS, và virus gây bệnh viêm màng bụng truyền nhiễm), Togavirus (ví dụ, virus sindbis, virus gây bệnh viêm não ở ngựa, virus gây bệnh chikungunya, virus gây bệnh sởi rubella, virus sông Ross, virus gây bệnh tiêu chảy ở bò, virus gây dịch tả lợn), các Flavivirus (ví dụ, virus gây bệnh danga, virus Tây sông Nile, virus gây bệnh sốt vàng, virus gây bệnh viêm não Nhật Bản, virus gây bệnh viêm não St. Louis, virus

gây bệnh viêm não do ve truyền), các Coronavirut (ví dụ, các Coronavirut ở người (cảm lạnh thông thường), virut gây viêm dạ dày ruột ở lợn), các Rhabdovirut (ví dụ, virut gây bệnh dại, virut gây bệnh viêm miệng có mụn nước), các Filovirut (ví dụ, virut Marburg, virut Ebola), Paramyxovirut (ví dụ, virut gây bệnh sởi, virut gây bệnh sốt ho của chó, virut quai bị, virut gây bệnh khó thở của trẻ em, virut hợp bào hô hấp, virut gây bệnh Niucatxon, virut gây bệnh dịch tả ở trâu bò), các Orthomyxovirut (ví dụ, các virut gây bệnh cúm ở người, các virut gây bệnh cúm chim, các virut gây bệnh cúm của ngựa), các Bunyavirut (ví dụ, hantavirut, virut LaCrosse, virut gây sốt ở vùng thung lũng Rift), các Arenavirut (ví dụ, virut Lassa, virut Machupo), các Reovirut (ví dụ, các reovirut ở người, rotavirut ở người), các Birnavirut (ví dụ, bệnh Gumboro, virut gây hoại tử tuyến tụy ở cá), các Retrovirut (ví dụ, HIV 1, HIV 2, HTLV-1, HTLV-2, virut gây bạch cầu ở bò, virut gây suy giảm miễn dịch ở mèo, virut xacôm ở mèo, virut u tuyến vú chuột), các Hepadnavirut (ví dụ, virut gây bệnh viêm gan B), các Parvovirut (ví dụ, parvovirut B ở người, parvovirut ở chó, virut gây viêm ruột truyền nhiễm của mèo), các Papovavirut (ví dụ, các papillomavirut ở người, SV40, các papillomavirut ở bò), các Adenovirut (ví dụ, adenovirut ở người, adenovirut ở chó, adenovirut ở bò, adenovirut ở lợn), các virut ecpet (ví dụ, virut gây mụn giộp sinh dục, virut gây bệnh thủy đậu, virut gây Bệnh viêm mũi khí quản truyền nhiễm ở bò, cytomegalovirut ở người, virut ecpet 6 ở người), và các Poxvirut (ví dụ, virut vaccinia, các fowlpoxvirut, poxvirut gây bệnh ở gấu trúc Mỹ, virut gây bệnh skunkpox, monkeypoxvirut, virut vaccinia, virut u mềm lây).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các chế phẩm hoặc các công thức ở đây gắn với các virut đã được giảm độc lực bằng bất kỳ phương thức nào, bao gồm nhưng không hạn chế chỉ là, cấy chuyển tế bào, tái sắp xếp vật liệu di truyền, đưa vào những đột biến trong các dòng vô tính lây nhiễm, di truyền ngược, thao tác tái tổ hợp ADN hoặc ARN khác. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các phương án khác liên quan tới các virut mà được xử lý để biểu hiện các protein hoặc ARN bất kỳ nào khác bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các flavivirut tái tổ hợp, adenovirut tái tổ hợp, poxvirut tái tổ hợp, retrovirut tái tổ hợp, virut liên quan đến adeno tái tổ hợp và virut ecpet tái tổ hợp. Các virut này có thể được sử dụng làm phòng ngừa các virut gây bệnh, vaccin để chữa trị bệnh ung thư, hoặc virut được đưa vào để biểu hiện protein

hoặc ARN (ví dụ, liệu pháp gen, liệu pháp đổi mã, liệu pháp ribozym hoặc liệu pháp ARN ức chế tế bào nhỏ) để chữa trị các rối loạn.

Theo một số phương án, các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều virus được bao (ví dụ, các virus có màng bao) bao gồm các họ Togavirut, Flavivirut, Coronavirut, Rhabdovirut, Filovirut, Paramyxovirut, Orthomyxovirut, Bunyavirut, Arenavirut, Retrovirut, Hepadnavirut, Virus ecpet hoặc Poxvirut. Theo một số phương án, các chế phẩm chứa một hoặc nhiều virus ARN có vỏ bọc là các họ Togavirut, Flavivirut, Coronavirut, Rhabdovirut, Filovirut, Paramyxovirut, Orthomyxovirut, Bunyavirut, Arenavirut, hoặc Retrovirut. Theo các phương án khác, các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều virus ARN sợi dương tính có vỏ bọc bao gồm các họ Togavirut, Flavivirut, Coronavirut, hoặc Retrovirut. Theo một số phương án, các chế phẩm có thể chứa một hoặc nhiều Flavivirut sống đã được làm giảm độc lực (ví dụ, virus gây bệnh danga, virus Tây sông Nile, virus gây bệnh sốt vàng, hoặc virus virus gây bệnh viêm não Nhật Bản).

Một số phương án của sáng chế đề cập đến các chế phẩm cho các virus sống đã được làm giảm độc lực ở dạng nước hoặc được làm khô đông lạnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các chế phẩm cải thiện sự ổn định nhiệt của virus và ngăn sự bất hoạt khi làm lạnh - rã đông sẽ cải thiện các sản phẩm ở dạng lỏng, ở dạng bột, được đông lạnh-làm khô hoặc được làm khô đông lạnh và được bào chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau khi hoàn nguyên trong nước, các vaccin đã được làm ổn định này có thể được cung cấp theo các đường dùng thuốc khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự cung cấp trong da, dưới da, trong cơ, qua mũi, cung cấp qua phổi hoặc qua đường miệng. Các dụng cụ khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được dùng để phân phối vaccin bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ống tiêm và kim tiêm, kim hai nhánh, cung cấp bằng bơm hoặc miếng dán da, cung cấp bằng cách phun không cần kim, phân phối bằng hạt qua da, hoặc cung cấp bằng bột dạng sol khí.

Các phương án theo sáng chế có thể bao gồm các chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực (như đã mô tả ở trên) và hỗn hợp của một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao và một hoặc nhiều protein trong chất đệm chấp nhận được về mặt sinh lý. Theo một số phương án, các

chế phẩm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực, một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao, một hoặc nhiều protein, và một hoặc nhiều hydrat cacbon, trong chất đệm chấp nhận được về mặt sinh lý.

Theo các phương án khác, các chế phẩm có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao để làm tăng độ ổn định nhiệt của các virus sống đã được làm giảm độc lực. Các chất hoạt động bề mặt được đưa vào các chế phẩm vaccin để ngăn sự mất thuốc do bám lên bề mặt như các lọ nhỏ bằng thủy tinh (ví dụ, xem Burke, Hsu và các đồng tác giả. 1999). Tuy nhiên, một số phương án của sáng chế đề xuất các chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao có các tính chất sinh học đáng chú ý hữu ích cho các chế phẩm và các phương pháp được bộc lộ ở đây. Các copolyme khối EO-PO có thể bao gồm các khối polyetylen oxit (EO được chỉ định là $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) và polypropylen oxit (PO được chỉ định là $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-$). Khối PO có thể được hai khối EO nằm bên sườn trong bố trí $\text{EO}_x\text{-PO}_y\text{-EO}_x$. Vì thành phần PO có tính hút nước và thành phần EO kỵ nước, toàn bộ tính kỵ nước, trọng lượng phân tử và các tính chất của chất hoạt động bề mặt có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi x và y trong cấu trúc khối $\text{EO}_x\text{-PO}_y\text{-EO}_x$. Trong các dung dịch nước, các copolyme khối EO-PO sẽ tự lắp ráp vào các mixen với lõi PO và vành bao gồm các nhóm EO kỵ nước. Các chế phẩm copolyme khối EO-PO được nghiên cứu làm các chất phân phối thuốc hiệu quả đối với nhiều loại thuốc kỵ nước và đối với protein, ADN hoặc các vaccin đã bị bất hoạt (ví dụ, Todd, Lee và các đồng tác giả. 1998; Kabanov, Lemieux và các đồng tác giả. 2002). Ở các nồng độ cao (ví dụ: > hơn 10%) đã biết của các copolyme khối EO-PO có trọng lượng phân tử cao hơn sẽ trải qua sự gel hoá ngược, tạo thành gel như sự các sự tăng nhiệt độ. Sự tạo thành gel ở các nhiệt độ cơ thể cho phép sử dụng các gel copolyme khối EO-PO để hoạt động với vai trò là kho chứa các ứng dụng phân phối thuốc và vaccin (ví dụ, xem Coeshott, Smithson và các đồng tác giả. 2004). Ngoài ra, vì các tính chất hoạt động bề mặt của chúng, các polyme này được sử dụng trong các chế phẩm tá dược, và làm chất nhũ hóa trong các kem và gel được áp dụng tại chỗ. Các copolyme khối EO-PO cũng được thấy để chữa lành nhanh vết thương và bỏng và để gắn các màng tế bào sau khi bị phá hủy gián tiếp bởi nhiệt hoặc xung điện.

Theo các phương án khác, các chế phẩm vaccin có thể bao gồm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt với trọng lượng phân tử là 1500 hoặc lớn hơn. Theo phương án đã biết, chất hoạt động bề mặt là copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen (hoặc copolyme khối EO-PO), không phải là ion, kỵ nước. Trong khi các khối copolyme khối EO-PO được sử dụng làm các tá dược và phân phối tá dược cho các vaccin bị bất hoạt, các vaccin protein hoặc các vaccin ADN, sự sử dụng của chúng ngăn sự bất hoạt của virus sống không được đoán trước trong nghiên cứu. Theo một số phương án, chế phẩm có thể chứa một hoặc nhiều polyme EO-PO với trọng lượng phân tử 3000 hoặc lớn hơn. Theo các phương án khác, chế phẩm có thể bao gồm một phần copolyme khối EO-PO copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] hoặc copolyme poloxame 403, Pluronic P123. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các biến đổi của các chất hoạt động bề mặt có thể được tạo ra bằng phương pháp hóa học. Điều được đề xuất theo sáng chế là bất kỳ các polyme làm chất hoạt động bề mặt tương đương nào cơ bản đều được xem xét.

Các phương án theo sáng chế có thể bao gồm các chế phẩm của một hoặc nhiều virus sống đã được làm giảm độc lực, một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt và một hoặc nhiều protein. Theo một số phương án, protein có thể là albumin. Albumin huyết thanh là một trong các protein phổ biến nhất trong máu động vật có xương sống và có nhiều chức năng. Protein là các axit amin 585 với trọng lượng phân tử là 66500. Albumin huyết thanh người không bị glycoxyl hóa và có nhóm thiol đơn tự do liên quan tới một số trong vô số hoạt tính liên kết. Albumin huyết thanh chủ yếu là α -helix với ba miền cấu trúc, mỗi miền được chia nhỏ thành hai miền con. Albumin được biết tới để liên kết đặc hiệu các phân tử khác nhau, bao gồm các thuốc như aspirin, ibuprofen, halothan, propofol và warfarin cũng như các axit béo, các axit amin, các steroid, glutathion, các kim loại, bilirubin, lysolexithin, hematin, và các prostaglandin. Các miền cấu trúc khác nhau được đưa vào trong liên kết thuốc; hầu hết các thuốc có phân tử nhỏ và các hoóc môn liên kết với một trong hai vị trí sơ cấp được đặt trong các miền con IIA và IIIA. Do thiếu sự tạo miễn dịch của mình, albumin thường được sử dụng làm protein mang trong các sản phẩm sinh học. Vì liều lượng protein được chứa trong vaccin virus sống được làm giảm độc lực có thể là những phân đoạn microgram (nhận được từ 10^3 tới 10^5 các phần nhỏ của virus), protein mang trợ được sử dụng để ngăn sự mất mát do sự hấp thụ và liên kết không đặc hiệu với thủy tinh, chất dẻo hoặc

các bề mặt khác. Tuy nhiên, như đã giải thích ở đây, sự cải thiện bất ngờ về độ ổn định được quan sát thấy với sự kết hợp của albumin và các copolyme khối EO-PO đề xuất những tương tác lẫn nhau giữa hai thành phần và/hoặc giữa các thành phần và các phần nhỏ của virus. Ngoài ra, sự ổn định của virus được nâng cao với sự có mặt của albumin là không thích hợp vì chức năng protein mang nói chung: các protein khác như gelatin và lactoferrin không cải thiện được độ ổn định của virus.

Theo một số phương án, albumin huyết thanh có thể từ người hoặc nguồn động vật có vú khác. Đối với các vaccine được sử dụng cho người, các phương án cụ thể có thể bao gồm albumin người hoặc các sản phẩm của người khác như được cần để giảm hoặc loại bỏ các đáp ứng miễn dịch bất lợi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các albumin đặc hiệu cho mỗi dạng có thể được sử dụng trong các vaccine động vật (ví dụ albumin của chó cho các sản phẩm của chó, albumin của bò đối với các sản phẩm của bò). Theo các phương án thực hiện thêm nữa, protein là albumin tái tổ hợp ở người. Các phương pháp chuẩn tồn tại để ép albumin tái tổ hợp ở người hoặc các phần của nó trong các hệ ép khác nhau bao gồm vi khuẩn, men, tảo, thực vật, tế bào động vật có vú hoặc các hệ chuyển gen ở động vật. Ngoài ra, albumin huyết thanh hoặc các phần của chúng có thể được tạo ra trong các hệ không có tế bào hoặc được tổng hợp hóa học. Albumin tái tổ hợp ở người được tạo ra trong này hoặc trong bất kỳ hệ tương tự nào được đưa vào đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ rằng các protein khác có thể thế cho albumin. Ví dụ, albumin là thành viên thuộc họ gia đình đa gen. Do cấu trúc của chúng và các sự tương tự liên tiếp, các thành viên khác thuộc họ này (ví dụ, α -fetoprotein, protein liên kết vitamin D, hoặc afamin) có thể thế cho albumin trong các chế phẩm và các phương pháp được đề xuất theo sáng chế. Đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ hiểu rõ rằng các biến đổi có thể được tạo ra đối với albumin bởi bất kỳ phương thức nào được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bằng biến đổi sau dịch mã, bởi sự cắt bỏ protein phân giải và/hoặc các phương thức hóa học. Các nhóm thế và các sự thay đổi cho albumin cung cấp chức năng ổn định tương đương cơ bản cho albumin huyết thanh mà không cần nhóm thế và các thay đổi được đề xuất theo sáng chế.

Trong một số phương án của sáng chế, mô tả các chế phẩm có chất hoạt động bề mặt trọng lượng phân tử cao, protein và hydrat cacbon trong chất đệm chấp nhận được về mặt sinh lý. Theo một số phương án thực hiện, hydrat cacbon là đường hoặc polyol. Các đường có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các monosacarit, (ví dụ, glucoza, galactoza, riboza, mannoza, rhamnoza, taloza, xyloza hoặc aloza arabinosa), các disacarit (ví dụ, trehaloza, sucroza, maltoza, isomaltoza, xenlibioza, gentiobioza, laminariboza, xylobioza, manobioza, lactoza, hoặc fructoza.), các trissacarit (ví dụ, acarboza, raffinosa, melizitoza, panoza, hoặc xenlotrioza) hoặc các polyme đường (ví dụ, dextran, xanthan, pullulan, các xyclodextrin, amyloza, amylopectin, tinh bột, các xenloologosacarit, xenluloza, các maltooligosacarit, glycogen, chitosan, hoặc chitin). Các polyol có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, manitol, sorbitol, arabitol, erythritol, maltitol, xylitol, glycitol, glycol, polyglycitol, polyetylen glycol, polypropylen glycol, và glyxerol.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, các chế phẩm có thể chứa tổ hợp của một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO, một hoặc nhiều protein, và trehaloza trong chất đệm được dụng. Theo một số phương án, trehaloza có thể có mặt ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 50% trọng lượng/thể tích. Trehaloza được sử dụng để làm tăng độ ổn định của các chế phẩm protein. Được biết tới rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này là quá trình làm lạnh các tế bào và toàn bộ các mô ở nhiệt độ dưới không và được sử dụng trong tự nhiên để bảo vệ các sinh vật khỏi sự căng thẳng. Các sinh vật Anhydrobiotic có thể chịu được các điều kiện nước thấp chứa các lượng lớn trehaloza. Trehaloza được thấy để ngăn cả hai trường hợp dung hợp màng và các sự chuyển tiếp pha có thể gây ra sự mất ổn định màng trong suốt lúc làm khô. Phân tích cấu trúc gợi ý rằng trehaloza phù hợp tốt giữa các nhóm có đầu phân cực trong các lớp màng đôi lipid. Trehaloza cũng ngăn sự biến chất của các protein dễ hủy trong lúc làm khô. Người ra nghĩ rằng trehaloza làm ổn định các protein bởi liên kết hydro với các phần còn lại của protein phân cực. Trehaloza là disacarit bao gồm hai phân tử glucoza theo liên kết 1:1. Do liên kết 1:1, trehaloza là không đáng kể hoặc không có khả năng khử và do đó cơ bản là không có phản ứng với các axit amin và các protein. Sự thiếu hoạt động giảm này có thể nâng cao tác dụng ổn định của trehaloza lên các protein. Theo một số phương án, trehaloza tạo ra độ ổn định cho các virus sống đã được làm giảm

độc lực. Hoạt tính này của trehaloza có thể là do khả năng của nó làm ổn định cả các màng và các vỏ protein của các virus.

Theo các phương án khác, các chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO, một hoặc nhiều protein và một hoặc nhiều hydrat cacbon, ở đó một trong các hydrat cacbon là chitosan, trong chất đệm được dùng để tạo ra độ ổn định được cải thiện đối với các virus sống đã được làm giảm độc lực. Theo một số phương án, các chế phẩm có thể bao gồm chitosan ở các nồng độ trong khoảng từ 0,001 tới 2% (ví dụ ở pH khoảng 6,8). Chitosan là cation polysaccharit nhận được bằng cách khử sự axetyl hóa chitin, polyme cấu trúc của các bộ xương ngoài loài giáp xác. Nó là polyme của N-axetyl-glucosamin và glucosamin; hàm lượng của hai hydrat cacbones phụ thuộc vào phạm vi khử sự axetyl hóa. Điện tích dương của Chitosan cho phép nó gắn với bề mặt được tích điện âm và các phân tử. Do đó, nó gắn với các bề mặt niêm mạc và nhờ đó cải thiện sự hấp thụ ở niêm mạc. Chitosan cũng có thể liên kết và tạo thành các hạt nano với ADN, ARN và các oligonucleotit khác và được sử dụng trong phân phối gen không virus. Một số phương án của sáng chế ở đây chứng tỏ chitosan làm tăng độ ổn định của virus sống đã được làm giảm độc lực.

Theo một số phương án, các chế phẩm có thể được mô tả là thường bao gồm chất đệm được dùng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận thấy rằng các chất đệm được dùng khác nhau tồn tại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đệm chứa phosphat, TRIS, MOPS, HEPES, bicacbonat, các đệm khác được biết đến trong lĩnh vực này và tổ hợp các chất đệm khác. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận thấy rằng điều chỉnh nồng độ muối tới gần các mức được lý (ví dụ, nước muối hoặc tổng muối 0,15M) có thể là tối ưu để đưa các chế phẩm vào ngoài ruột để ngăn sự phá hủy tế bào và/hoặc đau ở vị trí tiêm. Người có trình độ trong lĩnh vực kỹ thuật nhận thấy rằng các nồng độ hydrat cacbon tăng, các nồng độ muối có thể bị giảm đi để duy trì nồng độ mol tương đương đối với chế phẩm. Theo một số phương án, môi trường đệm với pH lớn hơn 6,8 được dự kiến; một số virus sống đã được làm giảm độc lực (ví dụ các flavivirus) là không ổn định ở pH thấp. Theo các phương án khác, chất đệm được dùng có thể là nước muối đệm phosphat (PBS).

Một số chế phẩm vaccin virus sống được làm giảm độc lực là các chế phẩm làm tăng độ ổn định và/hoặc giảm sự thoái hóa của virus sống đã được làm giảm độc lực cùng với sự tạo miễn dịch được giảm đi hoặc không tạo miễn dịch. Theo các phương án này, các chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất protein; một hoặc nhiều sacarit hoặc các chất polyol; và một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử cao, trong đó chế phẩm giảm sự mất hoạt động của virus sống đã được làm giảm độc lực. Do đó, các chế phẩm đã biết được đề xuất theo sáng chế làm giảm đi phản ứng bất lợi khi được cung cấp vào chủ thể. Trong một số chế phẩm mẫu, (các) chất hoạt động bề mặt bao gồm một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO; các chất protein được chọn từ nhóm bao gồm lactalbumin, albumin huyết thanh, α -fetoprotein, protein liên kết vitamin D, afamin nhận được từ các dạng động vật có xương sống; và (các) chất hydrat cacbon là một hoặc nhiều sacarit và/hoặc polyol. Theo một số phương án, các chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều (chất) hydrat cacbon được chọn từ nhóm bao gồm trehaloza, sucroza, chitosan, sorbitol, và manitol. Trong các phương án thực hiện đặc biệt hơn, để làm giảm phản ứng miễn dịch đối với vaccin, albumin huyết thanh có thể nhận được từ các dạng động vật có xương sống hoặc Theo các phương án khác, từ các nguồn tương tự như chủ thể (ví dụ, người). Trong các phương án khác của sáng chế, chất hydrat cacbon là trehaloza. Trong các phương án khác của sáng chế, ít nhất một chất hoạt động bề mặt là copolyme khối EO-PO copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®]. Trong một số chế phẩm vaccin virus sống được làm giảm độc lực, ít nhất một chất hydrat cacbon là trehaloza. Trong một số các chế phẩm vaccin virus sống được làm giảm độc lực bao gồm, copolyme khối EO-PO copolyme poloxame 407 Pluronic F127[®] với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 tới 4% trọng lượng/thể tích; và/hoặc nồng độ albumin huyết thanh nằm trong khoảng từ 0,001 đến 3% trọng lượng/thể tích và/hoặc nồng độ trehaloza có thể nằm trong khoảng từ 5 tới 50% trọng lượng/thể tích.

Các được phẩm

Sáng chế theo các phương án của nó đề xuất việc cho đối tượng cần sử dụng chế phẩm ở dạng tương hợp sinh học thích hợp để sử dụng chế phẩm in vivo. Thuật ngữ "dạng tương hợp sinh học thích hợp cho sự cung cấp được lý ở trong cơ thể sống" được hiểu là dạng của hoạt chất (ví dụ, chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực

của các phương án thực hiện) được sử dụng trong đó các tác dụng chữa bệnh của hoạt chất có tác dụng hơn bất kỳ tác dụng độc tính nào. Việc sử dụng lượng các chế phẩm chữa bệnh có hoạt tính chữa bệnh được xác định định nghĩa như là lượng có hiệu quả, ở các liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Ví dụ, lượng hoạt tính chữa bệnh của hợp chất có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng của bệnh, tuổi, giới tính và khối lượng của người bệnh. Chế độ liều lượng có thể được điều chỉnh để cung cấp đáp ứng chữa bệnh tối ưu.

Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, chất hoá dược, protein, peptit theo phương án thực hiện) có thể được cung cấp theo cách thức thông thường như dưới da, trong tĩnh mạch, bằng cách cung cấp qua đường miệng, xông, áp dụng qua da, áp dụng qua âm đạo, áp dụng tại chỗ, cung cấp trong mũi hoặc trực tràng. Theo phương án đặc biệt hơn, hợp chất có thể được cung cấp bằng đường miệng hoặc dưới da. Theo các phương án khác, hợp chất có thể được cung cấp trong tĩnh mạch. Trong một phương án khác của sáng chế, hợp chất có thể được cung cấp trong mũi, như là xông.

Hợp chất có thể được cung cấp cho đối tượng với chất mang hoặc chất làm loãng thích hợp, được cung cấp đồng thời với chế phẩm. Thuật ngữ "chất mang dược dụng" như được sử dụng ở đây nhằm để bao gồm các chất làm loãng như nước muối hoặc các dung dịch đệm dạng nước. Hoạt chất cũng có thể được cung cấp ngoài ruột hoặc trong màng bụng. Các chất phân tán cũng có thể được điều chế trong glyxerol, glycol polyetylen lỏng, và các hỗn hợp của trong trong các dầu. Dưới các điều kiện thông thường của sự lưu giữ và sử dụng, những sự điều chế này có thể chứa chất bảo quản để ngăn sự phát triển của các vi sinh vật.

Các thuốc thích hợp để sử dụng cho tiêm có thể được cung cấp bởi các phương thức đã được biết đến trong nghiên cứu. Ví dụ, các dung dịch nước vô trùng (ở đó có thể tan trong nước) hoặc các chất phân tán và các bột vô trùng để điều chế ngay tức thì các dung dịch vô trùng hoặc chất phân tán có thể tiêm được có thể được sử dụng. Trong tất cả các trường hợp, chế phẩm có thể là vô trùng và có thể được chảy tới mức khả năng tiêm dễ dàng có. Ngoài ra nó có thể được bảo vệ thêm chống lại hoạt động làm hư thoái hóa của các vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Chất mang dược dụng có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và tương tự), và các hỗn hợp

thích hợp của chúng. Độ chảy thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lexithin, bằng cách duy trì kích thước hạt được yêu cầu trong trường hợp của chất phân tán và bởi sự sử dụng các chất hoạt động bề mặt.

Các dung dịch tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách đưa hợp hoạt chất vào một lượng với dung môi thích hợp hoặc với một hoặc tổ hợp các thành phần được liệt kê ở trên, như được yêu cầu, sau đó được vô trùng.

Sau khi bào chế, các dung dịch có thể được cung cấp theo cách tương thích với chế phẩm theo liều và với lượng để đảm bảo hiệu quả chữa bệnh. Các chế phẩm được cung cấp một cách dễ dàng dưới dạng các dạng bào chế theo liều khác nhau, ví dụ như dạng dung dịch tiêm đã mô tả ở trên. Đề xuất rằng, các viên nang giải phóng chậm, các vi hạt giải phóng theo thời gian, và các dạng tương tự cũng có thể được sử dụng để cung cấp các chế phẩm theo sáng chế. Các dung dịch nước đặc biệt này đặc biệt thích hợp cho sự cung cấp trong tĩnh mạch, trong cơ, qua da, dưới da, và trong màng bụng.

Các hoạt chất chữa bệnh có thể được bào chế trong hỗn hợp có thể bao gồm với lượng nằm khoảng từ 0,0001 đến 1,0mg, hoặc từ 0,001 đến 0,1mg, hoặc từ 0,1 đến 1,0g hoặc thậm chí từ 1 tới 10g trên một liều. Liều đơn lẻ hoặc nhiều liều cũng có thể được sử dụng theo một kế hoạch thích hợp cho tình huống đã định trước. Theo một số các phương án thực hiện, các liều lượng có thể được cung cấp trước, trong và/hoặc sau khi phơi ra với virus được dự tính trước.

Theo phương án khác, dung dịch hoặc phun qua mũi, các bình phun hoặc xông có thể được sử dụng để phân phối hợp chất quan tâm. Đối với các phương thức cung cấp khác, các chế phẩm thêm vào thích hợp bao gồm các thuốc đạn và các thuốc đặt vào âm đạo phụ nữ cho tan ra. Thuốc đặt vào trực tràng hoặc các thuốc đạn cũng có thể được sử dụng. Nói chung, đối với các thuốc đạn, các chất kết dính truyền thống và các chất mang có thể bao gồm, ví dụ, các polyalkylen glycol hoặc các triglyxerit; các thuốc đạn này có thể được tạo ra từ các hỗn hợp chứa thành phần hoạt tính trong khoảng từ 0,5% tới 10%, tốt hơn là từ 1% tới 2%

Các chế phẩm qua đường miệng bao gồm các tá dược được sử dụng thông thường như, ví dụ, các loại có tính dược bao gồm manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat và tương tự. Trong một số phương án

của sáng chế, các chế phẩm được qua đường miệng có thể bao gồm chất làm loãng tro hoặc chất mang ăn được có thể tiêu hóa được, hoặc có thể được bọc trong viên con nhộng có vỏ gelatin cứng hoặc mềm, hoặc được nén thành các viên thuốc, hoặc có thể được đưa trực tiếp thức ăn theo chế độ. Để cung cấp sự chữa bệnh bằng đường miệng, các hợp hoạt chất có thể được đưa vào với các tá dược và được sử dụng dưới dạng các viên thuốc có thể ăn vào bụng, các viên thuốc uống qua miệng, các viên thuốc ngậm, các viên con nhộng, thuốc luyện đan, các huyền phù, xy rô, bánh xốp, và tương tự. Các chế phẩm này và các sự điều chế nên chứa ít nhất 0,1% hợp hoạt chất. Phần trăm của các chế phẩm và các sự điều chế có thể, tất nhiên, được biến đổi và có thể thường nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến khoảng 75% trọng lượng trên một đơn vị, hoặc tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25 đến 60%. Lượng các hợp hoạt chất trong các chế phẩm có lợi để chữa bệnh là liều lượng thích hợp có thể thu được.

Các kit

Các phương án khác đề cập đến các kit để sử dụng với các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây. Các chế phẩm và các chế phẩm virus sống có thể được cung cấp trong kit. Các kit cũng có thể bao gồm vật chứa thích hợp, các chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực đã trình bày chi tiết ở đây và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ sung như các chất kháng virus, các chất chống nấm và các chất chống vi khuẩn.

Các kit có thể bao gồm thêm chế phẩm được phân ước thích hợp để sử dụng cho đối tượng cần nó. Ngoài ra, các chế phẩm theo sáng chế có thể được loại nước toàn bộ hoặc một phần hoặc là dạng nước. Các kit được đề xuất trong sáng chế có thể được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở các nhiệt độ được làm lạnh như đã bộc lộ ở đây phụ thuộc vào chế phẩm cụ thể.

Vật chứa nghĩa là tất cả các kit sẽ thường bao gồm ít nhất một lọ nhỏ, ống kiểm tra, bình thốt cổ, chai lọ, ống tiêm hoặc các cách thức vật chứa khác, trong đó chế phẩm được đặt vào, và tốt hơn là, được chia thành phân ước thích hợp. Ở đó thành phần bổ sung được đề xuất, kit cũng sẽ thường chứa một hoặc nhiều vật chứa thêm vào trong đó chất hoặc thành phần có thể được đặt vào đó. Các kit ở đây cũng sẽ thường bao gồm các phương tiện chứa chất, chế phẩm và bất kỳ vật chứa thuốc thử nào khác

đóng kín để bán trong thương mại. Các vật chứa này có thể bao gồm các vật chứa bằng chất dẻo được đúc phun hoặc đúc thổi trong đó các lọ nhỏ mong muốn được giữ lại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được kể đến để làm rõ một số phương án của sáng chế được giới thiệu ở đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ theo sau sự mô tả các kỹ thuật đã được tìm ra để vận hành tốt trong thực tế được bộc lộ ở đây, và do đó có thể được xem xét để tạo nên các cách thức được ưu tiên trong thực tế của nó. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, vì sự bộc lộ hiện tại, hiểu rõ rằng nhiều thay đổi có thể được tạo ra trong các phương án cụ thể đã được bộc lộ và vẫn thu được một kết quả tương tự hoặc giống như vậy mà không tách rời khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Độ ổn định cơ bản của flavivirus DEN-2 PDK 53 trong pha lỏng

Theo một phương pháp minh họa, độ ổn định nhiệt đối với các flavivirus trong pha lỏng được nghiên cứu. Theo phương pháp này, độ ổn định cơ bản của vector vaccin gốc DEN-2 PDK 53, được bảo quản trong nước muối đệm phosphate (PBS) (PBS là viết tắt của phosphate buffered saline), ở các nhiệt độ khác nhau được xác định (Bảng 1). Trong một ví dụ, 1×10^4 pfu của virus DEN-2 PDK 53 trong tổng thể tích là 0,5ml PBS được ủ, trong các lọ nhỏ 2ml có nắp xoay hoặc ở nhiệt độ 4°C, hoặc ở nhiệt độ trong phòng (~ 21°C) hoặc ở nhiệt độ 37°C. Sau thời gian 24 giờ ủ, hiệu giá của virus và hoạt tính của nó được xác định bằng cách phân tích bằng chuẩn độ trên đĩa lớp phủ agarosa Neutral Red trong các tế bào Vero. Như được minh họa trong bảng 1, ủ DEN-2 PDK 53 trong PBS ở 4°C dẫn tới sự giảm trung bình đi bốn lần lượng virus và mất hoàn toàn hoạt tính của virus khi được ủ ở nhiệt độ 37°C trong cùng thời gian. Các kết quả này chứng minh độ ổn định tương đối kém của flavivirus DEN-2 PDK 53 với sự có mặt của các tá dược làm ổn định.

Bảng 1

Độ ổn định của virus Den-2 PDK53 được bảo quản trong thời gian 24 giờ ở các nhiệt độ khác nhau.

Nhiệt độ	Chế phẩm	Tỷ lệ % tổn thất hiệu giá của virus
4°C	PBS	75
~21°C	PBS	78
37°C	PBS	100

Ví dụ 2

Các hiệu quả làm ổn định của các chế phẩm

Trong các chế phẩm mẫu đã biết, các tá dược được dùng được đề xuất theo sáng chế nhằm ổn định nhiệt cho các vaccine virus sống được biết tới trong nghiên cứu. Theo một phương pháp mẫu, PBS được sử dụng làm một thành phần cơ bản để đạt được các hiệu quả ổn định của các tá dược khác nhau. Trong các ví dụ này, dung dịch gốc của mỗi tá dược được tạo ra trong PBS và pH được điều chỉnh tới xấp xỉ 7,1 bằng NaOH, ngoại trừ chitosan ở đó pH của dung dịch gốc được điều chỉnh tới xấp xỉ 6,8. Các tá dược được làm loãng trong PBS tới các nồng độ cuối được chỉ ra (w/v) (Bảng 2). Với phương pháp này, 1×10^4 pfu của virus DEN-2 PDK 53, trong môi trường không có huyết thanh, được thêm vào 0,5ml mỗi chế phẩm và được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Tiếp sau ủ, hoạt tính và hiệu giá của virus được xác định bằng cách chuẩn độ trên đĩa trong các tế bào Vero, như đã mô tả ở trên. Như đã minh họa trong bảng 2, các hiệu quả ổn định của các chế phẩm bao gồm tá dược đơn lẻ, ở các nồng độ khác nhau có thể so sánh được với các ví dụ thử nghiệm trước, là nhỏ nhất. Tuy nhiên, một số tá dược ví dụ, trehalose và albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người (rHSA), có hiệu quả hơn so với các tá dược khác khi làm ổn định virus DEN-2 PDK 53 ở nhiệt độ 37°C. Các kết quả của nghiên cứu được đưa ra trong bảng 2 cũng bộc lộ rằng các hiệu quả làm ổn định được tăng lên của một số tá dược, bao gồm rHSA và trehalose, có thể thu được trong các khoảng nồng độ đã biết của các tá dược này. Trong ví dụ đặc biệt này, trehalose có hiệu quả hơn ở các nồng độ trên 15% trọng lượng/thể tích và copolyme poloxamer 407, F127® ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3%.

Bảng 2

Hiệu quả của các tá dược khác nhau lên độ ổn định của DEN-2 PDK53 khi được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ

Chế phẩm	Tỷ lệ % tổn thất hiệu giá của virus
PBS	100,0
10% Sucroza	99,9
15% Sucroza	98,3
20% Sucroza	96,4
25% Sucroza	93,4
2% Trehaloza	98,3
5% Trehaloza	97,0
10% Trehaloza	93,3
15% Trehaloza	83,3
2% Manitol	100,0
5% Manitol	100,0
10% Manitol	99,8
15% Manitol	86,7
5% Sorbitol	100
10% Sorbitol	99,9
15% Sorbitol	99,9
1% Polyvinyl Pyrolidon	100,0
5% Polyvinyl Pyrolidon	100,0
10% Polyvinyl Pyrolidon	100,0
0,2% F127	99,6
0,5% F127	99,6
1% F127	99,5
2% F127	99,5
10% F127	99,9
0,1% rHSA	91,2

Chế phẩm	Tỷ lệ % tổn thất hiệu giá của virus
0,5% rHSA	95,0
1,0% rHSA	89,0
3,0% rHSA	89,0
5,0% rHSA	97,5
0,05% Chitosan	99,0
0,1% Chitosan	99,0

Ví dụ 3

Các hiệu quả làm ổn định của các chế phẩm bao gồm các tổ hợp cụ thể của các tá dược

Trong quy trình minh họa dưới đây, các chế phẩm bao gồm nhiều tá dược trong các tổ hợp khác nhau và các nồng độ được kiểm tra đối với các hiệu quả ổn định lên vacxin flavivirus DEN-2 PDK 53 gốc. Các tá dược được làm loãng tới các nồng độ cuối được chỉ định trong PBS từ các dung dịch gốc như đã mô tả trong ví dụ 2. 1×10^4 pfu của vacxin virus DEN-2 PDK 53 được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 0,5ml của mỗi chế phẩm trong thời gian 24 giờ (Fig.1) qua 48 giờ (Fig.2). Ở các khoảng thời gian cụ thể nồng độ và hoạt tính của virus được xác định bằng sự phân tích chuẩn độ trên đĩa như đã mô tả trong ví dụ 1. Fig.1 mô tả các kết quả mẫu của sự chứng minh này đã thể hiện là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus sau khi ủ, đối với sự đưa vào, là sự tổn thất hiệu giá $\log_{10}$ trong Fig.2. Phân tích các tổ hợp của các tá dược khác nhau, trong sự minh họa cụ thể này, bộc lộ rằng các chế phẩm bao gồm sacarit, chất hoạt động bề mặt không phải ion copolyme Pluronic và protein là tối ưu để cải thiện độ ổn định của DEN-2 PDK 53 ở nhiệt độ 37°C. Các chế phẩm bao gồm trehalosa, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA có các hiệu quả ổn định lớn nhất. Đáng ngạc nhiên, hiệu quả ổn định của tổ hợp của ba tá dược này là lớn hơn nhiều so với tổng của chúng được quan sát thấy với mỗi thành phần riêng lẻ do vậy đề nghị sự đồng vận giữa các thành phần. Độ ổn định nhiệt được cải thiện của flavivirus DEN-2 PDK 53 được thu nhờ các hoạt tính đồng vận của tổ hợp bao gồm trehalosa, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA không thể được biết trước dựa trên các ví dụ của các nghiên cứu trước. Các Fig 1 và 2 cũng minh họa rằng hiệu quả làm ổn định của hỗn

hợp trehaloza/ copolyme poloxame 407, Pluronic F127®/rHSA được cải thiện hơn bằng cách thêm chitosan 0,05%. Fig.2 thể hiện rằng tỷ lệ bất hoạt của virus khi được bảo quản qua 48 giờ ở nhiệt độ 37°C được giảm đáng kể bởi các chế phẩm chứa trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA. Các ví dụ trong nghiên cứu đề nghị rằng độ ổn định của các flavivirus có thể được nâng cao bởi các chế phẩm chứa các cation hoá trị hai Ca^{2+} và Mg^{2+} . Tuy nhiên, như đã mô tả trong các Fig.1 và 2, sự bổ sung Ca^{2+} (0,0009M) và Mg^{2+} (0,0005M) vào chế phẩm không có lợi ích ổn định thêm nào. Các kết quả từ Fig.2 đề nghị rằng bổ sung các cation hoá trị hai có thể tác động tiêu cực tới độ ổn định của virus pha lỏng trong thời gian dài trong bối cảnh của các phương án thực hiện cụ thể.

Trong một phương pháp mẫu, chế phẩm bao gồm trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA được đánh giá đối với các tính chất ổn định của nó với nhiều flavivirus. Độ ổn định của các flavivirus khảm DEN-2 thể hiện ở các protein của vỏ và màng từ các virus Tây sông Nile (DEN-2/WN), Dengue 1 (DEN-2/D1), Dengue 3 (DEN-2/D3, hoặc Dengue 4 (DEN-2/D4) được xác định như đã mô tả đối với ví dụ 1. Các kết quả minh họa trong bảng 3 bộc lộ độ ổn định pha lỏng được cải thiện lớn của tất cả các flavivirus khảm khi được bảo quản trong chế phẩm bao gồm trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA. Các chimera khác nhau thể hiện các protein của màng và vỏ bọc khác nhau từ 5 loại flavivirus khác nhau trong huyết thanh. Ngoài ra, virus Tây sông Nile và các virus gây bệnh danga khác nhau đáng kể. Kết quả này cho thấy rằng các chế phẩm theo sáng chế có thể hữu ích để ổn định pha lỏng của các thành viên khác nhau thuộc họ Flaviviridae cũng như các họ virus khác. Độ ổn định đối với các flavivirus ở nhiệt độ trong phòng (~21°C) và ở nhiệt độ 4°C được kiểm tra bởi các quy trình mô tả được vạch ra ở ví dụ 1. Các kết quả mẫu, được minh họa trong bảng 4, bộc lộ chế phẩm bao gồm trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA duy trì hiệu quả hoạt tính của virus trong thời gian 7 ngày ở nhiệt độ 21°C và trong thời gian 48 ngày ở nhiệt độ 4°C.

Bảng 3.

Độ ổn định của các flavivirus khảm khác nhau được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ trong PBS hoặc chế phẩm (F1) bao gồm 15% trehaloza, 2% copolyme poloxame 407, Pluronic, F127® và 1% rHSA

Virut	Chế phẩm	% Nồng độ virut còn lại
DEN-2/WN	PBS	2
	F1	45
DEN-2/D1	PBS	0,2
	F1	22
DEN-2/D3	PBS	0,3
	F1	30
DEN-2/D4	PBS	1
	F1	28

Bảng 4.

Độ ổn định của các flavivirut được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong 7 hoặc 48 ngày trong PBS hoặc chế phẩm (F1) bao gồm trehaloza 15%, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® 2% và rHSA 1%.

Virut	nhiệt độ	chế phẩm	Tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virut còn lại	
			7 ngày	48 ngày
DEN-2 PDK-53	21°C	PBS	0	0
	21°C	F1	100	0
	4°C	PBS	0	0
	4°C	F1	100	100
DEN-2/WN	21°C	PBS	0	0
	21°C	F1	100	0
	4°C	PBS	0	0
	4°C	F1	100	100

Ví dụ 4

Sử dụng các thành phần thay thế

Phương pháp mẫu khác được sử dụng để so sánh các hiệu quả làm ổn định của albumin huyết thanh bò (BSA) và, gelatin, với hiệu quả làm ổn định của rHSA và của các copolyme Pluronic khác nhau. Các phân tích độ ổn định của virus DEN-2 PDK 53 được chỉ đạo như đã chỉ ra trước đây đối với các Ví dụ 1 và 2. Các ví dụ trước đây đã gọi ra các chế phẩm bao gồm trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] và rHSA đã cải thiện tối ưu độ ổn định nhiệt của virus vắc xin gốc DEN-2 PDK 53. Như đã thể hiện bởi ví dụ trong Fig.3, các hiệu quả làm ổn định của albumin huyết thanh bò có thể so sánh được với các hiệu quả làm ổn định của rHSA đơn lẻ hoặc kết hợp với trehaloza và copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®]. Fig.3 cũng chứng tỏ rằng chúng như là các tá dược biệt lập; gelatin có thể so sánh được với rHSA trong việc làm ổn định DEN-2 PDK 53 ở nhiệt độ 37°C. Tuy nhiên trong phương pháp mẫu này, không giống BSA, gelatin không xuất hiện là một nhóm thể hiệu quả cho rHSA trong các chế phẩm cũng chứa trehaloza và copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®]. Do đó, trong khi các protein khác với rHSA có thể được sử dụng kết hợp với trehaloza và copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] nhằm làm ổn định các vắc xin flavivirus, sử dụng albumin huyết thanh hoặc các protein có cấu trúc hóa học tương tự là thích hợp hơn theo phương pháp mẫu này. Ngoài ra, Fig.3 minh họa, như là các tá dược biệt lập, copolyme poloxame 403, Pluronic Pluronic P123[®] có thể so sánh được với copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] trong khả năng của nó làm ổn định virus DEN-2 PDK-53. Tuy nhiên, trong phương pháp mẫu này, copolyme poloxame 403, Pluronic P123[®] không xuất hiện là một nhóm thể hiệu quả cho copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] trong các chế phẩm cũng chứa trehaloza và albumin huyết thanh. Như được minh họa trong Fig.4, các chế phẩm chứa trehaloza, rHSA và các chất hoạt động bề mặt có tính được được sử dụng thông thường khác như Polysorbat 20 (Tween 20), thay vì copolyme Pluronic, không có hiệu quả trong việc làm ổn định DEN-2 PDK 53 đối với các chế phẩm chứa copolyme Pluronic. Các phương pháp mẫu này gợi ý các hiệu quả ổn định tốt hơn của các chế phẩm chứa các chất hoạt động bề mặt copolyme Pluronic có trọng lượng phân tử cao rõ rệt.

Dữ liệu mẫu được minh họa thêm trong Fig 4. Fig.4 mô tả độ ổn định của virus DEN-2 PDK 53 trong các chế phẩm chứa các chất hoạt động bề mặt khác nhau. DEN-2 PDK 53 được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 23 giờ trong mỗi chế phẩm. Các chất hoạt động bề mặt được đánh giá trong ví dụ này bao gồm n-octyl- β -D-

glucopyranosit (β -OG), Polysorbat 20 (P 20), Polysorbat 80 (P 80) và copolyme poloxame 407, Pluronic F127® (F). Các thành phần của chế phẩm khác bao gồm trehaloza (T) và rHSA (A). Các trị số được thể hiện như là tỷ lệ phần trăm hiệu giá của virus còn lại sau khi ủ đối với nồng độ đầu vào.

Ví dụ 5

So sánh các hiệu quả ổn định của các chế phẩm khác nhau

Các tính chất ổn định của một chế phẩm mẫu được so sánh với các tính chất ổn định của các chế phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chế phẩm làm ổn định cho các vacxin của flavivirus, được bộc lộ trong kỹ thuật (patent Mỹ số 4,500,512), bao gồm lactoza 4%, sorbitol 2%, CaCl_2 0,1g/L, MgSO_4 0,076g/L và các axit amin thứ tự từ 0,0005M tới 0,05M trong PBS. Chế phẩm khác được báo cáo bởi Adebayo và các đồng tác giả (1998) bao gồm sucroza 10%, lactalbumin 5%, CaCl_2 0,1g/L, và MgSO_4 0,076g/L. Trong một phương pháp mẫu, các tính chất ổn định của các chế phẩm này được so sánh với phương án đặc biệt trong sáng chế. Trong một chế phẩm ví dụ, F1, chế phẩm này bao gồm trehaloza 15%, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® 2% và HAS tái tổ hợp 1%. F2 là chế phẩm của patent Mỹ số 4,500,512 mà không có axit amin và F3 là chế phẩm tương tự với histidin và alanin của các axit amin. F4 là chế phẩm của Adebayo, và các đồng tác giả. 1×10^4 pfu của vacxin virus DEN-2 PDK 53 được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 0,5ml của mỗi chế phẩm trong khoảng thời gian 23 giờ, sau khi hoạt tính và hiệu giá của virus được đánh giá như đã mô tả trong ví dụ 1. Như được minh họa trong Fig.5, một số phương án thực hiện, ví dụ chế phẩm F1, thể hiện sự cải thiện đáng kể so với các chế phẩm đã mô tả trước đây. Trong ví dụ đã chỉ ra, hầu như không có hoạt tính nào của virus được bình phục sau khi cất trữ trong các chế phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (các chế phẩm F3 và F4), trong khi tới 50% hiệu giá của virus ban đầu được bình phục sau khi bảo quản trong chế phẩm đã được bộc lộ trong sáng chế. Các kết quả này bộc lộ rằng các chế phẩm trước không hiệu quả để làm tăng độ ổn định của vacxin virus sống trong sự bảo quản pha lỏng.

Ví dụ 6

Bảo quản hoạt tính của virus sau nhiều lần đông lạnh-rã đông

Trong một phương pháp mẫu, khả năng lựa chọn chế phẩm để bảo quản hoạt tính của virus sau các chu kỳ làm lạnh - rã đông được chứng tỏ. 1×10^4 pfu của vaccine virus DEN-2 PDK 53 được tạo huyền phù trong 0,5ml mỗi chế phẩm trong các lọ nhỏ có nắp xoay. Đối với vòng đông lạnh-rã đông thứ nhất, các lọ nhỏ được làm khô đông lạnh ở nhiệt độ -80°C trong khoảng thời gian 24 giờ và sau đó được rã đông nhanh chóng ở nhiệt độ 37°C . Ngay lập tức theo sau đó là vòng đông lạnh-rã đông thứ hai ở đó các lọ nhỏ được làm khô đông lạnh ở nhiệt độ -80°C trong 1 giờ và sau đó được rã đông nhanh chóng ở nhiệt độ 37°C . Nồng độ của virus và hoạt tính của nó sau đó được đánh giá bởi sự phân tích chuẩn độ trên đĩa như đã mô tả trong ví dụ 1. Như được minh họa trong Fig.6, các chế phẩm cụ thể bao gồm trehalose, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] và rHSA đã bảo quản hiệu quả hoạt tính của virus đầy đủ qua hai chu trình đông lạnh - rã đông. Ngoài ra, các chế phẩm bao gồm các ba tá dược này có hiệu quả hơn so với các chế phẩm chỉ chứa một tá dược đơn lẻ. Các kết quả của thử nghiệm minh họa cụ thể này đề nghị rằng các chế phẩm và các phương pháp được bộc lộ ở đây là chất bảo vệ đông lạnh hiệu quả đối với các vaccine flavivirus và có thể tạo thuận lợi bảo quản virus trong lúc làm khô đông lạnh, phun-làm khô, hoặc các kỹ thuật loại nước khác.

Ví dụ 7

Sự làm ổn định các virus sống đã được làm giảm độc lực khác.

Các ví dụ đã minh họa trước đó bộc lộ sự làm ổn định pha lỏng hiệu quả của các flavivirus sống đã được làm giảm độc lực trong các chế phẩm bao gồm trehalose, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] và rHSA. Được đoán trước là các phương án đã bộc lộ ở đây cũng có thể có hiệu quả làm ổn định các virus sống đã được làm giảm độc lực khác. Ví dụ, chế phẩm bao gồm trehalose, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®] và rHSA có thể được sử dụng để làm ổn định các virus gây bệnh sởi sống, đã được làm yếu, virus Sindbis đã được làm yếu, virus gây bệnh cúm đã được làm yếu, adenovirus tái tổ hợp, đã được làm yếu, hoặc virus vaccinia đã được làm yếu. Trong một phương pháp mẫu, các virus không phải là flavivirus này có thể được tạo huyền phù và được giữ trong pha lỏng, trong chế phẩm bao gồm trehalose, copolyme poloxame 407, Pluronic F127[®], và rHSA trực tiếp sau khi thu từ sự nuôi cấy tế bào. Theo phương pháp minh họa khác, các virus không phải là flavivirus có thể được tạo

huyền phù trong chế phẩm trước, hoặc sau khi làm đông lạnh hoặc sấy phun. Độ ổn định của virus được cải thiện theo mặt thống kê có thể chứng tỏ rằng chế phẩm của phương án này có thể áp dụng được cho các vaccine virus đã được giảm độc lực khác ngoài họ Flavivirus. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận ra rằng sự áp dụng sau đó có thể được mở rộng đối với các virus sống đã được làm giảm độc lực khác.

Ví dụ 8

Độ an toàn và sự tạo miễn dịch *trong cơ thể sống*.

Sự tương tác phân tử giữa các tá dược và phân tử hoặc các thành phần của tế bào có thể đáp ứng, không chỉ làm tăng độ ổn định của các vaccine virus, mà còn làm cho tế bào tăng lên hoặc phá hủy mô *trong cơ thể sống*. Các chế phẩm có thể làm giảm sự tạo miễn dịch trong các vaccine virus trong các động vật sống. Trong ví dụ này, đã chứng tỏ rằng các chế phẩm mẫu là an toàn sau khi tiêm dưới da và cơ bản là trợ với miễn dịch. Bốn chế phẩm mẫu khác nhau được chọn để kiểm tra trong các con chuột như sau.

Chế phẩm 1: Trehaloza 15%, F-127 2%, rHSA 1%

Chế phẩm 2: Trehaloza 15%, F-127 2%, rHSA 1%, CaCl_2 1mM/MgSO₄ 0,5mM

Chế phẩm 3: Trehaloza 15%, F-127 2%, rHSA 1%, chitosan 0,5%

Chế phẩm 4: Trehaloza 22,5%, F-127 3%, rHSA 1,5%

Chế phẩm 5: PBS

Trong các phương pháp đã biết được mô tả ở đây, các nhóm có 8 hoặc 9 con chuột NIH Swiss được tạo miễn dịch bằng cách tiêm dưới da 1×10^5 pfu của vaccine flavivirus DEN-2 PDK-53/WN tái tổ hợp đã tạo thành chế phẩm ở ngày 0 (d0), được tăng lên với vaccine được tạo chế phẩm tương tự ở d29 và sau đó được thử thách với 10^3 pfu trên loại chủng Tây sông Nile (NY99) gây bệnh trên d45. Chuột đối chứng (bốn nhóm 8 con) được nhận các chế phẩm 1 – 4 đơn độc mà không có virus. Không có bất kỳ trường hợp bất lợi sau khi cung cấp cho bất kỳ con chuột nào đã miễn dịch

được quan sát thấy. Do đó, trong ví dụ này, không có các trường hợp bất lợi rõ ràng gây ra bởi các chế phẩm mẫu mà có hoặc không có vaccin virus. Các huyết thanh được thu thập trước khi miễn dịch ở d0, trước khi nâng lên ở d28, trước khi thử thách ở d44 và sau thử thách ở d75. Các hiệu giá của kháng thể trung hoà virus Tây sông Nile trong các huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm trung hoà giảm đám hoại tử (plaque reduction neutralization test-PRNT). Các kết quả của nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Kháng thể trung hoà và sự bảo vệ được tạo ra bởi các vaccin DEN2/WN đã được tạo thành chế phẩm

		Sau khi đưa vào (d 28)		Sau khi nâng lên (d44)		Sau thử thách (d75)			
chế phẩm	số	GMT ¹	% SC ²	GMT	% SC	GMT	% SC	Sống sót	% sống sót
1	8	30	87,5	123	100	761	100	8/8	100
2	8	10	62,5	226	100	830	100	8/8	100
3	8	40	100	123	100	1810	100	8/8	100
4	9	10	66,7	137	100	1660	100	8/9	88.9
5	9	10	66,7	109	100	1742	100	9/9	100
Các đối chứng	32	1	0	1	0	1280	100	7/32	21.9

¹ GMT = nồng độ trung bình nhân; nồng độ <10 được quy định tùy ý một giá trị là 1.

²% SC = tỷ lệ phần trăm các động vật đã chuyển dạng huyết thanh với các nồng độ PRNT >10.

Phần lớn các động vật nhận vaccin DEN-2/WN đã chuyển dạng huyết thanh sau khi không quan tâm tới liều thuốc đầu tiên dù không có chế phẩm (Chế phẩm 5) hoặc một trong các chế phẩm mẫu (Các chế phẩm 1 – 4) được sử dụng. Ngoài ra, tất cả các

động vật được chủng ngừa đã chuyển dạng huyết thanh sau khi sự cung cấp tăng lên. Các nồng độ PRNT trung bình nhân (GMT) chứng tỏ không nhiều những sự khác biệt giữa các nhóm vaccin. Các nồng độ là thấp sau khi tạo miễn dịch sơ cấp, được tăng lên 3 – 10 lần sau khi tăng lên và sau đó đã thể hiện một đáp ứng hồi tưởng kịch tính nhờ sự thử thách. 100% tất cả các động vật đã được chủng ngừa đã sống sót gay go, các động vật đã được chủng ngừa đã sống sót sau khi sử dụng liều kiểm chứng, lại không phụ thuộc vào chế phẩm vaccin. Chỉ 22% động vật đối chứng sống sót, những con sống sót đã thể hiện bằng chứng về các đáp ứng của kháng thể trung hòa có hiệu nghiệm sau khi thử thách. Một ưu điểm đó là ví dụ này chứng tỏ rằng các chế phẩm mẫu không làm giảm khả năng của vaccin DEN-2/WN tái tổ hợp mẫu để phòng bệnh sốt Tây sông Nile trong các con chuột.

Ví dụ 9

Trong ví dụ khác, các chế phẩm lỏng được sử dụng chứa trehaloza, rHSA và copolyme poloxame 407, Pluronic F127® để làm ổn định flavivirut khảm Tây sông Nile được bảo quản trong các khoảng thời gian khác nhau hoặc ở 25°C hoặc 4°C. 1×10^4 pfu của vaccin virut khảm DEN-2/WN được ủ ở mỗi nhiệt độ trong phòng và hoạt tính của virut được đánh giá ở một hoặc hai tuần như đã mô tả trong ví dụ 1. Như được minh họa trong các Fig 7 và 8, các chế phẩm chứa trehaloza, rHSA và copolyme poloxame 407, Pluronic F127® đã cải thiện đáng kể độ ổn định nhiệt của vaccin virut DEN-2/WN trong lúc bảo quản lần lượt ở nhiệt độ 25°C và 4°C. Ở nhiệt độ 25°C, mức độ bất hoạt của virut là ít hơn so với một log qua bảy ngày. Ở nhiệt độ 4°C mức độ bất hoạt của virut là không đáng kể trong khoảng thời gian tới 12 tuần khi được bảo quản trong các chế phẩm mẫu bao gồm trehaloza, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® và rHSA.

Ví dụ 10

Trong phương pháp mẫu khác, các hiệu quả làm ổn định của các chế phẩm được chứng tỏ bao gồm trehaloza, rHSA và copolyme Pluronic với các vaccin DEN-2 PDK 53 đã loại nước. 1×10^4 pfu của vaccin virut DEN-2 PDK 53 được tạo thành chế phẩm theo các quy trình đã bộc lộ ở đây. Các vaccin đã được tạo thành chế phẩm được đặt trong các lọ huyết thanh và được đưa vào các quy trình làm lạnh đông lạnh

thông thường. Các vaccin đã làm khô được nút lại dưới chân không, bảo quản ở nhiệt độ 37°C hoặc 4°C trong thời gian 14 ngày sau đó khôi phục vaccin về thể tích ban đầu của nó bằng cách thêm nước vô trùng. Hoạt tính virus của vaccin đã khôi phục được đánh giá như đã chỉ ra ban đầu. Ở nhiệt độ 37°C, với sự có mặt của các chế phẩm chứa trehaloza, rHSA và copolyme Pluronic được tạo trong nước muối đệm phosphat, 1 log của sự mất nồng độ trung bình của virus được quan sát (Fig.9). Không có sự bất hoạt của virus nào được quan sát thấy đối với các vaccin virus DEN-2 PDK 53 đã loại nước được tạo chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong khoảng thời gian 14 ngày. Các kết quả này chứng tỏ sự bảo quản hiệu quả vaccin virus đã loại nước sử dụng các chế phẩm được đề xuất theo sáng chế.

Fig.9. mô tả độ ổn định của DEN-2 PDK 53 được làm khô đông lạnh ở các nhiệt độ khác nhau. Loga của độ tổn thất hiệu giá của virus của vaccin DEN-2 PDK 53 được làm khô đông lạnh sau ủ ở nhiệt độ 37°C hoặc 4°C trong thời gian 2 tuần được xác định. Các chế phẩm F1 (trehaloza 15%, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® 2%, rHSA 1%) và F2 (trehaloza 15%, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® 2%, rHSA 0,01%) được tạo thành trong nước muối đệm phosphat. Chế phẩm F3 (trehaloza 15%, copolyme poloxame 407, Pluronic F127® 2%, rHSA 0,01%) được bào chế cho vào trong bazo Tris 10mM.

Tất cả các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ và yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tạo ra và thực hiện trừ khi thực hiện được tiến hành không đúng cách xét theo bản mô tả sáng chế này. Trong khi các chế phẩm và các phương pháp được mô tả dưới dạng các phương án ưu tiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng, các biến thể có thể được áp dụng cho các chế phẩm và các phương pháp được mô tả ở đây theo các bước hoặc theo trình tự các bước của các phương pháp đã được bộc lộ ở đây, mà không vượt quá phạm vi sáng chế. Cụ thể hơn, một số chất mà đều có tương quan về mặt hóa học và sinh lý học đều có thể thay thế cho các chất được mô tả ở đây mà vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự. Tất cả các thay thế hoặc biến thể đó mà là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ được coi là vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần Yêu cầu bảo hộ sáng chế.

Tất cả các tài liệu, hoặc các phần của tài liệu, được trích dẫn ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sáng chế, đơn sáng chế, các bài báo, sách và các chuyên luận đều được gộp toàn bộ vào đây thông qua viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm virus gây bệnh danga sống được làm giảm độc lực chứa:

một hoặc nhiều virus gây bệnh danga sống đã được làm giảm độc lực;

một hoặc nhiều albumin được chọn từ nhóm bao gồm các lactalbumin và các albumin huyết thanh, và

trehaloza.

2. Chế phẩm virus theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều copolyme khối poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit) (EO-PO), một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO này có phân tử lượng bằng hoặc lớn hơn 3000, như poloxame 407 (Pluronic® F127).

3. Chế phẩm virus theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này thích hợp để loại nước toàn bộ hoặc một phần.

4. Chế phẩm virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó một hoặc nhiều albumin là ít nhất albumin huyết thanh từ loài động vật có xương sống hoặc albumin tái tổ hợp.

5. Chế phẩm virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nồng độ trehaloza nằm trong khoảng từ 5 đến 50% (trọng lượng/thể tích).

6. Chế phẩm virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó một hoặc nhiều albumin bao gồm albumin huyết thanh và nồng độ albumin huyết thanh nằm trong khoảng từ 0,001 đến 3% (trọng lượng/thể tích).

7. Chế phẩm virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó một hoặc nhiều albumin huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm albumin huyết thanh bò và albumin huyết thanh người.

8. Phương pháp làm giảm sự bất hoạt của chế phẩm virus gây bệnh danga sống được làm giảm độc lực bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều virus gây bệnh danga sống đã

được làm giảm độc lực với chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều albumin được chọn từ nhóm bao gồm các lactalbumin và các albumin huyết thanh, và trehaloza.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều copolyme khối poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit) (EO-PO), một hoặc nhiều copolyme khối EO-PO này có phân tử lượng bằng hoặc lớn hơn 3000, như poloxame 407 (Pluronic® F127).

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước loại nước toàn bộ hoặc một phần chế phẩm.

11. Kit để làm giảm sự bất hoạt của chế phẩm virus sống được làm giảm độc lực bao gồm:

ít nhất một vật chứa; và

hỗn hợp chứa chế phẩm virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

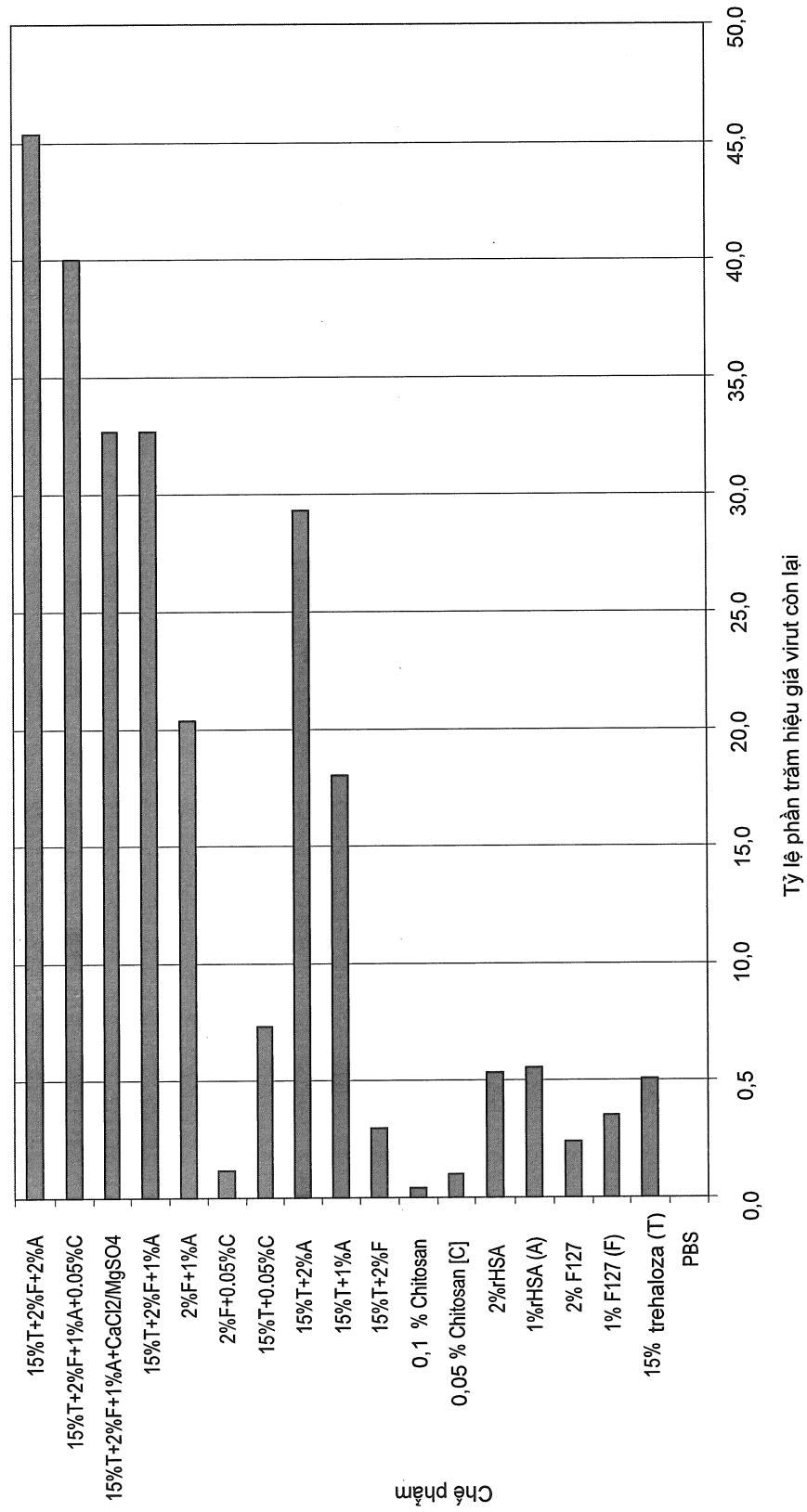
Fig. 1

Fig. 2

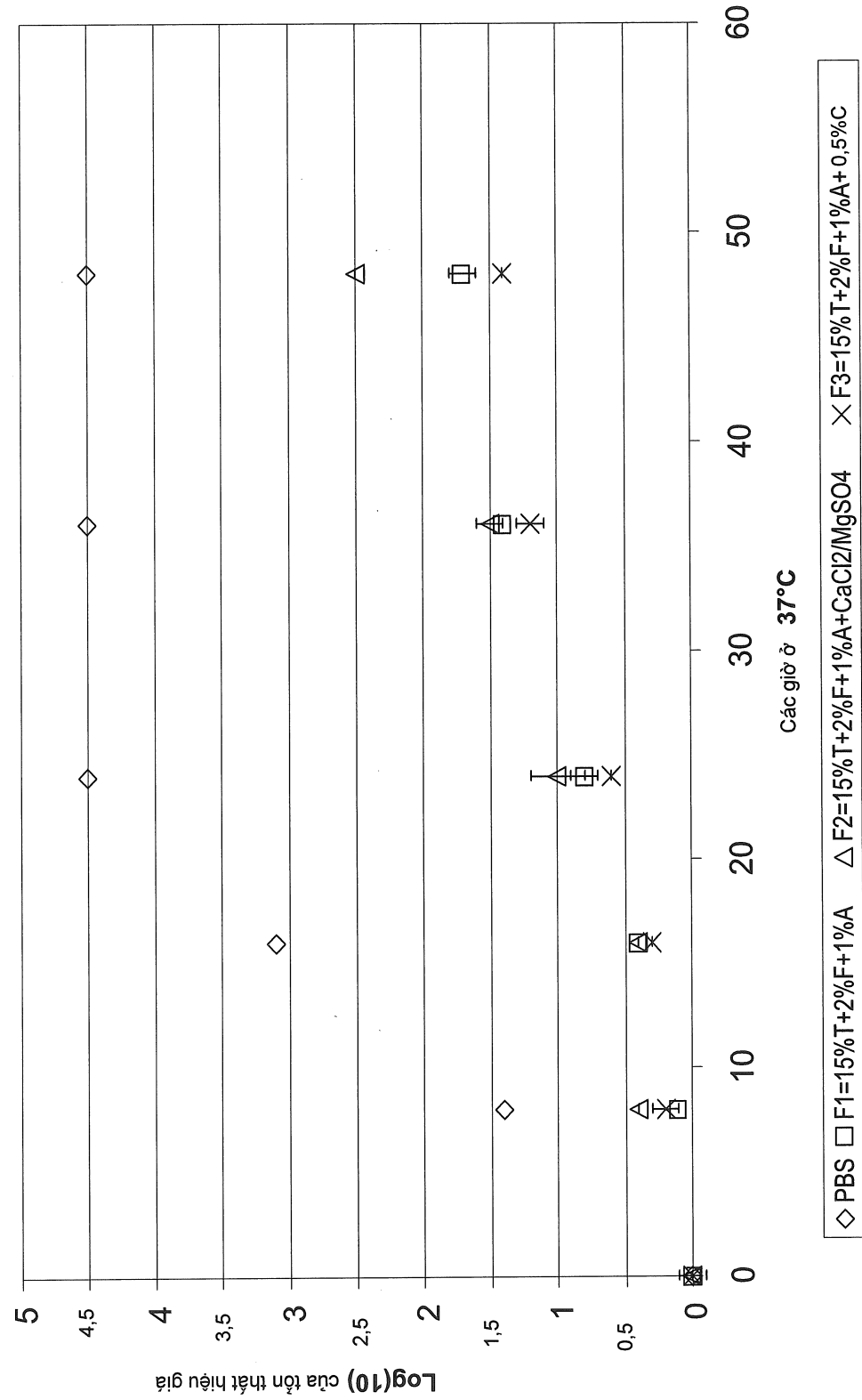


Fig.3

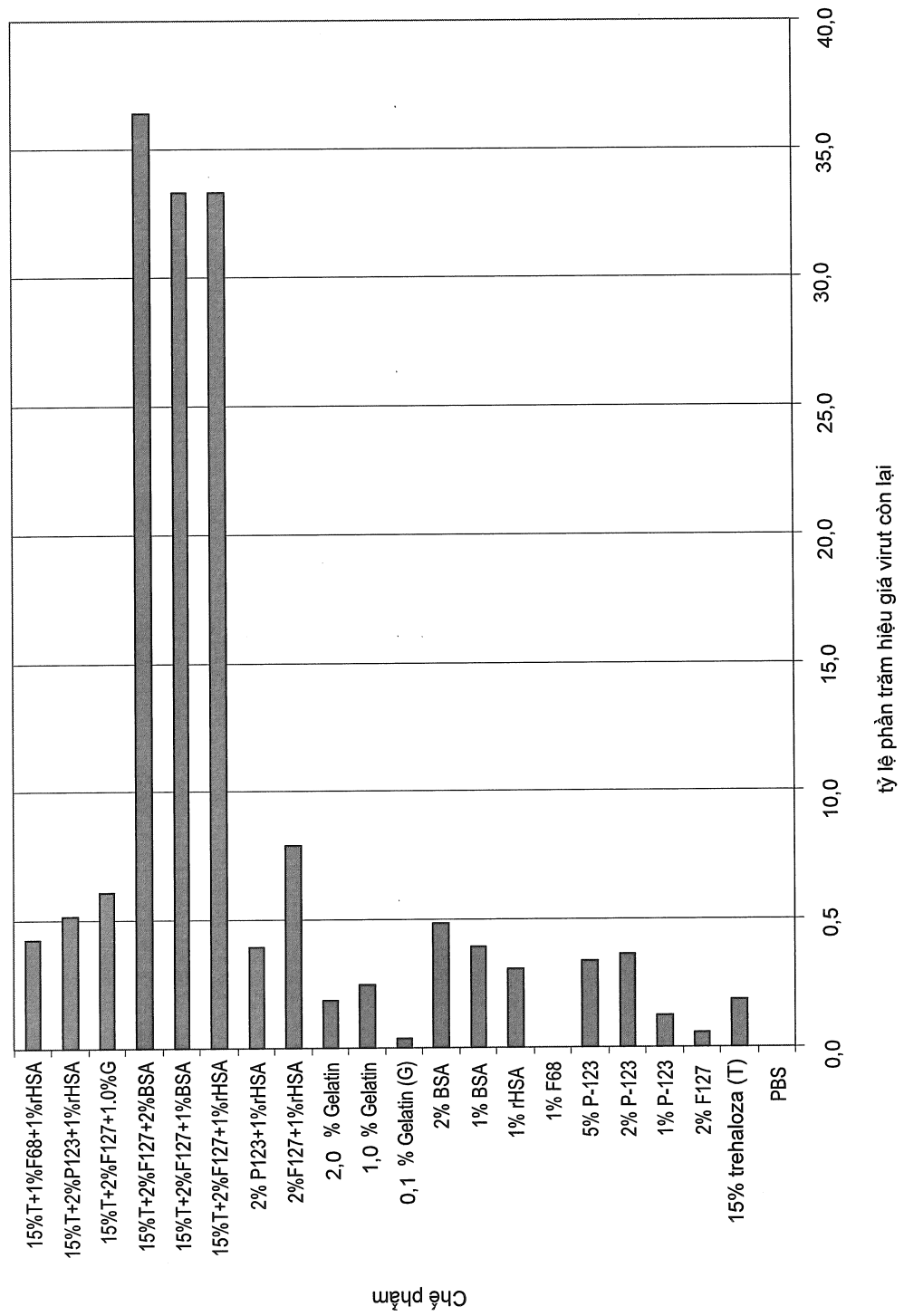


Fig. 4

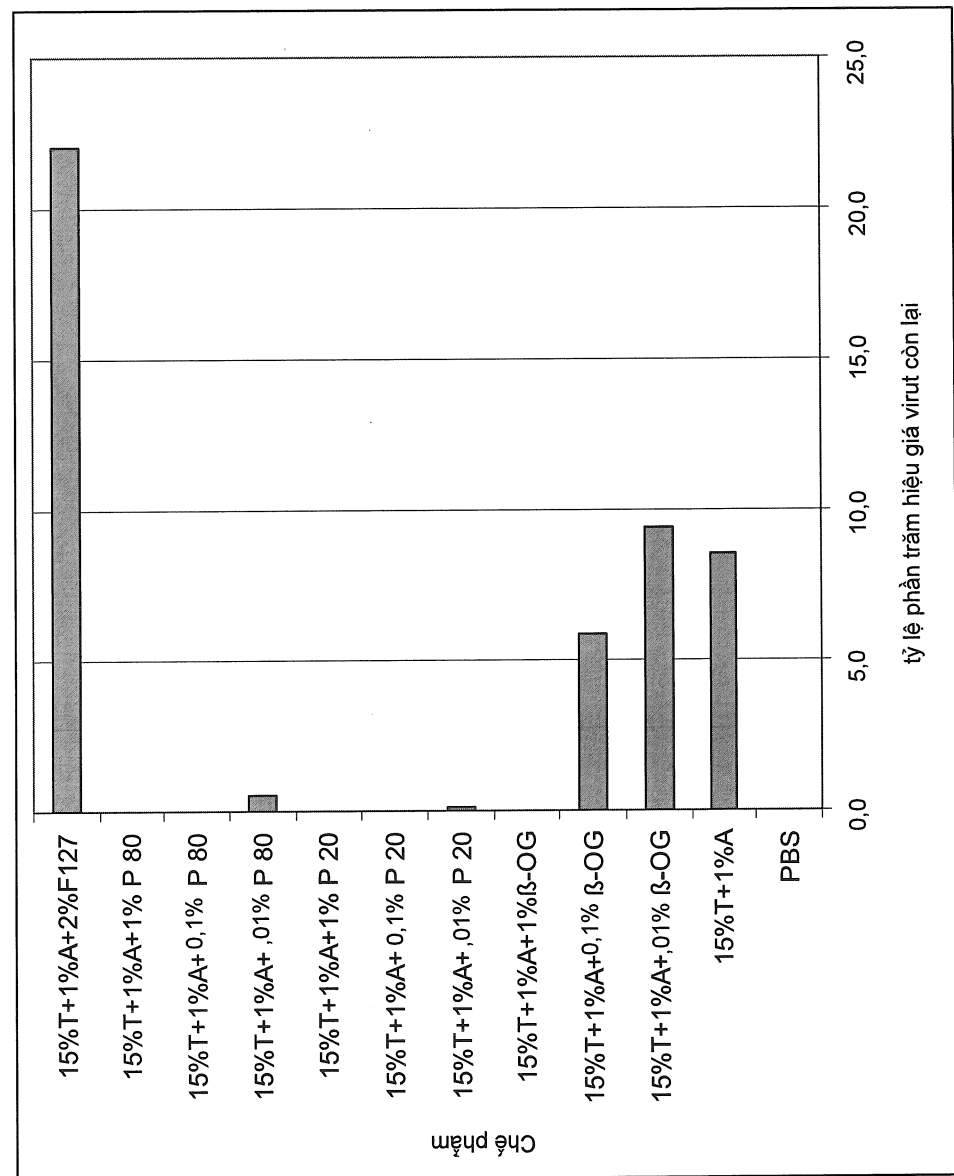


Fig. 5

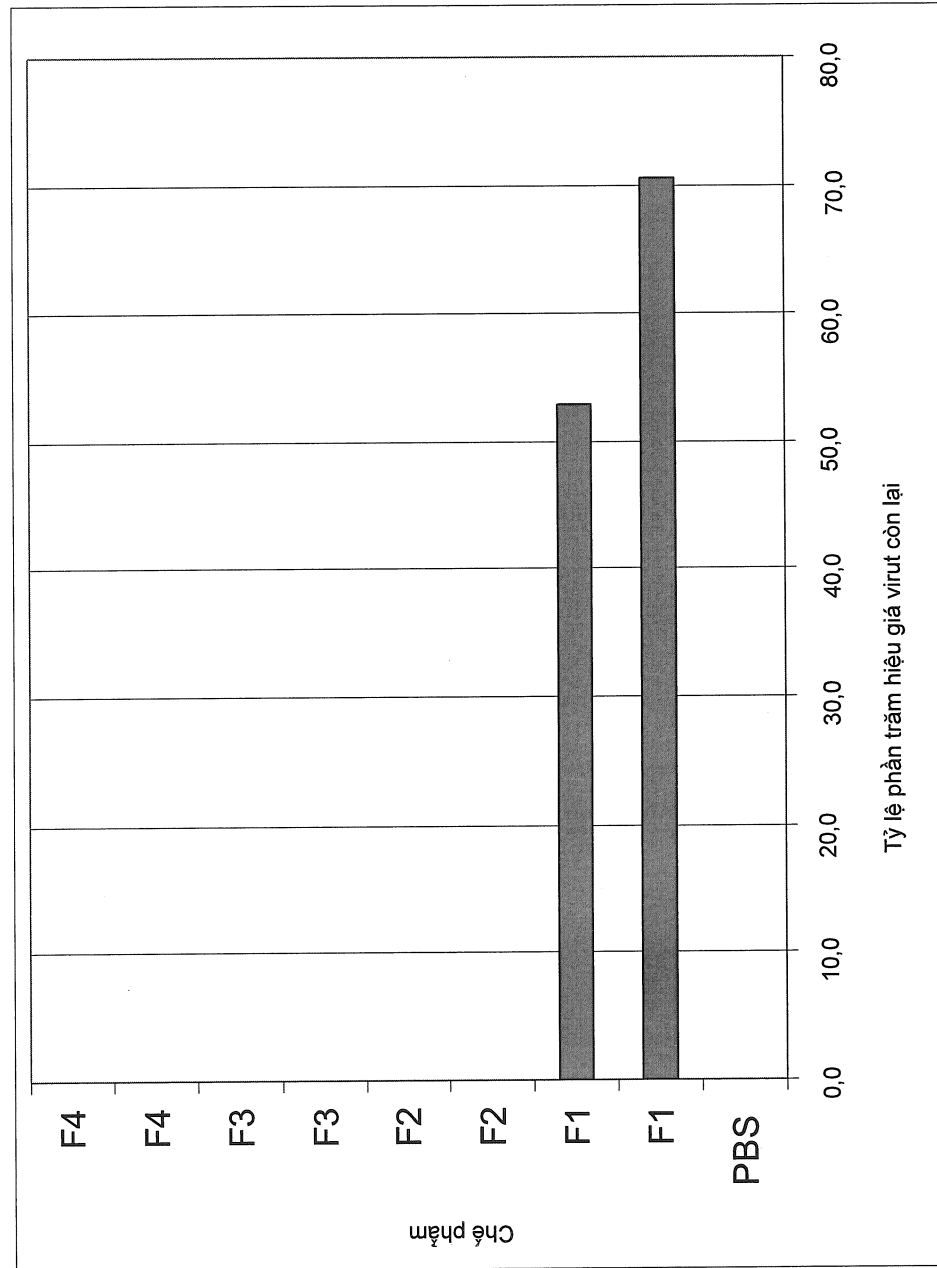
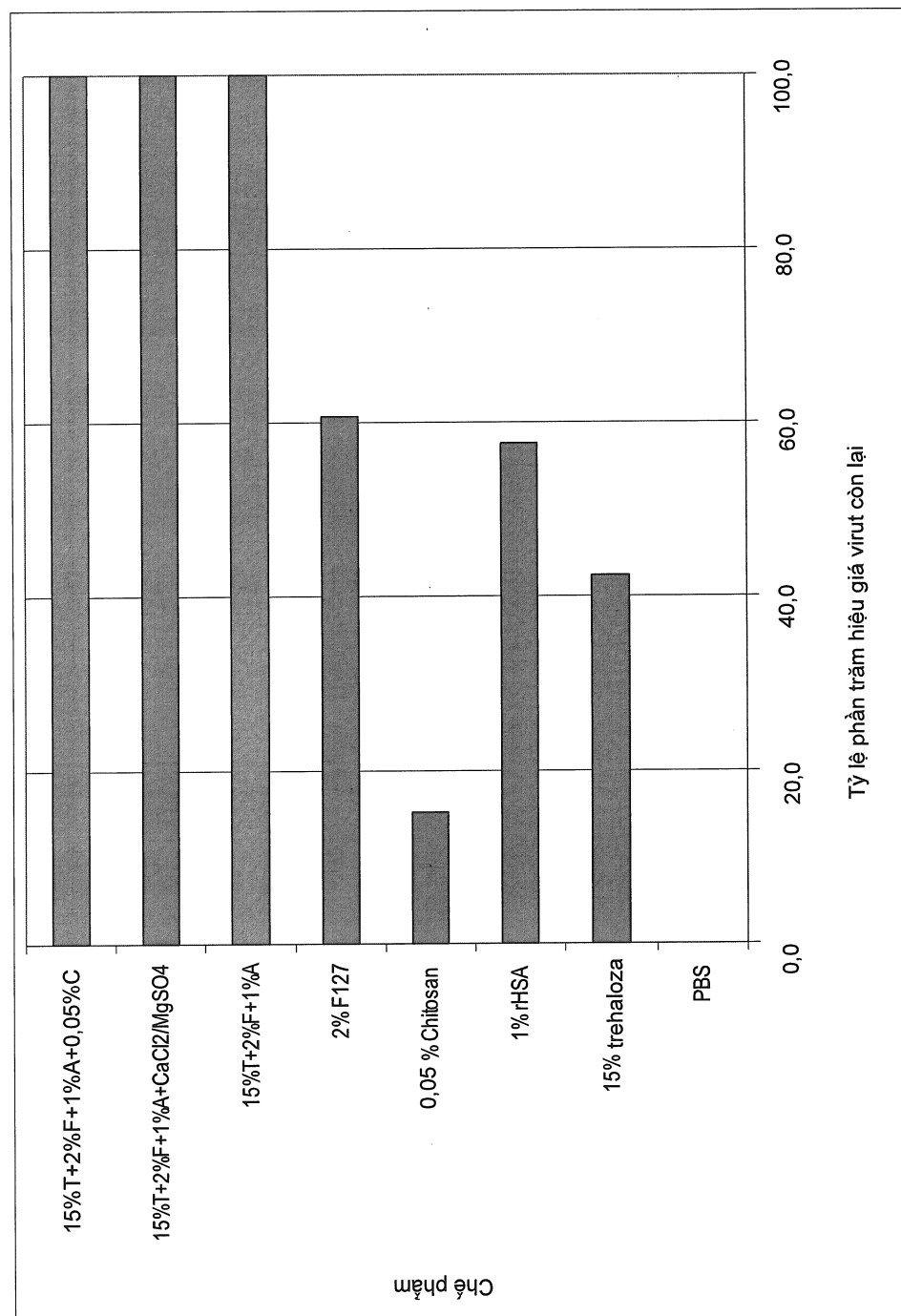


Fig. 6



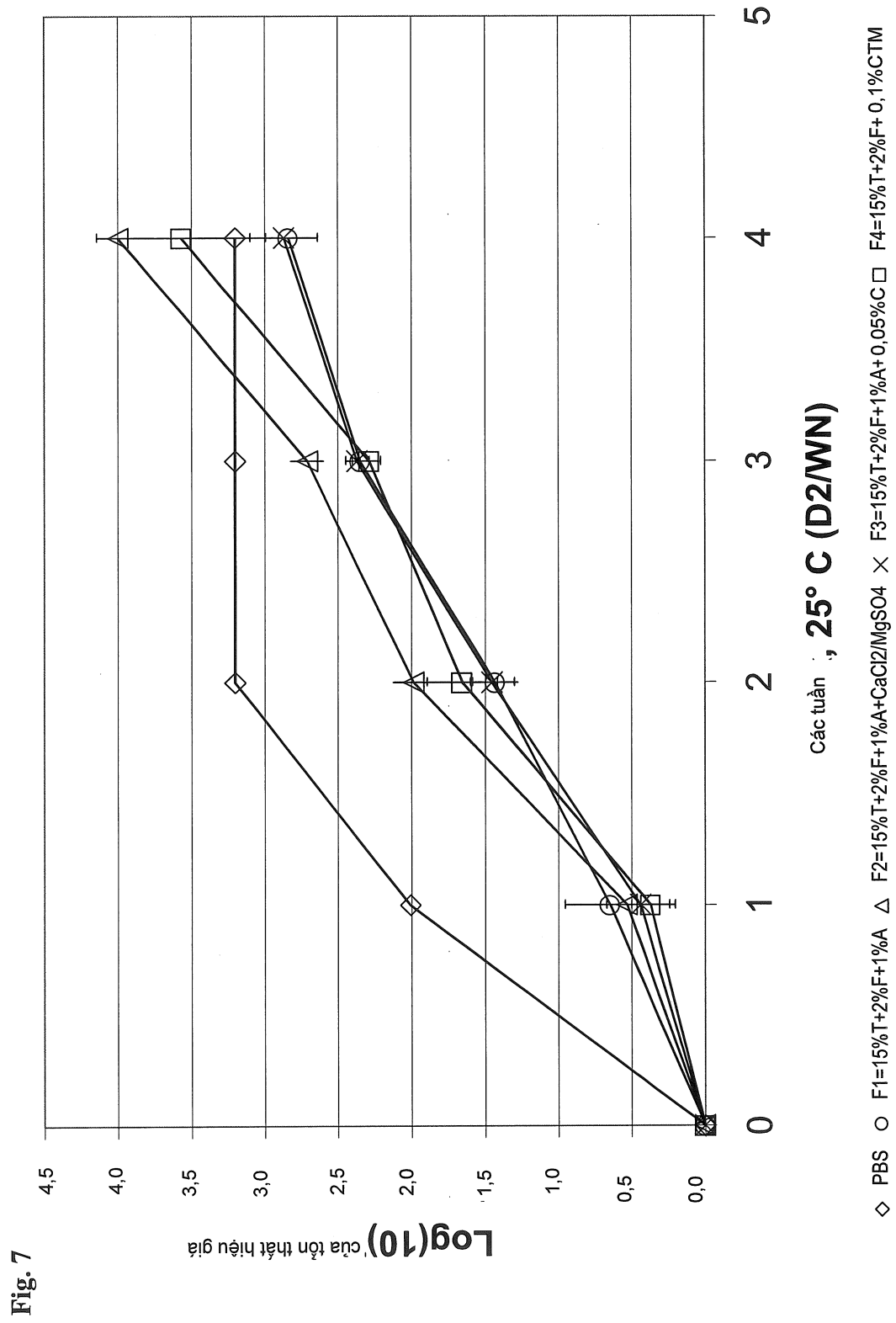


Fig. 8

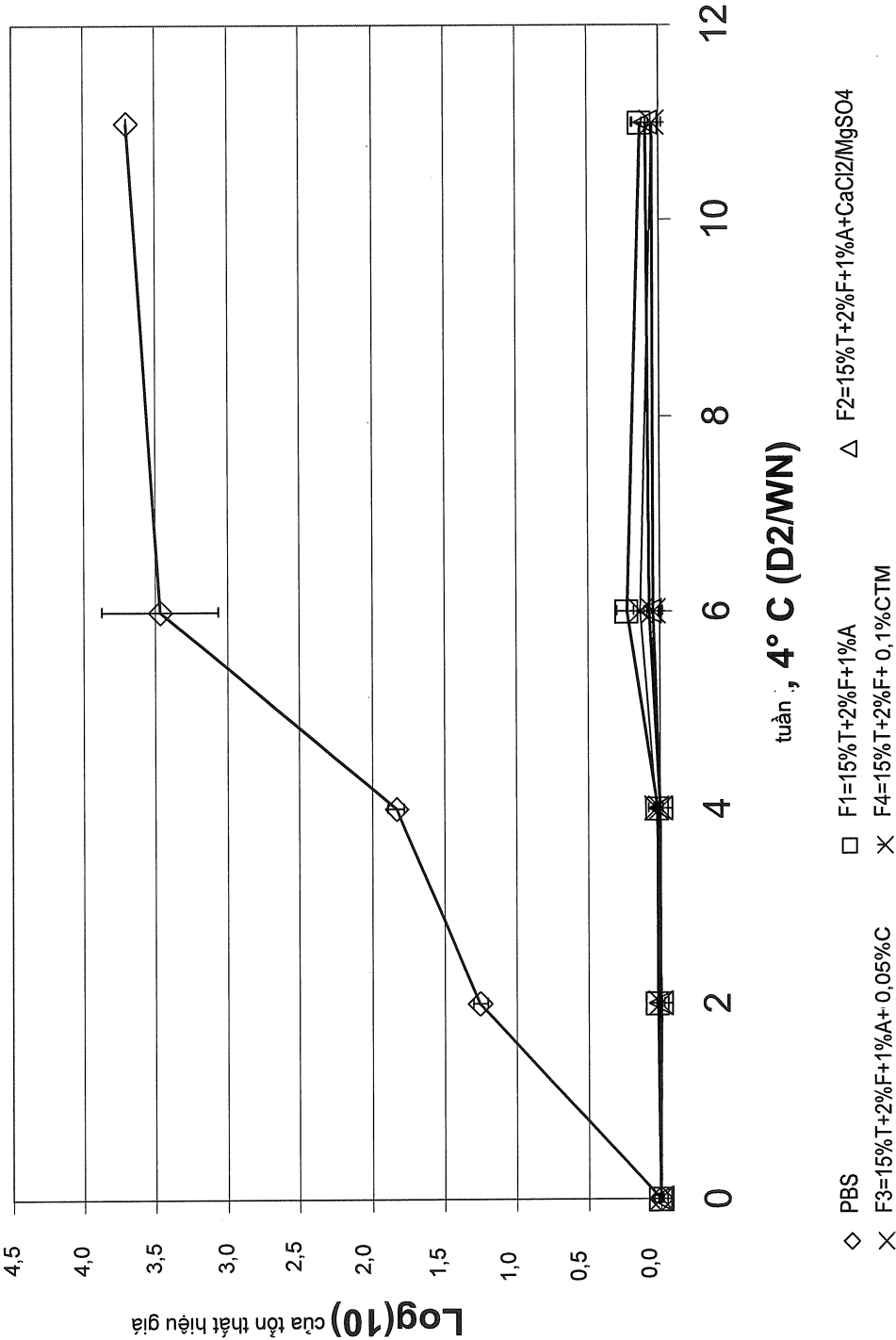


Fig. 9

