



(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)



1-0029013

(51)⁷ A61K 39/00; A61K 39/02

(13) B

(21) 1-2015-03653

(22) 06/03/2014

(86) PCT/EP2014/054379 06/03/2014

(87) WO/2014/135651 12/09/2014

(30) 61/774,993 08/03/2013 US; 13169328.5 27/05/2013 US

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/02/2016 335A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden, The Netherlands

(72) POOLMAN, Jan Theunis (NL).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN HO GÀ VÔ BÀO

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ho gà vô bào (aP) bao gồm biến độc tố ho gà của kháng nguyên *Bordetella pertussis* (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN), trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100 µg đối với mỗi liều dùng cho người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực chăm sóc sức khỏe. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ho gà vô bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bordetella pertussis là virus gây ho gà. Việc đưa vào vacxin toàn bộ tế bào *B. pertussis* (wP) đã bị giết trong những năm 1940 đã thành công trong việc làm giảm tỷ lệ phát bệnh và tỷ lệ chết do ho gà ở trẻ nhỏ và trẻ sơ sinh [<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf>; Bisgard, K.M. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pertussisguide/downloads/chapter1.pdf>. 2000; Edwards, K.M. & Decker, M.D. Pertussis vaccines. Trong tài liệu *Vaccines* (Eds. Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. & Offit, P.A.) Elsevier Health Sciences, 2008. 467-517; Tài liệu hướng dẫn này được đề cập dưới đây là "*Vaccines*, Plotkin 2008"]. Tuy nhiên, trên thế giới, ho gà vẫn còn là vấn đề quan trọng ở trẻ nhỏ. Các đánh giá từ WHO đề xuất rằng, trong năm 2008 khoảng 16 triệu ca mắc ho gà xuất hiện, và khoảng 195.000 ở trẻ nhỏ tử vong do bệnh này.

Từ những năm 90, vacxin wP đã được thay thế bởi vacxin ho gà vô bào (aP) ở các nước thu nhập cao nhất và gần đây hơn ở cả các nước có thu nhập trung bình. Vacxin ho gà vô bào cảm ứng với các tác dụng phụ tương đối ít hơn so với vacxin wP mà kết hợp với với rủi ro cao là bị sốt ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), phản ứng dị truyền ở vị trí tiêm và, mặc dù đến mức độ kém hơn, chứng co giật và các đoạn đáp ứng cao với đường ruột [Zhang, *Cochrane Database Syst Rev* 2011].

Một đến hai thập kỷ sau khi giới thiệu vacxin aP, sự tăng về khai báo ho gà trong thanh thiếu niên và người trưởng thành đã được báo cáo bởi một số nước, bao gồm Hợp chủng quốc Hoa Kỳ, Vương Quốc Anh, Úc, Na-Uy và Hà Lan. Các giải thích có lợi bao gồm chẩn đoán được cải thiện và giám sát, mô phỏng việc quay vòng các chủng *B. pertussis* vào vacxin, và/hoặc tăng hiện tượng suy giảm miễn dịch kết hợp với vacxin aP [Tanaka, *Jama* 2003, 290: 2968-2975; Satoh, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010, 33: e81-88; Zepp, *Lancet Infect Dis*

2011; De Greeff, *PLoS One* 2010, : e14183; Tan, *Pediatr Infect Dis J* 2005, 24(5 Suppl): S10-18].

Hiện tại, tất cả vaccin aP được cấp phép được tạo thành từ tối thiểu là một, nhưng chủ yếu là phức, lên đến tối đa là 5 yếu tố độc lực *B. pertussis* (được giải độc). Tất cả các vaccin aP chứa biến độc tố ho gà (PT). Vaccin aP đa thành phần ít nhất bao gồm PT và sợi ngưng kết hồng cầu bám kết bề mặt *B. pertussis*. Với việc làm tăng hóa trị hơn nữa một hoặc nhiều trong số chất bám dính pertactin (PRN) và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM2 và FIM 3, cùng nhau là để chỉ FIM hoặc FIM2/3 ở đây) có mặt [Edwards, In: *Vaccines*, Plotkin, 2008. 467-517].

Tài liệu WO 96/34883 mô tả các liều nằm trong khoảng từ 1 đến 10 μ g của FIM đối với mỗi liều dùng cho người, với các liều là 10 và 5 μ g đối với mỗi liều dùng cho người trong vaccin aP được lấy làm ví dụ, trong khi chỉ các liều 5 μ g đối với mỗi liều dùng cho người thực tế được thử nghiệm, và các vaccin được thử nghiệm được xem xét tính hiệu quả.

Thường tin tưởng rằng, vaccin aP5 (vaccin ho gà vô bào với 5 thành phần PT, FHA, PRN, FIM2/3; DTaP5 là vaccin aP5 còn bao gồm biến độc tố bệnh uốn ván và biến độc tố bệnh bạch hầu) là các vaccin aP hiệu quả nhất hiện tại khả thi. Các lượng riêng của các thành phần aP có mặt trong vaccin aP5 được đăng ký có trên thị trường là (theo microgam đối với mỗi liều dùng cho người): 2,5-20 đối với PT, 5-20 đối với FHA, 3 đối với PRN và 5 đối với FIM.

Ở một vài trong số các thử nghiệm về hiệu quả vaccin ho gà vô bào được tiến hành ở châu Âu giữa những năm 1990, các nỗ lực được thực hiện để xác định các mối liên quan tạo miễn dịch của việc bảo vệ đối với các thành phần vaccin aP riêng. Sử dụng dữ liệu từ thử nghiệm của Thụy Điển DTaP5 (PT+FHA+PRN+FIM2/3) mối tương quan thống kê rõ rệt giữa bảo vệ lâm sàng và sự có mặt trong huyết thanh tiền phơi nhiễm của các kháng thể IgG ngừa PRN, FIM2 và PT, nhưng không ngừa FHA, đã được chứng tỏ [Storsaeter, *Vaccine* 1998, 16: 1907-1916]. FIM3 xuất hiện là thành phần không bảo vệ trong phạm vi DTaP5 [Poolman, *Expert Reviews Vaccines* 2007, 6: 47-56].

Huyết thanh được gom từ các đối tượng trong thử nghiệm vaccin ở Đức cho phép đánh giá các mức cụ thể của kháng thể kháng PT, FHA, PRN và FIM2 mà

liên quan với việc bảo vệ, mà đã thể hiện rằng chỉ các kháng thể ngừa PRN, và PT kết hợp rõ rệt với việc bảo vệ [Stehr, 1998, *Pediatrics* 101: 1-11; Cherry, 1998, *Vaccine* 16: 1901-1906]. Ngoài ra, các nghiên cứu tiền lâm sàng có đã thể hiện rằng, việc bổ sung PRN cải thiện mức độ bảo vệ được cho bởi vacxin mà chứa PT và FHA mô hình nhiễm ở chuột vào trong mũi [Guiso, 1999, *Vaccine* 17: 2366-2376; DeNoel, 2005, *Vaccine* 23: 5333-5341] và các kháng thể kháng PRN là cốt yếu đối với opsonin thực bào của *B. pertussis* [Hellwig, 2003, *JID* 188: 738-742]. Các dữ liệu này cùng chỉ ra rằng PT và PRN là kháng nguyên bảo vệ chính trong vacxin ho gà vô bào hiện hành.

Làm một phần của thử nghiệm hiệu quả tiêm phòng vacxin aP sắp tới, IgG bảo vệ ngừa PT, FHA, PRN và FIM2/3 được đo trong các mẫu huyết thanh liên tiếp thu được từ những người tham gia qua giai đoạn 18 tháng. Qua 18 tháng, tỷ lệ phần trăm sa sút về IgG ngừa PT là mạnh nhất (73% giảm về hiệu giá IgG trung bình hình học) và cao hơn rõ rệt so với tỷ lệ phần trăm giảm về các kháng thể ngừa PRN, FHA và FIM. Ngược lại, kháng thể IgG kháng PRN có tỷ lệ sa sút thấp nhất (56% giảm về hiệu giá IgG trung bình hình học) [Le, 2004, *JID*, 190: 535-544].

Kết hợp 2 quan sát cho thấy 1) PT và PRN là các kháng nguyên bảo vệ chính trong vacxin aP và 2) các kháng thể kháng PT có tỷ lệ sa sút cao hơn rõ rệt so với các kháng thể kháng PRN, nhấn mạnh rằng, các kháng thể kháng PRN là cốt yếu trong việc đề xuất bảo vệ trong thời gian dài nhờ aP ngừa nhiễm *B. pertussis*.

Tuy nhiên, sự nổi lên của các chủng *B. pertussis* không biểu hiện PRN đã quan sát được trong vài năm gần đây khắp thế giới, ví dụ, ở Pháp, Nhật, Hà Lan, Mỹ, Phần Lan, Na-Uy và Thụy Điển [Bouchez, 2009, *Vaccine* 27: 6034-41; Hegerle, 2012, *Clin. Microbiol. Infect.* 18: E340-346; Otsuka, 2012, *PloS One* 7: e31985; Advani, 2013, *J. Clin. Micro* 51: 422-428]. Nghiên cứu gần đây ở Mỹ đã thể hiện rằng 11 trong số 12 dạng phân lập của *B. pertussis* được nuôi cấy từ các mẫu ở trẻ nhỏ nằm viện ở Philadelphia trong quá trình các năm 2011 và 2012 thực tế là âm tính với PRN [Queenan, 2013, *N Engl J Med.* 368: 583-4]. Xem là có hay không mô phỏng chủng này được truyền vacxin sơ bộ hiện tại không được biết đến. Có thể là, các chủng âm tính với PRN này có thể làm mất vacxin dẫn đến

miễn dịch, đặc biệt là khi các hiệu giá kháng PT suy giảm, và điều này góp phần đề quan sát được là làm tăng về bệnh *B. pertussis*.

Các vaccin aP hiện tại được cấp phép và các vaccin aP có trên thị trường do đó xuất hiện hiệu quả không đủ, cụ thể là ngừa chủng âm tính với PRN mới nổi lên. Vẫn còn có nhu cầu đôi hơn nữa với vaccin aP, mà có hiệu quả cải thiện cụ thể để ngừa các chủng *B. pertussis* âm tính với PRN này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm vaccin ho gà vô bào.

Tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng vaccin aP bao gồm liều cao FIM 2/3 thể hiện việc bảo vệ được cải thiện rõ rệt ngừa các chủng *B. pertussis* âm tính với PRN. Do đó, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin ho gà vô bào (aP) bao gồm kháng nguyên *B. pertussis* biến độc tố ho gà (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN), trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100 µg đối với mỗi liều dùng cho người.

Theo một số phương án, FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 80, từ 15 đến 60, từ 20 đến 60, hoặc từ 12 đến 50, từ 15 đến 50, từ 20 đến 50, từ 20 đến 30, từ 20 đến 25, hoặc từ 12 đến 30, hoặc từ 12 đến 25, hoặc khoảng 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25 µg đối với mỗi liều dùng cho người.

Theo các phương án được ưu tiên, vaccin aP theo sáng chế bao gồm pertactin (PRN).

Theo một số phương án, PT được giải độc di truyền.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn bao gồm các kháng nguyên từ một hoặc nhiều mầm bệnh khác với *B. pertussis*.

Theo một số phương án của chúng, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều trong số:

a) biến độc tố bệnh uốn ván; b) biến độc tố bệnh bạch hầu; c) Liên hợp oligosacarit hoặc polysacarit *Haemophilus influenzae* dạng b (Hib); d) kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg); và e) virus bại liệt được bất hoạt (IPV).

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm vaccin

ho gà vô bào theo sáng chế, biến độc tố bệnh uốn ván và biến độc tố bệnh bạch hầu.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn bao gồm chất bổ trợ. Theo một số phương án, chất bổ trợ bao gồm muối nhôm, như là nhôm phosphat, nhôm hydroxit, hoặc cả nhôm phosphat và nhôm hydroxit.

Sáng chế còn mô tả phương pháp cảm ứng đáp ứng miễn dịch trong, hoặc để vaccin cho, đối tượng ngừa *B. pertussis*, phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng chế phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn mô tả phương pháp bảo vệ đối tượng khỏi ho gà mà bị gây ra bởi nhiễm chủng âm tính với PRN của *B. pertussis*, phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng chế phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong cảm ứng đáp ứng miễn dịch trong, hoặc để vaccin cho, đối tượng ngừa *B. pertussis* bằng cách dùng chế phẩm cho đối tượng. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm theo sáng chế để điều chế thuốc cảm ứng đáp ứng miễn dịch trong, hoặc để vaccin cho, đối tượng ngừa *B. pertussis* bằng cách dùng chế phẩm cho đối tượng. Theo một số phương án, *B. pertussis* ngừa mà đáp ứng miễn dịch được mong muốn bao gồm chủng âm tính với PRN.

Sáng chế còn mô tả phương pháp chủng ngừa cho đối tượng là người ngừa *Bordetella pertussis*, tùy ý chủng âm tính với PRN của *Bordetella pertussis*, phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng kháng nguyên *Bordetella pertussis* sau: biến độc tố ho gà (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN), trong đó FIM được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100 µg.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện log₁₀ CFU trung bình của *B. pertussis* cho từng phổi vào ngày 0, 2, 5 và 8 sau thử thách vào trong mũi ở chuột được vaccin với vaccin DTaP5 (aP5) hoặc aP5 + FIM. Chuột được vaccin ở 4 và 7 tuần tuổi và được thử thách vào trong mũi ở 9 tuần tuổi với các chủng *B. pertussis* khác nhau: WHO

18323 (Fig.1A), PRN-STOP phân lập âm tính với PRN về lâm sàng (Fig.1B) và PRN-IS phân lập âm tính với PRN về lâm sàng (Fig. 1C).

* $p < 0,05$ so sánh kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vaccin với aP5 và aP5 + FIM ở từng thời điểm cụ thể, sử dụng thử nghiệm chính xác của Wilcoxon.

$p < 0,01$ so sánh Log10 CFU đặc tính đáp ứng theo thời gian từ ngày 0 đến ngày 8, sau khi vaccin với aP5 và aP5 + FIM sử dụng phân tích Covariance.

Fig. 2 thể hiện kết quả đếm Log10 CFU trung bình từ phổi ở chuột được thử thách với chủng *B. pertussis* âm tính với PRN I195 ở tuần 9 tuổi sau khi vaccin với vaccin aP2 ở 1/10 liều dùng cho người với việc bổ sung lượng FIM tăng ở 4 và 7 tuần tuổi. Phần mô tả chi tiết hơn được mô tả trong Ví dụ 2.

Fig. 3 thể hiện kết quả đếm Log10 CFU trung bình từ chuột 5 ngày bị mắc bệnh phổi sau thử thách với 4 các chủng *B. pertussis* ở tuần 9 sau khi vaccin với vaccin aP5 ở 1/10 liều dùng cho người có hoặc không có việc bổ sung 5µg FIM ở 4 và 7 tuần tuổi. Phần mô tả chi tiết hơn được mô tả trong Ví dụ 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm các yếu tố độc lực *Bordetella pertussis* được giải độc, cụ thể là biến độc tố ho gà (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN), trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100 µg đối với mỗi liều dùng cho người. Các chế phẩm này có thể được sử dụng làm vaccin ho gà vô bào (aP), và được chứng tỏ ở đây là có hiệu quả đáng ngạc nhiên hơn so với vaccin aP5 hiện là tốt nhất.

Cụ thể, liều FIM tăng như so với phân liều được mô tả và đề xuất trước đó cho thành phần này dẫn đến hiệu quả tiêm phòng vaccin được cải thiện ngừa chủng âm tính với PRN của *B. pertussis* mới nổi lên, như so với vaccin aP5 có trên thị trường và các vaccin aP có trên thị trường khác. Đây là một ngạc nhiên lớn, do kỹ thuật hiện nay không cho đề xuất bất kỳ để làm tăng lượng của FIM đối với mỗi liều dùng cho người lớn hơn 5 µg, và kỹ thuật hiện nay thực tế đề xuất rằng, việc làm tăng lượng của thành phần này không dẫn đến cải thiện hiệu quả.

Tác dụng của việc tăng liều FIM trong vaccin đã được, ví dụ, điều tra nghiên cứu trong các mô hình ở người và động vật. Trong trẻ sơ sinh 17 đến 19 tháng tuổi đã thể hiện rằng, không có sự khác nhau về tần số của các phản ứng đảo ngược, hiệu giá kháng thể hoặc về hiệu giá số lần trung bình tăng sau tạo miễn dịch giữa 2 vaccin aP 5 thành phần với hoặc là 10 µg của PT, 5 µg của FHA, 3 µg của PRN và 5 µg của FIM2/3 hoặc bao gồm lượng gấp đôi của tất cả các kháng nguyên này (Halperin, *Arch Pedi Adol Med* 1994, 148: 1220-1224).

Trong mô hình động vật đã phát hiện ra rằng, không có sự khác nhau về thể trọng, trọng lượng lá lách, kết quả đếm bạch cầu ngoại vi và độ thanh thải của *B. pertussis* từ phổi, khi chuột được vaccin với 3 dạng vaccin ho gà mà chứa các lượng FIM khác nhau (Morokuma, *Devel Biol Stand* 1991, 73: 223-232).

Một nghiên cứu khác đã thể hiện là không có sự khác nhau về mức kháng thể IgG giữa chuột nhận hoặc là liều cao (20 µg) hoặc liều thấp (4 µg) của FIM2 hoặc FIM3 tái tổ hợp. Bảy ngày sau thử thách vào trong mũi, không có sự khác nhau về tải nạp vi khuẩn trong phổi của chuột đối chứng, chuột được vaccin với FIM2 hoặc chuột được vaccin với FIM3 (Xu, *BMC Microbiology* 2009, 9:274-281).

Do đó, phát hiện của chúng tôi về tính hiệu quả tăng của vaccin sử dụng liều FIM cao trong mô hình thử thách mũi họng ở chuột là rất ngạc nhiên.

Do đó, không có sự chỉ ra hoặc đề xuất trong kỹ thuật hiện nay là lượng FIM tăng trong vaccin aP ở lượng thông thường sẽ dẫn đến cải thiện hiệu quả ngừa các chủng đột biến âm tính với PRN mới nổi lên.

“Liều dùng cho người” như được sử dụng ở đây (đôi khi là để chỉ “liều dùng đơn cho người”), nghĩa là lượng vaccin mà được dùng cho người trong liều dùng đơn. Thông thường là, lượng này có mặt ở thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2ml, ví dụ, từ 0,2 đến 1ml, thông thường là 0,5ml. Do đó, các lượng được chỉ ra có thể, ví dụ, có mặt ở nồng độ microgam cho mỗi 0,5ml khối vaccin. Theo một số phương án liều dùng (đơn) cho người do đó bằng với 0,5ml.

Các thành phần của một vài vaccin aP mà có trên thị trường hoặc đã có trên thị trường được mô tả trong các Bảng 21-3 và 21-4 của tài liệu "Vaccines. Tái bản lần thứ 5. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Phần 2, Chương 2 21 "Pertussis

vaccines", K.M. Edwards & M.D. Decker. tr. 467-517, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Các chế phẩm vacxin aP theo sáng chế bao gồm PT, FHA, và FIM2/3, và tốt hơn là PRN. Các thành phần này là các thành phần tiêu chuẩn trong các vacxin aP khác nhau có trên thị trường, và có được từ các nhà sản xuất khác nhau (tham khảo, ví dụ, Bảng 21-3 của Chương 21 của tài liệu *Vaccines*, Plotkin 2008), và, ví dụ, có trên thị trường từ List Biological Laboratories, Inc (Campbell, California). Chế phẩm theo sáng chế bao gồm độc tố ho gà được giải độc, còn được biết đến là biến độc tố ho gà (PT). PT có thể được giải độc hóa học hoặc được giải độc di truyền. Giải độc hóa học có thể, ví dụ, được tiến hành bởi phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp giải độc hóa học thông thường khác nhau, như là xử lý với formaldehyt, hydro peroxit, tetranitrometan, hoặc glutaraldehyt. Ví dụ, việc giải độc có thể được tiến hành như được mô tả ở trang 17 và Ví dụ 3 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án được ưu tiên, PT được giải độc di truyền. Điều này có thể được thực hiện bằng cách tạo ra các đột biến trong gen độc tố ho gà để bất hoạt hoạt tính enzym của đơn vị xúc tác nhỏ S1 của độc tố ho gà, và, ví dụ, được mô tả trong tài liệu US 7,144,576, US 7,666,436, và US 7,427,404. Cụ thể là các đột biến có lợi để giải độc độc tố ho gà, ví dụ, được đề xuất trong tài liệu US 7,427,404, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Một phương án đặc biệt có lợi là độc tố ho gà trong đó gốc axit amin Glu129 trong trình tự axit amin của độc tố ho gà gốc trong đơn vị nhỏ S1 được thay thế bởi Gly (E129G) và Arg9 được thay thế bởi Lys (R9K) (Patent Mỹ số 7,427,404; Buasri, *BMC Microbiology* 2012, 12: 61). PT được giải độc di truyền này (E129G, R9K) còn có thể được phân lập thuận tiện từ chủng được thiết kế di truyền mà thể hiện việc sản xuất được cải thiện của điều này PT [Buasri, 2012, *supra*]. Các ưu điểm của việc sử dụng đột biến được giải độc di truyền mà không sử dụng hoặc sử dụng ít các hóa chất nguy hiểm cần thiết để giải độc, bảo quản cải thiện của các epitop của kháng nguyên PT và do đó better đáp ứng miễn dịch tchúng tôito, và/hoặc các lượng thấp hơn của kháng nguyên có thể được sử dụng trong vacxin. Theo các phương án khác nữa, PT được giải độc hóa học. PT được giải độc hóa học hoặc được giải độc di truyền được sử dụng rộng rãi trong vacxin aP (tham khảo, ví dụ, Bảng 21-3 ở Chương 21 của tài liệu

Vaccines, Plotkin 2008). PT có thể, ví dụ, thu được và được tinh chế như được mô tả ở trang 16 và Ví dụ 2 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. PT còn có thể thu được sử dụng phương pháp như, ví dụ, được mô tả trong tài liệu US5085862, WO96/34623, US4705868, EP0336736, WO9115505, EP0306318, EP0322533, EP0396964, EP0275689, WO91/12020, EP0427462, WO9819702 và US4784589 được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

PT được giải độc hóa học hoặc được giải độc di truyền là có được từ các nguồn khác nhau có trên thị trường. Theo một số phương án, lượng của PT trong vaccin theo sáng chế nằm trong khoảng từ 2-50 μ g, 5-40 μ g, 10-30 μ g, hoặc 20-25 μ g đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml).

Chế phẩm theo sáng chế theo một số phương án bao gồm pertactin (PRN), protein màng ngoài 69 kD của *B. pertussis* (do đó đôi khi còn là để chỉ kháng nguyên 69K). PRN có thể, ví dụ, thu được và được tinh chế như được mô tả ở trang 18 đến 19 và Ví dụ 2 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Còn có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu EP0162639, EP0484621, US6444211, US5276142, US5101014, EP0336736, WO96/34623, WO90/16651, và tài liệu WO90/56076, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. PRN còn có thể được phân lập thuận tiện từ các chủng *B. pertussis* mà được thiết kế di truyền để biểu hiện mức độ cao của PRN, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu [Buasri, 2012, *supra*].

Theo một số phương án, lượng của PRN trong vaccin theo sáng chế nằm trong khoảng 0,5-100 μ g, 1-50 μ g, 2-20 μ g, 3-30 μ g, 5-20 μ g, hoặc 6-10 μ g đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml) [tham khảo, ví dụ, EP 0928198].

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), chất bám dính chủ đạo 230-kDa của *B. pertussis* mà là quan trọng cho sự bám chặt của *B. pertussis* vào các tế bào biểu mô của vật chủ có lông mao ở đường hô hấp, và thành phần được thiết lập của vaccin aP nhiều hóa trị có trên thị trường. FHA có thể, ví dụ, thu được và được tinh chế như được mô tả ở trang 17 đến 18 và Ví dụ 2 của tài liệu WO 96/34883 được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. FHA còn có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu WO9013313, EP0484621,

WO9634623, EP0336736, WO9115505, US4784589, và tài liệu WO9004641, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, lượng của FHA trong vacxin theo sáng chế nằm trong khoảng 2-50 μg , 5-40 μg , 10-30 μg , hoặc 20-25 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml).

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm fimbrial agglutininogen 2 và 3, còn là đề chỉ fimbriae 2 và 3 hoặc agglutininogen 2 và 3 hoặc Ag 2 và 3 (ở đây là đề chỉ FIM2 và FIM3, hoặc là “FIM” hoặc “FIM2/3”, mà là tổ hợp của FIM2 và FIM3 ở dạng hỗn hợp). Thông thường là, trong chế phẩm theo sáng chế, tỷ lệ trọng lượng của FIM 2 so với FIM 3 nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1, ví dụ từ khoảng 1:1 đến 3:1, ví dụ từ khoảng 1,5:1 đến 2:1. Việc điều chế FIM được mô tả chi tiết ở trang 12 đến 13 và Ví dụ 2 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. FIM còn có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu WO9634623, US4784589, US6475754, EP0555894, WO9858668, và tài liệu WO0207764, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Lượng FIM trong vacxin theo sáng chế nằm trong khoảng từ 12-100 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml). Theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 12-50 μg , or 12-30 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml). Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, lượng FIM ít nhất là 15 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml). Theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng 15-100 μg , 15-80 μg , 15-60 μg , 15-50 μg , 15-30 μg hoặc 15-25 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml). Theo các phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, lượng FIM ít nhất là 20 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml). Theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng 20-100 μg , 20-80 μg , 20-60 μg , 20-50 μg , 20-30 μg , 20-25 μg , hoặc 25-50 μg đối với mỗi liều dùng cho người (thông thường là 0,5ml).

FIM có thể được phân lập từ *B. pertussis*, hoặc có thể theo cách tái tổ hợp được sản xuất, hoặc ví dụ có trên thị trường từ List Biological Laboratories, Inc (Campbell, California; <http://www.listlabs.com>, sản phẩm # 186 trong catalo trực tuyến).

Theo một số phương án được ưu tiên, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm đối với mỗi liều dùng cho người (hoặc cho mỗi 0,5ml khối vaccin): 10-25 μg PT, 10-25 μg FHA, 3-8 μg PRN, và 12-50 μg FIM. Theo một số phương án được ưu tiên, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm đối với mỗi liều dùng cho người (hoặc cho mỗi 0,5ml khối vaccin): 20-25 μg PT, 20-25 μg FHA, 3-8 μg PRN, và 12-50 μg FIM. Theo một số phương án được ưu tiên, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm đối với mỗi liều dùng cho người (hoặc cho mỗi 0,5ml khối vaccin): 20-25 μg PT, 20-25 μg FHA, 3-8 μg PRN, và 12-25 μg FIM. Trong một phương án nào đó, sáng chế đề xuất vaccin bao gồm đối với mỗi liều dùng cho người (hoặc cho mỗi 0,5ml khối vaccin) khoảng 20 μg FHA, khoảng 3 μg PRN, và khoảng 15-20 μg FIM.

Một cách đơn giản để điều chế vaccin theo sáng chế là bổ sung FIM có trên thị trường vào vaccin aP5 có trên thị trường. Vaccin theo sáng chế còn có thể đơn giản được điều chế bằng cách bổ sung FIM vào vaccin aP có trên thị trường mà bao gồm PT và FHA nhưng không có FIM (aP2), hoặc vaccin aP có trên thị trường mà bao gồm PT, FHA và PRN nhưng không có FIM (aP3). Theo một số phương án, FIM có thể trước tiên được hấp phụ vào chất bổ trợ nếu mong muốn như vậy, ví dụ vào nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat, trước khi bổ sung vào các thành phần khác. Theo các phương án khác nữa, FIM được bổ sung vào các thành phần khác không có hấp phụ trước vào chất bổ trợ.

Thuật ngữ 'khoảng' đối với các giá trị bằng số như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là giá trị đưa ra $\pm 10\%$.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm các thành phần protein không ho gà, ví dụ để thu được vaccin tổ hợp [Decker, M.D., Edwards, K.M. & Bogaerts, H.H. Combination vaccines. Trong tài liệu *Vaccines* (Eds. Plotkin, S., Orenstein, W.A. & Offit, P.A.) Elsevier Health Sciences, 2008. 1069-1101]. Do đó theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm kháng nguyên dẫn xuất từ một hoặc nhiều mầm bệnh khác với *B. pertussis*. Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều trong số các loại dưới đây: biến độc tố bệnh uốn ván (TT), biến độc tố bệnh bạch hầu (DT),

liên hợp oligosacarit hoặc polysacarit *Haemophilus influenzae* dạng-b (Hib), kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg), virus bại liệt được bất hoạt (IPV).

Vaccine tổ hợp của aP với các thành phần không ho gà này đã được biết đến và được sử dụng rộng rãi. Việc điều chế vaccine tổ hợp đã, ví dụ, được mô tả trong tài liệu WO2010/046935, US6013264, WO2007/054820, WO98/000167, và EP1946769, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, aP5 (hoặc aP4: PT, FHA, FIM2/3) theo sáng chế là ở trong chế phẩm mà còn bao gồm DT và TT, do đó đề xuất đối với DTaP5 (hoặc DTaP4) vaccine theo sáng chế. Vaccine DTaP5 là được sử dụng rộng rãi để ngăn ngừa bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván và ho gà. Vaccine theo sáng chế có lượng FIM cao hơn so với vaccine DTaP5 được mô tả trước khi, và ngừa hiệu quả hơn các chủng *B. pertussis* âm tính với PRN so với thông thường vaccine DTaP5.

Một cách để phân lập, tinh chế và để giải độc DT được mô tả ở trang 33-34 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. DT còn có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu US4709017, US5843711, US5601827, US5917017, và tài liệu WO96/34623, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Một cách để phân lập, tinh chế và để giải độc TT được mô tả ở trang 34- 36 của tài liệu WO 96/34883, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. TT còn có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu EP0209281, EP0478602, và tài liệu WO96/34623, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Liên hợp oligosacarit hoặc polysacarit Hib có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu WO2007/054820, WO2004/110480, US6333036, WO2010/046935, US4372945, US4474757, WO95/08348, WO2010/046935, US4673574, EP0161188, EP0208375, và EP0477508, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Hib kháng nguyên có thể ví dụ là nang polysacarit của Hib, hoặc liên hợp của polysacarit hoặc dẫn xuất oligosacarit của chúng vào protein chất mang như là DT, TT, hoặc₁₉₇, tính hướng không độc của bệnh bạch hầu độc tố được phân lập từ *Corynebacterium diphtheriae* C7 (b197).

HBsAg có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu EP0226846, EP0299108, US6013264, WO2007/054820, WO2010/046935, và tài liệu WO9324148, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

IPV có thể là đơn trị, chứa một dạng của virus bại liệt (dạng 1, 2 hoặc 3), hoặc lưỡng trị (chứa 2 các dạng của virus bại liệt, ví dụ các dạng 1 và 2, 1 và 3 hoặc 2 và 3), hoặc tam trị (chứa 3 dạng của virus bại liệt, tức là, các dạng 1, 2 và 3). Tốt hơn là, IPV theo sáng chế chứa các dạng virus bại liệt 1, 2 và 3 được bất hoạt. IPV có thể, ví dụ, thu được như được mô tả trong tài liệu US 4525349, và tài liệu WO2011/006823, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Các thành phần không ho gà này có thể thu được từ các nhà sản xuất khác nhau. Các ví dụ được mô tả trong tài liệu ["Vaccines." Tái bản lần thứ 5. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Phần 2, Chương 38 ("Combination vaccines", M.D. Decker, K.M. Edwards, H.H. Bogaerts, tr. 1069-1101)].

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm chứa các thành phần ho gà (vacxin aP5 hoặc aP4) theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên (tức là, bao gồm 12 đến 100 µg FIM đối với mỗi liều dùng cho người và PT, FHA và tùy ý PRN; dưới đây là để chỉ "aP theo sáng chế", hoặc gọi là "aP5*" cho ngắn gọn), và DT.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế và TT.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế và IPV (ở đây là để chỉ "aP5*-IPV").

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT và TT (ở đây là để chỉ "DTaP5*").

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT và Hib (ở đây là để chỉ "DTaP5*-Hib").

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT và IPV (ở đây là để chỉ "DTaP5*-IPV").

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT và HBsAg (ở đây là để chỉ "DTaP5*- HepB").

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT, Hib và HBSAg (ở đây là để chỉ “DTaP5*-Hib-HepB”).

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT, Hib và IPV (ở đây là để chỉ “DTaP5*- Hib-IPV”).

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT, HBSAg và IPV (ở đây là để chỉ “DTaP5* -HepB -IPV’ ”).

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm aP theo sáng chế, DT, TT, Hib, HBSAg và IPV (ở đây là để chỉ “DTaP5*-Hib-HepB-IPV”).

Các thành phần không ho gà khác nữa có thể tùy ý được bổ sung, ví dụ các thành phần mà là đôi khi được kết hợp với aP trong vaccin tổ hợp, như là kháng nguyên từ màng não khuẩn cầu và/hoặc phế khuẩn cầu.

Đối với vaccin tổ hợp, lượng của các thành phần không ho gà có thể được biến thiên. Nhìn chung, lượng của các thành phần này như thông thường là có mặt trong các vaccin riêng hoặc trong tổ hợp có thể được sử dụng theo sáng chế. Tham khảo, ví dụ "Vaccines." Tái bản lần thứ 5. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Phần 2, về các thành phần khác nhau và các vaccin tổ hợp; cụ thể, Chương 38 mô tả các vaccin kết hợp bao gồm các vaccin aP với các thành phần được đề cập nêu trên [Decker, tr 1069-1101]; Chương 10 mô tả DT [Vitek, tr 139-156]; Chương 31 mô tả TT [Wassilak, pp 805-840]; Chương 25 mô tả vaccin IPV [Plotkin, tr 605-630]; Chương 11 mô tả vaccin Hib [Chandran, tr 157-176]; và Chương 13 mô tả vaccin Hepatitis B (dựa trên HBsAg) [Mast, tr 205-242], được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các ví dụ không giới hạn của lượng phù hợp (thường còn để biểu hiện các lượng của DT và TT theo IU hoặc theo Lf (đơn vị kết cụm), tham khảo, ví dụ, [Decker, In: Vaccines, tr 1069-1101, supra], nhưng ở đây sáng chế đề xuất theo microgam) của kháng nguyên theo liều sẽ, ví dụ nằm trong khoảng: 1-100 µg, ví dụ 2-40 µg, ví dụ 6-25 µg, ví dụ 15-25 µg DT; 1-50 µg, ví dụ 2-20 µg, ví dụ 5-10 µg TT; 1-100 µg, ví dụ 3 đến 40 µg protein HBsAg cho một mililít; 0,1-100 µg, ví dụ 0,2 đến 50 µg, ví dụ 1 đến 25 µg, ví dụ 2-10 µg nang polysacarit hoặc oligosacarit Hib của chúng ở dạng liên hợp vào protein chất mang; các sản phẩm chứa IPV dẫn xuất từ dạng đại (IPV dạng đại) nhìn chung được tạo thành để chứa các đơn vị 40-8-32 D-Ag theo liều đối với các dạng virut bại liệt 1, 2 và 3,

tương ứng. Tuy nhiên, các lượng này có thể còn được thay đổi, ví dụ các lượng thấp hơn như là các đơn vị 10-20 D-Ag đối với dạng IPV 1 còn có thể được sử dụng, và các lượng đối với các dạng IPV 2 và 3 còn có thể được biến thiên (tham khảo ví dụ EP 2066344). Các lượng có thể còn thay đổi theo việc sử dụng mong muốn, ví dụ vaccin liều mạnh có thể theo một số phương án chứa ít đơn vị hơn của một số thành phần so với vaccin môi.

Các thành phần protein trong chế phẩm theo sáng chế được mong muốn dẫn đến đáp ứng miễn dịch tùy thuộc vào việc dùng cho đối tượng thích hợp. Sẽ là rõ ràng đối với chuyên gia trong ngành là bất cứ nơi nào được ưu tiên ở đây cho protein hoặc đột biến của chúng, ví dụ các biến độc tố, các phần của protein có thể còn được sử dụng và có thể có các đặc tính tương đương hoặc trong một số trường hợp các đặc tính được ưu tiên for cảm ứng đáp ứng miễn dịch. Hơn nữa, protein có thể chứa (bổ sung) các đột biến, như là loại bỏ, chèn vào, thay thế, v.v.. Do đó, các đoạn chất kháng nguyên và các dạng biến đổi của các thành phần protein được chỉ ra là có mặt trong phạm vi ý nghĩa của protein được chỉ ra ở đây.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm vaccin ho gà vô bào, hoặc là các thành phần của vaccin tổ hợp, mà thường đáp ứng miễn dịch đến một hoặc nhiều trong số các thành phần trong chế phẩm tùy thuộc vào việc dùng cho các đối tượng thích hợp. Đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm đáp ứng tế bào và/hoặc đáp ứng dịch thể. Đáp ứng miễn dịch này tốt hơn là cho sự bảo vệ ngừa nhiễm với mầm bệnh hoặc ngừa bệnh hoặc ít nhất giảm mức trầm trọng của triệu chứng bị gây ra bởi mầm bệnh từ mà các thành phần tương ứng là dẫn xuất (tức là, trong trường hợp bất kỳ tốt hơn là ngừa *B.pertussis*, và tốt hơn là còn ngừa âm tính với PRN đột biến của chúng). Chế phẩm theo sáng chế có thể do đó phù hợp là để chỉ vaccin. Liều của vaccin là lượng mà được dùng trong việc dùng đơn cho đối tượng. Đối tượng có thể phù hợp là động vật hoặc người, và theo một số phương án đối tượng được ưu tiên là người. Nhiều vaccin là phù hợp, và thực tế tốt hơn là, được dùng nhiều hơn một lần cho cùng cá thể với đủ khoảng thời gian để thu được hiệu quả liều mạnh ở cá thể, ví dụ, ít nhất 4 tuần, đến một vài năm lên đến khoảng 2 thập kỷ giữa các lần dùng. Miễn dịch phức thường được dùng cho trẻ sơ sinh. Chế phẩm theo sáng chế có thể còn được dùng nhiều hơn một lần, ví dụ, trong một

phương án không giới hạn, 2 hoặc 3 hoặc nhiều lần với ít nhất khoảng thời gian 4 tuần, ví dụ khoảng thời gian 1 hoặc 2 tháng giữa mỗi lần dùng. Một ví dụ không giới hạn là việc dùng theo lịch trình EPI, ở 6 tuần, 10 tuần và 14 tuần tuổi. Một cơ chế khác sẽ là ở 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng tuổi. Theo một số phương án vaccin liều mạnh được đưa ra 10 đến 20 năm sau đó, ví dụ, trong quá trình ở độ tuổi thanh niên. Vaccin liều mạnh thêm 10 năm nữa có thể được đưa ra. Theo một số phương án, aP theo sáng chế được dùng 2 hoặc 3 lần trong năm đầu tiên của cuộc sống, liều mạnh hơn nữa được dùng năm thứ hai của cuộc sống, và liều mạnh hơn nữa được dùng ở 4 đến 5 năm tuổi, sau khi mà liều mạnh cho thanh thiếu niên được dùng ở gần 12 năm tuổi. Ngoài ra, Td (vaccin chứa TT-DT được đưa ra cho thanh thiếu niên) đề xuất liều mạnh hơn có thể được tiếp sau, tức là, mỗi mười năm và thay thế Td với Tdap, trong đó thành phần ho gà vô bào là aP theo sáng chế. Tuy nhiên, sẽ là rõ ràng đối với chuyên gia trong ngành là sơ đồ vaccin của vaccin aP theo sáng chế có thể được biến thiên phù hợp, như rõ ràng từ đa dạng rộng của cơ chế tạo miễn dịch của các vaccin aP có trên thị trường bởi các nhà thẩm quyền quốc gia khác nhau (ví dụ, Bảng 21-5 trong tài liệu "Vaccines." Tái bản lần thứ 5. S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, 2008, Phần 2, Chương 21 "Pertussis vaccines", K.M. Edwards & M.D. Decker. tr. 467-517).

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn được sử dụng phù hợp làm vaccin liều mạnh đối với dân số mà đã được vaccin trước đó bởi khác vaccin, là các loại wP hoặc vaccin aP của các chế phẩm khác nhau hoặc vaccin tổ hợp bao gồm wP hoặc aP của các chế phẩm khác nhau so với vaccin theo sáng chế. Các liều mạnh này có thể, ví dụ, được sử dụng đối với vaccin của người trưởng thành hoặc người già, mà có không được vaccin ngừa *B.pertussis* trong thời gian lâu hơn so với thập kỷ. Có thể là hữu dụng để lặp lại các vaccin liều mạnh này, ví dụ khoảng mỗi 5, 10 hoặc 15 năm một lần. Nó còn được đề xuất để dùng biến độc tố bệnh uốn ván, được giảm biến độc tố bệnh bạch hầu và vaccin ho gà vô bào (Tdap) cho phụ nữ mang thai với từng trường hợp bắt chấp tiền sử đã từng dùng Tdap ở lần mang thai trước đó. Theo một số phương án, aP theo sáng chế được dùng cho trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, thanh thiếu niên, người trưởng thành, người già, hoặc phụ nữ mang thai, ví dụ, là aP hoặc là Tdap.

Chế phẩm theo sáng chế là dược phẩm. Chế phẩm này bao gồm chế phẩm theo sáng chế và thông thường là chất mang hoặc tá dược được dùng. Trong bối cảnh này, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là chất mang hoặc tá dược đó, ở các phân liều và nồng độ được dùng, sẽ không gây ra các tác dụng không mong muốn hoặc có hại ở các đối tượng mà chúng được dùng cho. Các chất mang và các tá dược được dụng này là đã được biết rõ trong ngành [Remington. The Science and Practise of Pharmacy, Mack Publishing Company 1990; Frokjaer, S. & Hovgaard, L. Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, 2000; Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press 2000]. Chế phẩm tốt hơn là được bào chế và được dùng là dung dịch tiệt trùng. Dung dịch vô trùng được điều chế bằng cách lọc vô trùng hoặc bằng các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết. Dung dịch này sau đó có thể được làm đông khô hoặc được nạp vào các vật chứa phân liều dược phẩm. Độ pH của dung dịch thường nằm trong khoảng pH 3,0 đến 9,5, ví dụ pH 5,0 đến 7,5. Các thành phần của chế phẩm thông thường là ở trong dung dịch có có chất đệm được dụng phù hợp, và dung dịch có thể còn chứa muối. Theo một số phương án, chất tẩy có mặt. Theo một số phương án, vaccin có thể được bào chế vào trong chế phẩm tiêm được. Các chế phẩm này chứa các lượng hiệu quả của các thành phần protein, là dung dịch lỏng lỏng tiệt trùng, huyền phù lỏng hoặc các tinh huống được tạo đông lạnh và tùy ý chứa các chất ổn định hoặc các tá dược. Một vài ví dụ của chế phẩm phù hợp để bảo quản và để dùng thuốc của vaccin aP hoặc vaccin tổ hợp là đã được biết đến là (ví dụ, các Bảng 21-3 và 21-4 trong tài liệu ["Vaccines." Tái bản lần thứ 5. S. Plotkin, và cộng sự, *supra*]). Các ví dụ về chất pha loãng phù hợp là PBS hoặc nước muối. Chất bảo quản có thể tùy ý có mặt, ví dụ phenoxyetanol, thimerosal hoặc paraben. Nếu chất bảo quản có mặt, tốt hơn là có mặt ở các mức thấp. Trong trường hợp vaccin tổ hợp bao gồm IPV, việc sử dụng của thimerosal tốt hơn là được tránh, khi mà thimerosal có thể dẫn đến thất thoát tiềm năng của thành phần IPV (tham khảo ví dụ Sawyer LA, 1994, *Vaccine* 12 : 851-856; EP 2066344). Các thành phần khác nữa mà có thể tùy ý có mặt làm các thành phần cấu thành vết là polysorbate-80, gelatin và phần tồn lưu từ các biến độc

tổ hóa học (ví dụ, nếu PT được biến độc tổ hóa học) như là glutaraldehyt, formaldehyt.

Tốt hơn là vacxin theo sáng chế được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng 2-8°C.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm hơn nữa một hoặc nhiều chất bổ trợ. Chất bổ trợ được biết đến trong ngành là để làm tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch cho xác định kháng nguyên được áp dụng (để tìm hiểu về chất bổ trợ, tham khảo, ví dụ, Montomoli, 2011, *Expert Rev Vaccines* 10: 1053-1061). Các ví dụ về chất bổ trợ phù hợp bao gồm các muối nhôm như là nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat; chế phẩm nhũ tương trong dầu (hoặc chế phẩm dầu trong nước), bao gồm nhũ tương squalen nước, như là MF59 (tham khảo, ví dụ, tài liệu WO 90/14837); chế phẩm saponin, như là đối với QS21 có trên thị trường và Phức kích thích miễn dịch (ISCOMS) (tham khảo, ví dụ, US 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); kháng thể thụ thể giống Toll (TLR), ví dụ kháng thể TLR7 (tham khảo, ví dụ, tài liệu WO 2012/117377, trang từ 15 đến 18, ví dụ), ví dụ, trong tổ hợp với muối nhôm, ví dụ nhôm hydroxit mà kháng thể TLR có thể được hấp phụ vào đó; vi khuẩn hoặc các dẫn xuất vi khuẩn, các ví dụ về chúng là monophosphoryl lipit A (MPL), 3-O MPL được loại axyl (3dMPL), CpG-motif chứa oligonucleotit, độc tố vi khuẩn được ribosylat hóa bởi ADP hoặc đột biến của chúng, như là LT độc tố đường ruột kém chịu nhiệt *E. coli*, CT độc tố tả, và các loại tương tự. Ví dụ PT và biến độc tố bệnh uốn ván còn có các đặc tính bổ trợ của chính chúng. Theo một số phương án chế phẩm theo sáng chế bao gồm nhôm làm tá được, ví dụ dưới dạng nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm kali phosphat, hoặc kết hợp của chúng, ở các nồng độ 0,05 – 5 mg, ví dụ từ 0,075-1,0 mg, hàm lượng nhôm mỗi liều dùng.

Theo các phương án khác nữa, chế phẩm được sử dụng trong sáng chế không bao gồm chất bổ trợ khác nữa.

Tốt hơn là, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm chất bổ trợ. Theo một số phương án được ưu tiên, chất bổ trợ là muối nhôm như là nhôm phosphat, nhôm hydroxit hoặc tổ hợp của chúng. Tốt hơn là, một, nhiều hoặc tất cả các kháng nguyên aP được hấp phụ trên muối nhôm. Ngoài ra, các kháng nguyên khác có thể

được hấp phụ trên muối nhôm. Theo một số phương án, một, nhiều hoặc tất cả các kháng nguyên aP (PT, FHA, FIM, PRN nếu có mặt) được hấp phụ trên nhôm hydroxit. Theo một số phương án, một, nhiều hoặc tất cả các kháng nguyên aP (PT, FHA, FIM, PRN nếu có mặt) được hấp phụ trên nhôm phosphat. Chế phẩm của vaccin aP và vaccin aP tổ hợp với các muối nhôm, ví dụ, được mô tả trong tài liệu [Denoël, 2002, *Vaccine* 20: 2551-2555]. Thông thường là, các thành phần riêng được hấp phụ riêng rẽ trên muối nhôm, và các thành phần sau đó được trộn để tạo ra chế phẩm vaccin. Điều này còn cho phép điều chế vaccin trong đó một số thành phần được hấp phụ trên muối nhôm thứ nhất [ví dụ $\text{Al}(\text{PO})_4$], trong khi các thành phần khác được hấp phụ trên muối nhôm thứ hai [ví dụ $\text{Al}(\text{OH})_3$]. Ngoài ra, các thành phần khác của vaccin tổ hợp có thể được hấp phụ trên muối nhôm, ví dụ DT và TT có thể được hấp phụ trên nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, hoặc tổ hợp của các loại này. Các thành phần DT và TT có thể được hấp phụ vào cùng muối nhôm hoặc vào các muối nhôm khác nhau làm các thành phần aP. Các thành phần khác nữa của vaccin tổ hợp có hóa trị tăng có thể còn được hấp phụ trên các muối nhôm, ví dụ HBsAg, Hib và/hoặc IPV có thể hoặc có thể không được hấp phụ trên các muối nhôm. Theo một số phương án được ưu tiên, trong đó vaccin tổ hợp bao gồm HBsAg, HBsAg được hấp phụ trên nhôm phosphat (tham khảo, ví dụ, tài liệu WO 93/24148). Nếu Hib có mặt trong vaccin tổ hợp và một số thành phần khác như là một hoặc nhiều trong số DT, TT hoặc aP được hấp phụ trên nhôm hydroxit, rủi ro của hiện tượng giao thoa (can thiệp) (làm giảm hiệu quả của thành phần Hib) có thể được giảm ví dụ bởi hấp phụ Hib lên trên nhôm phosphat hoặc sử dụng Hib mà không được hấp phụ trên chất bổ trợ nhôm, và kết hợp thành phần này với các thành phần khác bởi hoặc là cùng lúc (tức là, ngay trước khi dùng) việc bổ sung Hib, hoặc bằng cách trộn với các thành phần khác mà được hấp phụ trên chất bổ trợ nhôm hydroxit theo cách là chất bổ trợ nhôm hydroxit chưa bão hòa, như được mô tả chi tiết trong tài liệu WO 99/48525. Do đó, chuyên gia trong ngành nhận thức được các cách khác nhau của việc hình thành vaccin tổ hợp theo sáng chế theo cách phù hợp.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế bao gồm PT, FHA, FIM2/3, và nhôm hydroxit, và tùy ý PRN. Theo một số phương án, chế phẩm

vacxin theo sáng chế bao gồm PT, FHA, FIM2/3, và nhôm phosphat, và tùy ý PRN. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm PT, FHA, FIM2/3, nhôm hydroxit và nhôm phosphat, và tùy ý PRN. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*, và nhôm hydroxit. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*, và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*, nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm aP5*-IPV, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-IPV, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-Hib, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-HepB, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-Hib-HepB, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-Hib-IPV, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-HepB-IPV, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin theo sáng chế bao gồm DTaP5*-Hib-HepB-IPV, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit và nhôm phosphat.

Việc dùng của chế phẩm theo sáng chế có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các đường dùng tiêu chuẩn. Các phương án không giới hạn bao gồm việc dùng ngoài đường tiêu hóa, như là bằng cách tiêm, ví dụ, trong da, trong cơ, qua da, trong mũi, v.v.. Trong một phương án vacxin được dùng bằng cách tiêm cơ vào trong đùi hoặc vào trong cơ vai. Chuyên gia trong ngành biết các khả năng khác nhau để dùng vacxin theo sáng chế, để dẫn đến đáp ứng miễn dịch ít nhất một trong số các kháng nguyên trong vacxin. Nhìn chung, liều tiêu chuẩn của vacxin ho gà là 0,5ml được đưa vào trong cơ ở bên đùi trước hoặc, nếu cần thiết, vào cơ vai.

Tuy nhiên, lượng của các thành phần trong chế phẩm được đề xuất cho người bệnh trong quá trình một lần dùng có thể được biến thiên như được biết đến đối với bác sĩ đa khoa chuyên ngành. Ngoài ra, chất bổ trợ, nếu được sử dụng, có thể được mô phỏng theo hệ thống phân phối.

Mặc dù được ưu tiên là có chế phẩm đơn để vaccin để ngừa ho gà, chuyên gia trong ngành sẽ nhận thức được rằng, tác dụng của sáng chế như được mô tả ở đây còn có thể thu được bằng cách vaccin với các thành phần của vaccin aP, tức là, PT, FHA, FIM ở liều dùng cho người nằm trong khoảng 12-100 μg , và tùy ý PRN, trong đó không cần thiết tất cả các thành phần trong cùng chế phẩm, ví dụ, trong đó (một phần của) FIM ở trong chế phẩm riêng rẽ.. Ví dụ, vaccin aP có trên thị trường (có FIM ở liều nằm trong khoảng 0-5 μg đối với mỗi liều dùng cho người) có thể được bổ trợ bằng cách cùng dùng của FIM làm thành phần riêng với tổng liều được dùng nằm trong khoảng 12-100 μg , ví dụ 15-80 μg , 20-60 μg , 20-50 μg , hoặc 20-25 μg FIM, ví dụ bằng cách tiêm trước tiên chế phẩm vaccin aP bao gồm PT, FHA, tùy ý liều của 5 μg FIM, và tùy ý PRN và tiêm chế phẩm riêng rẽ bao gồm (phần còn lại của) FIM để bổ sung vào phân liều tổng nằm trong khoảng 12-100 μg , ví dụ 15-80 μg , 20-60 μg , 20-50 μg hoặc 20-25 μg FIM. Theo các phương án này, việc dùng đồng thời có nghĩa là các chế phẩm riêng rẽ đó được dùng (ví dụ được tiêm) trong phạm vi một giờ, tốt hơn là trong phạm vi vài phút giữa các lần dùng, tốt hơn là chúng được dùng cơ bản là đồng thời (ví dụ bằng cách tiêm cùng nhau hoặc bằng cách tiêm liên tiếp). Một cách thay thế, các hợp chất có thể được trộn với nhau ngay trước khi dùng, sao cho tiêm một lần (với chế phẩm mà là chế phẩm theo sáng chế) là đủ. Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp vaccin cho đối tượng là người để ngừa *Bordetella pertussis*, tùy ý chủng âm tính với PRN của *Bordetella pertussis*, phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng các kháng nguyên *Bordetella pertussis* sau: biến độc tố ho gà (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN), trong đó FIM được dùng với lượng nằm trong khoảng 12-100 μg . Theo các phương án được ưu tiên, phương pháp này được thực hiện bằng cách dùng chế phẩm đơn theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được giải thích thêm trong các ví dụ sau đây. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào. Các ví dụ này chỉ dùng để làm rõ sáng chế.

Ví dụ 1. FIM liều cao trong vaccin aP5 cải thiện việc bảo vệ ngừa *B. pertussis* âm tính với PRN

Phương pháp

Mô hình thử thách phổi với *Bordetella pertussis* cho chuột được xác nhận là hợp lệ, mà liên quan với lâm sàng hiệu quả tiêm phòng vaccin aP, (Guiso, 1999, *Vaccine* 17; 2366-2376; Denoel, 2005, *Vaccine* 23:5333-5341; Godfroid, 2004, *Int. J. Med. Microbiol.* 294; 269-276) được sử dụng để thử nghiệm hiệu quả tiêm phòng vaccin ho gà vô bào 5 thành phần được cấp phép (ADACEL™, Sanofi Pasteur; trong ví dụ này còn đề chỉ aP5) ở 1/4 của liều dùng cho người có hoặc không có việc bổ sung 2 µg của kháng nguyên FIM2/3 được tinh chế (List Biological Laboratories Inc). Mỗi liều 0,5 mL ADACEL™ chứa 5 Lf biến độc tố bệnh uốn ván, 2 Lf biến độc tố bệnh bạch hầu và 5 kháng nguyên ho gà vô bào (2,5 µg độc tố ho gà được giải độc, 5 µg sợi ngưng kết hồng cầu, 3 µg pertactin và 5 µg fimbriae dạng 2 và dạng 3). Cụ thể, chuột cái Balb/c được vaccin dưới da với aP5 có hoặc không có kháng nguyên FIM2/3 <259 ở 4 và 7 tuần tuổi ở ¼ liều dùng cho người. Do đó, các động vật nhận hoặc là 1,25µg FIM2/3 (nhóm dùng aP5) hoặc 3,25µg FIM2/3 (nhóm dùng aP5 + FIM), mà bằng với 5µg và 13µg liều dùng cho người, tương ứng. Ở 9 tuần tuổi, chuột được thử thách vào trong mũi với ~10⁶ cfu của *B. pertussis* WHO 18323 (a pertactin positive strain), chủng dương tính pertactin), chủng âm tính với pertactin PRN-STOP và chủng âm tính với pertactin PRN-IS [Queenan, 2013, *N Engl J Med.* 368: 583-4]. Ở 2 giờ, 2 ngày, 5 ngày và 8 ngày sau thử thách (n=5/nhóm) độ thanh thải ở phổi được xác định bằng cách đếm các khuẩn lạc <263 *B. pertussis* phát triển trên các đĩa aga Bordet-Gengou sau khi đặt các chuỗi pha loãng của dịch treo mô đồng thể ở phổi.

Các kết quả

Đặc tính đáp ứng xử lý theo thời gian sau khi vaccin với aP5 có hoặc không có việc bổ sung kháng nguyên FIM2/3 được mô tả trên Fig.1. Để thử nghiệm về sự khác nhau thống kê rõ rệt giữa kết quả đếm Log10 CFU trung bình vào ngày 5 và ngày 8 giữa chuột được vaccin với aP5 hoặc aP5 + FIM, thử nghiệm chính xác của Wilcoxon được sử dụng. Ngoài ra, dữ liệu đặc tính đáp ứng xử lý theo thời gian (từ ngày 0 đến ngày 8) được tạo mô hình bởi Phân tích Covariance (Milliken GA và cộng sự Analysis of Covariance, Dept of Statistics, Kansas State University, 1989.; SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Version 6, Tái bản lần thứ tư, Tập 2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989). Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989).

Đối với chủng *B. pertussis* 18323 (chủng dương tính với PRN, Fig.1A), so sánh sự khác nhau về kết quả đếm Log10 CFU ở ngày 5 sử dụng thử nghiệm một phía phi tham số chính xác của Wilcoxon, đã thể hiện rằng kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vaccin với aP5 + FIM được hạ thấp rõ rệt ($p < 0,05$) so với kết quả đếm sau khi vaccin với aP5 riêng. Việc tạo mô hình của dữ liệu đặc tính đáp ứng theo thời gian xử lý mẫu đã thể hiện là không có sự khác nhau thống kê rõ rệt về đáp ứng xử lý từ ngày 0 đến ngày 8 so với việc điều chỉnh bằng phép Phân tích Covariance với ngày làm thông số cho độ nghiêng và ngày* ngày làm thông số đối với đường cong phương trình bậc 2.

Sau khi thử thách với chủng *B. pertussis* PRN-STOP (Fig.1B), so sánh sự khác nhau về kết quả đếm Log10 CFU ở ngày 5 sử dụng thử nghiệm một phía phi tham số chính xác của Wilcoxon đã thể hiện rằng, kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vaccin với aP5 + FIM được hạ thấp rõ rệt ($p < 0,02$) so với kết quả đếm sau khi vaccin với aP5 riêng. Việc tạo mô hình của dữ liệu đặc tính đáp ứng theo thời gian xử lý mẫu đã thể hiện là không có sự khác nhau thống kê rõ rệt về đáp ứng xử lý từ ngày 0 đến ngày 8 so với việc điều chỉnh bằng cách phân tích của mô hình Covariance.

Đối với chủng *B. pertussis* PRN-IS (Fig.1C), so sánh sự khác nhau về kết quả đếm Log10 CFU ở ngày 5 được chỉ ra là không có sự khác nhau rõ rệt giữa các xử lý vaccin sử dụng thử nghiệm một phía phi tham số chính xác của Wilcoxon. Vào ngày 8 có xu hướng là kết quả đếm Log10 CFU trung bình là thấp hơn sau khi

vacxin với aP5 + FIM được so sánh với kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vacxin với aP5 riêng ($P < 0,08$) sử dụng thử nghiệm phi tham số chính xác của Wilcoxon. Sự tương tự tiệm cận của thử nghiệm chính xác của Wilcoxon đã thể hiện sự khác nhau rõ rệt của vacxin vào ngày 8 ($p < 0,03$). Việc tạo mô hình của dữ liệu đặc tính đáp ứng theo thời gian xử lý mẫu đã đề xuất sự khác nhau về đáp ứng xử lý từ ngày 0 đến ngày 8 so với việc điều chỉnh bằng phép Phân tích Covariance với ngày làm thông số cho độ nghiêng và ngày*ngày*trt làm thông số đường cong phương trình bậc 2.

Để thử nghiệm sự khác nhau về hiệu quả xử lý, sự tương phản tuyến tính giữa các đặc tính xử lý từ ngày 0 đến ngày 8 đã chỉ ra rằng kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vacxin với aP5 + FIM được hạ thấp rõ rệt ($p < 0,01$) so với giá trị đếm được đo sau khi vacxin với aP5 riêng.

Nói tóm lại, các kết quả này thể hiện rằng, việc bổ sung 2 μ g FIM2/3 vào 1/4 ²⁷⁴ liều dùng vacxin Adacel cho người làm tăng rõ rệt hiệu quả tiêm phòng của vacxin này trong mô hình thử thách cho mũi họng ở chuột ngà dạng phân lập *B. pertussis* âm tính với PRN. Phát hiện này là đáng ngạc nhiên khi mà không có đề xuất trước đó bất kỳ rằng lượng FIM tăng trong vacxin ho gà sẽ làm tăng tính hiệu quả của nó. Kết quả này là đặc biệt thích đáng trong bối cảnh của chủng âm tính với PRN mà là hiện tại bùng phát và gây ra bệnh khắp thế giới.

Ví dụ 2: Tăng hiệu quả tiêm phòng vacxin sau khi bổ sung FIM trong mô hình thử thách chuột là phụ thuộc liều

Phương pháp

Để xác định nghiên cứu có hay không việc tăng liều FIM liên quan với tăng hiệu quả tiêm phòng vacxin, mà sẽ đề xuất tác dụng cụ thể cho FIM, mô hình thử thách phối với ²⁸⁰*Bordetella pertussis* cho chuột được xác nhận là hợp lệ như được mô tả nêu trên, được sử dụng. Các động vật được vacxin với 1/10 liều dùng cho người của vacxin aP 2 thành phần được cấp phép (PENTAVAC®, Sanofi Pasteur MSD; vacxin sau đây là để chỉ aP2) có hoặc không có việc bổ sung FIM2/3 (List Biological Laboratories Inc; vật liệu khác nữa là để chỉ FIM). Từng liều 0,5ml PENTAVAC® cho người chứa: (ít nhất) 40 IU biến độc tố bệnh uốn ván (TT); (ít nhất) 30 IU biến độc tố bệnh bạch hầu (DT); các đơn vị kháng nguyên

40, 8 và 32 D của virus bại liệt được bất hoạt (IPV) các dạng 1, 2 và 3 tương ứng; 10 µg polysaccharit dạng B của *H. Influenzae* được tạo liên hợp đến TT (Hib-TT); và 2 kháng nguyên ho gà vô bào (25µg độc tố ho gà được giải độc (PT) và 25µg sợi ngưng kết hồng cầu (FHA)). Lượng là 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 hoặc 5,0 µg FIM, tương ứng với 5, 10, 15, 20, 25 hoặc 50µg FIM đối với mỗi liều dùng cho người, tương ứng, được hấp phụ vào nhôm hydroxit và được cùng dùng (ở dạng tiêm riêng rẽ) với vaccin aP2 được cấp phép (do đó mô phỏng đúng như vaccin aP với liều FIM cao theo sáng chế). Ở 9 tuần tuổi, chuột được thử thách vào trong mũi với $\sim 10^6$ cfu của chủng *B. pertussis* âm tính với PRN (I195). Ở 2 giờ (n= 5/nhóm) và 5 ngày (n=10/nhóm) độ thanh thải ở phổi được xác định bằng cách đếm các khuẩn lạc <284 *B. pertussis* phát triển trên các đĩa aga Bordet-Gengou sau khi đặt các chuỗi pha loãng của dịch treo mô đồng thể ở phổi.

Các kết quả

Việc làm giảm phụ thuộc liều về số lượng của các khuẩn lạc *B. pertussis* được nuôi cấy từ phổi của chuột được vaccin quan sát được với lượng FIM tăng. Tương tự, việc làm giảm phụ thuộc liều về số lượng của các khuẩn lạc *B. pertussis* được nuôi cấy từ phổi của chuột được vaccin quan sát được ở chuột được vaccin với việc pha loãng 1/25 và việc làm tăng lượng của FIM. Fig.2 thể hiện kết quả đếm Log10 CFU thu được từ phổi của chuột được vaccin với 1/10 liều dùng aP2 cho người khi có lượng FIM tăng, 5 ngày sau thử thách với chủng *B. pertussis* I195. Bảng 1 thể hiện kết quả đếm Log10 CFU trung bình và giá trị P được tính toán sử dụng Mann-Whitney (GraphPad Prism) so sánh kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi vaccin với aP2 ở 1/10 liều dùng cho người có hoặc không có FIM. Sau khi bổ sung FIM với lượng 2µg hoặc nhiều hơn vào aP2 ở mức 1/10 liều dùng cho người (liều dùng tương đương cho người là 20 µg), hiệu quả tiêm phòng vaccin tăng rõ rệt.

Kết luận

Hiệu quả phụ thuộc liều của liều FIM tăng trên hiệu quả tiêm phòng vaccin chứng tỏ hiệu quả này là đặc hiệu đối với FIM. Ngoài ra, vaccin bao gồm liều FIM cao là hiệu quả hơn so với vaccin chứa lượng tối đa FIM có mặt trong vaccin

aP5 hiện hành có trên thị trường (5 µg đối với mỗi liều dùng cho người) Điều này phù hợp với các phát hiện trong Ví dụ 1 mà đã thể hiện rằng, việc làm tăng liều FIM trong vacxin aP trên 10 µg đối với mỗi liều dùng cho người được cải thiện tính hiệu quả, và hơn nữa mở rộng phát hiện đến vacxin aP khác và chủng ho gà bổ sung âm tính với PRN.

Ví dụ 3. Hiệu quả tiêm phòng vacxin aP5 tăng với việc bổ sung FIM quan sát được là ngừa các chủng *B. pertussis* phức.

Phương pháp:

Mô hình thử thách phổi với *Bordetella pertussis* cho chuột được xác nhận là hợp lệ như được mô tả nêu trên, được sử dụng để điều tra nghiên cứu có hay không việc tăng liều FIM hiệu quả tiêm phòng vacxin được cải thiện ngừa các chủng *B. pertussis* khác nhau. 1/10 liều dùng cho người của ADACEL® (Sanofi Pasteur; chứa 2,5µg PT, 5µg FHA, 3µg PRN và 5µg FIM2/3 đối với mỗi liều dùng cho người, tham khảo cả Ví dụ 1; ở đây là để chỉ aP5) hoặc BOOSTRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals; chứa 5 Lf của biến độc tố bệnh uốn ván, 2,5 Lf của biến độc tố bệnh bạch hầu, 8µg PT, 8µg FHA và 2,5µg PRN đối với mỗi liều dùng cho người; ở đây là để chỉ aP3) được sử dụng, có hoặc không có bổ sung (ở dạng tiêm riêng rẽ sau khi hấp phụ vào nhôm hydroxit) của 5µg FIM (List Biological Laboratories Inc), tương ứng với 50µg đối với mỗi liều dùng cho người. Các động vật mà được vacxin ở 4 và 7 tuần tuổi, được thử thách ở 9 tuần tuổi với một trong số các chủng *B. pertussis* dưới đây: WHO 18323 (dương tính với PRN), 24422 (âm tính với PRN), 24421 (âm tính với PRN) hoặc I195 (âm tính với PRN). Ở 2 giờ (n= 5/nhóm) và 5 ngày (n=10/nhóm) độ thanh thải ở phổi được xác định bằng cách đếm các khuẩn lạc <300 *B. pertussis* phát triển trên các đĩa aga Bordet-Gengou sau khi đặt các chuỗi pha loãng của dịch treo mô đồng thể ở phổi.

Các kết quả

Việc bổ sung 5µg FIM vào 1/10 liều dùng cho người của aP5 đã cải thiện hiệu quả tiêm phòng vacxin ngừa tất cả các chủng *B. pertussis*, mà đạt tới ngừa đáng kể theo thống kê 3 chủng ho gà được thử nghiệm (WHO 18323 (p=0,04), PRN-24421(p=0,03) và PRN-I195 (p=0,001)) (Fig.3, Bảng 2).

Thực nghiệm này còn được tiến hành bằng cách sử dụng aP3 (1/10 liều dùng cho người). Đối với 3 chủng thử thách (WHO 18323, 24422 và 24421) việc giảm sau khi bổ sung FIM không quan sát được với vaccin aP3 này (BOOSTRIX®), mặc dù điều này có thể có khả năng được giải thích một phần bởi tính hiệu quả đã cao quan sát được đối với các chủng thử thách này với aP3 cụ thể này khi được đưa ra không có FIM. Tuy nhiên, việc giảm rõ rệt về kết quả đếm Log10 CFU quan sát được với việc bổ sung FIM vào aP3 này khi thử thách với chủng *B. pertussis* I195.

Về tổng thể, các dữ liệu này chỉ ra rằng, vaccin với liều FIM cao sẽ có cải thiện hiệu quả ngừa khoảng rộng chủng ho gà.

Kết luận

Tính hiệu quả tăng quan sát được sau khi tạo miễn dịch với mức độ FIM cao trong tổ hợp với vaccin aP5 có trên thị trường ngừa danh sách các chủng <310*B. pertussis* chỉ ra tính có lợi của liều FIM cao quan sát được còn ngừa các chủng ho gà khác nhau.. Do đó, vaccin bao gồm liều FIM cao theo sáng chế có thể góp phần cho việc làm giảm tỷ lệ mắc bệnh ho gà.

Ví dụ 4. Tính hiệu quả tăng với việc bổ sung FIM đối với các vaccin aP khác nhau hiện có trên thị trường

Phương pháp

Mô hình thử thách phối với *Bordetella pertussis* cho chuột được xác nhận là hợp lệ như được mô tả nêu trên, được sử dụng để điều tra nghiên cứu có hay không việc tăng liều FIM (List Biological Laboratories Inc) làm cải thiện hiệu quả tiêm phòng vaccin của ADACEL® (Sanofi Pasteur; chứa 2,5 µg PT, 5 µg FHA, 3 µg PRN và 5 µg FIM 2+3 làm các thành phần aP đối với mỗi liều dùng cho người), PENTAVAC® (Sanofi Pasteur MSD; chứa 25 µg PT và 25 µg FHA làm các thành phần aP đối với mỗi liều dùng cho người) hoặc <318BOOSTRIX® (GlaxoSmithKline Biologicals; chứa 8 µg PT, 8 µg FHA và 2,5 µg PRN làm các thành phần aP đối với mỗi liều dùng cho người).

Chuột được vaccin với 1/10 liều dùng cho người ở 4 và 7 tuần tuổi có hoặc không có việc bổ sung 5 µg FIM vào vaccin có trên thị trường (tương ứng với 50 µg FIM được bổ sung đối với mỗi liều dùng cho người), được thử thách ở 9 tuần

tuổi với chủng âm tích với *B. pertussis* pertactin I195 và độ thanh thải ở phổi được xác định 5 ngày sau thử thách (n=10/nhóm) bằng cách đếm các khuẩn lạc <321*B. pertussis* phát triển trên các đĩa aga Bordet-Gengou.

Kết quả

Đối với cả ba vaccin, việc bổ sung FIM dẫn đến hạ thấp rõ rệt kết quả đếm Log10 CFU trung bình so với kết quả đếm Log10 CFU trung bình sau khi tiến hành vaccin dùng vaccin có trên thị trường riêng (Bảng 3)

Kết luận

Hiệu quả tiêm phòng vaccin của cả ba vaccin được cải thiện rõ rệt sau khi bổ sung FIM. Điều này đề xuất tác dụng của FIM có thể được tạo ra đến khoảng các vaccin aP có trên thị trường mà chứa các lượng khác nhau của kháng nguyên ho gà và các lượng FIM khác nhau. Hiệu quả tiêm phòng vaccin mà đã bao gồm FIM (ADACEL®) hoặc các loại mà không bao gồm FIM (PENTAVAC® hoặc BOOSTRIX®) cải thiện, thể hiện rằng, không chỉ sự có mặt của FIM mà góp phần cho hiệu quả tiêm phòng vaccin, mà liều FIM cũng là quan trọng.

Ví dụ 5. Chức năng kháng thể kháng FIM tăng sau khi vaccin với liều FIM cao ngừa khoảng rộng của các chủng ho gà </331></330

Hoạt tính chức năng của các thành phần kháng thể ngừa ho gà được nhận diện làm thông số quan trọng bổ sung để cân nhắc, cụ thể khi đánh giá chế phẩm mới chứa PT và FIM mà được biết đến là dẫn đến các kháng thể với hoạt tính chức năng như là trung hòa độc tố và ngưng kết vi khuẩn tương ứng. Các thử nghiệm để đo các kháng thể ngưng kết *B. pertussis* toàn bộ tế bào được thiết lập. Mặc dù không có ngưỡng chức năng mà được phát hiện ra là liên quan trực tiếp với tính hiệu quả bảo vệ của vaccin ho gà, tuy nhiên, chúng là thông số tạo miễn dịch quan trọng để xác định làm một phần cho so sánh tổng thể của chế phẩm vaccin mới mà chúng tỏ được là an toàn và hiệu quả (từ bản giới thiệu dự thảo của WHO đối với vaccin aP, WHO/BS/2011.2158, phần C.2.1.2). Do đó, từ liên quan được đưa ra của các thử nghiệm này đối với FIM chứa vaccin aP, chúng tôi đã sử dụng thử nghiệm ngưng kết để kiểm nghiệm hơn nữa vaccin theo sáng chế ngừa các chủng *B. pertussis* khác nhau.

Phương pháp

Gom huyết thanh từ chuột mà được vaccin ở 4 và 7 tuần tuổi với 1/10 liều dùng cho người của PENTAVAC® (Sanofi Pasteur MSD; chứa làm kháng nguyên aP 25µg PT và 25µg FHA đối với mỗi liều dùng cho người; ở đây là để chỉ aP2) có hoặc không có việc bổ sung FIM (List Biological Laboratories Inc). Lượng là 0,5 hoặc 2,0µg FIM, tương ứng với 5 hoặc 20µg FIM đối với mỗi liều dùng cho người, tương ứng, được hấp phụ vào nhôm hydroxit và cùng được dùng (ở dạng tiêm riêng rẽ) với vaccin aP2 có trên thị trường. Ở tuần 9, 5 động vật cho một nhóm dùng liều được giết và huyết thanh được phân lập từ các giọt máu cuối được tạo lượng để điều tra nghiên cứu các mức kháng thể kháng FIM (chức năng). Để đánh giá chức năng kháng thể đáp ứng đến FIM, thử nghiệm ngưng kết được tiến hành. Trong thử nghiệm này, sự có mặt của các kháng thể chức năng trong huyết thanh thử nghiệm dẫn đến hình thành phức kháng nguyên/kháng thể khi được trộn với *B. pertussis*. Ngưng kết dương tính được xác định là sự có mặt của dung dịch mờ trong giếng, do sự có mặt của phức kháng nguyên/kháng thể. Ngưng kết âm tính quan sát được là phần lắng xuống của vi khuẩn được xác định ở đáy của giếng.

Tóm lại, 50 µl huyết thanh thử nghiệm được pha loãng theo dãy trong PBS và được trộn với 50 µl dung dịch huyền phù *B. pertussis* của OD₆₀₀ là 1,0. Hỗn hợp này được ủ qua đêm và ngày hôm sau sự có mặt hoặc không có mặt của phần vi khuẩn lắng xuống được xác định nhờ sử dụng gương đảo. Hiệu giá ngưng kết được xác định là sự pha loãng cao nhất mà dẫn đến ngưng kết hoàn toàn.

Để xác định nghiên cứu xem là có hay không các kháng thể kháng FIM được dẫn đến bởi vaccin của chuột là chức năng ngừa danh sách các chủng *B. pertussis* mà được thử nghiệm xem là có hay không huyết thanh có khả năng ngưng kết đến 10 các chủng *B. pertussis* biểu hiện FIM khác nhau. Từ danh sách 30 dạng phân lập *B. pertussis* lâm sàng hiện nay (được cung cấp miễn phí bởi Giáo sư Alan Evangelista, thuộc bệnh viện St. Christopher's cho trẻ em ở Philadelphia), 24 dạng phân lập được thể hiện ngưng kết trong được đọc ra với kháng thể đơn dòng kháng FIM có trên thị trường kiểm soát dương tính (06/128, NIBSC, UK), khẳng định các chủng này biểu hiện kháng nguyên FIM. Từ danh sách 24 chủng này, các chủng âm tính với 5 PRN và dương tính với 5 PRN được lựa chọn để thử nghiệm huyết thanh chuột.

Các kết quả

Vaccine với sự có mặt của FIM dẫn đến các hiệu giá chức năng kháng thể. Ngưng kết dương tính quan sát được với tất cả 6 lượng huyết thanh chuột của chuột được vaccine với sự có mặt của FIM ngừa tất cả 10 chủng *B. pertussis*. Nhóm đối chứng không được vaccine và nhóm nhận aP2 ở 1/10 liều dùng cho người riêng, mà không bao gồm FIM, không thể hiện ngưng kết bất kỳ (Bảng 4). Mặc dù liều FIM cao được thể hiện là hiệu quả hơn so với liều FIM thấp ở mô hình thử thách phổi với *Bordetella pertussis* cho chuột được xác nhận là hợp lệ (ví dụ 2), không có mối tương quan đáp ứng liều FIM rõ rệt (dữ liệu không được thể hiện đối với các liều FIM khác), mà có khả năng do giới hạn của thử nghiệm được chuẩn hóa của WHO này, mà không đủ nhạy để phát hiện sự khác nhau nhỏ trong ngưng kết.

Kết luận

Việc vaccine bằng vaccine có trên thị trường với sự có mặt của FIM dẫn đến cảm ứng các kháng thể chức năng ngừa danh sách rộng các chủng <362 *B. pertussis*, cả các chủng âm tính với PRN hoặc dương tính với PRN. Phát hiện này chỉ ra rằng vaccine bao gồm liều FIM cao sẽ hiệu quả trong việc làm giảm bệnh ho gà bị gây ra bởi khoảng rộng của các chủng *B. pertussis*.

Bảng 1. Tác dụng trong việc bảo vệ của việc bổ sung việc làm tăng các liều của FIM vào vacxin aP2

	Tổng lượng FIM	Liều dùng FIM tương đương cho người	Log10 CFU trung bình	Giá trị P so với aP2 riêng
Đối chứng	-	-	7,2	0,0002
aP2	-	-	2,9	-
aP2 + 0,5 µg FIM	0,5 µg	5 µg	3,5	0,3418
aP2 + 1,0 µg FIM	1,0 µg	10 µg	2,1	0,0514
aP2 + 1,5 µg FIM	1,5 µg	15 µg	2,5	0,5390
aP2 + 2,0 µg FIM	2,0 µg	20 µg	2,0	0,0164
aP2 + 2,5 µg FIM	2,5 µg	25 µg	1,6	0,0013
aP2 + 5,0 µg FIM	5,0 µg	50 µg	1,4	0,0001

Bảng 1: Giá trị P như được xác định nhờ sử dụng Mann-Whitney, so sánh sự khác nhau về kết quả đếm Log10 CFU trung bình từ phổi ở chuột được thử thách với chủng *B. Pertussis* âm tính với PRN I195 ở tuần 9 sau khi vacxin với aP2 ở 1/10 liều dùng cho người với việc bổ sung FIM đối lại aP2 riêng được đưa ra trong 1/10 liều dùng cho người ở 4 và 7 tuần tuổi. Chi tiết hơn tham khảo Ví dụ 2.

Bảng 2. Hiệu quả của việc bổ sung FIM vào vaccin aP5 để bảo vệ ngừa khác nhau các chủng

	aP5			aP5 + FIM			
Chủng	Tổng lượng FIM (μ g)	Liều dùng FIM tương đương cho người (μ g)	Log10 CFU trung bình CFU	Tổng lượng FIM (μ g)	FIM tương đương Liều dùng cho người (μ g)	Log10 CFU trung bình	Giá trị P
WHO 18323	0,5	5	4,0	5,5	55	3,3	0,04
24422	0,5	5	4,6	5,5	55	3,6	0,08
24421	0,5	5	4,5	5,5	55	3,8	0,03
I195	0,5	5	5,3	5,5	55	4,0	0,001

Bảng 2: Kết quả đếm Log10 CFU trung bình từ chuột 5 ngày bị mắc bệnh phổi sau thử thách với 4 chủng *B. pertussis* khác nhau ở tuần 9 sau khi vaccin với aP5 ở 1/10 liều dùng cho người có hoặc không có việc bổ sung 5 μ g FIM ở 4 và 7 tuần tuổi. Giá trị P được xác định nhờ sử dụng Mann-Whitney. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 3.

Bảng 3. Hiệu quả của việc bổ sung FIM vào các vaccin aP khác nhau có trên thị trường

	Lượng FIM tổng (μg)	Liều dùng FIM tương đương cho người (μg)	Log10 CFU trung bình	Giá trị P
ADACEL®	0,5	5	5,3	
<i>ADACEL®</i> + <i>FIM</i>	5,5	55	3,94	0,001
PENTAVAC®	0	0	2,89	
<i>PENTAVAC®</i> + <i>FIM</i>	5	50	1,38	0,0001
BOOSTRIX®	0	0	4,1	
<i>BOOSTRIX®</i> + <i>FIM</i>	5	50	2,87	0,004

Bảng 3: Kết quả đếm Log10 CFU trung bình từ phổi ở chuột, 5 ngày sau thử thách với chủng *B. pertussis* I195 ở tuần 9 sau khi vaccin với 3 vaccin aP được cấp phép khác nhau ở 1/10 liều dùng cho người có hoặc không có việc bổ sung 5 μg FIM ở 4 và 7 tuần tuổi. Giá trị P được xác định nhờ sử dụng Mann-Whitney. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 4.

Bảng 4. Hoạt tính chức năng của các kháng thể ngừa các chủng khác nhau bằng cách bổ sung FIM vào aP2 vacxin

	Tổng lượng FIM (µg)	Liều dùng FIM tương đương cho người (µg)	Mức kháng thể FIM	Ngưng kết ngừa Các chủng âm tính với PRN						Ngưng kết ngừa Các chủng dương tính với PRN					
Chủng#				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Đối chứng	-	-	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<		
aP2	-	-	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<		
aP2 + 0,5 µg FIM	0,5	5,0	193	480	480	480	480	320	320	200	480	320	320		
aP2 + 2,0 µg FIM	2,0	20	285	960	960	960	960	960	960	640	960	640	800		

Bảng 4: Các mức kháng thể kháng FIM và hiệu giá ngưng kết ngừa danh sách các chủng *B. pertussis* như được xác định trong các lượng huyết thanh được gom từ 5 chuột cho một nhóm, được vacxin ở 4 và 7 tuần tuổi với 1/10 liều dùng aP2 cho người có hoặc không có việc bổ sung FIM. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 5.

<: nhỏ hơn giới hạn dưới của việc phát hiện (LLOD)

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm vaccin ho gà vô bào (aP) bao gồm biến độc tố ho gà của kháng nguyên *Bordetella pertussis* (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100 μg đối với mỗi liều dùng cho người.
2. Chế phẩm aP theo điểm 1, trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 60 μg đối với mỗi liều dùng cho người.
3. Chế phẩm aP theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 60 μg đối với mỗi liều dùng cho người.
4. Chế phẩm aP theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 50 μg đối với mỗi liều dùng cho người.
5. Chế phẩm aP theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó FIM có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 25 μg đối với mỗi liều dùng cho người.
6. Chế phẩm vaccin aP theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm pertactin (PRN).
7. Chế phẩm vaccin aP theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó PT được giải độc di truyền.
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm kháng nguyên từ một hoặc nhiều mầm bệnh không phải là *B.pertussis*.
9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó chế phẩm này bao gồm biến độc tố bệnh uốn ván và biến độc tố bệnh bạch hầu.

10. Chế phẩm theo điểm 8 hoặc điểm 9, trong đó chế phẩm này bao gồm một hoặc nhiều trong số:

- a) liên hợp oligosacarit hoặc polysacarit của *Haemophilus influenzae* (Hib);
- b) kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg); và
- c) virus bại liệt bị bất hoạt (IPV).

11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất bổ trợ.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chất bổ trợ bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat, hoặc hỗn hợp của chúng.

13. Chế phẩm chứa biến độc tố ho gà của kháng nguyên *Bordetella pertussis* (PT), sợi ngưng kết hồng cầu (FHA), và fimbriae dạng 2 và dạng 3 (FIM), và tùy ý pertactin (PRN) dùng để chủng ngừa đối tượng là người chống lại *Bordetella pertussis*, tùy ý chủng PRN âm của *Bordetella pertussis*, bằng cách dùng kháng nguyên *Bordetella pertussis* cho đối tượng, trong đó FIM được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 100µg.

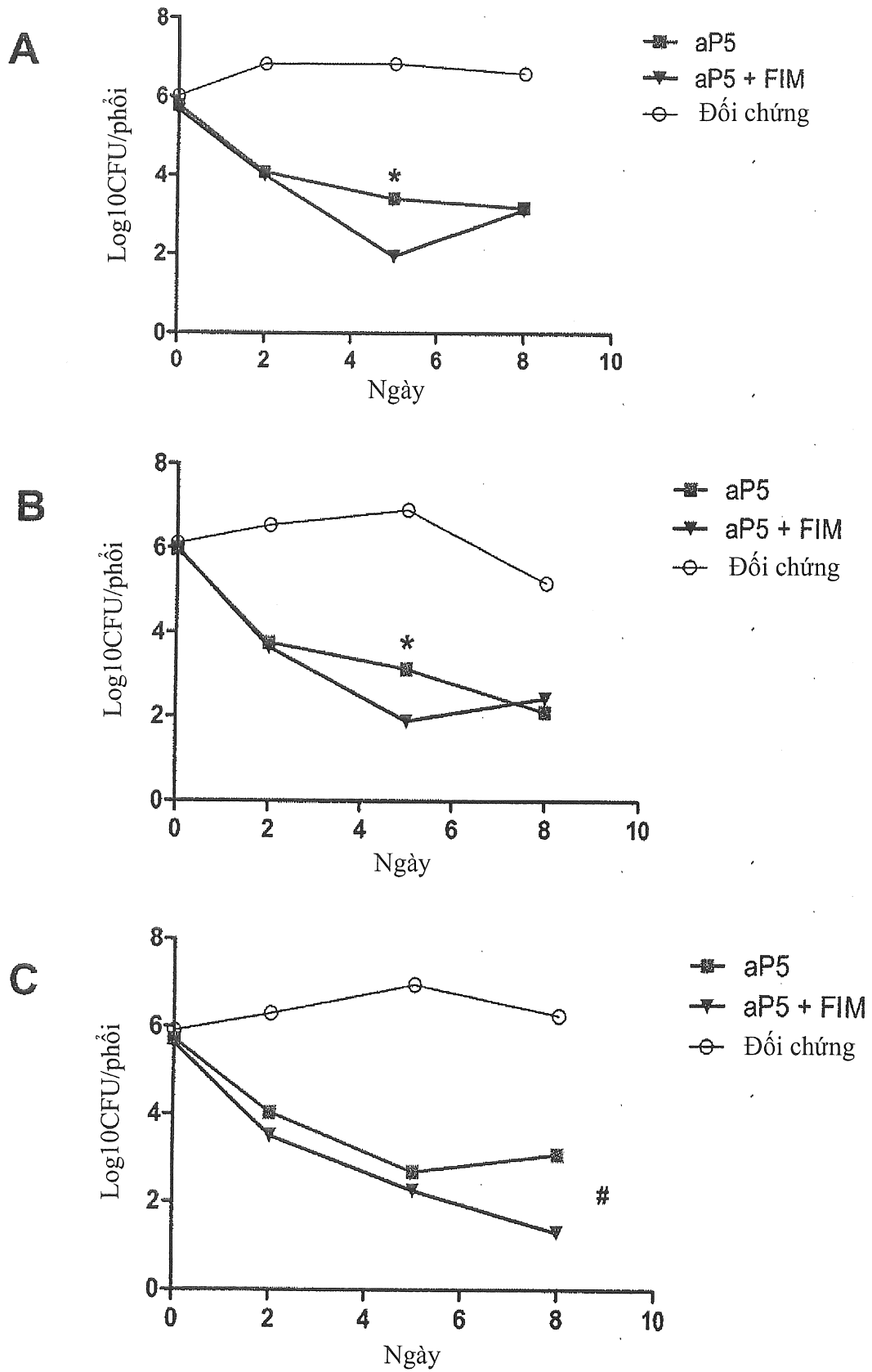


FIG. 1

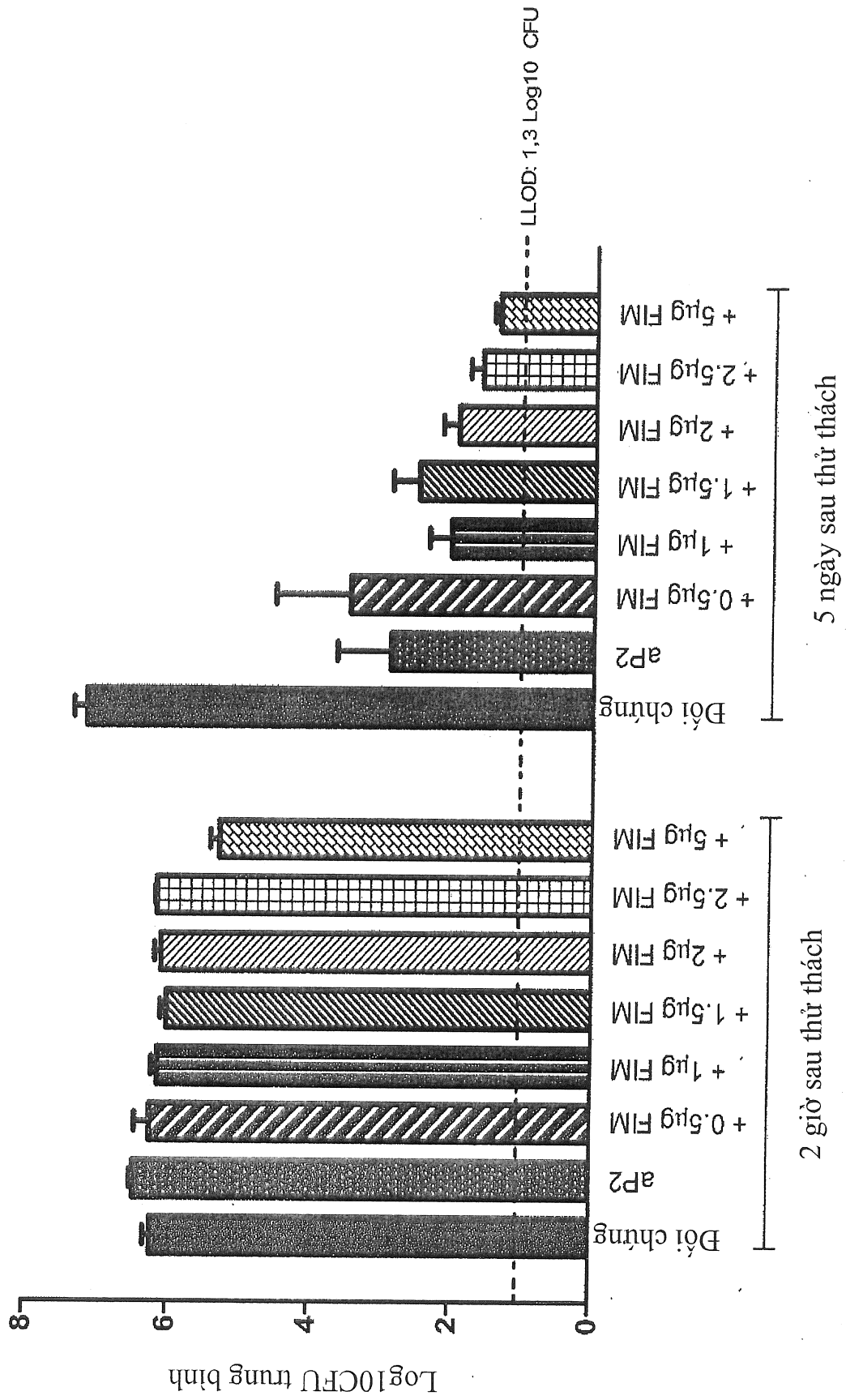


FIG. 2

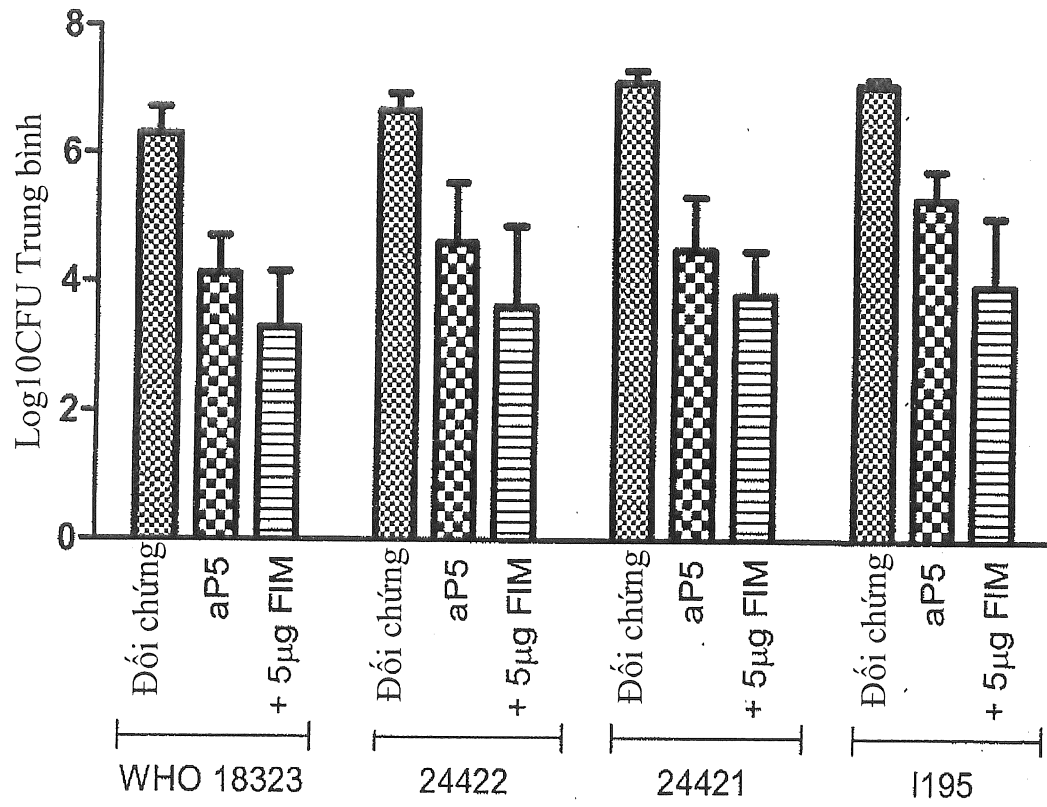


FIG. 3