



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0029252

(51)⁷ A61K 31/12; A61P 31/14; A61K 39/145; (13) B
A61P 1/16; A61K 31/16; A61K 39/12

(21) 1-2018-02794

(22) 10/01/2017

(86) PCT/JP2017/000485 10/01/2017

(87) WO2017/122635 20/07/2017

(30) 2016-006133 15/01/2016 JP

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/10/2018 367A

(73) KM Biologics Co., Ltd. (JP)

1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, Japan

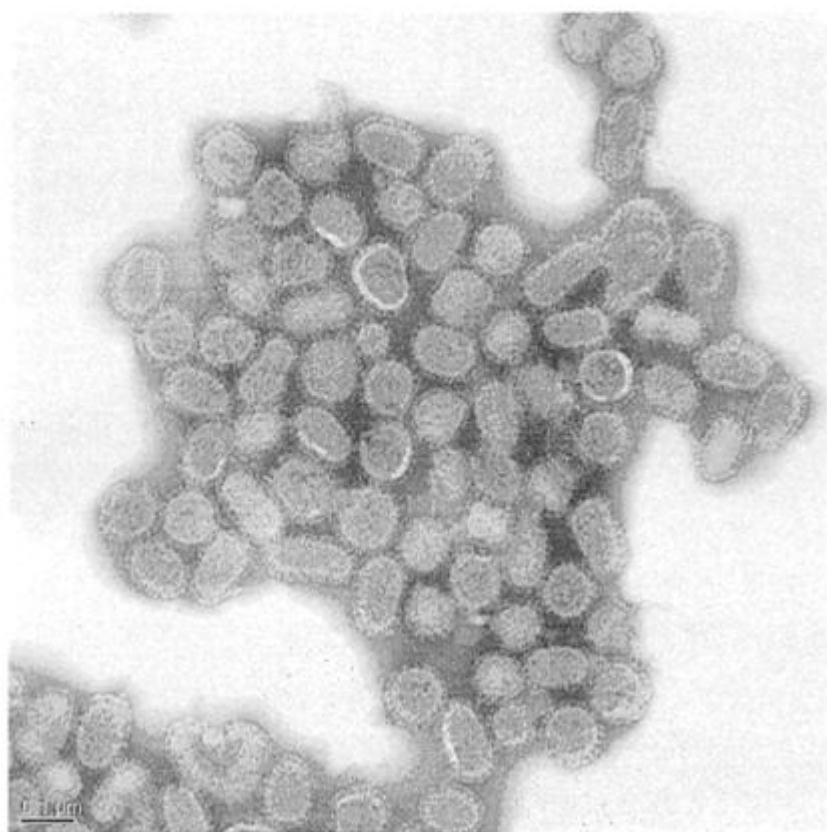
(72) ONUMA Hiroto (JP); TSURUDOME Yukari (JP); IKEDA Kazuyuki (JP);

YAMAUE Ryo (JP); KIMACHI Kazuhiko (JP); ABE Motoharu (JP); WATANABE Akihiro (JP); OHARA Yuki (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VACXIN CHỨA HẠT VIRUT CỔ ĐỊNH, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT VIRUT CỔ ĐỊNH

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin chứa hạt virut cổ định, trong đó đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virut cổ định trong thử nghiệm chất gây sốt là nhỏ hơn 80% tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với các hạt virut gốc của hạt virut cổ định hoặc hạt virut đã bất hoạt tương ứng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vacxin chứa hạt virus cố định. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vacxin chứa hạt virus cố định với các phản ứng bất lợi được ngăn chặn bằng cách cố định cấu trúc hạt của virus trong chất cố định.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh truyền nhiễm do virus như virus cúm và virus viêm não Nhật Bản có thể trở nên trầm trọng tùy thuộc vào loại virus hoặc đối tượng bị nhiễm. Chủng ngừa vacxin hoặc tương tự đã được biết là phương pháp để bảo vệ hoặc ngăn ngừa chống lại các bệnh truyền nhiễm do virus.

Danh mục liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố quốc tế số WO 2016/010081

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: J. Infect. Dis. 2009 200 (6) 841-848

Tài liệu phi sáng chế 2: Vaccine 2009 27 (5) 786-791

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần giải quyết

Các vacxin chống lại virus như virus cúm và virus viêm não Nhật Bản được sản xuất và có bán trên thị trường với hai loại: vacxin bất hoạt và vacxin sống. Trong số đó, vacxin bất hoạt được chia một cách rộng rãi thành vacxin virus toàn phần được bào chế bằng cách xử lý hạt virus đã tinh chế bằng tác nhân bất hoạt như formalin, và vacxin virus tách chiết được bào chế bằng cách phá vỡ (tách chiết) hạt virus đã tinh chế bằng dung môi hữu cơ hoặc chất hoạt động bề mặt. Vacxin virus toàn phần có tính sinh miễn dịch cao và tuyệt vời về mặt tác dụng ngăn ngừa sự lây nhiễm. Tuy nhiên, vacxin virus toàn phần có xu hướng trong đó các phản ứng bất lợi như đáp ứng cục bộ và đáp ứng sốt biểu thị rất mạnh. Mặt khác, vacxin virus tách chiết tuyệt vời về mặt độ

an toàn vì các đáp ứng cục bộ giảm và chỉ có một số đáp ứng sốt. Tuy nhiên, tính sinh miễn dịch của vacxin virus tách chiết thường thấp ở trẻ em khi mà sự miễn dịch cơ bản chưa được thiết lập hoặc người già khi mà các đáp ứng miễn dịch đã suy yếu. Do đó, nhu cầu phát triển các vacxin thể hiện được hiệu lực (tính sinh miễn dịch) tốt hơn so với vacxin virus tách chiết và có độ an toàn cao được đặt ra.

Sáng chế đã được thực hiện để đáp ứng nhu cầu nêu trên, và mục đích của sáng chế là cung cấp vacxin có tính sinh miễn dịch cao và các phản ứng bất lợi được ngăn chặn.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu kỹ lưỡng để đạt được mục đích này và nhờ đó đã hoàn thành sáng chế với bất ngờ phát hiện rằng, vacxin chứa các hạt virus (sau đây gọi là "hạt virus cố định") mà giữ được thành phần và cấu trúc tương đương với các hạt virus gốc bằng cách cố định cấu trúc hạt của hạt virus trong chất cố định mà không phá vỡ (tách chiết) cấu trúc này, là tương đương trong thử nghiệm sinh miễn dịch và đạt được kết quả tuyệt vời trong thử nghiệm chất gây sốt, v.v. của các phản ứng bất lợi.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các đối tượng [1] đến [15] sau đây:

[1] Vacxin chứa hạt virus cố định, trong đó

đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus cố định trong thử nghiệm thử nghiệm chất gây sốt là thấp hơn 80% tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

[2] Vacxin theo mục [1], trong đó đáp ứng gây sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt là $1,3^{\circ}\text{C}$ hoặc thấp hơn.

[3] Vacxin chứa hạt virus cố định, trong đó

lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định là thấp hơn 80% tính theo lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

[4] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó các hạt

virut gốc của hạt virut cố định bao gồm hạt orthomyxovirus, hạt flavivirus, hoặc hạt picornavirus.

[5] Vacxin theo mục [4], trong đó các hạt virut bao gồm hạt virut cúm, hạt virut viêm não Nhật Bản, hoặc các hạt virut viêm gan A.

[6] Vacxin theo mục [5], trong đó các hạt virut bao gồm các hạt virut cúm.

[7] Vacxin theo mục [6], trong đó các hạt virut cúm bao gồm các hạt virut cúm A hoặc các hạt virut cúm B.

[8] Vacxin theo mục [6] hoặc [7], trong đó các hạt virut cúm bao gồm các hạt virut cúm được phân loại vào chủng thuộc phân typ H1N1, chủng thuộc phân typ H2N2, chủng thuộc phân typ H3N2, chủng thuộc phân typ H3N8, chủng thuộc phân typ H5N1, chủng thuộc phân typ H5N2, chủng thuộc phân typ H5N6, chủng thuộc phân typ H6N1, chủng thuộc phân typ H7N3, chủng thuộc phân typ H7N7, chủng thuộc phân typ H7N9, chủng thuộc phân typ H9N2, hoặc chủng thuộc phân typ H10N8.

[9] Vacxin theo mục [5], trong đó các hạt virut bao gồm các hạt virut viêm não Nhật Bản.

[10] Vacxin theo mục [9], trong đó hạt virut viêm não Nhật Bản bao gồm chủng Beijing-1, chủng Nakayama, chủng SA14-14-2, hoặc chủng P3.

[11] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], trong đó 0% đến 90% protein bề mặt trên hạt virut cố định không được cố định.

[12] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [11], trong đó giá trị tương đối của hoạt tính riêng (hàm lượng kháng nguyên/hàm lượng protein) của hạt virut cố định so với hoạt tính riêng của hạt virut gốc của hạt virut cố định là 0% đến 95%.

[13] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12], trong đó hạt virut cố định có cỡ hạt trung bình từ 80% đến 150% cỡ hạt của hạt virut gốc của hạt virut cố định hoặc hạt virut đã bất hoạt tương ứng.

[14] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [13], trong đó đỉnh được phát hiện ở nồng độ sacaroza 35% hoặc cao hơn, khi hạt virut cố định được đo

bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza.

[15] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [14], trong đó quan sát thấy đỉnh đơn khi hạt virus cố định được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

[16] Vacxin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [15], trong đó vacxin này cảm ứng IgG2a đặc hiệu hạt virus cố định hơn là IgG1 đặc hiệu hạt virus cố định khi gây miễn dịch ở chuột nhắt.

[0009] Sáng chế cũng đề xuất các đối tượng [17] đến [31] sau đây:

[17] Phương pháp sản xuất hạt virus cố định, bao gồm bước bổ sung chất cố định vào huyền phù chứa các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

[18] Phương pháp theo mục [17], trong đó chất cố định bao gồm aldehyt.

[19] Phương pháp theo mục [18], trong đó aldehyt được chọn từ nhóm gồm formaldehyt, paraformaldehyt, glutaraldehyt, và tổ hợp của chúng.

[20] Phương pháp theo mục [19], trong đó aldehyt bao gồm formaldehyt.

[21] Phương pháp theo mục [20], trong đó nồng độ formaldehyt là từ 0,005 đến 0,5% trọng lượng/thể tích tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.

[22] Phương pháp theo mục [19], trong đó aldehyt bao gồm glutaraldehyt.

[23] Phương pháp theo mục [22], trong đó nồng độ glutaraldehyt là từ 0,001 đến 0,06% trọng lượng/thể tích tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.

[24] Phương pháp theo mục [17], trong đó chất cố định bao gồm carbodiimit.

[25] Phương pháp theo mục [24], trong đó carbodiimit được chọn từ nhóm gồm dicyclohexylcarbodiimit, diisopropylcarbodiimit, 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua, các chất tương tự của chúng và tổ hợp của chúng.

[26] Phương pháp theo mục [25], trong đó carbodiimit bao gồm 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua.

[27] Phương pháp theo mục [26], trong đó nồng độ 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua là từ 0,05 đến 1500 mM tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.

[28] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục [17] đến [27], trong đó hạt

virut gốc là hạt virut được thu hồi bằng cách gây nhiễm tế bào nuôi cấy, trứng gà hoặc não chuột nhất.

[29] Phương pháp theo mục [28], trong đó tế bào nuôi cấy bao gồm các tế bào sơ cấp hoặc các dòng tế bào.

[30] Phương pháp theo mục [29], trong đó tế bào nuôi cấy bao gồm tế bào Vero hoặc tế bào MDCK.

[31] Phương pháp sản xuất vaccin, bao gồm bước bổ sung hạt virut cố định thu được từ phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [17] đến [30].

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, có thể tạo ra vaccin có tính sinh miễn dịch cao và các phản ứng bất lợi được ngăn chặn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là ảnh các hạt virut cúm cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng formalin).

Fig. 2 là ảnh các hạt virut cúm cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng glutaraldehyt).

Fig. 3 là ảnh các hạt virut cúm cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng EDC).

Fig. 4 là ảnh các hạt virut viêm não Nhật Bản cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng glutaraldehyt).

Fig. 5 là ảnh các hạt virut viêm não Nhật Bản cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng formalin).

Fig. 6 là ảnh các hạt virut viêm não Nhật Bản cố định được chụp dưới kính hiển vi điện tử (xử lý bằng EDC).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án ưu tiên theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án dưới đây.

Vaccin chứa hạt virut cố định

Vaccin theo phương án này là vaccin chứa hạt virut cố định, trong đó đáp ứng

sốt tổng cộng ($^{\circ}\text{C}$) của ba thỏ với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt giảm tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ với các hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Tương tự, với vaccin này, lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định giảm tính theo lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng các hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Tức là, tính sinh miễn dịch của vaccin chứa hạt virus cố định là bằng hoặc cao hơn tính sinh miễn dịch của vaccin virus tách chiết, và các phản ứng bất lợi như đáp ứng cục bộ và đáp ứng sốt được giữ ngang bằng với vaccin virus tách chiết. Theo khía cạnh khác, hạt virus cố định có độ ổn định tuyệt vời so với vaccin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

"Hạt virus cố định" nghĩa là các hạt virus không có khả năng gây nhiễm vật chủ và cấu trúc hạt của chúng được cố định bằng cách liên kết ngang các protein bề mặt của các hạt virus với nhau. Vì hạt virus cố định giữ được cấu trúc tương đương với các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng, tính sinh miễn dịch là cao. Hạt virus cố định thu được bằng cách xử lý các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng bằng chất cố định. Theo ngữ cảnh này, "chất cố định" nghĩa là tác nhân mà liên kết ngang các protein của các hạt virus với nhau bằng các liên kết cộng hóa trị. Ví dụ, chất cố định là tác nhân mà liên kết ngang các kháng nguyên bề mặt với nhau, kháng nguyên bề mặt với protein nền hoặc protein màng, các protein nền với nhau, hoặc các protein màng với nhau và duy trì cấu trúc hạt của hạt virus.

"Hạt virus đã bất hoạt" nghĩa là các hạt virus không có khả năng gây nhiễm vật chủ và cấu trúc hạt của chúng không được cố định. Các hạt virus đã bất hoạt thu được bằng cách xử lý các hạt virus gốc bằng tác nhân bất hoạt. Trong trường hợp các hạt virus cúm, các hạt virus đã bất hoạt có thể, ví dụ, thu được bằng cách bổ sung formalin (dung dịch nước formaldehyt 36 đến 38% trọng lượng/thể tích) vào huyền phù chứa các hạt virus cúm sao cho nồng độ cuối đạt 0,02% thể tích/thể tích (0,0072 đến 0,0076% trọng lượng/thể tích tính theo formaldehyt), và cho phản ứng ở 4°C trong 6 tuần. Trong trường hợp các hạt virus viêm não Nhật Bản, các hạt virus đã bất hoạt có

thể, ví dụ, là vacxin viêm não Nhật Bản lượng lớn nuôi cấy trong tế bào Vero có bán trên thị trường (do hãng General Incorporated Foundation sản xuất, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, tên thương mại "ENCEVAC", chứa các hạt virus viêm não Nhật Bản đã được bất hoạt bằng formalin 0,08 % thể tích/thể tích).

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành bằng phương pháp tuân theo phương pháp thử nghiệm chất gây sốt được giới thiệu trong tài liệu Japanese Minimum Requirements for Biological Products (Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 192). "Đáp ứng sốt" nghĩa là giá trị khác biệt tối đa (còn gọi là "nhiệt độ trực tràng chênh lệch") giữa nhiệt độ trực tràng của thỏ đo được sau khi tiêm mẫu vào tĩnh mạch tai (còn gọi là "giá trị đo") và nhiệt độ trực tràng của thỏ đo được trước khi tiêm (còn gọi là "nhiệt độ trực tràng đối chứng"). Trong ngữ cảnh này, khi nhiệt độ trực tràng chênh lệch là giá âm, đáp ứng sốt được xem là 0.

Cụ thể, thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành theo quy trình sau: đầu tiên, dung dịch trong đó hàm lượng protein trong 1 mL được điều chỉnh đến 70 µg (trong trường hợp hạt virus viêm não Nhật Bản) hoặc 240 µg (trong trường hợp các hạt virus cúm) bằng cách pha loãng các hạt virus cố định bằng nước muối được dùng làm mẫu. 1 đến 3 mL mẫu trên một kg thể trọng được tiêm vào thỏ, và sự gia tăng nhiệt độ trực tràng được quan sát trong tới 6 giờ sau đó. Chênh lệch giữa nhiệt độ trực tràng (nhiệt độ trực tràng đối chứng) của thỏ trước khi tiêm mẫu và nhiệt độ trực tràng của thỏ sau khi tiêm được xác định, và giá trị chênh lệch tối đa được dùng làm đáp ứng sốt của thỏ. Cùng thử nghiệm này được tiến hành cho ba thỏ, và đáp ứng sốt tổng cộng (°C) của ba thỏ được xác định.

Trong vacxin, đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt có thể nhỏ hơn 80%, có thể nhỏ hơn 60%, có thể nhỏ hơn 40%, có thể nhỏ hơn 20%, và có thể nhỏ hơn 10%, tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ với các hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Giới hạn dưới không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 0% hoặc cao hơn và có thể là 20% hoặc cao hơn, tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ với các hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Bằng cách đặt đáp ứng sốt

tổng cộng trong khoảng nêu trên, có thể tạo ra vacxin có các phản ứng bất lợi được ngăn chặn so với vacxin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

Trong vacxin, đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt có thể là 1,3°C hoặc thấp hơn, có thể là 0,9°C hoặc thấp hơn, và có thể là 0,5°C hoặc thấp hơn. Giới hạn dưới không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 0°C hoặc cao hơn và có thể là 0,6°C hoặc cao hơn. Bằng cách đặt đáp ứng sốt tổng cộng trong khoảng nêu trên, có thể tạo ra vacxin có các phản ứng bất lợi được ngăn chặn so với vacxin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

"Xytokin gây viêm" là tên chung của các xytokin được tạo ra trong đáp ứng viêm, và ví dụ bao gồm IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α , và IFN- γ .

"Tế bào đơn nhân máu ngoại vi người" (PBMC) nghĩa là các lympho bào (bao gồm tế bào T, tế bào B, tế bào NK, v.v.) và các bạch cầu đơn nhân thu được từ máu ngoại vi người.

Lượng xytokin gây viêm được xác định bằng cách xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMC) bằng các hạt virus bằng phương pháp tuân theo thử nghiệm European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Phương pháp được mô tả trên đây có thể là phương pháp European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test được thay đổi điều kiện đo như thể hiện trong các ví dụ sau đây.

Trong vacxin, lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định có thể thấp hơn 80%, có thể thấp hơn 60%, có thể thấp hơn 40%, có thể thấp hơn 20%, và có thể thấp hơn 10%, tính theo lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng các hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Giới hạn dưới không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 0% hoặc cao hơn và có thể là 40% hoặc cao hơn, tính theo lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Bằng cách đặt lượng xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định trong

khoảng nêu trên, có thể tạo ra vaccin có các phản ứng bất lợi được ngăn chặn so với vaccin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

Trong trường hợp mà xytokin gây viêm là IL-1 β , nồng độ xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định có thể là 30 pg/ml hoặc thấp hơn và có thể là 20 pg/ml hoặc thấp hơn, tính theo dung dịch nuôi cấy chứa tế bào đơn nhân máu ngoại vi người. Giới hạn dưới không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 0 pg/ml hoặc cao hơn và có thể là 5 pg/ml hoặc cao hơn. Bằng cách đặt nồng độ xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định trong khoảng nêu trên, có thể tạo ra vaccin có các phản ứng bất lợi được ngăn chặn so với vaccin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

Trong trường hợp mà xytokin gây viêm là IL-6, nồng độ xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định có thể là 50 pg/ml hoặc thấp hơn và có thể là 40 pg/ml hoặc thấp hơn, tính theo dung dịch nuôi cấy chứa tế bào đơn nhân máu ngoại vi người. Giới hạn dưới không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là 0 pg/ml hoặc cao hơn và có thể là 5 pg/ml hoặc cao hơn. Bằng cách đặt nồng độ xytokin gây viêm được tạo ra từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định trong khoảng nêu trên, có thể tạo ra vaccin có các phản ứng bất lợi được ngăn chặn so với vaccin virus toàn phần chứa các hạt virus đã bất hoạt thông thường.

Ví dụ về các hạt virus gốc của hạt virus cố định bao gồm hạt poxvirus, hạt herpesvirus, hạt orthomyxovirus, hạt paramyxovirus, hạt rhabdovirus, hạt coronavirus, hạt arenavirus, hạt togavirus, hạt flavivirus, hạt bunyavirus, hạt retrovirus, hạt hepadnavirus, hạt adenovirus, hạt papillomavirus, hạt papovavirus, hạt filovirus, hạt reovirus, hạt picornavirus và hạt calicivirus. Ví dụ về các hạt orthomyxovirus bao gồm hạt virus cúm. Ví dụ về hạt flavivirus bao gồm hạt virus viêm não Nhật Bản. Ví dụ về hạt picornavirus bao gồm hạt virus viêm gan A.

Ví dụ về hạt virus cúm bao gồm hạt virus cúm A và hạt virus cúm B. Ví dụ về hạt virus cúm A bao gồm các hạt virus cúm được phân loại vào chủng thuộc phân typ

H1N1, chủng thuộc phân typ H2N2, chủng thuộc phân typ H3N2, chủng thuộc phân typ H3N8, chủng thuộc phân typ H5N1, chủng thuộc phân typ H5N2, chủng thuộc phân typ H5N6, chủng thuộc phân typ H6N1, chủng thuộc phân typ H7N3, chủng thuộc phân typ H7N7, chủng thuộc phân typ H7N9, chủng thuộc phân typ H9N2, hoặc chủng thuộc phân typ H10N8.

Ví dụ về hạt virus viêm não Nhật Bản bao gồm hạt virus viêm não Nhật Bản thuộc chủng Beijing-1, chủng Nakayama (chủng Nakayama-NIH), chủng SA14-14-2, và chủng P3.

Hạt virus cố định chứa các axit nucleic từ hệ gen (ADN, ARN, v.v.) thu được từ các hạt virus vì không như vaccine virus tách chiết, cấu trúc hạt không bị phá vỡ. Các axit nucleic hệ gen thu được từ hạt virus có khả năng hoạt động như tá dược. Ví dụ, vaccine poliovirus bất hoạt bao gồm kháng nguyên D chứa ARN hệ gen của virus và kháng nguyên C không chứa ARN hệ gen của virus. Kháng nguyên C có tính sinh miễn dịch yếu và không thể hiện hiệu quả như kháng nguyên vaccine. Loại phân tử có tác dụng làm kháng nguyên vaccine chỉ là kháng nguyên D. Điều này cho thấy rằng ARN hệ gen virus có trong vaccine là quan trọng để phát huy tác dụng của nó. Do đó, vaccine theo phương án này có khả năng kích thích đáp ứng loại Th1. Điều này là trái với vaccine virus cúm tách chiết mà kích thích đáp ứng loại Th2. Kháng thể thuộc nhóm phụ IgG2a được kích thích bằng đáp ứng loại Th1 ở chuột nhất là tốt hơn về khả năng bảo vệ chống lại sự lây nhiễm virus cúm so với kháng thể thuộc nhóm phụ IgG1 được kích thích bằng đáp ứng loại Th2. Từ điều này, có thể trông đợi những cải tiến hơn nữa về hiệu lực của vaccine. Tức là, khi gây miễn dịch ở chuột nhất, vaccine có thể kích thích IgG2a đặc hiệu cho hạt virus cố định hơn là IgG1 đặc hiệu cho hạt virus cố định.

Hạt virus cố định có thể có thông số (chẳng hạn, phân tử lượng, cỡ hạt trung bình, tỷ trọng hoặc hàm lượng hemagglutinin (HA)) gần như giống với các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng, khi đo bằng phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng sacaroza, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, và/hoặc phương pháp tán xạ ánh sáng động.

Ví dụ, hạt virus cố định có thể là hạt virus cố định có cỡ hạt trung bình từ 80% đến 150% cỡ hạt của hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng và có thể là hạt virus cố định có cỡ hạt trung bình từ 90% đến 140%. Trong trường hợp hạt virus viêm não Nhật Bản, hạt virus cố định có thể là hạt virus cố định có cỡ hạt trung bình từ 90% đến 130% cỡ hạt của hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng và có thể là hạt virus cố định có cỡ hạt trung bình từ 100% đến 120%.

Trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus cúm, cỡ hạt trung bình của hạt virus cố định có thể khoảng 150 nm, có thể từ 120 nm đến 180 nm, và có thể từ 130 nm đến 170 nm, khi đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động. Theo khía cạnh khác, trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus cúm, cỡ hạt trung bình của hạt virus cố định có thể là 100 nm hoặc lớn hơn, có thể là 120 nm hoặc lớn hơn, có thể là 130 nm hoặc lớn hơn, có thể là 150 nm hoặc lớn hơn, và có thể là 170 nm hoặc lớn hơn, khi đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động. Cỡ hạt trung bình có thể là 180 nm hoặc nhỏ hơn, có thể là 175 nm hoặc nhỏ hơn, và có thể là 170 nm hoặc nhỏ hơn. Trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus viêm não Nhật Bản, cỡ hạt trung bình của hạt virus cố định có thể khoảng 90 nm và có thể từ 80 nm đến 110 nm, khi đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động. Theo khía cạnh khác, trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus viêm não Nhật Bản, cỡ hạt trung bình của hạt virus cố định có thể là 70 nm hoặc lớn hơn, có thể là 80 nm hoặc lớn hơn, và có thể là 90 nm hoặc lớn hơn, khi đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động. Cỡ hạt trung bình có thể là 110 nm hoặc nhỏ hơn, và có thể là 100 nm hoặc nhỏ hơn.

Trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ các hạt virus có vỏ, hàm lượng lipid trong hạt virus cố định có thể tương đương với hàm lượng lipid trong các hạt virus được mô tả trên đây.

Hạt virus cố định có thể là hạt virus cố định trong đó đỉnh được phát hiện ở nồng độ sacaroza 35% hoặc cao hơn, và có thể là hạt virus cố định trong đó đỉnh được phát hiện ở nồng độ sacaroza 45% hoặc cao hơn và 55% hoặc thấp hơn, khi đo bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza. Nồng độ sacaroza có thể được xác

định bằng phương pháp phổ biến đã biết. Ví dụ, nồng độ sacaroza cps thể được xác định bằng cách tráng mẫu chứa hạt virus cố định với gradien tỷ trọng sacaroza từ 15 đến 60%, và thực hiện ly tâm 18000 vòng/phút ($RCF = 57500 (\times g)$) trong 16 giờ ở $4^{\circ}C$.

Hạt virus cố định có thể là hạt virus cố định trong đó quan sát thấy đỉnh đơn khi đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC)). Ví dụ, trong trường hợp thực hiện đo phân tử lượng bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (tên thương mại: VSKgel G6000PWXL (do hãng Tosoh Corp. sản xuất) hoặc Superose 6 10/300 GE (do hãng GE Healthcare Japan Corp. sản xuất)) (chất rửa giải: PBS, tốc độ dòng: 0,5 ml/phút), chúng có thể là hạt virus cố định của hạt virus viêm não Nhật Bản trong đó quan sát thấy đỉnh đơn ở thời gian rửa giải khoảng 14 đến 15 phút, và có thể là hạt virus cố định của hạt virus cúm trong đó quan sát thấy đỉnh đơn ở thời gian rửa giải khoảng 16 đến 17 phút.

Trong vaccin, 0% đến 90% protein bề mặt trên hạt virus cố định có thể không được cố định, và 5% đến 80% protein bề mặt trên hạt virus cố định có thể không được cố định.

Ví dụ về protein bề mặt trên hạt virus cố định bao gồm kháng nguyên bề mặt, protein nền, protein màng, và tổ hợp của chúng.

Trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus cúm, ví dụ về kháng nguyên bề mặt bao gồm hemagglutinin (HA) và neuraminidaza (NA). Ví dụ về các protein nền bao gồm protein M1. Ví dụ về các protein màng bao gồm protein M2.

Trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus viêm não Nhật Bản, ví dụ về kháng nguyên bề mặt bao gồm protein E và protein M.

Ví dụ về phương pháp tính toán tỷ lệ protein không cố định bao gồm phương pháp xác định tỷ lệ phần trăm thay đổi (tỷ lệ phần còn lại) về lượng protein giữa trước khi cố định và sau khi cố định đối với phân tử lượng gốc của protein đích. Trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus cúm, các ví dụ bao gồm phương pháp thực hiện SDS-PAGE (điện di trên gel polyacrylamit) trong điều kiện khử, sau đó xác định mật độ của dải protein M1, một trong số các protein cấu thành

của virus, bằng tỷ trọng kế, và tính toán tỷ lệ phần còn lại (%) của protein M1. Trong trường hợp này, do nồng độ chất cố định tăng, tỷ lệ phần còn lại của protein M1 có xu hướng giảm. Bằng cách áp dụng phương pháp này, việc phân tích mức độ liên kết ngang bằng chất cố định có thể được tiến hành.

Theo phương án này, trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ hạt virus cúm, chúng có thể là hạt virus cố định trong đó tỷ lệ phần còn lại của protein M1 là từ 5% đến 90%, và có thể là hạt virus cố định trong đó tỷ lệ phần còn lại của protein M1 là từ 10% đến 80%. Nói cách khác, từ 5% đến 90% protein M1 có thể không được cố định, và từ 10% đến 80% có thể không được cố định.

Việc phân tích mức độ liên kết ngang cũng có thể được thực hiện bằng cách xác định hoạt tính riêng (hàm lượng kháng nguyên/hàm lượng protein) của hạt virus cố định. Kháng thể đơn dòng được sử dụng trong phép đo hàm lượng kháng nguyên của các hạt virus nhận biết epitop trung hòa, và sự giảm hoạt tính riêng khi có thay đổi về cấu trúc của epitop trung hòa xảy ra. Giá trị tương đối (%) của hoạt tính riêng của hạt virus cố định so với các hạt virus không cố định được tính toán bằng cách sử dụng đặc tính này, và mức độ liên kết ngang được đánh giá. Theo phương án này, giá trị tương đối của hoạt tính riêng nằm trong khoảng từ 0 đến 95%. Trong trường hợp mà hạt virus cố định có nguồn gốc từ virus viêm não Nhật Bản, giá trị tương đối của hoạt tính riêng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định có thể từ 90 đến 95%, có thể từ 70 đến 90%, và có thể từ 50 đến 70%.

Lượng hạt virus cố định có trong vaccine có thể được chọn một cách thích hợp theo loại virus hoặc đối tượng tiếp nhận. Ví dụ, lượng (nồng độ) hạt virus cố định có trong vaccine cúm có thể từ 1 đến 40 μg HA/mL dưới dạng nồng độ hemagglutinin trên một chủng virus.

Vaccine có thể là vaccine đơn giá chứa kháng nguyên thu được từ cùng loại virus hoặc vi khuẩn. Vaccine có thể là vaccine kết hợp chứa chứa kháng nguyên thu được từ nhiều loại virus hoặc vi khuẩn. Vaccine có thể là vaccine đa giá chứa các kháng nguyên thu được từ các virus hoặc vi khuẩn thuộc cùng chi và thuộc nhiều loại hoặc kiểu. Ví dụ, trong trường hợp mà vaccine là vaccine virus cúm, vaccine này có thể chứa hạt virus

cúm A cố định hoặc hạt virus cúm B cố định hoặc có thể chứa cả hai loại này. Trong trường hợp mà vaccine là vaccine virus viêm não Nhật Bản, vaccine này có thể chứa virus thu được từ nuôi cấy tế bào hoặc virus thu được từ não chuột nhắt. Vaccine virus cúm hoặc vaccine virus viêm não Nhật Bản có thể chứa kháng nguyên thu được từ virus hoặc vi khuẩn khác. Ví dụ, vaccine này có thể được trộn với vaccine kết hợp bạch hầu-ho gà-uốn ván-virus bại liệt bất hoạt (vaccine DPT-IPV).

Dạng liều vaccine có thể là, ví dụ, dạng lỏng, dạng bột (bột đông khô, bột khô, v.v.), dạng nang, viên nén, hoặc trạng thái lạnh đông.

Vaccine có thể chứa chất mang được dùng. Chất mang thường dùng trong sản xuất vaccine có thể được sử dụng làm chất mang mô tả trên đây mà không có hạn chế. Cụ thể, ví dụ về chất mang bao gồm nước muối, nước muối được đệm, dextroza, nước, glyxerol, các dung dịch đệm trong nước đẳng trương và tổ hợp của chúng. Vaccine còn có thể được bổ sung chất nhũ hóa, chất bảo quản (ví dụ, thimerosal), chất tạo trương lực, chất điều chỉnh độ pH, chất bất hoạt (ví dụ, formalin), và các chất tương tự một cách thích hợp.

Đường dùng của vaccine có thể, ví dụ, dùng qua da, dùng dưới lưỡi, dùng nhỏ mắt, dùng trong da, dùng trong cơ, dùng đường miệng, dùng đường ruột, dùng trong mũi, dùng trong tĩnh mạch, dùng dưới da, dùng trong màng bụng, và dùng đường hít từ miệng đến phổi.

Phương pháp sử dụng vaccine có thể là, ví dụ, phương pháp tiến hành sử dụng bằng xi lanh, miếng dán qua da, vi kim, dụng cụ cấy ghép giải phóng kéo dài, xi lanh có trang bị vi kim, dụng cụ không dùng kim, hoặc phun.

Để tăng cường thêm tính sinh miễn dịch, vaccine có thể chứa tá dược. Ví dụ về tá dược bao gồm các tá dược nhôm hoặc tá dược dạng nhũ tương dầu trong nước chứa squalene (AS03, MF59, etc.), các phối tử của thụ thể tương tự Toll như CpG và 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL), các tá dược dựa trên saponin, các tá dược dựa trên polyme như axit poly- γ -glutamic, và các polysaccharit như chitosan và inulin.

Ví dụ về động vật có vú đích bao gồm chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột

đồng, thỏ, mèo, chó, cừu, lợn, gia súc, ngựa, dê, khỉ, và người. Vacxin theo phương án này có thể được sử dụng cho người và có thể được sử dụng cho trẻ em dưới 5 tuổi và người già 65 tuổi hoặc cao hơn.

Trong trường hợp mà vacxin cúm được sử dụng cho người, vacxin này có thể được sử dụng sao cho 3,8 µg HA đến 30 µg HA trong một liều thành phần hoạt tính (hạt virus cố định) được sử dụng, dù khác biệt phụ thuộc vào mục đích sử dụng, phương pháp sử dụng, và tình trạng của đối tượng tiếp nhận (giới tính, độ tuổi, thể trọng, tình trạng y tế, v.v.).

Phương pháp sản xuất hạt virus cố định

Phương pháp sản xuất hạt virus cố định theo phương án này bao gồm bước cố định cấu trúc hạt cho các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

Phương pháp phá vỡ (tách chiết) các hạt virus có vỏ bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt hoặc dung môi hữu cơ cho đến nay đã được biết là các kỹ thuật tăng cường độ an toàn cho vacxin. Tuy nhiên, trong các phương pháp này, hiệu lực (tính sinh miễn dịch) của các vacxin thường giảm khi hạt bị vỡ. Trong phương pháp sản xuất được mô tả trên đây, cấu trúc hạt virus được duy trì, và nhờ đó, có thể tăng cường độ an toàn khi duy trì hiệu lực của vacxin, do việc xử lý các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng bằng chất cố định mà tạo ra liên kết cộng hóa trị với protein hạt virus.

Phương pháp sản xuất có thể bao gồm thêm bước nuôi cấy vật chủ, bước này cho phép virus nhiễm vào vật chủ, bước sao chép virus trong vật chủ, bước thu hồi các hạt virus từ vật chủ, hoặc bước bất hoạt các hạt virus được thu hồi.

Các hạt virus có thể là các hạt virus được thu hồi từ vật chủ sau khi hạt virus được để cho nhiễm vào vật chủ và sao chép. Vật chủ có thể được chọn một cách thích hợp theo loại hạt virus. Phương pháp bất hoạt các hạt virus có thể sử dụng phương pháp phổ biến đã biết, và ví dụ bao gồm phương pháp tiến hành bất hoạt bằng chất bất hoạt như formalin. Trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus cúm, ví dụ về vật chủ bao gồm tế bào nuôi cấy, trứng gà và não chuột nhắt. Tế bào nuôi cấy có thể là tế bào sơ cấp hoặc các dòng tế bào. Ví dụ về tế bào nuôi cấy bao gồm tế bào Vero và tế

bào MDCK.

Phương pháp sử dụng trứng gà hoặc tế bào Vero làm vật chủ (Vaccine, 1998 May-Jun; 16 (9-10): 960-8), phương pháp sử dụng tế bào Vero làm vật chủ (Vaccine, 2007 August 10; 25 (32): 6028-6036), và phương pháp sử dụng tế bào MDCK làm vật chủ (J Virol. 2012 Nov; 86 (22): 12341-50) là các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết là phương pháp gây nhiễm và sao chép virus cúm.

Cố định các hạt virus

Ví dụ về bước cố định bao gồm phương pháp xử lý các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng bằng chất cố định, và ví dụ bao gồm bước bổ sung chất cố định vào chứa các hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng. Nồng độ hạt virus trong huyền phù có thể được thay đổi thích hợp theo loại virus, loại chất cố định và nồng độ chất cố định, v.v. ví dụ, nồng độ hạt virus trong huyền phù có thể từ 60 đến 90 µg/mL, có thể từ 300 đến 3000 µg/mL, và có thể từ 500 đến 2500 µg/mL, dưới dạng nồng độ protein hạt virus.

Loại chất cố định có thể được thay đổi thích hợp theo loại virus. Ví dụ về chất cố định bao gồm các dung môi hữu cơ, aldehyt, diimidoeste, bis(3,5-dibromosalicyl) fumarat (DBBF), carbodiimide, và tổ hợp của chúng. Ví dụ về các dung môi hữu cơ bao gồm metanol, etanol, axeton, và tổ hợp của chúng. Ví dụ về các aldehyt bao gồm formaldehyt (FA) (ví dụ, formalin), paraformaldehyt, glutaraldehyt (GA), và tổ hợp của chúng. Ví dụ về các carbodiimide bao gồm dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), các chất tương tự của chúng và tổ hợp của chúng.

Nồng độ chất cố định có thể được thay đổi thích hợp theo loại virus và loại chất cố định. Trong trường hợp mà chất cố định bao gồm formaldehyt, nồng độ formaldehyt có thể từ 0,005 đến 0,5% trọng lượng/thể tích tính theo tổng lượng huyền phù chứa hạt virus và chất cố định. Trong trường hợp mà nồng độ formaldehyt nhỏ hơn 0,005% trọng lượng/thể tích, mức cố định thường yếu và cấu trúc hạt khó duy trì. Trong trường hợp mà nồng độ formaldehyt vượt quá 0,5 % trọng lượng/thể tích, mức cố định thường mạnh và cải biến hóa học bằng liên kết ngang diễn ra qua nhiều.

Nhằm cải thiện hơn nữa hiệu giá HA, nồng độ formaldehyt có thể từ 0,01 đến 0,5% trọng lượng/thể tích, có thể từ 0,018 đến 0,152% trọng lượng/thể tích, có thể từ 0,029 đến 0,152% trọng lượng/thể tích, và có thể từ 0,029 đến 0,076% trọng lượng/thể tích, tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định. Phương pháp sử dụng chất cố định chứa formaldehyt có thể được dùng trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus cúm hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản.

Trong trường hợp mà chất cố định là formalin (dung dịch nước formaldehyt 36 đến 38 % trọng lượng/thể tích), nồng độ formalin có thể từ 0,014 đến 0,4% thể tích/thể tích, có thể từ 0,05 đến 0,4% thể tích/thể tích, có thể từ 0,08 đến 0,4% thể tích/thể tích, và có thể từ 0,08 đến 0,2% thể tích/thể tích, tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.

Trong trường hợp mà chất cố định chứa glutaraldehyt, nồng độ glutaraldehyt có thể từ 0,001 đến 0,06% trọng lượng/thể tích, có thể từ 0,002 đến 0,05% trọng lượng/thể tích, có thể từ 0,004 đến 0,02% trọng lượng/thể tích, và có thể từ 0,005 đến 0,01% trọng lượng/thể tích, tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định. Trong trường hợp mà nồng độ này thấp hơn 0,001% trọng lượng/thể tích, các hạt có xu hướng kết tụ khi hạt virus viêm não Nhật Bản được sử dụng làm hạt virus. Trong trường hợp mà nồng độ này vượt quá 0,06% trọng lượng/thể tích, epitop của protein E, protein cấu trúc chính, có xu hướng bị bất hoạt khi hạt virus viêm não Nhật Bản được dùng làm hạt virus. Phương pháp sử dụng glutaraldehyt làm chất cố định có thể được dùng trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus cúm hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản.

Trong trường hợp mà chất cố định chứa EDC, nồng độ EDC có thể từ 0,05 đến 1500 mM, có thể từ 0,15 đến 500 mM, và có thể từ 5 đến 50 mM, tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định. Phương pháp sử dụng chất cố định chứa EDC có thể được dùng trong trường hợp mà các hạt virus là hạt virus cúm hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản.

Nhiệt độ ở thời điểm xử lý bằng chất cố định có thể được điều chỉnh thích hợp theo loại virus, loại chất cố định, nồng độ chất cố định, v.v. Nhiệt độ có thể từ 0°C (bể nước đá) đến 37°C, có thể từ 4°C đến 37°C, và có thể từ 25°C đến 37°C.

Khoảng thời gian xử lý bằng chất cố định (thời gian xử lý) có thể được thay đổi thích hợp theo loại virus, loại chất cố định, nồng độ chất cố định, nhiệt độ xử lý, v.v. Khoảng thời gian này có thể từ 1 ngày đến 4 tuần, có thể từ 3 ngày đến 4 tuần, và có thể từ 1 tuần đến 4 tuần. Trong trường hợp sử dụng EDC làm chất cố định, khoảng thời gian này có thể từ 5 phút đến 24 giờ, có thể từ 0,5 giờ đến 24 giờ, và có thể từ 2 giờ đến 20 giờ.

Để kết thúc tiến trình liên kết ngang bằng chất cố định, việc xử lý ngừng phản ứng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng axit amin như glycine. Việc xử lý ngừng phản ứng có thể được thực hiện nhằm mục đích cải thiện độ ổn định, tính sinh miễn dịch, và độ an toàn của vaccine.

Tùy theo nhu cầu, có thể có thêm bước tinh chế hạt virus cố định đã thu hồi. Mặc dù có thể thực hiện phương pháp tinh chế hạt virus cố định một cách thích hợp bằng phương pháp phổ biến đã biết, ví dụ bao gồm phương pháp thực hiện lọc bằng cách sử dụng màng siêu lọc.

Phương pháp sản xuất vaccine theo phương án này bao gồm bước bổ sung hạt virus cố định thu được bằng phương pháp sản xuất hạt virus cố định. Phương pháp sản xuất vaccine còn có thể bao gồm thêm bước bổ sung chất mang, chất nhũ hóa, chất bảo quản, chất tạo trương lực, chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt hóa được dùng, và các chất tương tự.

Tốt hơn nếu việc chủng ngừa vaccine có thể tạo ra cho đối tượng chất lượng và số lượng gây miễn dịch tương tự như ở thời điểm lây nhiễm thực tế, và các đặc tính miễn dịch tương tự do vaccine tạo ra chống lại sự miễn dịch do lây nhiễm thực tế gây ra xác định hiệu quả của vaccine. Tất cả protein virus có thể có mặt trong vaccine làm kháng nguyên để bảo vệ chống lại sự lây nhiễm. Xét thấy rằng sự có mặt của các axit nucleic hệ gen thu được từ virus tăng cường tính sinh miễn dịch của protein virus, kích cỡ và hình dạng của các hạt virus, v.v. từng yếu tố riêng rẽ đều nhằm phục vụ cho đáp ứng miễn dịch, các tác giả sáng chế tin rằng vaccine tốt nhất là vaccine có thành phần và cấu trúc càng tương tự với virus thực tế càng tốt. Vì hạt virus cố định theo phương án này có thành phần và cấu trúc tương đương với các hạt virus gốc trừ việc chúng

được cố định bằng chất cố định, có thể tạo ra vacxin với tính sinh miễn dịch cao và các phản ứng bất lợi được ngăn chặn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mặc dù sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây có tham chiếu đến các ví dụ, sáng chế không bị giới hạn bởi những ví dụ này theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1

1. Tạo ra kháng nguyên có nguồn gốc từ hạt virus cúm

(1) Tạo ra hạt virus cúm cố định bằng FA

Xử lý bằng formaldehyt (FA)

Chủng virus cúm A thuộc phân typ H1N1 (A/California/07/2009 (X-179A); sau đây còn gọi là "chủng A/CA") được cấy vào các khoang niệu của trứng đã tạo phôi 11-ngày tuổi và nuôi cấy ở 34°C trong 2 ngày. Sau khi dịch niệu nang thu được được làm trong, hạt virus cúm được kết tủa bằng cách siêu ly tâm. Hạt virus cúm được tạo huyền phù lại trong nước muối đệm phosphat (PBS) để thu được huyền phù. Huyền phù thu được được ly tâm bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza (RCF = 57500 ($\times$ g), 16 giờ), và các hạt virus cúm được tinh chế bằng cách thu hồi phân đoạn có nồng độ sacaroza từ 33% đến 50%. Phân đoạn thu được được pha loãng sao cho nồng độ protein cuối của hạt virus cúm đã tinh chế là 500 μ g/mL, để thu được huyền phù. Sau đó, formalin (dung dịch nước formaldehyt 36 đến 38% trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào huyền phù này sao cho nồng độ cuối đạt từ 0,05 đến 0,20% thể tích/thể tích (từ 0,018 đến 0,076% trọng lượng/thể tích tính theo formaldehyt), và được cho phản ứng ở 25°C trong 1 tuần. Sau khi hoàn thành phản ứng, formaldehyt được loại bỏ bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng PBS, để nhờ đó thu được hạt virus cúm cố định (sau đây gọi là "hạt virus cúm cố định bằng FA").

(2) Tạo ra hạt virus cúm bất hoạt

Formalin (dung dịch nước formaldehyt 36 đến 38% trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào huyền phù sao cho nồng độ cuối đạt 0,02% thể tích/thể tích (từ 0,0072 đến 0,076% trọng lượng/thể tích tính theo formaldehyt), và được cho phản ứng ở 4°C trong 6 đến 8 tuần. Sau khi hoàn thành phản ứng, formaldehyt được loại bỏ bằng cách

thẩm tách dung dịch phản ứng bằng PBS, để nhờ đó thu được hạt virus cúm bất hoạt. Hạt virus cúm bất hoạt cũng được tạo ra từ các chủng virus cúm khác (các chủng phân typ) bằng phương pháp tương tự và được sử dụng làm đối chứng so sánh trong ví dụ từ 1 đến 6.

(3) Tạo kháng nguyên virus cúm tách chiết

Kháng nguyên virus cúm tách chiết (sau đây còn gọi là "kháng nguyên cúm tách chiết") làm đối chứng so sánh sử dụng dung dịch gốc của từng chủng có trong vaccine cúm HA (do hãng General Incorporated Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute sản xuất, tên thương mại "vaccine cúm HA "KAKETSUKEN"").

2. Thử nghiệm chất gây sốt

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành theo tài liệu Japanese Minimum Requirements for Biological Products (Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 192). Dung dịch trong đó hàm lượng protein trong 1 mL được điều chỉnh đến 240 μ g bằng cách pha loãng hạt virus cúm bất hoạt, hạt virus cúm cố định bằng FA hoặc kháng nguyên cúm tách chiết bằng nước muối được sử dụng làm mẫu. 1 đến 3 mL mẫu trên một kg thể trọng được tiêm vào thỏ, và sự gia tăng nhiệt độ trực tràng được quan sát đến 6 giờ sau đó. Chênh lệch giữa nhiệt độ trực tràng (nhiệt độ trực tràng đối chứng) của thỏ trước khi tiêm mẫu và nhiệt độ trực tràng của thỏ sau khi tiêm được xác định, và giá trị chênh lệch tối đa được dùng làm đáp ứng sốt của thỏ. Cùng thử nghiệm này được tiến hành trên ba thỏ. Đáp ứng sốt tổng cộng ($^{\circ}$ C) của ba thỏ được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	Đáp ứng sốt tổng cộng ($^{\circ}$ C)
Hạt virus cúm cố định bằng FA	0,05	0,30
	0,08	0,51
	0,11	0,20
	0,14	0,17
	0,20	0,04
Hạt virus cúm bất hoạt	-	3,72
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	0,53

Đối với tất cả các hạt virus cúm cố định bằng FA, không quan sát thấy đáp ứng sốt tổng cộng ở mức 1,3°C hoặc cao hơn, và đã quan sát thấy mức giảm đáp ứng sốt tổng cộng 3°C hoặc cao hơn so với hạt virus cúm bất hoạt. Đối với hạt virus cúm được cố định bằng FA đã phát hiện rằng đáp ứng sốt tổng cộng đủ thấp, như đối với kháng nguyên cúm tách chiết. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng FA có độ an toàn cao như đối với kháng nguyên virus tách chiết.

3. Xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin gây viêm (IL-6) được tạo ra trong trường hợp kích thích tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMC) bằng hạt virus cúm cố định bằng FA mà việc cố định được thực hiện ở nồng độ formalin 0,05% thể tích/thể tích, 0,08 % thể tích/thể tích, hoặc 0,11% thể tích/thể tích hoặc hạt virus cúm bất hoạt được xác định bằng phương pháp theo tài liệu European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách gộp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả về lượng xytokin được tạo ra chống lại hạt virus cúm cố định bằng FA và hạt virus cúm bất hoạt được thể hiện trên bảng 2. Đã phát hiện rằng lượng IL-6 được tạo ra đối với hạt virus cúm cố định bằng FA là đủ thấp so với hạt virus cúm bất hoạt. Điều này cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng FA có độ an toàn cao so với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 2

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus cúm cố định bằng FA	0,05	9,2
	0,08	7,3
	0,11	9,2
Hạt virus cúm bất hoạt	-	17,0

Ví dụ 2

Đánh giá về mặt vật lý

1. Phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza

Phân đoạn thu được được pha loãng bằng phương pháp theo ví dụ 1 được mô tả trên đây sao cho protein nồng độ cuối của hạt virus cúm (chủng A/CA) đạt 2500 µg/mL, để thu được huyền phù. Sau đó, formalin được bổ sung vào huyền phù sao cho nồng độ cuối đạt 0,12 % thể tích/thể tích, và được cho phản ứng ở 25°C trong 1 tuần. Hạt virus cúm cố định bằng FA thu được bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng PBS. Hạt virus cúm cố định bằng FA thu được phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza. Mẫu được tráng trên gradien tỷ trọng sacaroza từ 15 đến 60%, và tiến hành ly tâm 18000 vòng/phút (57500 ($\times$ g)) trong 16 giờ ở 4°C. Sau khi ly tâm, việc phân đoạn được tiến hành thành 0,6 mL mỗi phân đoạn, và nồng độ sacaroza, hiệu giá HA và nồng độ protein trong mỗi phân đoạn được xác định. Kết quả về chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1) được thể hiện trên bảng 3. Kháng nguyên virus tách chiết thể hiện rằng các protein được phân bố rộng trên các nồng độ sacaroza từ 25 đến 50%, và các hạt virus bị phá hủy. Trái với điều này, hạt virus cúm cố định bằng FA cho thấy là được phân đoạn dưới dạng đỉnh đơn (hạt) ở nồng độ sacaroza cao (44,3%). Hiệu giá HA là 10240 lần.

Bảng 3

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza và hiệu giá HA

	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Kháng nguyên cúm tách chiết
Nồng độ sacaroza (%)	44,3 Đỉnh đơn	25-50 Phân bố rộng
Hàm lượng protein (µg/mL)	460,0	-
Hiệu giá HA (x)	10240	-

2. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) chi tiết hơn, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử. Mẫu được cố định bằng glutaraldehyt ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, mẫu đã cố định được đặt lên tấm lưới phủ ion để quan sát (do hãng Nisshin EM Co., Ltd. sản xuất), để yên

trong khoảng 60 giây, và nhuộm âm tính bằng dung dịch nước axit phosphovonframic 2%. Mẫu đã nhuộm được quan sát và chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (Tecnai G2 do hãng FEI Company sản xuất; điện thế tăng tốc: 120 kV).

Hình ảnh hạt virus cúm cố định bằng FA chụp bằng kính hiển vi điện tử được thể hiện trên Fig. 1. Hạt virus cúm cố định bằng FA giữ được cấu trúc hạt như ở hạt virus cúm bất hoạt.

3. Tán xạ ánh sáng động

Hạt virus cúm cố định bằng FA có nguồn gốc từ chủng virus cúm A thuộc phân typ H3N2 (A/New York/39/2012 (X-233A); sau đây còn gọi là "chủng A/NY") và chủng virus cúm B Victoria lineage (chủng B/Brisbane/60/2008; sau đây còn gọi là "chủng B/BR") được tạo ra bằng phương pháp theo ví dụ 1, và cỡ hạt trung bình tương ứng của chúng được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trên bảng 4. Hạt virus cúm cố định bằng FA có cỡ hạt trung bình khoảng từ 140 đến 150 nm mà là đơn. Từ điều này, đã phát hiện rằng cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng FA là tương đương với hạt virus cúm bất hoạt. Cấu trúc hạt của hạt virus cúm cố định bằng FA được duy trì, và không quan sát thấy các tạp chất như các thể kết tụ.

Bảng 4

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động (cỡ hạt trung bình khối có trọng số (đỉnh chính) (nm))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	139,5	159,2
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	149,3	137,8

4. Xác định phân bố phân tử lượng (SEC)

Hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng B/MA) được tạo ra từ chủng virus cúm B Yamagata lineage (chủng B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) (sau đây còn gọi là "chủng B/MA")) bằng phương pháp theo ví dụ 1 được mô tả trên đây. Việc xác định

phân bố phân tử lượng của kháng nguyên virus tách chiết và hạt virus cúm cố định bằng FA được thực hiện với chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), và chủng B/MA (chủng thuộc typ B) bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (tên thương mại: TSKgel G6000PWXL (do hãng Tosoh Corp. sản xuất)) (được thực hiện ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút với PBS làm chất rửa giải). Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 5. Đối với hạt virus cúm cố định bằng FA, quan sát thấy đỉnh đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 16 đến 17 phút. Mặt khác, đối với kháng nguyên virus tách chiết thu được từ chủng này, quan sát thấy ba đỉnh ở thời gian rửa giải khoảng từ 19 đến 30 phút.

Bảng 5

Mẫu rửa giải SEC (thời gian rửa giải (phút))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Kháng nguyên cúm tách chiết
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	16-17 Đỉnh đơn	19, 26, 30 Ba đỉnh
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	16-17 Đỉnh đơn	19, 24, 26 Ba đỉnh
Chủng B/MA (chủng thuộc typ B)	16-17 Đỉnh đơn	19, 24, 25 Ba đỉnh

5. Phân tích bằng mức độ liên kết ngang

Mức độ liên kết ngang bằng chất cố định được phân tích đối với hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) được tạo ra trong ví dụ 1 bằng quy trình sau: sau khi đệm SDS (nồng độ cuối: 0,76 % trọng lượng/thể tích Tris, 1 % trọng lượng/thể tích SDS, 10 % thể tích/thể tích glycerol, 0,01 % trọng lượng/thể tích bromophenol blue (BPB)) và 2-mercaptoethanol (nồng độ cuối: 0,8 % thể tích/thể tích) đầu tiên được bổ sung vào mẫu và đun sôi trong 6 phút, SDS-PAGE được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị PAGEL NPU-12,5L (do hãng ATTO Technology, Inc. sản xuất, tên thương mại) hoặc PAGEL NPU-R12.5L (do hãng ATTO Technology, Inc. sản xuất, tên thương mại). Sau khi điện di, tiến hành nhuộm CBB (xanh Coomassie), và chụp ảnh bằng thiết bị LAS3000 (do hãng FUJIFILM Corp. sản xuất, tên thương mại). Khi việc liên kết ngang bằng chất cố định diễn ra, protein M1, một trong số các protein

cấu thành của virus, di chuyển từ vị trí vạch gốc (25 đến 37 kDa) đến phân tử lượng cao hơn. Do đó, điều này cho thấy rằng vạch protein M1 (vạch M1) được phát hiện ở vị trí gốc phát sáng, được sử dụng làm chỉ số về mức độ liên kết ngang. Cụ thể, giá trị tương đối (%) của giá trị đo tỷ trọng của vạch M1 được phát hiện ở vị trí gốc (sau đây giá trị tương đối này còn được gọi là "tỷ lệ gốc protein M1" (%)), của hạt virus cúm cố định bằng FA được xử lý bằng mỗi nồng độ formalin đến giá trị đo tỷ trọng của vạch M1 của hạt virus cúm không cố định được tính toán. Kết quả được thể hiện trong bảng 6. Tỷ lệ gốc protein M1 của hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) mà đã thực hiện việc cố định bằng các nồng độ formalin 0,05%, 0,08%, 0,11%, và 0,14% lần lượt là 35,7%, 23,8%, 11,0%, và 5,4%, điều này cho thấy rằng nồng độ formalin tăng, liên kết ngang được đẩy nhanh sao cho tỷ lệ gốc protein M1 giảm.

Bảng 6

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Tỷ lệ gốc protein M1

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	Tỷ lệ gốc protein M1 (%)
Hạt virus cúm cố định bằng FA	0,05	35,7
	0,08	23,8
	0,11	11,0
	0,14	5,4

6. Tính sinh miễn dịch - 1 (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

Tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt. Kháng nguyên virus tách chiết, hạt virus cúm bất hoạt, hoặc hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) được tiêm trong cơ với liều tiêm 0,8 µg dưới dạng lượng protein cho chuột nhắt ddY (cái, 8 tuần tuổi) (13 con mỗi nhóm). Ba tuần sau khi gây miễn dịch, các chuột được thu thập máu toàn phần và giết êm ái. Huyết thanh thu được bằng cách ly tâm, và hiệu giá HI được xác định theo tài liệu "Pathogen Detection Manual" (của National Institute of Infectious Diseases, Japan). Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá HI (GMT)) khi thực hiện tiêm trong cơ cho chuột nhắt được thể hiện trong bảng 7. Hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) có tính sinh miễn dịch cao so với kháng nguyên virus tách chiết và có tính sinh miễn dịch tương đương với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 7

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Hiệu giá HI (GMT) (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
GMT	65	65	36

7. Tính sinh miễn dịch - 2 (tiêm trong da cho chuột nhắt)

Tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/CA) được đánh giá bằng cách tiêm trong da cho chuột nhắt theo cùng quy trình như trong mục “6. tính sinh miễn dịch - 1 (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)” được mô tả trên đây. Kháng nguyên virus tách chiết, hạt virus cúm bất hoạt, hoặc hạt virus cúm cố định bằng FA được tiêm trong da với liều tiêm 0,2 µg tính theo lượng protein cho chuột nhắt ddY (cái, 8 tuần tuổi) (5 con mỗi nhóm). Ba tuần sau khi gây miễn dịch, các chuột được thu thập máu toàn phần và giết êm ái. Huyết thanh thu được bằng cách ly tâm, và hiệu giá HI được xác định. Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá HI (GMT)) khi thực hiện tiêm trong da cho chuột nhắt được thể hiện trong bảng 8. Hạt virus cúm cố định bằng FA có tính sinh miễn dịch cao đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết và có tính sinh miễn dịch tương đương với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 8

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Hiệu giá HI (GMT) (tiêm trong da cho chuột nhắt)

	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
GMT	106 ^{*1}	106 ^{*1}	30

*1: P<0,05

8. Tính sinh miễn dịch - 3 (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên virus tách chiết, hạt virus cúm bất hoạt, và hạt virus cúm cố định bằng FA được đánh giá đối với chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), và chủng B/BR và chủng B/MA (các chủng thuộc typ B) bằng cách sử dụng khỉ cynomolgus (đực hoặc cái, 17 đến 25 tháng tuổi). Kháng nguyên virus tách chiết, hạt virus cúm bất hoạt, hoặc

hạt virus cúm cố định bằng FA được tiêm dưới da hai lần cách nhau 21 ngày với liều tiêm tương ứng với 7,5 µg HA (lượng protein tương ứng với lượng HA của kháng nguyên virus tách chiết) cho 8 hoặc 9 động vật mỗi nhóm. Trước lần gây miễn dịch thứ cấp và vào ngày 21 sau khi gây miễn dịch thứ cấp, thực hiện thu máu một phần. Huyết thanh thu được bằng cách ly tâm, và hiệu giá HI và hiệu giá trung hòa được xác định theo tài liệu "Pathogen Detection Manual" (của National Institute of Infectious Diseases, Japan). Kết quả về tính sinh miễn dịch được thể hiện trong bảng 9 (hiệu giá HI (GMT) vào ngày 21 sau khi gây miễn dịch thứ cấp và bảng 10 (hiệu giá trung hòa (GMT) vào ngày 21 sau khi gây miễn dịch thứ cấp). Đã phát hiện đối với hiệu giá HI mà hạt virus cúm cố định bằng FA có tính sinh miễn dịch cao so với kháng nguyên virus tách chiết. Cụ thể, tính sinh miễn dịch, trừ chủng B/MA, cao đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết. Như đối với hiệu giá trung hòa, hạt virus cúm cố định bằng FA cũng có tính sinh miễn dịch cao đáng kể đối với tất cả các chủng thuộc typ A và các chủng thuộc typ B so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 9

Hiệu giá HI (GMT): Tiêm dưới da cho khỉ *Cynomolgus* (ngày 21 sau khi gây miễn dịch thứ cấp)

	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	160 ^{*1}	226 ^{*2}	18
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	34 ^{*1}	37 ^{*1}	11
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	52 ^{*2}	31 ^{*2}	8
Chủng B/MA (chủng thuộc typ B)	18	20 ^{*2}	5

*1: P<0,05, *2: P<0,01

Bảng 10

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tiêm dưới da cho khỉ Cynomolgus (ngày 21 sau khi gây miễn dịch thứ cấp)

	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	761 ^{*2}	1076 ^{*2}	62
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	698 ^{*1}	640 ^{*1}	135
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	174 ^{*2}	147 ^{*2}	18
Chủng B/MA (chủng thuộc typ B)	174 ^{*2}	174 ^{*2}	14

*¹: P<0,05, *²: P<0,01

9. Phân tích kiểu phụ kháng thể

Hiệu giá của kháng thể IgG1 và IgG2a đặc hiệu kháng nguyên virus có trong huyết thanh chuột nhắt được xác định theo chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1) và chủng B/MA (chủng thuộc typ B) thu được ở mục "6. Tính sinh miễn dịch - 1 (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)" được mô tả trên đây bằng phương pháp hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) dưới dạng phân tích kiểu phụ kháng thể. Kết quả cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng FA kích thích IgG2a đặc hiệu kháng nguyên hơn là IgG1 đặc hiệu kháng nguyên (bảng 11 và 12). Kết quả này tương tự với kết quả của hạt virus cúm bất hoạt, và xu hướng kích thích IgG2a mạnh hơn cũng được thấy khi so sánh với kháng nguyên virus tách chiết. Từ kết quả này, hạt virus cúm cố định bằng FA có thể được trông đợi là cải thiện hơn nữa hiệu lực của vacxin so với kháng nguyên virus tách chiết mà hoạt hóa miễn dịch dịch thể nhưng khó có thể hoạt hóa miễn dịch qua trung gian tế bào.

Bảng 11

Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1): Kết quả phân tích kiểu phụ (EU/mL)

Kiểu phụ IgG	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
-IgG1	200	280	7108
-IgG2a	13997	18248	9351

Giá trị khi huyết thanh của từng chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên virus

tách chiết được pha loãng 25600 lần được đặt là 1 EU/mL.

Bảng 12

Chủng B/MA (chủng Yamagata lineage): Kết quả phân tích kiểu phụ (EU/mL)

Kiểu phụ IgG	Hạt virus cúm cố định bằng FA	Hạt virus cúm bất hoạt	Kháng nguyên cúm tách chiết
-IgG1	200	498	2694
-IgG2a	15853	8867	3622

Giá trị khi huyết thanh của từng chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên virus tách chiết được pha loãng 25600 lần được đặt là 1 EU/mL.

10. Đánh giá lượng ARN được giải phóng

Lượng ARN được giải phóng theo thời gian trong quá trình xử lý bằng proteaza được đánh giá đối với hạt virus cúm cố định bằng FA (chủng A/NY) được tạo ra bằng phương pháp theo ví dụ 1, theo quy trình sau: đầu tiên, hạt virus cúm cố định bằng FA được pha loãng bằng PBS, và SDS và proteinaza K được bổ sung vào, và cho phản ứng ở 55°C trong khi ARN được chiết theo thời gian. Chất phản ứng TRIzol LS, PureLink RNA Mini Kit, và PureLink DNaza (do hãng Invitrogen Corp. sản xuất, tên thương mại) được dùng để chiết ARN. Hàm lượng ARN chiết được được xác định bằng chất phản ứng và kit Quant-iT RiboGreen RNA (do hãng Invitrogen Corp. sản xuất, tên thương mại). Hàm lượng ARN theo thời gian ở từng nồng độ FA được thể hiện trong bảng 13. Kết quả thể hiện rằng sự giải phóng ARN bị chậm đi theo cách phụ thuộc nồng độ FA. Điều này cho thấy rằng sự giải phóng ARN bị chậm đi cho cố định bằng FA làm chậm việc sản sinh xytokin gây viêm, tạo ra độ an toàn cao.

Bảng 13

Thay đổi theo thời gian của hàm lượng ARN được giải phóng sau khi xử lý bằng proteaza

Xử lý bằng proteaza (giờ)	Hàm lượng ARN (ng/mL)				
	0,02% FA	0,05% FA	0,08% FA	0,11% FA	0,14% FA
0,1	8	4	3	2	3
1,0	4424	2989	2205	1622	1284
6,0	5655	5462	5477	4795	4519
12,0	5513	6128	6447	5947	6385
18,0	6401	6525	6682	6794	6362
24,0	6187	6615	6902	6429	6555

Ví dụ 3

(1) Tạo ra hạt virus cúm cố định bằng GA

1. Xử lý bằng glutaraldehyt (GA)

Virus cúm A (chủng thuộc phân typ H3N2 (chủng A/NY)) và virus cúm B (chủng Victoria lineage thuộc typ B (chủng B/BR)) được nuôi cấy và tinh chế bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 1. Các hạt của từng virus cúm đã tinh chế được pha loãng sao cho nồng độ protein cuối của hạt virus cúm đã tinh chế là 1000 $\mu\text{g/mL}$, để thu được huyền phù. Tiếp theo, dung dịch GA 1% trọng lượng/thể tích được sử dụng và pha loãng sao cho nồng độ GA đạt 0,016% trọng lượng/thể tích hoặc 0,008% trọng lượng/thể tích. Huyền phù và dung dịch GA pha loãng (0,016% trọng lượng/thể tích hoặc 0,008% trọng lượng/thể tích) được trộn với lượng bằng nhau và cho phản ứng ở 4°C trong 3 ngày. Sau khi hoàn thành phản ứng, GA được bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng PBS, để nhờ đó thu được hạt virus cúm cố định (sau đây còn gọi là "hạt virus cúm cố định bằng GA"). Hoạt tính gây sốt của hạt virus cúm cố định bằng GA thu được (chủng A/NY và chủng B/BR) được đánh giá bằng thử nghiệm chất gây sốt gồm đánh giá đáp ứng sốt tổng cộng trên ba thỏ, và xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người.

2. Thử nghiệm chất gây sốt

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành theo cùng phương pháp như trong ví dụ 1. Dung dịch trong đó hàm lượng protein trong 1 mL được điều chỉnh đến 240 μg bằng cách pha loãng hạt virus cúm bất hoạt hoặc hạt virus cúm cố định bằng GA (chủng A/NY và chủng B/BR) bằng nước muối được sử dụng làm mẫu. 1 mL mẫu trên một kg thể trọng được tiêm vào thỏ, và sự gia tăng nhiệt độ trực tràng được quan sát đến 6 giờ sau đó. Đáp ứng sốt tổng cộng (°C) của ba thỏ đối với chủng A/NY strain được thể hiện trong bảng 14, và đáp ứng sốt tổng cộng (°C) của ba thỏ đối với chủng B/BR được thể hiện trong bảng 15.

Đối với tất cả các hạt virus cúm cố định bằng GA, không quan sát thấy đáp ứng sốt tổng cộng ở mức 1,3°C hoặc cao hơn, và quan sát thấy mức giảm 2,5°C hoặc lớn hơn hoặc 3°C hoặc lớn hơn về đáp ứng sốt tổng cộng tính theo hạt virus cúm bất hoạt.

Đã phát hiện rằng đối với hạt virus cúm được cố định bằng GA đáp ứng sốt tổng cộng là đủ thấp. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng GA có độ an toàn cao so với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 14

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Đáp ứng sốt tổng cộng (°C)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	0,05
	0,008	0,21
Hạt virus cúm bất hoạt	-	2,78
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	0,05

Bảng 15

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Đáp ứng sốt tổng cộng (°C)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	0,00
	0,008	0,20
Hạt virus cúm bất hoạt	-	3,68
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	0,13

3. Xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin (IL-1 β) được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người bằng hạt virus cúm cố định bằng GA hoặc hạt virus cúm bất hoạt được xác định bằng phương pháp theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách gộp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả về lượng xytokin được tạo ra chống lại hạt virus cúm cố định bằng GA (chủng A/NY và chủng B/BR) được thể hiện trên bảng 16 và 17. Đã phát hiện rằng lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus cúm cố định bằng GA là đủ thấp so với hạt virus cúm bất hoạt. Điều này cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng GA có độ an toàn cao như đối với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 16

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	-IL-1 β (pg/mL)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	24,4
	0,008	20,3
Hạt virus cúm bất hoạt	-	41,3

Bảng 17

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	-IL-1 β (pg/mL)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	20,9
	0,008	16,4
Hạt virus cúm bất hoạt	-	27,7

Ví dụ 4

Đánh giá về mặt vật lý

Các đặc tính vật lý của hạt virus cúm cố định bằng GA thu được trong ví dụ 3 được mô tả trên đây được đánh giá bằng các phương pháp sau.

1. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus cúm cố định bằng GA (chủng A/NY) chi tiết hơn, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử theo cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Ảnh chụp đại diện của hạt virus cúm cố định bằng GA (chủng A/NY) được cho phản ứng ở 4°C trong 3 ngày với nồng độ GA 0,008% trọng lượng/thể tích được thể hiện trên Fig. 2. Hạt virus cúm cố định bằng GA duy trì được cấu trúc hạt, và không quan sát thấy thể kết tụ trong đó các hạt liên kết với nhau.

2. Tán xạ ánh sáng động

Cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng GA được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trong bảng 18. Hạt virus cúm cố định bằng GA có cỡ hạt trung bình khoảng từ 130 đến 160 nm mà là đơn. Từ điều này, đã phát hiện rằng cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng

GA là tương đương với hạt virus cúm gốc. Tức là đã phát hiện rằng cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng GA là đơn nhất và không thay đổi. Cấu trúc hạt của hạt virus cúm cố định bằng GA được duy trì, và không quan sát thấy các tạp chất như các thể kết tụ.

Bảng 18

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động (cỡ hạt trung bình khối có trọng số (đỉnh chính) (nm))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Hạt virus cúm cố định bằng GA
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	0,004	161,8
	0,008	158,2
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	0,004	136,0
	0,008	136,1

3. Xác định phân bố phân tử lượng (SEC)

Phân bố phân tử lượng của hạt virus cúm cố định bằng GA được xác định bằng cùng phương pháp (SEC) như trong ví dụ 2. Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 19. Đối với kháng nguyên cúm tách chiết, quan sát thấy bốn đỉnh ở thời gian rửa giải khoảng từ 16 đến 30 phút. Mặt khác, đối với hạt virus cúm cố định bằng GA, quan sát thấy đỉnh đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 16 đến 17 phút.

Bảng 19

Mẫu rửa giải SEC (thời gian rửa giải (phút))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Loại kháng nguyên	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Thời gian rửa giải SEC (phút)
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	16-17 Đỉnh đơn
		0,008	16-17 Đỉnh đơn
	Kháng nguyên cúm tách chiết	-	16, 19, 26, 29 Bốn đỉnh
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	16-17 Đỉnh đơn
		0,008	16-17 Đỉnh đơn
	Kháng nguyên cúm tách chiết	-	16, 18, 25, 29 Bốn đỉnh

4. Phân tích bằng mức độ liên kết ngang

Mức độ liên kết ngang của hạt virus cúm cố định bằng GA bằng chất cố định được phân tích bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Kết quả về chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 20. Tỷ lệ gốc protein M1 của hạt virus cúm cố định bằng GA mà đã thực hiện việc cố định bằng các nồng độ glutaraldehyt 0,004% trọng lượng/thể tích và 0,008% trọng lượng/thể tích lần lượt là 23,8% và 10,8%, điều này cho thấy rằng nồng độ glutaraldehyt tăng, liên kết ngang được đẩy nhanh sao cho tỷ lệ gốc protein M1 giảm.

Bảng 20

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Tỷ lệ gốc protein M1

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Tỷ lệ gốc protein M1 (%)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	23,3
	0,008	10,8

5. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

Tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng GA (chủng B/BR) được đánh giá bằng quy trình sau: đầu tiên, kháng nguyên virus tách chiết hoặc hạt virus cúm cố định bằng GA được tiêm trong cơ với liều tiêm 0,8 µg tính theo lượng protein cho chuột nhắt ddY (cái, 8 tuần tuổi) (16 con mỗi nhóm). Ba tuần sau khi gây miễn dịch, các chuột được thu thập máu toàn phần và giết êm ái. Huyết thanh thu được bằng cách ly tâm, và hiệu giá trung hòa được xác định. Kết quả đại diện về tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hòa (GMT)) của chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 21. Trong trường hợp chủng thuộc typ B, hạt virus cúm cố định bằng GA có tính sinh miễn dịch cao so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 21

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Hiệu giá trung hòa (GMT) (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Hiệu giá trung hòa (GMT)
Hạt virus cúm cố định bằng GA	0,004	38
	0,008	35
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	27

6. Phân tích kiểu phụ kháng thể

Hiệu giá của IgG1 và IgG2a đặc hiệu kháng nguyên virus cúm có trong huyết thanh chuột nhất thu được ở mục "5. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhất)" được mô tả trên đây được xác định bằng phương pháp ELISA dưới dạng phân tích kiểu phụ kháng thể. Kết quả cho thấy, trái với kháng nguyên cúm tách chiết, hạt virus cúm cố định bằng GA kích thích IgG2a đặc hiệu kháng nguyên hơn là IgG1 đặc hiệu kháng nguyên (bảng 22). Kết quả này tương tự với kết quả của hạt virus cúm bất hoạt. Từ kết quả này, hạt virus cúm cố định bằng GA có thể được trông đợi là cải thiện hơn nữa hiệu lực của vaccin so với kháng nguyên virus tách chiết mà hoạt hóa miễn dịch dịch thể nhưng khó có thể hoạt hóa miễn dịch qua trung gian tế bào.

Bảng 22

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Kết quả phân tích kiểu phụ (EU/mL)

Kiểu phụ IgG	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt	Hạt virus cúm cố định bằng GA	
			0,004 (% trọng lượng/thể tích)	0,008% (% trọng lượng/thể tích)
-IgG1	3788	382	243	200
-IgG2a	749	20306	10901	10669

Giá trị khi huyết thanh của từng chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên virus tách chiết (IgG1) hoặc hạt tương tự virus (IgG2a) được pha loãng 25600 lần được đặt là 1 EU/mL.

Ví dụ 5

(1) Tạo ra hạt virus cúm cố định bằng EDC

1. Xử lý bằng 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydroclorua (EDC)

Virus cúm A (chủng thuộc phân typ H3N2 (chủng A/NY)) và virus cúm B (chủng Victoria lineage (chủng B/BR)) được nuôi cấy và tinh chế bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 1. Phân đoạn thu được được pha loãng sao cho nồng độ protein cuối của các hạt của từng virus cúm đã tinh chế đạt 2500 µg/mL đối với chủng A/NY và 500 µg/mL đối với chủng B/BR, để thu được huyền phù. Tiếp theo, dung dịch EDC được pha loãng hàng loạt đến nồng độ từ 0,1 đến 4 M bằng PBS, bổ sung bào

huyền phù sao cho nồng độ cuối đạt từ 50 đến 500 mM, và được cho phản ứng trong từ 2 đến 20 giờ trong khi làm mát bằng nước đá (0°C). Sau khi hoàn thành phản ứng, EDC được loại bỏ bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng PBS, để nhờ đó thu được hạt virus cúm cố định (sau đây còn gọi là "hạt virus cúm cố định bằng EDC"). Hoạt tính gây sốt của hạt virus cúm cố định bằng EDC thu được (chủng A/NY và chủng B/BR) được đánh giá bằng thử nghiệm chất gây sốt gồm đánh giá đáp ứng sốt tổng cộng trên ba thỏ, và xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người.

2. Thử nghiệm chất gây sốt

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành theo cùng phương pháp như trong ví dụ 1. Dung dịch trong đó hàm lượng protein trong 1 mL được điều chỉnh đến 240 µg bằng cách pha loãng hạt virus cúm cố định bằng EDC bằng nước muối được sử dụng làm mẫu. Hạt virus cúm cố định bằng EDC được sử dụng làm mẫu trong đó sau 2 giờ phản ứng có làm mát bằng nước đá với nồng độ EDC 50 mM hoặc 500 mM, dung dịch phản ứng được xử lý thẩm tách bằng PBS (nồng độ EDC 5 mM cũng được tiến hành đối với chủng A/NY). Tương tự, mẫu trong đó sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 5 mM, dung dịch phản ứng được xử lý thẩm tách bằng PBS cũng được sử dụng đối với chủng A/NY. 1 mL mẫu trên một kg thể trọng được tiêm vào thỏ, và sự gia tăng nhiệt độ trực tràng được quan sát đến 6 giờ sau đó. Đáp ứng sốt tổng cộng (°C) của ba thỏ được thể hiện trong bảng 23 và 24.

Đối với hạt virus cúm cố định bằng EDC, không quan sát thấy đáp ứng sốt tổng cộng ở mức 1,3°C hoặc cao hơn trong tất cả các điều kiện xử lý EDC. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng EDC có độ an toàn cao như đối với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 23

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý bằng EDC (giờ)	Đáp ứng sốt tổng cộng (°C)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	5	2	0,66
	5	20	0,86
	50	2	0,12
	500	2	0,53
Hạt virus cúm bất hoạt	-	-	2,78
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	-	0,05

Bảng 24

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý bằng EDC (giờ)	Đáp ứng sốt tổng cộng (°C)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	50	2	0,24
	500	2	0,50
Hạt virus cúm bất hoạt	-	-	3,68
Kháng nguyên cúm tách chiết	-	-	0,13

3. Xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin (IL-1 β và IL-6) được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người bằng hạt virus cúm cố định bằng EDC hoặc hạt virus cúm bất hoạt được xác định bằng phương pháp theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách gộp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả về lượng xytokin được tạo ra chống lại hạt virus cúm cố định bằng EDC và hạt virus cúm bất hoạt thuộc chủng A/NY và chủng B/BR được thể hiện trên bảng 25 và 26. Đã phát hiện rằng lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus cúm cố định bằng EDC là đủ thấp so với hạt virus cúm bất hoạt. Điều này cho thấy rằng hạt virus cúm cố định bằng EDC dễ dàng ngăn chặn các phản ứng bất lợi so với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 25

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ EDC (mM)	-IL-1 β (pg/mL)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	50	5,8	37,9
	500	12,7	65,2
Hạt virus cúm bất hoạt	-	41,3	129,7

Bảng 26

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ EDC (mM)	-IL-1 β (pg/mL)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	50	Nhỏ hơn 3,9	16,4
	500	13,5	125,7
Hạt virus cúm bất hoạt	-	27,7	197,1

Ví dụ 6

Đánh giá về mặt vật lý

Các đặc tính vật lý của hạt virus cúm cố định bằng EDC thu được trong ví dụ 5 được mô tả trên đây được đánh giá bằng các phương pháp sau.

1. Phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza

Hạt virus cúm cố định bằng EDC được phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Kết quả đại diện về hạt virus cúm cố định bằng EDC (chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)) sau khi phản ứng trong 2 giờ có làm mát bằng nước đá với EDC nồng độ 50 mM được thể hiện trong bảng 27. Kháng nguyên virus tách chiết thể hiện rằng các protein được phân bố rộng trên các nồng độ sacaroza từ 25 đến 50%, và các hạt virus bị phá hủy. Trái với điều này, hạt virus cúm cố định bằng EDC cho thấy là được phân đoạn dưới dạng đỉnh đơn (hạt) ở nồng độ sacaroza cao (47,2%). Hiệu giá HA là 10240 lần.

Bảng 27

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Phân tích bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza và hiệu giá HA

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết
Nồng độ sacaroza (%)	47,2 Đỉnh đơn	25-50 Phân bố rộng
Hàm lượng protein ($\mu\text{g/mL}$)	494,0	-
Hiệu giá HA (x)	10240	-

2. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus cúm cố định bằng EDC chi tiết, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử theo cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Ảnh đại diện chụp hạt virus cúm cố định bằng EDC sau khi phản ứng trong 2 giờ trong bể nước đá với nồng độ EDC nồng độ 500 mM được thể hiện trên Fig. 3. Hạt virus cúm cố định bằng EDC duy trì được cấu trúc hạt, và không quan sát thấy thể kết tụ trong đó các kháng nguyên liên kết với nhau.

3. Tán xạ ánh sáng động

Cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng EDC được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trong bảng 28. Hạt virus cúm cố định bằng EDC (chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) và chủng B/BR (chủng thuộc typ B)) có cỡ hạt trung bình khoảng từ 130 đến 160 nm mà là đơn. Từ điều này, đã khẳng định rằng cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định bằng EDC là tương đương với hạt virus cúm gốc. Tức là đã phát hiện rằng cỡ hạt trung bình của hạt virus cúm cố định là đơn nhất và không thay đổi ngay cả khi xử lý bằng EDC. Cấu trúc hạt của hạt virus cúm cố định bằng EDC được duy trì, và không quan sát thấy các tập chất như các thể kết tụ.

Bảng 28

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động (cỡ hạt trung bình khối có trọng số (đỉnh chính) (nm))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Nồng độ EDC (mM)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Hạt virus cúm bất hoạt
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	50	159,0	159,2
	500	167,1	
chủng B/BR (chủng thuộc typ B)	50	136,3	137,8
	500	136,4	

4. Xác định phân bố phân tử lượng (SEC)

Phân bố phân tử lượng của hạt virus cúm cố định bằng EDC có nguồn gốc từ chủng thuộc phân typ H3N2 (chủng A/NY) được xác định. Phép đo được thực hiện bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (tên thương mại: TSKgel G6000PWXL (do hãng Tosoh Corp. sản xuất)) (được thực hiện ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút với PBS làm chất rửa giải). Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 29. Đối với kháng nguyên cúm tách chiết, quan sát thấy bốn đỉnh ở thời gian rửa giải khoảng từ 16 đến 30 phút. Mặt khác, đối với hạt virus cúm cố định bằng EDC, quan sát thấy đỉnh đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 16 đến 17 phút

Bảng 29

Mẫu rửa giải SEC (thời gian rửa giải (phút))

Tên chủng của các hạt virus gốc	Loại kháng nguyên	Nồng độ EDC (mM)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	5	16-17 Đỉnh đơn
		50	16-17 Đỉnh đơn
	Kháng nguyên cúm tách chiết	-	16, 19, 26, 29 Bốn đỉnh

5. Phân tích bằng mức độ liên kết ngang

Mức độ liên kết ngang của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 bằng chất cố định được phân tích bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Kết

quả về chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) được thể hiện trên bảng 30. Tỷ lệ gốc protein M1 (%) của hạt virus cúm cố định bằng EDC mà đã thực hiện việc cố định bằng các nồng độ EDC 50mM và 500mM lượt là 85,7% và 53,4%, điều này cho thấy rằng nồng độ EDC tăng, liên kết ngang được đẩy nhanh sao cho tỷ lệ gốc protein M1 giảm. Kết quả về chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 31. Tỷ lệ gốc protein M1 (%) của hạt virus cúm cố định bằng EDC mà đã thực hiện việc cố định bằng các nồng độ EDC 5mM, 50mM và 500mM lượt là 85,1%, 56,1%, và 27,2%. Đã phát hiện rằng khi nồng độ EDC tăng, liên kết ngang được đẩy nhanh sao cho tỷ lệ các gốc protein M1, như đối với chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2).

Bảng 30

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Tỷ lệ gốc protein M1

	Nồng độ EDC (mM)	Tỷ lệ gốc protein M1 (%)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	50	85,7
	500	53,4

Bảng 31

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Tỷ lệ gốc protein M1

	Nồng độ EDC (mM)	Tỷ lệ gốc protein M1 (%)
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	5	85,1
	50	56,1
	500	27,2

6. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

Tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng EDC được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt. Huyết thanh thu được bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 4, và hiệu giá HI và hiệu giá trung hoà được xác định. Kết quả đại diện về tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng EDC sau 2 giờ phản ứng trong bể nước đá với nồng độ EDC 50 mM và 500 mM được thể hiện trong bảng 32 (hiệu giá HI (GMT) đối với chủng A/NY), bảng 33 (hiệu giá trung hoà (GMT) đối với chủng A/NY) và bảng 34 (hiệu giá trung hòa (GMT) đối với chủng B/BR). Trong trường hợp chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) và chủng B/BR (chủng Victoria

lineage thuộc typ B), hạt virus cúm cố định bằng EDC có tính sinh miễn dịch cao đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 32

Hiệu giá HI (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Nồng độ EDC (mM)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	50	24 ^{*1}	11
	500	44 ^{*2}	

*1: P<0,05, *2: P<0,01

Bảng 33

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Nồng độ EDC (mM)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	50	1506 ^{*1}	682
	500	2201 ^{*2}	

*1: P<0,01, *2: P<0,001

Bảng 34

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Nồng độ EDC (mM)	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	50	50	27
	500	87 ^{*1}	

*1: P<0,01

7. Phân tích kiểu phụ kháng thể

Hiệu giá của IgG1 và IgG2a đặc hiệu kháng nguyên virus có trong huyết thanh chuột nhắt thu được ở mục "6. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)" được mô tả trên đây được xác định bằng phương pháp ELISA dưới dạng phân tích kiểu phụ kháng thể. Kết quả cho thấy, trái với kháng nguyên cúm tách chiết, hạt virus cúm cố định bằng EDC kích thích IgG2a đặc hiệu kháng nguyên hơn là IgG1 đặc hiệu kháng nguyên (bảng 35 và 36). Từ kết quả này, hạt virus cúm cố định bằng EDC có thể được trông đợi là cải thiện hơn nữa hiệu lực của vacxin so với kháng nguyên virus tách chiết mà hoạt hóa miễn dịch dịch thể nhưng khó có thể hoạt hóa miễn dịch qua

trung gian tế bào.

Bảng 35

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Kết quả phân tích kiểu phụ (EU/mL)

Kiểu phụ IgG	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	
			500 mM	50 mM
-IgG1	4194	607	311	258
-IgG2a	1518	25398	27194	34031

Giá trị khi huyết thanh của từng chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên virus tách chiết (IgG1) hoặc hạt tương tự virus (IgG2a) được pha loãng 25600 lần được đặt là 1 EU/mL.

Bảng 36

Chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B): Kết quả phân tích kiểu phụ (EU/mL)

Kiểu phụ IgG	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	
			500 mM	50 mM
-IgG1	3788	382	1069	1001
-IgG2a	749	20306	25638	13471

Giá trị khi huyết thanh của từng chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên virus tách chiết (IgG1) hoặc hạt tương tự virus (IgG2a) được pha loãng 25600 lần được đặt là 1 EU/mL.

8. Tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

Tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng EDC được đánh giá bằng cách sử dụng khỉ cynomolgus bằng quy trình sai: đầu tiên, kháng nguyên virus tách chiết hoặc hạt virus cúm cố định bằng EDC được tiêm dưới da với liều tiêm 15 µg tính theo hàm lượng HA cho khỉ cynomolgus (đực hoặc cái, từ 29 đến 35 tháng tuổi) (8 con mỗi nhóm). Việc tiêm dưới da được thực hiện hai lần cách nhau 3 tuần, và máu được thu thập ở 4 tuần sau khi gây miễn dịch thứ cấp. Huyết thanh thu được bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2, và hiệu giá HI và hiệu giá trung hoà được xác định. Kết quả đại diện về hiệu giá HI (GMT) dưới dạng tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 5 mM được thể hiện trong bảng 37, và kết quả về hiệu giá trung hoà (GMT) được thể hiện trong bảng 38. Đối với chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY

(chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B), hạt virus cúm cố định bằng EDC có tính sinh miễn dịch cao đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 37

Hiệu giá HI (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	174 ^{*2}	15	247 ^{*2}
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	48 ^{*2}	9	62 ^{*2}
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	20 ^{*1}	5	37 ^{*2}
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	14 ^{*1}	5	24 ^{*2}

*1: $P < 0,05$, *2: $P < 0,001$ (thử nghiệm về sự khác biệt đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết)

Bảng 38

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	640 ^{*2}	34	640 ^{*2}
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	494 ^{*1}	52	538 ^{*2}
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	67 ^{*1}	9	160 ^{*2}
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	73 ^{*1}	10	174 ^{*2}

*1: $P < 0,05$, *2: $P < 0,001$ (thử nghiệm về sự khác biệt đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết)

9. Độ ổn định trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi (phân tích bằng mức độ liên kết ngang)

Độ ổn định của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được

đánh giá bằng cách sử dụng sự thay đổi về mức độ liên kết ngang giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi làm chỉ số. Đầu tiên, tỷ lệ gốc protein M1 (%) được tính toán bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2, và tỷ lệ gốc protein M1 sau thử nghiệm điều kiện bất lợi ở 37°C trong 1 tuần trong trường hợp đặt tỷ lệ gốc protein M1 trước thử nghiệm điều kiện bất lợi là 100% được tính toán tiếp. Kết quả về chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) được thể hiện trên bảng 39. Tỷ lệ gốc protein M1 sau thử nghiệm điều kiện bất lợi của hạt virus cúm bất hoạt tăng 24% so với trước thử nghiệm điều kiện bất lợi. Mặt khác, tỷ lệ gốc protein M1 sau thử nghiệm điều kiện bất lợi của hạt virus cúm cố định bằng EDC mà việc cố định được thực hiện với các nồng độ EDC 50 và 500 mM giảm 18%, so với trước thử nghiệm điều kiện bất lợi, và tỷ lệ phần trăm thay đổi là nhỏ hơn so với tỷ lệ phần trăm thay đổi của hạt virus cúm bất hoạt, điều này cho thấy sự ổn định cao hơn.

Bảng 39

Chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2): Tỷ lệ phần trăm thay đổi về tỷ lệ gốc protein M1 giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi

	Nồng độ EDC (mM)	Tỷ lệ phần trăm thay đổi (%) về tỷ lệ gốc protein M1 giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi
Hạt virus cúm cố định bằng EDC	50	Giảm 18%
	500	Giảm 18%
Hạt virus cúm bất hoạt	-	Tăng 24%

10. Độ ổn định trong thử nghiệm điều kiện bất lợi (phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch khuếch tán theo hướng bán kính đơn)

Độ ổn định của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá bằng cách sử dụng sự thay đổi về hàm lượng HA giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi làm chỉ số. Đầu tiên, hàm lượng HA được tính toán bằng thử nghiệm miễn dịch khuếch tán theo hướng bán kính đơn (Japanese Minimum Requirements for Biological Products (Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 192)), và tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA sau thử nghiệm điều kiện bất lợi ở 37°C trong 1 tuần trong trường hợp đặt hàm lượng HA

trước thử nghiệm điều kiện bất lợi là 100% được tính toán tiếp. Kết quả về chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA strain (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 40. Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA sau thử nghiệm điều kiện bất lợi của hạt virus cúm cố định bằng EDC là nhỏ, điều này cho thấy chúng ổn định.

Bảng 40

Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA của hạt virus cúm cố định bằng EDC giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi

	Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA giữa trước và sau thử nghiệm điều kiện bất lợi
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	Giảm 8%
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	Giảm 8%
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	Giảm 7%
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	Giảm 10%

11. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng (phân tích bằng mức độ liên kết ngang)

Độ ổn định của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá bằng cách sử dụng chênh lệch về mức độ liên kết ngang giữa trước và sau khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng làm chỉ số. Đầu tiên, tỷ lệ gốc protein M1 (%) được tính toán bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2, và tỷ lệ gốc protein M1 trong điều kiện bảo quản ở 5°C trong 11 tháng trong trường hợp đặt tỷ lệ gốc protein M1 trước khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng là 100% được tính toán tiếp. Kết quả về chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA strain (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 41. Tỷ lệ phần trăm

thay đổi về tỷ lệ gốc protein M1 trong điều kiện bảo quản ở 5°C trong 11 tháng của hạt virus cúm cố định bằng EDC là nhỏ, điều này cho thấy chúng ổn định.

Bảng 41

Tỷ lệ phần trăm thay đổi về tỷ lệ gốc protein M1 của hạt virus cúm cố định bằng EDC sau khi bảo quản 5°C trong 11 tháng

	Tỷ lệ phần trăm thay đổi về tỷ lệ gốc protein M1 sau khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	Giảm 5%
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	Giảm 9%
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	Giảm 12%
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	Giảm 13%

12. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng (phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch khuếch tán theo hướng bán kính đơn)

Độ ổn định của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá bằng cách sử dụng chênh lệch về hàm lượng HA giữa trước và sau khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng làm chỉ số. Đầu tiên, hàm lượng HA được tính toán bằng thử nghiệm miễn dịch khuếch tán theo hướng bán kính đơn (Japanese Minimum Requirements for Biological Products (Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 192)), và tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA sau thử nghiệm điều kiện bất lợi ở 5°C trong 11 tháng trong trường hợp đặt hàm lượng HA trước khi bảo quản ở 5°C trong 11 tháng là 100% được tính toán tiếp. Kết quả về chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA strain (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 42. Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA trong điều kiện bảo quản ở 5°C trong 11 tháng của hạt virus cúm cố định bằng EDC là nhỏ, điều này cho thấy chúng ổn định.

Bảng 42

Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA của hạt virus cúm cố định bằng EDC

	Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng HA
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	Giảm 1%
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	Tăng 9%
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	Giảm 6%
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	Tăng 6%

13. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng (tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt (tiêm trong cơ))

Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá bằng tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt (tiêm trong cơ). Huyết thanh thu được bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 4, và hiệu giá HI và hiệu giá trung hoà được xác định. Kết quả đại diện về hiệu giá HI (GMT) dưới dạng tính sinh miễn dịch của hạt virus cúm cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 5 mM được thể hiện trong bảng 43, và kết quả về hiệu giá trung hoà (GMT) được thể hiện trong bảng 44. Đối với chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B), hạt virus cúm cố định bằng EDC có tính sinh miễn dịch cao so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 43

Hiệu giá HI (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	53	28	61
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	15	13	14
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	30	20	32
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	20	14	26

Bảng 44

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm trong cơ cho chuột nhắt)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	640	279	640
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	1114	394	485
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	368	149	279
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	75	40	86

14. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng (kiểu phụ kháng thể)

Hiệu giá của IgG1 và IgG2a đặc hiệu kháng nguyên virus có trong huyết thanh chuột nhắt thu được ở mục "13. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng (tính sinh miễn dịch ở chuột nhắt (tiêm trong cơ))" được mô tả trên đây được xác định bằng phương pháp ELISA dưới dạng phân tích kiểu phụ kháng thể. Kết quả cho thấy, trái với kháng nguyên cúm tách chiết, hạt virus cúm cố định bằng EDC kích thích IgG2a

đặc hiệu kháng nguyên hơn là IgG1 đặc hiệu kháng nguyên (bảng 45) ngay cả sau khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng (bảng 45). Từ kết quả này, có thể trông đợi rằng miễn dịch qua trung gian tế bào được hoạt hóa bằng hạt virus cúm cố định bằng EDC được duy trì ngay cả sau khi bảo quản ở 5°C trong 9 tháng.

Bảng 45

Kết quả phân tích kiểu phụ kháng thể IgG (EU/mL)

Chủng vaccin	Kiểu phụ IgG	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
A/CA	-IgG1	572	6562	328
	-IgG2a	36333	11638	38237
A/NY	-IgG1	542	9393	666
	-IgG2a	18765	6726	15732
B/MA	-IgG1	881	4288	539
	-IgG2a	43141	7214	43339
B/BR	-IgG1	549	5403	532
	-IgG2a	13985	2657	21647

15. Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 10 tháng (tính sinh miễn dịch ở khi cynomolgus (tiêm dưới da))

Độ ổn định khi bảo quản ở 5°C trong 10 tháng hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá bằng cách sử dụng khi cynomolgus tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da). Đầu tiên, kháng nguyên virus tách chiết, hạt virus cúm cố định bằng EDC, hoặc hạt virus cúm bất hoạt được tiêm dưới da với liều tiêm 15 µg tính theo hàm lượng HA cho khi cynomolgus (đực hoặc cái, từ 29 đến 35 tháng tuổi) (8 con mỗi nhóm). Việc tiêm dưới da được thực hiện hai lần cách nhau 3 tuần, và máu được thu thập ở 4 tuần sau khi gây miễn dịch thứ cấp. Huyết thanh thu được bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 2, và hiệu giá HI và hiệu giá trung hoà được xác định. Kết quả đại diện về hiệu giá HI (GMT) khi bảo quản ở 5°C trong 10 tháng của hạt virus cúm cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 5 mM được thể hiện trong bảng 46, và kết quả về hiệu giá trung hoà (GMT) được thể hiện trong bảng 47 (bảng 46 và 47 lần lượt mô phỏng bảng 37 và 38). Đối với chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1), chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2), chủng B/MA (chủng Yamagata lineage thuộc typ B), và chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B), hạt virus cúm cố định bằng EDC có tính sinh miễn dịch cao

đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết.

Bảng 46

Hiệu giá HI (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	174 ^{*2}	15	247 ^{*2}
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	48 ^{*2}	9	62 ^{*2}
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	20 ^{*1}	5	37 ^{*2}
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	14 ^{*1}	5	24 ^{*2}

*1: $P < 0,05$, *2: $P < 0,001$ (thử nghiệm về sự khác biệt đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết)

Bảng 47

Hiệu giá trung hoà (GMT): Tính sinh miễn dịch (tiêm dưới da cho khỉ cynomolgus)

	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Kháng nguyên cúm tách chiết	Hạt virus cúm bất hoạt
Chủng A/CA (chủng thuộc phân typ H1N1)	640 ^{*2}	34	640 ^{*2}
chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2)	494 ^{*1}	52	538 ^{*2}
Chủng B/MA (Chủng Yamagata lineage thuộc typ B)	67 ^{*1}	9	160 ^{*2}
chủng B/BR (Chủng Victoria lineage thuộc typ B)	73 ^{*1}	10	174 ^{*2}

*1: $P < 0,05$, *2: $P < 0,001$ (thử nghiệm về sự khác biệt đáng kể so với kháng nguyên virus tách chiết)

16. Đánh giá lượng ARN được giải phóng

Lượng ARN được giải phóng theo thời gian trong quá trình xử lý hạt virus cúm

cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 bằng proteaza được đánh giá. Đầu tiên, hạt virus cúm bất hoạt và hạt virus cúm cố định bằng EDC được pha loãng bằng PBS, và SDS và proteinaza K được bổ sung vào, và cho phản ứng ở 55°C trong khi RNA được thiết theo thời gian. Chất phản ứng TRIzol LS, PureLink RNA Mini Kit, và PureLink DNaza (do hãng Invitrogen Corp. sản xuất, tên thương mại) được dùng để chiết ARN. Hàm lượng ARN chiết được được xác định bằng chất phản ứng và kit Quant-iT RiboGreen RNA (do hãng Invitrogen Corp. sản xuất, tên thương mại). Kết quả đại diện về chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) được thể hiện trong bảng 48. Kết quả thể hiện rằng sự giải phóng ARN của hạt virus cúm cố định bằng EDC là chậm so với hạt virus cúm bất hoạt.

Bảng 48

Thay đổi theo thời gian của hàm lượng ARN được giải phóng sau khi xử lý bằng proteaza

Xử lý bằng proteaza (giờ)	Hàm lượng ARN (ng/mL)	
	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Hạt virus cúm bất hoạt
0,1	828	4847
0,5	3151	5540
1,0	3640	6067
6,0	4681	6183
12,0	5654	5628
18,0	5250	5991

17. Đánh giá lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin gây viêm được tạo ra theo thời gian của hạt virus cúm cố định bằng EDC được tạo ra trong ví dụ 5 được đánh giá. Phương pháp này tuân theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách gộp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Thay đổi theo thời gian về lượng IL-1 β được tạo ra chống lại hạt virus cúm bất hoạt và hạt virus cúm cố định bằng EDC thuộc chủng A/NY (chủng thuộc phân typ H3N2) được thể hiện trong bảng 49, và thay đổi theo thời gian về lượng IL-6 được tạo ra được thể hiện trong bảng 50. Thay đổi theo thời gian về lượng IL-1 β được tạo ra chống lại hạt

virut cúm bất hoạt và hạt virut cúm cố định bằng EDC thuộc chủng B/BR (chủng Victoria lineage thuộc typ B) được thể hiện trong bảng 51, và thay đổi theo thời gian về lượng IL-6 được tạo ra được thể hiện trong bảng 52. Kết quả thể hiện rằng sự sản sinh xytokin gây viêm của hạt virut cúm cố định bằng EDC là chậm so với hạt virut cúm bất hoạt. Tức là, đã cho thấy rằng sự giải phóng ARN trong cơ thể bị chậm lại nhờ cố định bằng EDC để làm chậm sự sản sinh xytokin gây viêm, nhờ đó hạt virut cúm cố định bằng EDC có độ an toàn cao.

Bảng 49

Thay đổi theo thời gian về lượng IL-1 β được tạo ra, giải phóng sau khi kích thích PBMC (chủng A/NY)

Thời gian kích thích (giờ)	Lượng IL-1 β được tạo ra (pg/mL)	
	Hạt virut cúm cố định bằng EDC	Hạt virut cúm bất hoạt
2,0	0	0
4,0	0	0
6,0	0	0
12,0	4,5	0
18,0	9,1	0
24,0	11,2	0
36,0	22,9	4,1
48,0	28,4	4,3

Bảng 50

Thay đổi theo thời gian về lượng IL-6 được tạo ra, giải phóng sau khi kích thích PBMC (chủng A/NY)

Thời gian kích thích (giờ)	Lượng IL-6 được tạo ra (pg/mL)	
	Hạt virut cúm cố định bằng EDC	Hạt virut cúm bất hoạt
2,0	0	0
4,0	0	0
6,0	0	0
12,0	28,3	14,1
18,0	65,7	20,5
24,0	135,3	29,2
36,0	240,3	37,7
48,0	321,3	46,4

Bảng 51

Thay đổi theo thời gian về lượng IL-1 β được tạo ra, giải phóng sau khi kích thích PBMC (chủng B/BR)

Thời gian kích thích (giờ)	Lượng IL-1 β được tạo ra (pg/mL)	
	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Hạt virus cúm bất hoạt
2,0	7,7	7,9
4,0	8,9	17,9
6,0	10,7	28,5
8,0	16,4	119,3
12,0	19,6	100,6
18,0	18,8	140,9
24,0	20,9	194,5
36,0	27,6	175,8
48,0	18,5	172,9

Bảng 52

Thay đổi theo thời gian về lượng IL-6 được tạo ra, giải phóng sau khi kích thích PBMC (chủng B/BR)

Thời gian kích thích (giờ)	Lượng IL-6 được tạo ra (pg/mL)	
	Hạt virus cúm cố định bằng EDC	Hạt virus cúm bất hoạt
2,0	32,4	46,7
4,0	152,2	477,6
6,0	200,9	548,6
8,0	226,0	547,1
12,0	304,1	693,0
18,0	311,6	740,7
24,0	331,5	780,8
36,0	304,1	645,6
48,0	292,3	599,1

Ví dụ 7

Tạo ra hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA

1. Xử lý bằng glutaraldehyt (bước cố định cấu trúc hạt của hạt virus)

Glutaraldehyt được bổ sung vào vacxin khối viêm não Nhật Bản nuôi cấy tế bào Vero (do hãng General Incorporated Foundation sản xuất, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, tên thương mại "ENCEVAC", chứa từ 60 đến 90 μ g/ml tính theo nồng độ protein hạt virus viêm não Nhật Bản đã bất hoạt bằng formalin 0,08% thể tích/thể tích; sau đây còn gọi là "hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt") sao cho nồng độ cuối đạt từ 0,005 đến 0,02% trọng lượng/thể tích, và

cho phản ứng ở 4°C trong 3 ngày. Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch phản ứng thu được được thẩm tách bằng dung dịch giống như PBS (PBS có bổ sung lactoza (nồng độ cuối: 5% trọng lượng/thể tích) làm chất hoạt hóa). Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định (sau đây còn gọi là "hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA") thu được bằng cách loại bỏ glutaraldehyt bằng thẩm tách. Hoạt tính gây sốt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA thu được được đánh giá bằng thử nghiệm chất gây sốt gồm đánh giá đáp ứng sốt tổng cộng trên ba thỏ, và xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người.

2. Thử nghiệm chất gây sốt

Thử nghiệm chất gây sốt được tiến hành theo cùng phương pháp như trong ví dụ 1. Dung dịch trong đó hàm lượng protein trong 1 mL được điều chỉnh đến 70 µg bằng cách pha loãng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt bằng nước muối được sử dụng làm mẫu. 3 mL mẫu trên một kg thể trọng được tiêm vào thỏ, và sự gia tăng nhiệt độ trực tràng được quan sát đến 6 giờ sau đó. Đáp ứng sốt tổng cộng (°C) của ba thỏ được thể hiện trong bảng 53. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA đại diện sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày ở nồng độ glutaraldehyt 0,01 % trọng lượng/thể tích được đánh giá.

Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA, không quan sát thấy đáp ứng sốt tổng cộng ở mức 1,3°C hoặc cao hơn, và quan sát thấy sự giảm 1,6°C hoặc cao hơn về đáp ứng sốt tổng cộng so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA có độ an toàn cao.

Bảng 53

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA: Đáp ứng sốt tổng cộng của ba thỏ

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Đáp ứng sốt tổng cộng (°C)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,01	0,94
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	2,58

3. Xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin (IL-1 β và IL-6) được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người bằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được xác định bằng phương pháp tuân theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách góp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả được thể hiện trong bảng 54. Đã phát hiện rằng lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA là đủ thấp so với lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA có độ an toàn cao hơn so với độ an toàn của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 54

Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	-IL-1 β (pg/mL)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,005	4,7	10,5
	0,01	4,7	15,4
	0,02	0	14,8
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	41,2	29,8

Ví dụ 8

Đánh giá về mặt vật lý

Các đặc tính vật lý của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA thu được trong ví dụ 7 được mô tả trên đây được đánh giá bằng các phương pháp sau.

1. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA chi tiết, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử theo cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Ảnh chụp đại diện của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày với nồng độ glutaraldehyt 0,01% trọng lượng/thể tích được thể hiện trên Fig. 4. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA duy trì được cấu

trúc hạt bằng cách cố định trong glutaraldehyt, như đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

2. Tán xạ ánh sáng động

Cỡ hạt trung bình của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trong bảng 55. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA có cỡ hạt trung bình khoảng 90 nm mà là đơn. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt là khoảng 80 nm mà là đơn. Cấu trúc hạt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được duy trì, và không quan sát thấy các tạp chất như các thể kết tụ.

Bảng 55

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Cỡ hạt trung bình khối có trọng số (nm)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,005	92,9
	0,01	93,5
	0,02	95,1
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	81,5

3. Xác định phân bố phân tử lượng (SEC)

Phân bố phân tử lượng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được xác định. Phép đo được thực hiện bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (tên thương mại: Superose 6 10/300 GE (do hãng GE Healthcare Japan Corp. sản xuất)) (được thực hiện ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút bằng cách sử dụng PBS làm chất rửa giải). Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 56. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA, quan sát thấy đỉnh chính đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt, cũng quan sát thấy đỉnh chính đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút.

Bảng 56

Mẫu rửa giải SEC

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Thời gian rửa giải (phút)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,005	14-15 Đỉnh đơn
	0,01	14-15 Đỉnh đơn
	0,02	14-15 Đỉnh đơn
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	14-15 Đỉnh đơn

4. Hàm lượng kháng nguyên

Hàm lượng kháng nguyên (hàm lượng của kháng nguyên) được xác định bằng phương pháp ELISA kiểu bán kẹp bằng cách sử dụng kháng thể kháng virus viêm não Nhật Bản theo quy trình sau: Kháng nguyên E trong mẫu được bắt giữ vào vi đĩa liên kết kháng thể IgG thô kháng virus viêm não Nhật Bản (kháng thể sơ cấp; kháng thể đa dòng). Sau đó, kháng thể đơn dòng kháng protein E của virus viêm não Nhật Bản (kháng thể thứ cấp; kháng thể đơn dòng) liên kết với peroxid có nguồn gốc từ cây cải ngựa (HRP) được cho phản ứng sao cho phức đĩa-liên kết kháng thể kháng kháng nguyên E/kháng nguyên E/kháng thể thứ cấp được tạo ra. Các chất phản ứng còn lại không phải ứng và mẫu được loại bỏ bằng cách rửa, và HRP trên phức kháng nguyên E phản ứng bằng cách phản ứng với dung dịch cơ chất enzym (dung dịch o-phenylendiamin: dung dịch OPD) sao cho sự phát triển màu xảy ra. Hàm lượng kháng nguyên E (hàm lượng kháng nguyên) được xác định trên cơ sở là cường độ phát triển màu của OPD tương đương với lượng phức (mà phản ứng lượng kháng nguyên E).

Hàm lượng kháng nguyên tương ứng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được thể hiện trong bảng 57. Để làm đại diện, khi hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA đại diện sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày ở nồng độ glutaraldehyt 0,01 % trọng lượng/thể tích được đánh giá, kháng nguyên tương đương với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được đưa vào.

Bảng 57

Kết quả về hàm lượng kháng nguyên

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,01	74,5
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	74,0

5. Phân tích bằng hoạt tính riêng

Mức độ liên kết ngang bằng chất cố định được đánh giá bằng hoạt tính riêng (hàm lượng kháng nguyên/hàm lượng protein) đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được tạo ra trong ví dụ 7. Cụ thể, kháng thể đơn dòng (503) được sử dụng trong phép đo hàm lượng kháng nguyên nhận biết epitop trung hòa, và hoạt tính riêng giảm khi xảy ra sự thay đổi về cấu trúc của epitop trung hòa. Giá trị tương đối (%) của hoạt tính riêng (sau đây giá trị tương đối này còn gọi là "tỷ lệ đáp ứng kháng thể 503" (%)) của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được xử lý bằng từng nồng độ glutaraldehyt so với hoạt tính riêng của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt không cố định được tính toán. Kết quả được thể hiện trong bảng 58. Tỷ lệ đáp ứng kháng thể 503 của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA mà việc cố định được thực hiện ở các nồng độ glutaraldehyt 0,005% trọng lượng/thể tích, 0,01% trọng lượng/thể tích, và 0,02% trọng lượng/thể tích lần lượt là 95,1%, 74,7%, và 55,2%, điều này cho thấy rằng nồng độ glutaraldehyt tăng, liên kết ngang được đẩy nhanh sao cho tỷ lệ đáp ứng giảm do sự thay đổi cấu trúc của epitop kháng thể 503.

Bảng 58

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA: Tỷ lệ đáp ứng kháng thể 503

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Tỷ lệ đáp ứng kháng thể 503 (%)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,005	95,1
	0,01	74,7
	0,02	55,2

6. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong màng bụng cho chuột nhắt)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA đại diện sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày với nồng độ glutaraldehyt 0,005 hoặc 0,01 % trọng lượng/thể tích hoặc

của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được tiêm trong màng bụng với liều tiêm 1 μg hoặc 0,25 μg cho chuột nhắt ddY (cái, 4 tuần tuổi) (10 con mỗi nhóm). Một tuần sau khi gây miễn dịch, việc gây miễn dịch được thực hiện lại, và 1 tuần sau đó, chuột được thu máu toàn phần và giết êm ái. Huyết thanh thu được bằng cách ly tâm và gộp chung lại theo lượng bằng nhau giữa các nhóm, và hiệu giá trung hòa được xác định theo tài liệu "Pathogen Detection Manual" (của National Institute of Infectious Diseases, Japan). Kết quả được tính toán độ giảm 50% mảng bám được thể hiện trong bảng 59. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA có hiệu giá trung hoà tương đương hoặc cao hơn so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 59

Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hoà)

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	Liều tiêm (μg)	
		1	0,25
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,005	$10^{2,3}$	$10^{1,7}$
	0,01	$10^{3,2}$	$10^{1,8}$
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	$10^{2,3}$	$10^{1,6}$

7. Độ ổn định trong thử nghiệm đẩy nhanh (hàm lượng kháng nguyên)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được pha loãng bằng dung dịch tương tự PBS sao cho nồng độ protein cuối đạt 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Độ ổn định trong bảo quản ở 25°C được đánh giá bằng hàm lượng kháng nguyên làm chỉ số. Kết quả đại diện về hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày với nồng độ glutaraldehyt 0,01% trọng lượng/thể tích hoặc của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được thể hiện trong bảng 60. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA duy trì được hàm lượng kháng nguyên trong 1 tháng trong điều kiện bảo quản ở 25°C. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt thể hiện sự giảm hàm lượng kháng nguyên trong điều kiện bảo quản ở 25°C. Điều này thể hiện rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được cải thiện về độ ổn định so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 60

Kết quả về độ ổn định (hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$))

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	25°C	
		Ngày 0	1 tháng sau
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,01	6,9 (100)	6,5 (94,2)
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	8,9 (100)	6,7 (75,3)

Tỷ lệ thay đổi (%) về hàm lượng kháng nguyên khi hàm lượng kháng nguyên vào ngày 0 được đặt là 100% được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

8. Độ ổn định trong thử nghiệm đẩy nhanh (tán xạ ánh sáng động)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được pha loãng bằng dung dịch tương tự PBS sao cho nồng độ protein cuối đạt 8 $\mu\text{g/mL}$. Độ ổn định khi bảo quản ở 25°C được đánh giá bằng cỡ hạt trung bình trong chất lỏng bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS, làm chỉ số. Kết quả đại diện về hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA sau khi phản ứng ở 4°C trong 3 ngày với nồng độ glutaraldehyt 0,01% trọng lượng/thể tích hoặc của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được thể hiện trong bảng 61. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA duy trì được cỡ hạt trung bình trong 1 tháng trong điều kiện bảo quản ở 25°C. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt thể hiện sự tăng cỡ hạt trung bình trong điều kiện bảo quản ở 25°C. Nhờ đó, điều này thể hiện rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được cải thiện về độ ổn định so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 61

Kết quả về độ ổn định (cỡ hạt trung bình khối có trọng số (nm))

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	25°C	
		Ngày 0	1 tháng sau
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,01	89,9 (100)	88,3 (98,2)
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	87,3 (100)	125,5 (143,8)

Tỷ lệ thay đổi (%) về cỡ hạt trung bình khi cỡ hạt trung bình vào ngày 0 được đặt là 100% được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

9. Độ ổn định trong bảo quản ở 4°C (tính sinh miễn dịch)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được pha loãng bằng dung dịch tương tự PBS sao cho nồng độ protein cuối đạt 8 µg/mL. Độ ổn định trong bảo quản ở 4°C được đánh giá bằng tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hoà) ở chuột nhắt làm chỉ số. Kết quả đại diện về hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA sau khi phản ứng ở 4°C trong 15 tháng với nồng độ glutaraldehyt 0,01% trọng lượng/thể tích hoặc của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được được thể hiện trong bảng 62. Mặc dù liều giữa 0 tháng và 15 tháng sau đó là khác nhau, đã xem là hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA duy trì được tính sinh miễn dịch trong 15 tháng trong bảo quản ở 4°C. Mặt khác, đã xem là hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt thể hiện sự giảm tính sinh miễn dịch trong điều kiện bảo quản ở 4°C. Đã xem là hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA được cải thiện về độ ổn định so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 62

Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hoà)

	Nồng độ GA (% trọng lượng/thể tích)	4°C			
		0 tháng		15 tháng sau đó	
		Liều			
		1	0,25	0,8	0,2
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng GA	0,01	10 ^{3,4}	10 ^{2,1}	10 ^{3,1}	10 ^{2,2}
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	10 ^{3,5}	10 ^{2,1}	10 ^{2,1}	10 ^{1,0}

Ví dụ 9

Tạo ra hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA

1. Xử lý bằng fomalin (bước cố định cấu trúc hạt của hạt virus)

Formalin (dung dịch nước formaldehyt 36 đến 38% trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt sao cho nồng độ cuối đạt từ 0,014 đến 0,04% thể tích/thể tích (từ 0,005 đến 0,015% trọng lượng/thể tích tính theo formaldehyt), và được cho phản ứng ở 25°C trong 1 tuần. Sau khi hoàn thành phản ứng, fomalin được loại bỏ bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng dung dịch

tương tự PBS, để nhờ đó thu được hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA (sau đây gọi là “hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA”). Hoạt tính gây sốt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA thu được được đánh giá bằng cách xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người.

2. Xác định lượng xytokin gây viêm được tạo ra

Lượng xytokin (IL-1 β và IL-6) được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người bằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được xác định bằng phương pháp tuân theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách góp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả được thể hiện trong bảng 63. Đã phát hiện rằng lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA là đủ thấp so với lượng xytokin gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA có độ an toàn cao hơn so với độ an toàn của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 63

Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	-IL-1 β (pg/mL)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,014	4,0	16,4
	0,02	0	16,4
	0,04	4,0	18,1
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	41,2	29,8

Ví dụ 10

Đánh giá về mặt vật lý

Các đặc tính vật lý của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA thu được trong ví dụ 9 được mô tả trên đây được đánh giá bằng các phương pháp sau.

1. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA chi tiết,

tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử theo cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Ảnh chụp đại diện của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA sau khi phản ứng ở 25°C trong 1 tuần với nồng độ fomalin 0,014% thể tích/thể tích được thể hiện (Fig. 5). Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA duy trì được cấu trúc hạt bằng cách cố định trong fomalin, như đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

2. Tán xạ ánh sáng động

Cỡ hạt trung bình của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trong bảng 64. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA có cỡ hạt trung bình khoảng 90 nm mà là đơn. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt là khoảng 80 nm mà là đơn. Cấu trúc hạt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA được duy trì, và không quan sát thấy các tạp chất như các thể kết tụ.

Bảng 64

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động

	Nồng độ fomalin (% thể tích/thể tích)	Cỡ hạt trung bình khối có trọng số (nm)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,014	92,0
	0,02	92,3
	0,04	93,9
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	81,5

3. Xác định phân bố phân tử lượng (SEC)

Phân bố phân tử lượng của hạt virus viêm não Nhật bản cố định bằng FA được xác định bằng cùng phương pháp (SEC) như trong ví dụ 8. Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 65. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA, quan sát thấy đỉnh chính đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt, cũng quan sát thấy đỉnh chính đơn ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút.

Bảng 65

Mẫu rửa giải SEC

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	Thời gian rửa giải (phút)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,014	14-15 Đỉnh đơn
	0,02	14-15 Đỉnh đơn
	0,04	14-15 Đỉnh đơn
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	14-15 Đỉnh đơn

4. Hàm lượng kháng nguyên

Hàm lượng kháng nguyên (hàm lượng của kháng nguyên) được xác định bằng phương pháp ELISA kiểu bán kẹp bằng cách sử dụng kháng thể kháng virus viêm não Nhật Bản theo cùng phương pháp như trong ví dụ 8.

Hàm lượng kháng nguyên tương ứng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được thể hiện trong bảng 66. Để làm đại diện, khi hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA sau khi phản ứng ở 25°C trong 1 tuần ở nồng độ formalin 0,014% thể tích/thể tích và 0,02% thể tích/thể tích được đánh giá, kháng nguyên tương đương với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được đưa vào.

Bảng 66

Kết quả về hàm lượng kháng nguyên

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	Hàm lượng kháng nguyên (µg/mL)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,014	85,9
	0,02	65,5
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	74,0

5. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong màng bụng cho chuột nhắt)

Để làm đại diện, hiệu giá trung hoà của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA sau khi phản ứng ở 25°C trong 1 tuần với nồng độ formalin 0,02% thể

tích/thể tích được xác định theo cùng phương pháp như trong ví dụ 8. Kết quả được tính toán độ giảm 50% mảng bám được thể hiện trong bảng 67. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA có hiệu giá trung hoà tương đương hoặc cao hơn so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 67

Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hoà)

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	Liều tiêm (μg)
		0,25
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,02	$10^{1,2}$
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	$10^{<1}$

6. Độ ổn định trong thử nghiệm điều kiện bất lợi (hàm lượng kháng nguyên)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được pha loãng bằng dung dịch tương tự PBS sao cho nồng độ protein cuối đạt 8 $\mu\text{g/mL}$. Độ ổn định trong bảo quản ở 37°C được đánh giá bằng hàm lượng kháng nguyên làm chỉ số. Kết quả đại diện sau khi phản ứng ở 25°C trong 1 tuần với nồng độ formalin 0,014% thể tích/thể tích được thể hiện trong bảng 68. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA duy trì được hàm lượng kháng nguyên trong 1 tuần trong điều kiện bảo quản ở 37°C. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt thể hiện sự giảm hàm lượng kháng nguyên trong điều kiện bảo quản ở 37°C. Điều này thể hiện rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA được cải thiện về độ ổn định so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 68

Kết quả về độ ổn định (hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$))

	Nồng độ formalin (% thể tích/thể tích)	37°C	
		Ngày 0	1 tuần sau
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng FA	0,014	5,3 (100)	5,4 (102,7)
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	8,6 (100)	6,3 (73,3)

Tỷ lệ thay đổi (%) về hàm lượng kháng nguyên khi hàm lượng kháng nguyên vào ngày 0 được đặt là 100% được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Ví dụ 11

Tạo ra hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC

1. Xử lý bằng 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)

EDC được bổ sung vào hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt sao cho nồng độ cuối đạt từ 0,15 đến 15 mM, và cho phản ứng ở 4°C trong từ 2 đến 20 giờ. Trong trường hợp thực hiện việc ngừng phản ứng, glycine được bổ sung thêm làm chất ngừng phản ứng với lượng 8 lần lượng EDC (tỷ lệ khối lượng mol) vào dung dịch phản ứng. Sau khi hoàn thành phản ứng, EDC và glycine được loại bỏ bằng cách thẩm tách dung dịch phản ứng bằng dung dịch tương tự PBS, để nhờ đó thu được hạt virus viêm não Nhật Bản cố định (sau đây gọi là “hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC”). Hoạt tính gây sốt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC thu được được đánh giá bằng cách xác định lượng cytokine gây viêm được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người.

2. Xác định lượng cytokine gây viêm được tạo ra

Để làm đại diện, lượng cytokine (IL-1 β và IL-6) được tạo ra trong trường hợp kích thích PBMC người bằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 0,15 mM hoặc 1,5 mM hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được xác định bằng phương pháp tuân theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test. Cụ thể, PBMC người được sử dụng bằng cách góp chung từ ít nhất 4 người cho theo European Pharmacopoeia Monocyte-Activation Test, nhưng thay bằng PBMC từ 1 người cho và xác định. Kết quả được thể hiện trong bảng 69. Đã phát hiện rằng lượng cytokine gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC là đủ thấp so với lượng cytokine gây viêm được tạo ra đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt. Điều này cũng cho thấy rằng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC có độ an toàn cao hơn so với độ an toàn của hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 69

Lượng xytokin gây viêm được tạo ra

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	-IL-1 β (pg/mL)	-IL-6 (pg/mL)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	0,15	Không thực hiện	8,3	19,2
	1,5	Không thực hiện	8,7	17,5
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	41,2	29,8

Ví dụ 12

Đánh giá về mặt vật lý

Các đặc tính vật lý của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC thu được trong ví dụ 11 được mô tả trên đây được đánh giá bằng các phương pháp sau.

1. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử

Để thử nghiệm hình dạng hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC chi tiết, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi điện tử theo cùng phương pháp như trong ví dụ 2. Ảnh chụp đại diện của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 1,5mM được thể hiện trên Fig. 6. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC duy trì được cấu trúc hạt bằng cách cố định trong EDC, như đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

2. Tán xạ ánh sáng động

Cỡ hạt trung bình của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC được phân tích bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (do hãng Malvern Panalytical Ltd. sản xuất). Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động được thể hiện trong bảng 70. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC có cỡ hạt trung bình khoảng 90 nm mà là đơn. Mặt khác, hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt là khoảng 80 nm mà là đơn. Cấu trúc hạt của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC được duy trì, và không quan sát thấy các tạp chất như các thể kết tụ.

Bảng 70

Cỡ hạt trung bình trong chất lỏng theo phương pháp tán xạ ánh sáng động

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	Cỡ hạt trung bình khối có trọng số (nm)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	0,15	Không thực hiện	91,9
	1,5	Không thực hiện	91,8
		Có thực hiện	91,8
	15	Không thực hiện	94,0
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	81,5

3. Xác định phân tử lượng (SEC)

Phân bố phân tử lượng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC được xác định bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 8. Mẫu rửa giải được thể hiện trên bảng 71. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC, quan sát thấy đỉnh đơn chính ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút. Đối với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt, cũng quan sát thấy đỉnh đơn chính ở thời gian rửa giải khoảng từ 14 đến 15 phút.

Bảng 71

Mẫu rửa giải SEC

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	Thời gian rửa giải (phút)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	0,15	Không thực hiện	14-15 Đỉnh đơn
	1,5	Không thực hiện	14-15 Đỉnh đơn
		Có thực hiện	14-15 Đỉnh đơn
	15	Không thực hiện	14-15 Đỉnh đơn
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	14-15 Đỉnh đơn

4. Hàm lượng kháng nguyên

Hàm lượng kháng nguyên (hàm lượng của kháng nguyên) được xác định bằng phương pháp ELISA kiểu bánh kẹp bằng cách sử dụng kháng thể kháng virus viêm não Nhật Bản theo cùng phương pháp như trong ví dụ 8. Để làm đại diện, hàm lượng kháng nguyên tương ứng của hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC sau khi phản ứng ở 4°C trong 20 giờ với nồng độ EDC 1,5mM và của hạt virus viêm não

Nhật Bản bất hoạt được được thể hiện trong bảng 72. Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC chứa hàm lượng kháng nguyên tương đương với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 72

Kết quả về hàm lượng kháng nguyên

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	Hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$)
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	1,5	Không thực hiện	78,5
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	74,0

5. Tính sinh miễn dịch (tiêm trong màng bụng cho chuột nhắt)

Hiệu giá trung hoà của hạt virus viêm não Nhật bản cố định bằng EDC được xác định bằng cùng phương pháp như trong ví dụ 8. Kết quả được tính toán độ giảm 50% mẩu bám được thể hiện trong bảng 73. Để làm đại diện, khi hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC trong đó sau khi phản ứng ở 4°C trong 2 giờ với nồng độ EDC 1,5 mM, glyxin được bổ sung vào làm chất ngừng phản ứng với lượng bằng 8 lần lượng EDC (tỷ lệ khối lượng mol) vào dung dịch phản ứng được đánh giá, hiệu giá trung hoà là tương đương hoặc cao hơn so với hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 73

Kết quả về tính sinh miễn dịch (hiệu giá trung hoà)

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	Liều tiêm (μg)
			1
Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	1,5	Có thực hiện	$10^{2,6}$
Hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	$10^{2,3}$

6. Độ ổn định (hàm lượng kháng nguyên)

Hạt virus viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC và hạt virus viêm não Nhật Bản bất hoạt được pha loãng bằng dung dịch tương tự PBS sao cho nồng độ protein cuối đạt 8 $\mu\text{g/mL}$. Độ ổn định trong bảo quản ở 25°C hoặc 37°C được đánh giá bằng hàm lượng kháng nguyên làm chỉ số. Kết quả được thể hiện trong các bảng 74 và 75. Hạt

virut viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC duy trì được hàm lượng kháng nguyên trong 1 tháng trong điều kiện bảo quản ở 25°C và trong 1 tuần trong điều kiện bảo quản ở 37°C. Mặt khác, hạt virut viêm não Nhật Bản bất hoạt thể hiện độ giảm hàm lượng kháng nguyên cả trong điều kiện bảo quản ở 25°C và trong điều kiện bảo quản ở 37°C. Điều này thể hiện rằng hạt virut viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC được cải thiện về độ ổn định so với hạt virut viêm não Nhật Bản bất hoạt.

Bảng 74

Kết quả về độ ổn định (hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$))

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	25°C	
			Ngày 0	1 tháng sau
Hạt virut viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	0,15	Không thực hiện	8,8 (100)	7,4 (83,4)
	1,5	Không thực hiện	8,7 (100)	7,7 (88,6)
	15	Không thực hiện	7,1 (100)	7,1 (100)
Hạt virut viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	8,6 (100)	6,8 (78,9)

Tỷ lệ thay đổi (%) về hàm lượng kháng nguyên khi hàm lượng kháng nguyên vào ngày 0 được đặt là 100% được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Bảng 75

Kết quả về độ ổn định (hàm lượng kháng nguyên ($\mu\text{g/mL}$))

	Nồng độ EDC (mM)	Xử lý ngừng phản ứng	37°C	
			Ngày 0	1 tuần sau
Hạt virut viêm não Nhật Bản cố định bằng EDC	0,15	Không thực hiện	6,6 (100)	5,8 (85,3)
	1,5	Không thực hiện	6,6 (100)	6,0 (90,9)
		Có thực hiện	5,8 (100)	5,8 (100)
Hạt virut viêm não Nhật Bản bất hoạt	-	-	7,2 (100)	5,1 (70,8)

Tỷ lệ thay đổi (%) về hàm lượng kháng nguyên khi hàm lượng kháng nguyên vào ngày 0 được đặt là 100% được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế hữu dụng trong lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là lĩnh vực vaccin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chứa hạt virus cố định,

trong đó các hạt virus cố định thu được bằng cách xử lý các hạt virus gốc hoặc các hạt virus đã bất hoạt tương ứng bằng chất cố định,

trong đó chất cố định chứa glutaraldehyt hoặc 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) carbodiimide hydroclorua,

trong đó các hạt virus bao gồm các hạt virus cúm hoặc các hạt virus viêm não Nhật Bản, và

trong đó đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt là thấp hơn 80% tính theo đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

2. Vacxin theo điểm 1, trong đó đáp ứng sốt tổng cộng của ba thử với hạt virus cố định trong thử nghiệm chất gây sốt là 1,3°C hoặc thấp hơn.

3. Vacxin chứa hạt virus cố định,

trong đó các hạt virus cố định thu được bằng cách xử lý các hạt virus gốc hoặc các hạt virus đã bất hoạt tương ứng bằng chất cố định,

trong đó chất cố định bao gồm glutaraldehyt hoặc 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) carbodiimide hydroclorua,

trong đó các hạt virus bao gồm các hạt virus cúm hoặc các hạt virus viêm não Nhật Bản, và

trong đó lượng xytokin gây viêm được sản xuất ra từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus cố định là thấp hơn 80% tính theo lượng xytokin gây viêm được sản xuất ra từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người được kích thích bằng hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

4. Vacxin theo điểm 1, trong đó các hạt virus cúm bao gồm hạt virus cúm A hoặc hạt virus cúm B.

5. Vacxin theo điểm 1, trong đó các hạt virus cúm bao gồm các hạt virus cúm được phân loại vào chủng thuộc phân typ H1N1, chủng thuộc phân typ H2N2, chủng thuộc phân typ H3N2, chủng thuộc phân typ H3N8, chủng thuộc phân typ H5N1, chủng thuộc phân typ H5N2, chủng thuộc phân typ H5N6, chủng thuộc phân typ H6N1, chủng thuộc phân typ H7N3, chủng thuộc phân typ H7N7, chủng thuộc phân typ H7N9, chủng thuộc phân typ H9N2, hoặc chủng thuộc phân typ H10N8.

6. Vacxin theo điểm 1, trong đó các hạt virus viêm não Nhật Bản bao gồm chủng Beijing-1, chủng Nakayama, chủng SA14-14-2, hoặc chủng P3.

7. Vacxin theo điểm 1, trong đó từ 0% đến 90% protein bề mặt trên hạt virus cố định không được cố định.

8. Vacxin theo điểm 1, trong đó giá trị tương đối của hoạt tính riêng (hàm lượng kháng nguyên/hàm lượng protein) của hạt virus cố định so với hoạt tính riêng của hạt virus gốc của hạt virus cố định là từ 0 đến 95%.

9. Vacxin theo điểm 1, trong đó hạt virus cố định có cỡ hạt trung bình từ 80% đến 150% cỡ hạt của hạt virus gốc của hạt virus cố định hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng.

10. Vacxin theo điểm 1, trong đó đỉnh được phát hiện ở nồng độ sacaroza là 35% hoặc cao hơn khi hạt virus cố định được đo bằng phương pháp đồng ly tâm gradien tỷ trọng sacaroza.

11. Vacxin theo điểm 1, trong đó quan sát thấy đỉnh đơn khi hạt virus cố định được đo

bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

12. Vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin này cảm ứng IgG2a đặc hiệu hạt virus cố định hơn là IgG1 đặc hiệu hạt virus cố định khi gây miễn dịch ở chuột nhắt.
13. Phương pháp sản xuất hạt virus cố định, bao gồm bước bổ sung chất cố định vào huyền phù chứa hạt virus gốc hoặc hạt virus đã bất hoạt tương ứng, trong đó chất cố định bao gồm glutaraldehyt hoặc 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua, và trong đó các hạt virus bao gồm hạt virus cúm hoặc hạt virus viêm não Nhật Bản.
14. Phương pháp sản xuất theo điểm 13, trong đó nồng độ glutaraldehyt là từ 0,001 đến 0,06% khối lượng/thể tích tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.
15. Phương pháp sản xuất theo điểm 13, trong đó nồng độ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua là từ 0,05 đến 1500 mM tính theo tổng lượng huyền phù và chất cố định.
16. Phương pháp sản xuất theo điểm 13, trong đó hạt virus gốc là hạt virus được thu hồi bằng cách gây nhiễm các tế bào nuôi cấy, trứng gà hoặc não chuột nhắt.
17. Phương pháp sản xuất theo điểm 16, trong đó các tế bào nuôi cấy bao gồm các tế bào sơ cấp hoặc các dòng tế bào.
18. Phương pháp sản xuất theo điểm 17, trong đó các tế bào nuôi cấy bao gồm tế bào Vero hoặc tế bào MDCK.
19. Phương pháp sản xuất vacxin, bao gồm bước bổ sung hạt virus cố định thu được

bằng phương pháp sản xuất theo điểm 13 với ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm gồm chất mang được dụng, chất nhũ hóa, chất bảo quản, chất tạo trương lực, chất điều chỉnh độ pH, và chất bất hoạt, nhờ đó tạo ra vacxin.

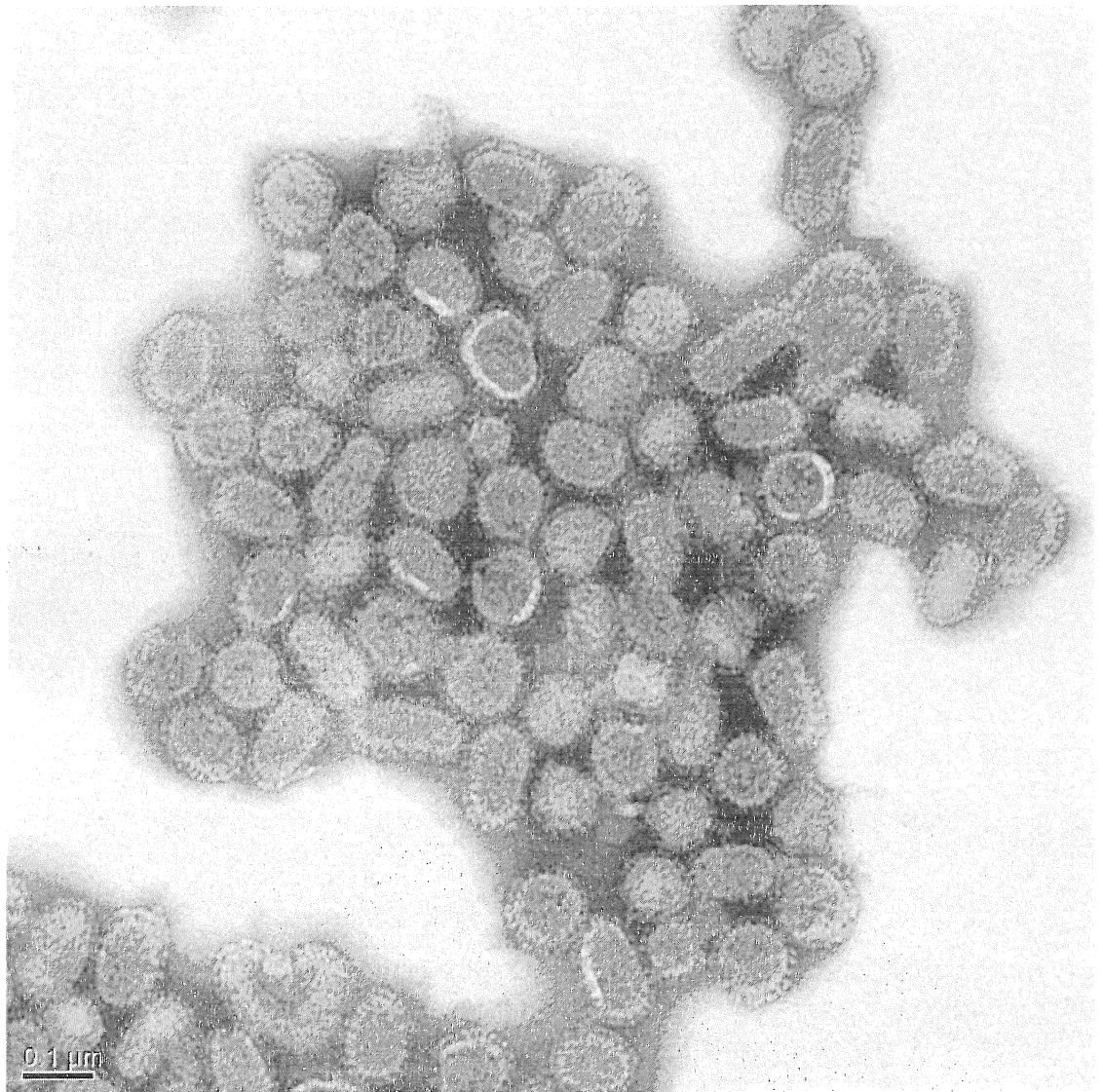
Fig.1

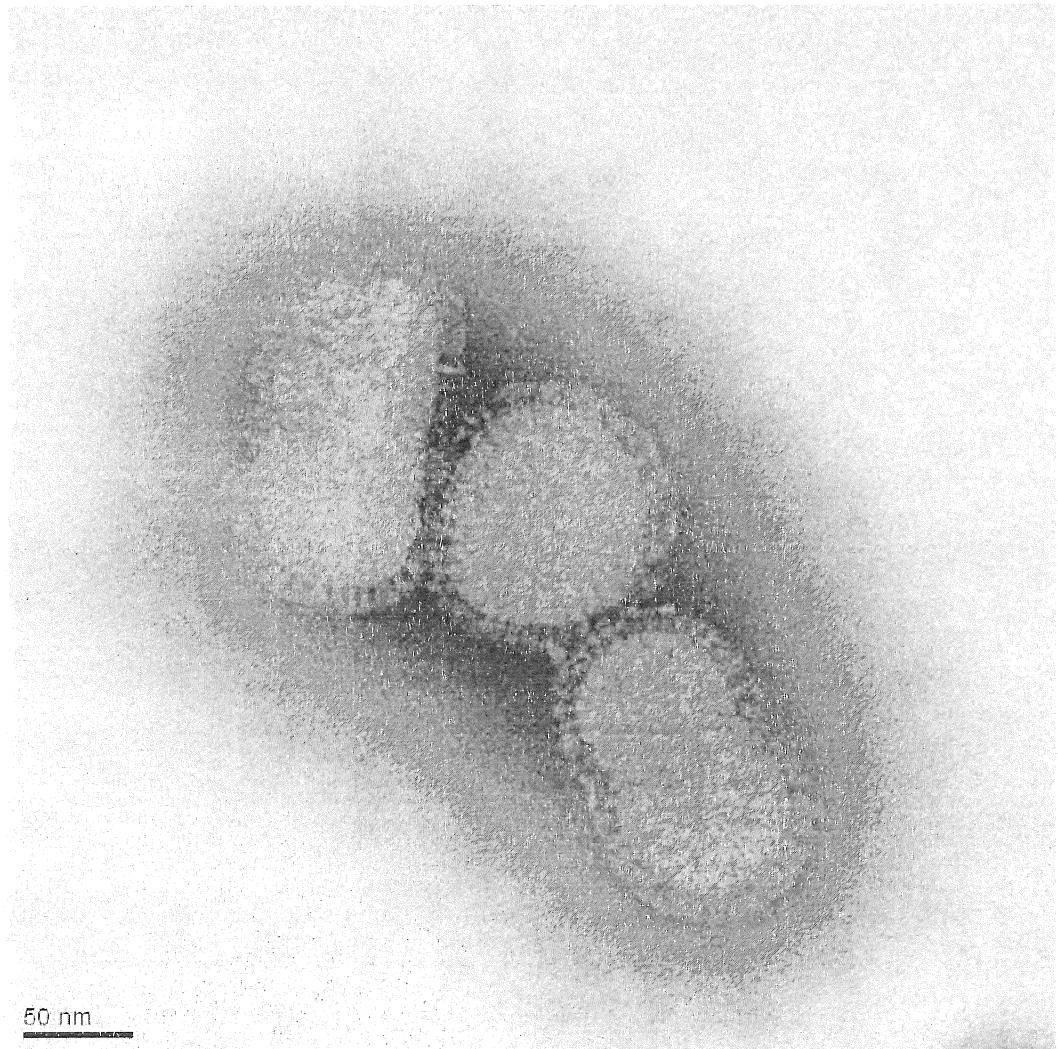
Fig.2

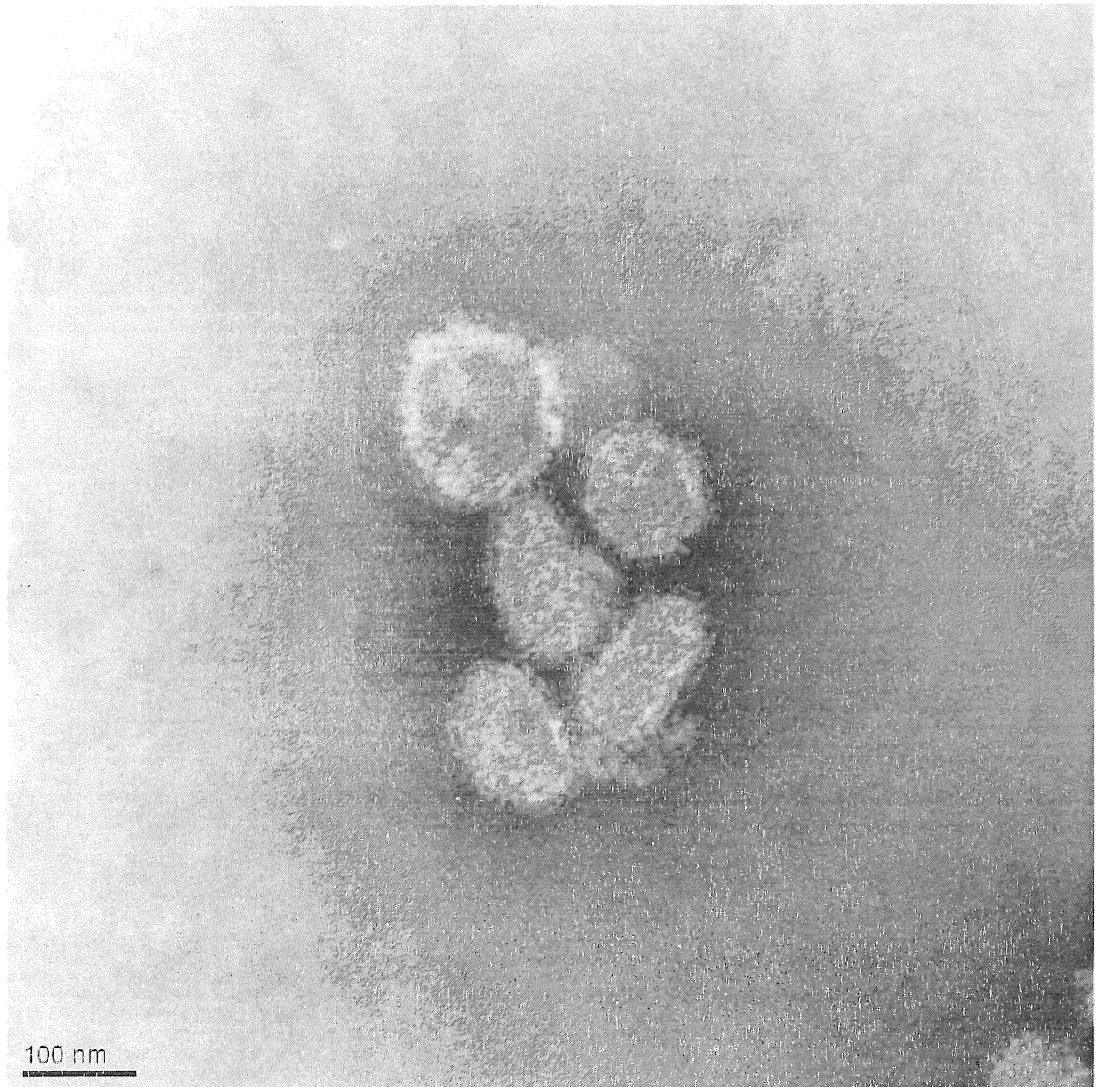
Fig.3

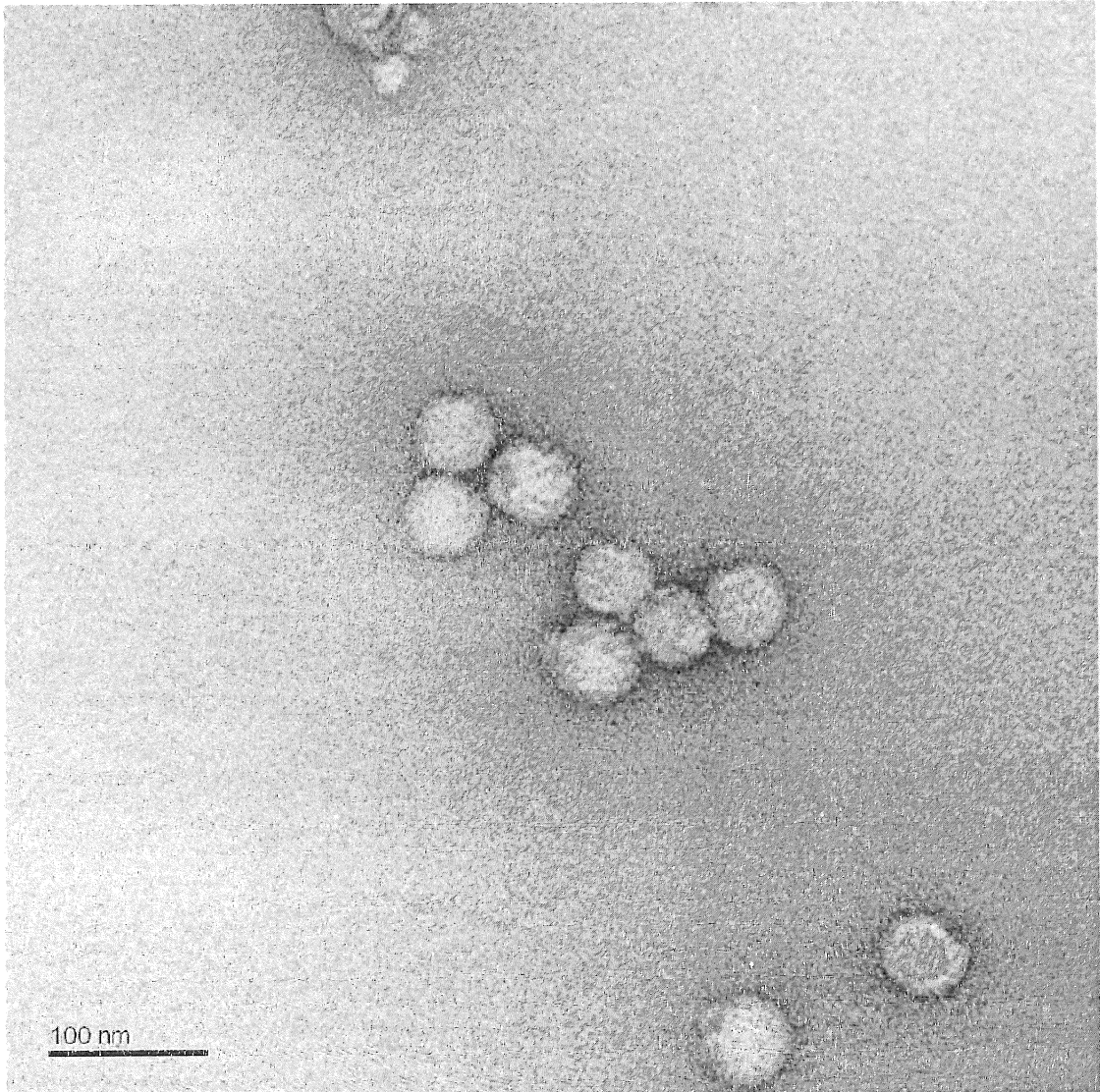
Fig.4

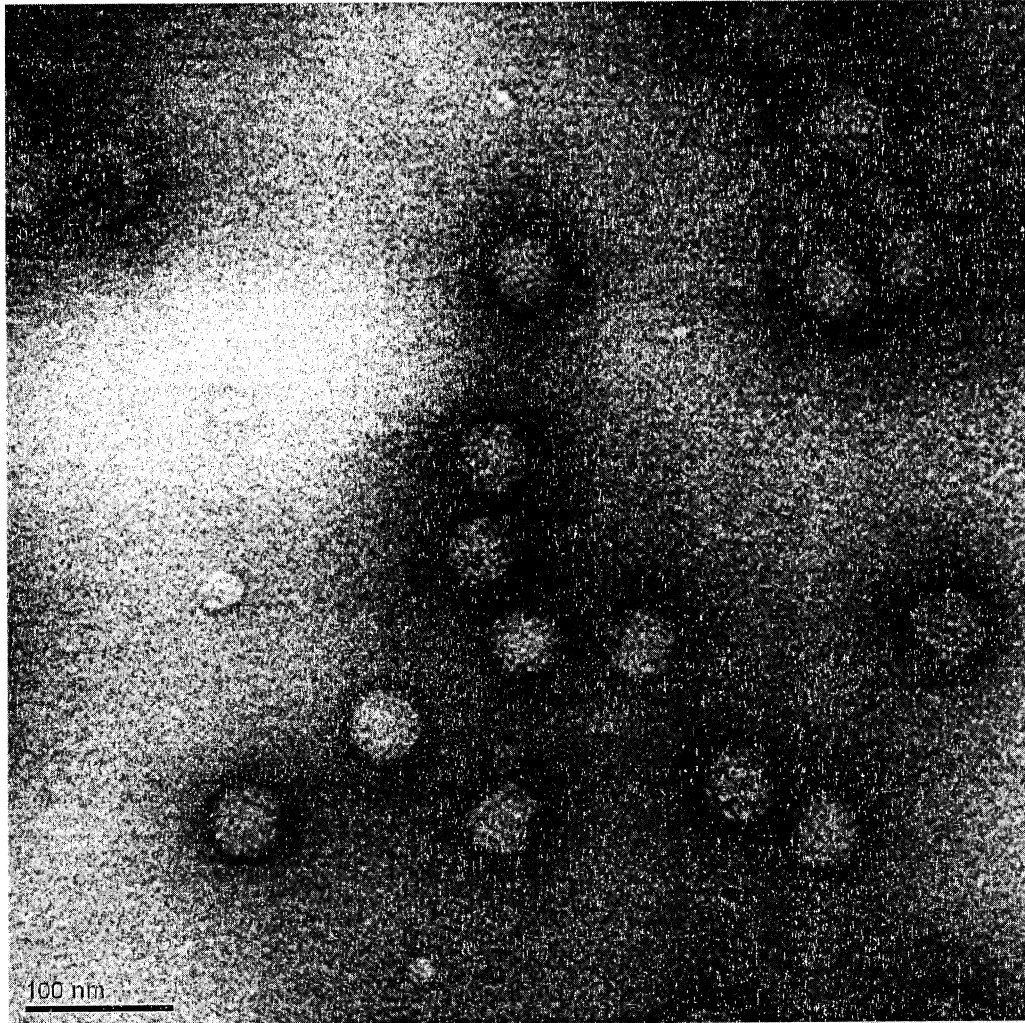
Fig.5

Fig.6