



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

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

(11)



1-0030912

(51)⁷ A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2016-03353

(22) 20/02/2015

(86) PCT/US2015/016921 20/02/2015

(87) WO 2015/127278 27/08/2015

(30) 61/942,386 20/02/2014 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/04/2017 349A

(73) Vaxart, Inc. (US)

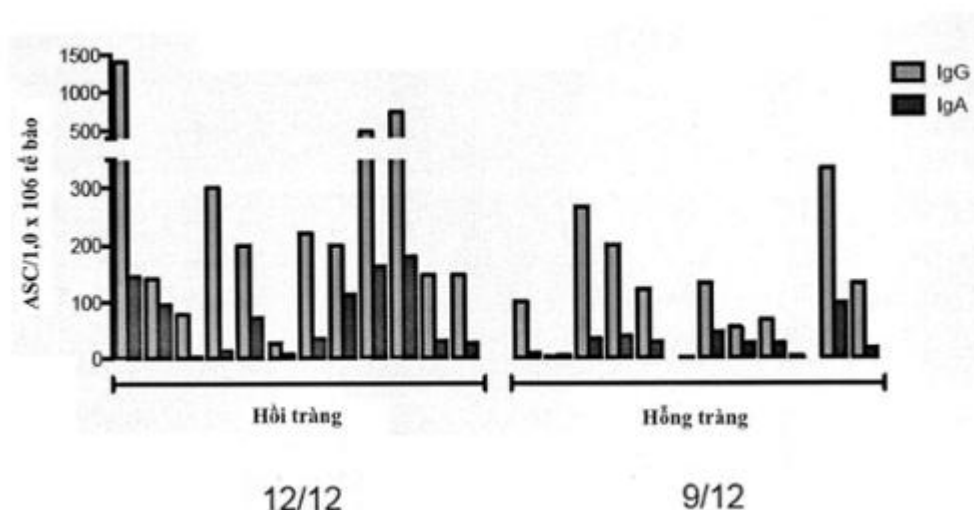
385 Oyster Point Boulevard, Suite 9A, South San Francisco, California 94080,
United States of America

(72) TUCKER, Sean (US); TRAGER, George (US).

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

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐỂ GÂY RA ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở NGƯỜI

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch để gây ra đáp ứng miễn dịch ở người. Chế phẩm này chứa chất sinh học gây miễn dịch được bao bằng (ii) tác nhân định hướng sự phân phối chất sinh học gây miễn dịch vào hồi tràng của người, trong đó tác nhân (ii) này là lớp bao tan trong ruột (ví dụ, Eudragit®) có ngưỡng pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,8.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch dùng để gây ra đáp ứng miễn dịch ở người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vaccin là một công cụ quan trọng để ngăn chặn và/hoặc điều trị nhiều tình trạng bệnh và rối loạn (ví dụ, bệnh nhiễm virus, bệnh nhiễm vi khuẩn và bệnh ung thư). Việc chủng ngừa thường được tiến hành bằng cách tiêm, nhưng việc này thường làm giảm số lượng đối tượng tham gia do sự bất tiện phải di chuyển đến điểm tiêm chủng và việc không thích tiêm. Hơn nữa, việc tiêm vaccin đòi hỏi phải sử dụng bộ dụng cụ vô trùng, như xylanh và kim tiêm, và cần người có kỹ năng để thực hiện tiêm.

Đối với vaccin cúm, chiến dịch quy mô lớn hàng năm được thực hiện để tập hợp đủ trứng được thụ tinh để thu hoạch và xử lý virus đầy đủ để đáp ứng các nhu cầu của thị trường. Môi trường nuôi cấy tế bào hoặc hemagglutinin (HA) có nguồn gốc thực vật có thể làm giảm gánh nặng đối với việc thu hoạch và xử lý trứng, nhưng các hướng tiếp cận này vẫn đòi hỏi công đoạn nạp và hoàn thiện vô trùng đắt tiền để sản xuất kim tiêm xylanh riêng biệt, mà cần thải bỏ dưới dạng rác thải sinh học. Khi xảy ra đại dịch, các trường học có thể bị đóng cửa và thi hành lệnh giãn cách xã hội, nhưng việc chủng ngừa cúm quy mô lớn thường vẫn đòi hỏi các đối tượng phải đến xếp hàng tại các cơ sở y tế để tiêm. Vaccin dạng uống, cho bệnh cúm hoặc các mầm bệnh khác, có thể được chuyển qua buro điện, do đó tránh được hầu hết sự tiếp xúc giữa người với người. Hơn nữa, quy trình dập viên là quy trình nhanh, vệ sinh mà không đòi hỏi quy trình nạp và hoàn thiện vô trùng đắt tiền như đối với vaccin dạng tiêm.

Vaccin mà có thể được phân phối qua đường tiêu hóa, ví dụ, qua đường miệng hoặc qua niêm mạc, được mô tả trong Patent Mỹ số 8,222,224.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm để chủng ngừa hiệu quả hơn cho đối tượng (người hoặc không phải người) bao gồm bước phân phối chất sinh học gây miễn dịch đặc hiệu vào hồi tràng của đối tượng này. Do đó, sáng chế đề xuất các vaccin có hiệu lực và hiệu quả hơn và chứng minh hiệu quả của chúng trên người.

Sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch để gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng chứa: chất sinh học gây miễn dịch được bao bằng tác nhân định hướng sự phân phối chất sinh học gây miễn dịch này vào hồi tràng của đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này là động vật không phải người, ví dụ, động vật linh trưởng, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, ngựa, chó, mèo hoặc gia cầm. Theo một số phương án, chất sinh học gây miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit sinh miễn dịch (ví dụ, các hạt giống virus, glycoprotein, phosphoprotein), hydrat cacbon và lipid.

Theo một số phương án, chất sinh học gây miễn dịch là vector biểu hiện mã hóa polypeptit sinh miễn dịch. Theo một số phương án, vector biểu hiện này là vector virus (ví dụ, adenovirus, AAV, retrovirus, hoặc lentivirus). Theo một số phương án, vector virus được làm giảm độc lực hoặc không đủ khả năng sao chép. Theo một số phương án, vector biểu hiện bao gồm gen khởi đầu (ví dụ, CMV, SV40 sớm hoặc muộn, β -actin, v.v.) liên kết theo cách có điều khiển với trình tự mã hóa polypeptit sinh miễn dịch. Theo một số phương án, vector biểu hiện này còn mã hóa ARN sợi kép (dsARN). Theo một số phương án, trình tự mã hóa dsARN được liên kết theo cách có điều khiển với gen khởi đầu, ví dụ, gen khởi đầu giống (sử dụng vị trí đi vào bên trong ribosom (IRES)) hoặc gen khởi đầu khác với gen khởi đầu liên kết theo cách có điều khiển với trình tự mã hóa polypeptit sinh miễn dịch.

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch còn chứa ít nhất một chất bổ trợ, ví dụ, chất chủ vận TLR3. Theo một số phương án, chất chủ vận TLR3 là dsARN hoặc chất giả dsARN.

Theo một số phương án, ít nhất 50% chất sinh học gây miễn dịch được phân phối (được giải phóng) trong hồi tràng, ví dụ, ít nhất 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, hoặc nhiều hơn chất sinh học gây miễn dịch chứa trong chế phẩm được sử dụng. Theo một số phương án, tác nhân định hướng sự phân phối (ví dụ, chất nền hoặc lớp bao tan trong ruột) bắt đầu hòa tan trước khi chế phẩm sinh miễn dịch đến được hồi tràng, nhưng giữ được ít nhất 50% chất sinh học gây miễn dịch đến khi chế phẩm sinh miễn dịch này đến được hồi tràng. Theo một số phương án, tác nhân định hướng phân phối này giữ được chất sinh học gây miễn dịch qua dạ dày, tá tràng và hồi tràng, nhưng giải phóng chất sinh học gây miễn dịch trong hồi tràng.

Theo một số phương án, tác nhân định hướng phân phối là lớp bao tan trong ruột. Nghĩa là, chất sinh học gây miễn dịch được bao phủ bằng lớp bao tan trong ruột. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột phân rã ở độ $\text{pH} \geq 5$, ví dụ, 5,2, 5,5, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 7,0, 5,5-6,8, 5,8-6,8, v.v.. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột được chọn từ nhóm bao gồm copolyme của axit metacrylic-ethyl acrylat (ví dụ, 1:1), loại A; copolyme của axit metacrylic, loại C; hỗn hợp của copolyme metacrylic loại A và C; và Time Clock®. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột không chứa xenluloza axetat phtalat (CAP). Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột có độ dày dẫn đến việc giải phóng chất sinh học gây miễn dịch trong hồi tràng. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột là dựa trên copolyme axit metacrylic có mức độ bao phủ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 10 miligam trên mỗi cm^2 . Theo một số phương án, tác nhân định hướng phân phối là viên nang được kiểm soát bằng phóng xạ.

Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa poly(axit metylacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100, trietyl xitrat, và bột talc, ví dụ, 1, 2, 3, 4 hoặc từ 1 đến 4 phần Eudragit® L-100, từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat, và từ 1 đến 2 phần bột talc. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 và poly(axit metacrylic-co-ethyl acrylat) 1:1. Theo một số phương án, tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 so với poly(axit metacrylic-co-ethyl acrylat) 1:1 nằm trong khoảng từ 1:4 đến 4:1, ví dụ, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100 và Eudragit® L100-55. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100 và Eudragit® L100-55, trietyl xitrat, và bột talc, ví dụ, từ 1 đến 4 phần Eudragit® L-100 và Eudragit® L100-55, từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat, và từ 1 đến 2 phần bột talc. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 và poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2. Theo một số phương án, tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 so với poly(axit metacrylic-co-metyl acrylat) 1:2 nằm trong khoảng từ 1:2 đến 2:1. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100 và Eudragit® S100. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100 và Eudragit® S100, trietyl

xitrat, và bột talc, ví dụ, từ 1 đến 4 phần Eudragit® L-100 và Eudragit®S100, từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat, và từ 1 đến 2 phần bột talc. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2 và poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1. Theo một số phương án, tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2 và poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1 nằm trong khoảng từ 1:4 đến 4:1, ví dụ, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, hoặc 3:1. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100-55 và Eudragit®S100. Theo một số phương án, lớp bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100-55 và Eudragit®S100, trietyl xitrat, và bột talc, ví dụ, từ 1 đến 4 phần Eudragit® L-100-55 và Eudragit®S100, từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat, và từ 1 đến 2 phần bột talc.

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch ở dạng viên nén hoặc viên nang, ví dụ, ở dạng viên nén được bao phủ bằng lớp bao tan trong ruột. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch được bao nang trong viên nang polyme chứa gelatin, hydroxypropylmetyl xenluloza, tinh bột, hoặc pululan. Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch ở dạng vi hạt có đường kính nhỏ hơn 2mm, ví dụ, mỗi vi hạt được bao phủ bằng lớp bao tan trong ruột như được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phân phối chế phẩm sinh miễn dịch vào hồi tràng của đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này dùng qua đường miệng chế phẩm sinh miễn dịch như được mô tả ở trên (nghĩa là, chất sinh học gây miễn dịch được bao bằng tác nhân định hướng sự phân phối chất sinh học gây miễn dịch vào hồi tràng, tùy ý chứa cả chất hỗ trợ). Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này là động vật không phải người. Theo một số phương án, phương pháp này tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cao hơn ít nhất là 10%, ví dụ, ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 100% hoặc nhiều hơn, so với đáp ứng miễn dịch ở đối tượng (cùng một đối tượng ở các thời điểm khác nhau, hoặc một đối tượng khác) tiếp nhận chế phẩm sinh miễn dịch giống như vậy nhưng không được định hướng vào hồi tràng. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch ở đối tượng này cao hơn ít nhất là 1,5 lần (ví dụ, 2 lần, 2,5 lần, 5 lần, hoặc nhiều hơn) so với đáp ứng miễn dịch ở đối tượng (cùng một đối tượng ở các thời điểm khác nhau, hoặc một đối tượng khác) tiếp nhận chế phẩm sinh miễn dịch giống như vậy nhưng không được định hướng vào hồi tràng. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch là sự gia tăng các kháng thể đặc hiệu với chất sinh học gây miễn dịch. Theo một số

phương án, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch tế bào, ví dụ, sự gia tăng xytokin như IFN- γ . Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch là sự tạo miễn dịch (ví dụ, đối tượng có sức đề kháng với bệnh nhiễm trùng gây ra bởi virus, vi khuẩn, v.v. mà chất sinh học gây miễn dịch này thu được từ đó).

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch tăng ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này, ví dụ, đối tượng người dùng qua đường miệng chế phẩm sinh miễn dịch như được mô tả ở trên (nghĩa là, chất sinh học gây miễn dịch được bao bằng tác nhân định hướng sự phân phối chất sinh học gây miễn dịch vào hồi tràng, tùy ý chứa cả chất hỗ trợ). Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tăng lên ít nhất là 10%, ví dụ, ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 100% hoặc nhiều hơn so với đáp ứng miễn dịch ở đối tượng (cùng một đối tượng ở các thời điểm khác nhau, hoặc một đối tượng khác) tiếp nhận chế phẩm sinh miễn dịch giống như vậy nhưng không được định hướng vào hồi tràng. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch ở đối tượng được tăng lên ít nhất 1,5 lần (ví dụ, 2 lần, 2,5 lần, 5 lần, hoặc nhiều hơn) so với đáp ứng miễn dịch ở đối tượng (cùng một đối tượng ở các thời điểm khác nhau, hoặc một đối tượng khác) tiếp nhận chế phẩm sinh miễn dịch giống như vậy nhưng không được định hướng vào hồi tràng. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch là sự gia tăng các kháng thể đặc hiệu với chất sinh học gây miễn dịch. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch tế bào, ví dụ, sự gia tăng xytokin như IFN- γ . Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch là sự tạo miễn dịch (ví dụ, đối tượng có sức đề kháng với bệnh nhiễm trùng gây ra bởi virus, vi khuẩn, v.v. mà chất sinh học gây miễn dịch này thu được từ đó).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Tế bào tiết kháng thể (ASC) đặc hiệu với HA được đo trong máu ngoại vi 7 ngày sau khi các đối tượng được cho dùng viên nang được kiểm soát bằng phóng xạ chứa rAd-HA-dsARN. Các đối tượng được chọn ngẫu nhiên để sử dụng vacxin được giải phóng trong hồi tràng hoặc hỗng tràng. (N=12 mỗi nhóm). Các kết quả cho thấy rằng 12 trong số 12 đối tượng sử dụng vacxin được phân phối vào hồi tràng có khả năng tạo ra các tế bào B tiết kháng thể nhận diện HA, trong khi chỉ có 9 trong số 12 đối tượng được sử dụng vacxin đến hỗng tràng có khả năng tạo ra tế bào B đặc hiệu kháng nguyên. Số lượng trung bình của IgA và IgG ASC đối với hồi tràng cao hơn đáng kể so với hỗng tràng.

Fig.2. Đáp ứng của tế bào T đối với rAd-HA-dsARN được xác định bằng cách phát hiện các mức IFN- γ 7 ngày sau khi sử dụng. Tất cả các cá thể trong nhóm phân phối trong hồi tràng đều thể hiện các mức IFN- γ cao hơn so với 75% nhóm phân phối trong hồi tràng. Mức IFN- γ trung bình cũng cao hơn đáng kể trong nhóm phân phối trong hồi tràng.

Fig.3. Các đáp ứng kháng thể vi trung hòa (MN) với virus cúm chủng A/CA/07/2009 được đo vào ngày 0 và ngày 28 sau khi gây miễn dịch. Số lần gia tăng về hiệu giá MN được lập đồ thị cho từng đối tượng có hiệu giá MN ban đầu nhỏ hơn hoặc bằng 40. Các kết quả cho thấy rằng sự phân phối trong hồi tràng dẫn đến tỷ lệ lớn các đối tượng (9 trong số 10) có hiệu giá MN tăng lên sau khi gây miễn dịch so với khi phân phối trong hồi tràng (6 trong số 10).

Fig.4. Các viên nén được tạo ra bằng cách sử dụng xenluloza vi tinh thể và tinh bột, với bari sulfat 10% là vật liệu chắn bức xạ. Các viên nén này được bao tan trong ruột bằng Eudragit L100® và được sử dụng cho khỉ cynomolgus macaques cái bằng ống thông từ miệng xuống dạ dày. Tia X được chiếu theo thời gian sau khi dùng. A. Viên nén trong dạ dày có mũi tên chỉ về phía viên nén. B. Một giờ sau đó, viên nén này có thể được quan sát thấy trong ruột, đốm trắng ở bên trái của cột sống có mũi tên chỉ vào. Viên nén hòa tan trong ruột trong hai giờ tiếp theo, và không quan sát thấy nữa.

Fig.5. Số lượng các ASC được báo cáo vào các ngày 7 và 35, 7 ngày sau mỗi lần gây miễn dịch. ASC cơ sở vào ngày 0 và ngày 28 là rất nhỏ, và không được lập đồ thị. Các đáp ứng trung bình vào ngày 7 được thể hiện đối với mỗi nhóm điều trị bằng đường nằm ngang.

Fig.6. Số lần gia tăng hiệu giá MN đối với từng đối tượng. Các cột có màu đậm chỉ ra vị trí mà hiệu giá tăng lên trong khoảng từ ngày 28 đến 56, trong khi đó các cột có màu nhạt thể hiện đáp ứng sau lần gây miễn dịch ban đầu. Đường thẳng được vẽ tại mức tăng MN gấp hai lần để thể hiện các đối tượng có đáp ứng kháng thể trung hòa có thể phát hiện được. Không có đối tượng nào trong nhóm giả dược có đáp ứng, trong khi đó có 3 đối tượng trong nhóm liều thấp và 7 đối tượng trong nhóm liều cao có đáp ứng kháng thể trung hòa cao gấp 2 lần hoặc nhiều hơn đối với virus cúm sau khi gây miễn dịch. Nhóm giả dược N=10, nhóm liều thấp và nhóm liều cao N=11.

Fig.7. Các đáp ứng kháng thể sau khi gây miễn dịch một lần duy nhất qua đường miệng. A. Hiệu giá kháng thể HAI trước và sau khi gây miễn dịch (lần lượt vào ngày 0 và 28) được thể hiện đối với từng đối tượng. B. Hiệu giá trung bình nhân HAI (GMT) theo thời gian. Hiệu giá HAI được đo vào thời điểm 0, 1, và 6 tháng sau khi gây miễn dịch để đánh giá độ bền của đáp ứng kháng thể. C. Hiệu giá MN, trước và sau khi gây miễn dịch được thể hiện cho từng đối tượng. D. Các đáp ứng ASC sau khi gây miễn dịch. Số lượng các IgG và IgA ASC được báo cáo (trên mỗi 10^6 PMBC) 7 ngày sau khi gây miễn dịch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự phân phối chất sinh học gây miễn dịch đến một phần cụ thể trong ruột non, nghĩa là, hồi tràng, gây ra đáp ứng điều trị lớn hơn nhiều so với khi chất này không được hướng đích, hoặc được hướng đích đến một vị trí khác. Điều này cho phép thiết kế được các vaccin có hiệu lực hơn, giảm chi phí đối với nguyên liệu, và giảm các tác dụng phụ cho người tiếp nhận.

I. I. Các định nghĩa

Thuật ngữ “sinh miễn dịch” dùng để chỉ khả năng của một chất trong việc gây ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ, qua trung gian tế bào hoặc thể dịch. Chất sinh miễn dịch thường là “ngoại lai” đối với vật chủ, ví dụ, từ một loài khác, hoặc từ vi khuẩn, virus hoặc nấm. Chất không phải ngoại lai có thể gây miễn dịch, ví dụ, trong trường hợp phản ứng tự miễn. Một số chất đặc hiệu với tế bào ung thư có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch, cho phép hệ miễn dịch của vật chủ tấn công tế bào ung thư.

Thuật ngữ “chất sinh học” dùng để chỉ axit nucleic, polypeptit, glycoprotein, hydrat cacbon, lipid, hoặc dạng cải biến của chúng (ví dụ, được metyl hóa, được glycosyl hóa, được đánh dấu phát hiện được). Chất sinh học được phân biệt với các thuốc phân tử nhỏ ở chỗ chúng có thể được tạo ra bởi các quy trình sinh học (bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp) thay vì được tổng hợp hóa học. Tuy nhiên, các chất sinh học này có thể được cải biến hóa học hoặc bao gồm các nucleotit hoặc axit amin không tự nhiên. Các chất sinh học này cũng có thể không có trong tự nhiên, ví dụ, là các chất tái tổ hợp hoặc thể khảm.

Như được sử dụng ở đây, “chất sinh học gây miễn dịch” dùng để chỉ chất trực tiếp đóng vai trò làm kháng nguyên (ví dụ, được nhận diện bởi thụ thể tế bào T hoặc kháng thể), hoặc chất mà, ngay khi được biểu hiện trong tế bào, nó đóng vai trò làm

kháng nguyên. Ví dụ, chất sinh học gây miễn dịch có thể bao gồm vector biểu hiện mã hóa polypeptit sinh miễn dịch.

Thuật ngữ “kháng nguyên” dùng để chỉ polypeptit, glycoprotein, lipoprotein, lipid, hydrat cacbon, hoặc chất khác mà được liên kết (ví dụ, được nhận diện là “ngoại lai”) bởi thụ thể tế bào T và/hoặc kháng thể. Kháng nguyên thường có nguồn gốc từ vi khuẩn, virus, hoặc nấm. Thuật ngữ “có nguồn gốc từ” chỉ ra là kháng nguyên này gần như tồn tại nguyên trạng trong ngữ cảnh kháng nguyên tự nhiên của nó, hoặc là nó đã được cải biến để được biểu hiện trong một số điều kiện nhất định, để chỉ bao gồm phần sinh miễn dịch nhiều nhất, hoặc nhằm loại bỏ các thành phần có liên quan có khả năng gây hại khác, v.v..

"Liều hoặc lượng có hiệu quả sinh miễn dịch" của chế phẩm như được mô tả ở đây là lượng tạo ra hoặc điều biến đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên được lựa chọn để chủng ngừa. Các đáp ứng miễn dịch bao gồm đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể được sử dụng với mục đích điều trị hoặc phòng ngừa để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở giai đoạn bất kỳ.

"Đáp ứng miễn dịch dịch thể" được gây ra bởi các thành phần không chứa tế bào trong máu, ví dụ, huyết tương hoặc huyết thanh; việc truyền huyết thanh hoặc huyết tương từ cá thể này sang cá thể khác sẽ truyền tính miễn dịch dịch thể. Các đáp ứng miễn dịch dịch thể thường qua trung gian tế bào B, ví dụ, sản sinh kháng thể.

"Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào" được gây ra bởi các lympho bào đặc hiệu kháng nguyên; việc truyền các lympho bào đặc hiệu kháng nguyên này từ cá thể này sang cá thể khác sẽ truyền tính miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào được gây ra ít nhất một phần bởi tế bào T, và có thể được phát hiện, ví dụ, bằng cách phát hiện các cytokin đặc hiệu tế bào T hoặc sự gia tăng phát triển tế bào T.

“Hồi tràng” là đoạn dài nhất trong số ba đoạn tạo thành ruột non, cùng với tá tràng và hỗng tràng. Nó tạo thành phần cuối cùng, giữa hỗng tràng và manh tràng.

Lớp bao tan trong ruột là hàng rào được phủ lên thuốc dùng qua đường miệng để ngăn không cho dược chất bên trong bị tiêu hóa trong môi trường có độ pH thấp của dạ dày và tá tràng (~pH=3).

Tác nhân, như lớp bao tan trong ruột, chất nền, hoặc viên nang, được cho là giữ được dược chất đã được bao hoặc được gắn vào khi có ít nhất là 60%, ví dụ, ít nhất

là khoảng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% lượng được chất đã sử dụng ban đầu vẫn được bao hoặc được gắn trong tác nhân đó. Tác nhân, ví dụ, lớp bao tan trong ruột hoặc chất nền, thường được thiết kế để phân rã trong một số điều kiện nhất định và giải phóng được chất. Việc phân rã có thể là từ từ, ví dụ, trong trường hợp lớp bao dày hơn hoặc phức tạp hơn về mặt hóa học. Lớp bao tan trong ruột được cho là “phân rã” khi độ dày của lớp bao bị giảm đi ít nhất là 10%, ví dụ, ít nhất 25%, 50%, hoặc 75% so với độ dày được sử dụng ban đầu. Sự phân rã không phải là thuật ngữ tuyệt đối, vì nó có thể diễn ra trong khoảng thời gian khác nhau tùy thuộc vào các điều kiện. Ví dụ, lớp bao được thiết kế để phân rã trong thời gian 5 phút ở độ pH=6,5 có thể phân rã, mặc dù là từ từ, ở độ pH=6 (ví dụ, trong thời gian 1 giờ). Sự phân rã không nhất thiết chỉ ra rằng được chất đã được bao hoặc gắn vào được giải phóng. Tuy nhiên, được chất này có thể bắt đầu được giải phóng trước khi lớp bao tan trong ruột hoặc chất nền bị phân rã hoàn toàn.

Thuật ngữ "khảm" hoặc "tái tổ hợp" như được sử dụng ở đây khi đề cập đến, ví dụ, axit nucleic, protein, hoặc vector, dùng để chỉ axit nucleic, protein hoặc vector đã được cải biến bằng cách đưa vào axit nucleic hoặc protein khác loại hoặc biến đổi axit nucleic hoặc protein tự nhiên. Do đó, ví dụ, vector khảm và tái tổ hợp bao gồm trình tự axit nucleic không được tìm thấy trong dạng tự nhiên của vector này (dạng không khảm hoặc không tái tổ hợp). Vector biểu hiện virus khảm dùng để chỉ vector biểu hiện virus chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit khác loại (ví dụ, sinh miễn dịch).

"Vector biểu hiện" là cấu trúc axit nucleic, được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với một loạt các yếu tố axit nucleic cụ thể mà cho phép sự phiên mã của một axit nucleic cụ thể trong tế bào vật chủ. Vector biểu hiện này có thể là một phần của plasmit, virus, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, vector biểu hiện bao gồm axit nucleic cần được phiên mã được liên kết theo cách có điều khiển với gen khởi đầu. Vector biểu hiện virus thường được làm cho không đủ khả năng sao chép hoặc được làm giảm độc lực. Vector có nguồn gốc virus có thể bao gồm các thành phần của vector biểu hiện cần thiết để biểu hiện trình tự mong muốn, nhưng loại bỏ các thành phần có liên quan đến, ví dụ, sự sao chép hoặc tác động gây bệnh khác.

Thuật ngữ "gen khởi đầu" và "trình tự điều khiển sự biểu hiện" được sử dụng ở đây dùng để chỉ trình tự điều khiển axit nucleic định hướng sự phiên mã của axit nucleic. Trình tự gen khởi đầu thường nằm gần với vị trí bắt đầu phiên mã, như yếu tố

TATA trong trường hợp gen khởi đầu polymeraza typ II. Gen khởi đầu cũng có thể bao gồm yếu tố tăng cường hoặc kìm hãm ngoại biên, mà có thể được bố trí đến vài nghìn cặp bazơ từ vị trí bắt đầu phiên mã. Gen khởi đầu bao gồm gen khởi đầu cơ định và gen khởi đầu cảm ứng được. Gen khởi đầu "cơ định" là gen khởi đầu hoạt động trong hầu hết các điều kiện môi trường và điều kiện phát triển. Gen khởi đầu "cảm ứng được" là gen khởi đầu hoạt động trong điều kiện điều biến môi trường và sự phát triển. Thuật ngữ "liên kết theo cách có điều khiển" dùng để chỉ liên kết chức năng giữa trình tự điều khiển biểu hiện axit nucleic (như gen khởi đầu, hoặc dãy các vị trí liên kết yếu tố phiên mã) và trình tự axit nucleic thứ hai, trong đó trình tự điều khiển biểu hiện định hướng sự phiên mã của axit nucleic tương ứng với trình tự thứ hai.

Thuật ngữ "khác loại" khi được sử dụng liên quan đến các phần của axit nucleic chỉ ra rằng axit nucleic này chứa hai hoặc nhiều trình tự con không được phát hiện là có mối quan hệ với nhau giống như vậy trong tự nhiên. Ví dụ, axit nucleic thường được sản xuất tái tổ hợp, có hai hoặc nhiều trình tự từ các gen không liên quan được sắp xếp để tạo thành axit nucleic chức năng mới, ví dụ, gen khởi đầu từ một nguồn và vùng mã hóa từ một nguồn khác. Tương tự, các phần khác loại của protein chỉ ra rằng protein này chứa hai hoặc nhiều trình tự con không được phát hiện là có mối quan hệ với nhau giống như vậy trong tự nhiên (ví dụ, protein dung hợp). Axit nucleic hoặc protein khác loại là phân tử không được tìm thấy trong môi trường cụ thể trong tự nhiên, ví dụ, protein khác loại của chuột nhắt trong tế bào người.

Thuật ngữ "axit nucleic" và "polynucleotit" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây dùng để chỉ polyme của các deoxyribonucleotit hoặc các ribonucleotit ở dạng chuỗi đơn hoặc chuỗi kép. Các thuật ngữ này bao gồm các gen, cADN, ARN, và các oligonucleotit (polynucleotit ngắn). Các thuật ngữ này bao gồm các axit nucleic chứa các chất tương tự nucleotit đã biết hoặc các gốc mạch chính hoặc các liên kết được cải biến, được tổng hợp, có trong tự nhiên, và không có trong tự nhiên, mà có các đặc tính liên kết tương tự với axit nucleic tham chiếu, và được chuyển hóa theo cách tương tự với các nucleotit tham chiếu. Các ví dụ về các chất tương tự này gồm, nhưng không giới hạn ở, phosphorothioat, phosphoramidat, methyl phosphonat, methyl phosphonat không đối xứng, 2-O-methyl ribonucleotit, peptit-axit nucleic (PNA). Thuật ngữ "nucleotit" thường dùng để chỉ monome axit nucleic.

Trừ khi có quy định khác, trình tự axit nucleic cụ thể cũng bao gồm các biến thể được biến đổi bảo tồn của nó (ví dụ, các đột biến thể codon thoái biến) và các trình tự bổ sung, cũng như trình tự được chỉ ra một cách rõ ràng. Cụ thể là, có thể thu được các đột biến thể codon thoái biến bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều (hoặc tất cả) codon đã chọn được thay thế bằng các gốc deoxyinosin và/hoặc bazơ hỗn hợp (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

"Liều điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu" của chế phẩm như được mô tả ở đây là lượng ngăn ngừa, làm giảm bớt, làm dịu, hoặc làm giảm nhẹ mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của bệnh và rối loạn bị gây ra bởi nguồn kháng nguyên đã chọn để chủng ngừa (ví dụ, virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, hoặc tế bào ung thư).

Thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ polypeptit được mã hóa bằng gen globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó mà liên kết đặc hiệu và nhận biết kháng nguyên. Các trình tự globulin miễn dịch bao gồm các trình tự của vùng hằng định kapa, lambda, alpha, gama, delta, epsilon và mu, cũng như vô số trình tự của vùng biến đổi globulin miễn dịch. Các chuỗi nhẹ được phân loại là kapa hoặc lamda. Các chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, mà lại xác định các lớp globulin miễn dịch lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE.

Tế bào T dùng để chỉ lớp lympho bào cụ thể trình diện thụ thể đặc hiệu (thụ thể tế bào T) được mã hóa bởi một họ gen. Các gen thụ thể tế bào T được nhận biết bao gồm locut alpha, beta, delta, và gama, và các thụ thể tế bào T này thường (nhưng không phải toàn bộ) nhận biết tổ hợp của MHC cộng với peptit ngắn. Tế bào T thường được phân loại rộng thành các tế bào T trợ giúp (CD4+) và các tế bào T gây độc tế bào (CD8+). Các kháng thể được sản sinh tự nhiên bởi các tế bào B, ví dụ, tế bào tiết kháng thể (ASC). Tế bào B trưởng thành có thể là tế bào B huyết tương, chưa từng tiếp xúc kháng nguyên (được hoạt hóa và sản sinh kháng thể), tế bào B nhớ, B-1, vùng rìa, tế bào B có nang, và tế bào B điều hòa.

Đáp ứng miễn dịch thích ứng dùng để chỉ sự nhận biết tế bào T và/hoặc tế bào B và/hoặc kháng thể của kháng nguyên.

Tế bào trình diện kháng nguyên (APC) là các tế bào có khả năng trình diện peptit sinh miễn dịch hoặc các mảnh của chúng cho tế bào T để hoạt hóa hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Các APC bao gồm tế bào đuôi gai, đại thực bào, tế bào B, bạch cầu đơn nhân và các tế bào khác mà có thể được thao tác di truyền thành các APC có hiệu lực. Các tế bào này có thể, nhưng không cần phải, được biến đổi di truyền để làm tăng khả năng trình diện kháng nguyên, để cải thiện sự hoạt hóa và/hoặc duy trì đáp ứng của tế bào T, để có tác dụng chống khối u tự thân và/hoặc có thể tương thích miễn dịch với đối tượng tiếp nhận (nghĩa là, haplotyp HLA được bắt cặp). APC có thể được phân lập từ bất kỳ trong số các nguồn khác nhau từ dịch sinh học và các cơ quan bao gồm tủy xương, máu ngoại vi, khối u và các mô quanh khối u, và có thể là tế bào tự thân, tế bào của cá thể khác trong cùng một loài, tế bào giống nhau về mặt di truyền hoặc tương thích về miễn dịch hoặc tế bào khác loại. APC thường sử dụng thụ thể từ locut tương thích mô chính (MHC) để trình diện polypeptit gắn cho tế bào T.

Chất bổ trợ là chất tăng cường đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Các chất bổ trợ thích hợp bao gồm, ví dụ, độc tố khuẩn tả, monophosphoryl lipid A (MPL), tá được hoàn thiện của Freund, tá được chưa hoàn thiện của Freund, Quil A, và Al(OH). Chất bổ trợ cũng có thể là các chất gây ra sự hoạt hóa APC và tăng cường sự trình diện của tế bào T thông qua các phân tử truyền tín hiệu thứ cấp như thụ thể giống Toll, ví dụ, ARN sợi kép (dsARN), chất giả dsARN, tiên mao của vi khuẩn, LPS, CpG ADN, và lipopeptit của vi khuẩn (Được xem xét mới đây trong tài liệu [Abreu et al., J Immunol, 174(8), 4453-4460 (2005)]).

Thuật ngữ "polypeptit", "peptit" và "protein" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây dùng để chỉ polyme của các axit amin. Các thuật ngữ này áp dụng cho các polyme của axit amin, trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là chất giả hóa học nhân tạo của axit amin có trong tự nhiên tương ứng, cũng như áp dụng cho polyme của axit amin có trong tự nhiên và polyme của axit amin không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "axit amin" dùng để chỉ axit amin tổng hợp và có trong tự nhiên, cũng như các chất tương tự axit amin và chất giả axit amin mà hoạt động theo cách thức tương tự với axit amin có trong tự nhiên. Axit amin có trong tự nhiên là các axit amin được mã hóa bởi mã di truyền, cũng như các axit amin được cải biến sau đó, ví dụ, hydroxyprolin, γ -carboxyglutamat, và O-phosphoserin. Các chất tương tự axit amin dùng để chỉ các hợp chất có cấu trúc hóa học cơ bản giống với axit amin có trong

tự nhiên, nghĩa là, cacbon được liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amin, và nhóm R, ví dụ, homoserin, norleuxin, methionin sulfoxit, methionin metyl sulfoni. Các chất tương tự này có các nhóm R được cải biến (ví dụ, norleuxin) hoặc các khung peptit được cải biến, nhưng giữ lại cấu trúc hóa học cơ bản giống với axit amin có trong tự nhiên. Chất giả axit amin dùng để chỉ hợp chất hóa học có cấu trúc khác với cấu trúc hóa học chung của axit amin, nhưng hoạt động theo cách thức tương tự với axit amin có trong tự nhiên.

Axit amin có thể được đề cập đến trong bản mô tả bằng các ký hiệu ba chữ cái đã biết thông thường của chúng hoặc bằng ký hiệu một chữ cái được đề nghị bởi Ủy ban danh pháp sinh hóa IUPAC-IUB. Tương tự, nucleotit có thể được đề cập đến bằng các mã một chữ cái được chấp nhận thông thường của chúng.

"Biến thể được biến đổi bảo tồn" áp dụng cho cả trình tự axit amin và trình tự axit nucleic. Đối với các trình tự axit nucleic cụ thể, các biến thể được biến đổi bảo tồn dùng để chỉ các axit nucleic mã hóa các trình tự axit amin giống nhau hoặc gần như giống nhau, hoặc khi axit nucleic này không mã hóa trình tự axit amin, biến thể được biến đổi bảo tồn dùng để chỉ các trình tự gần như giống nhau. Do sự thoái biến của mã di truyền, một số lượng lớn các axit nucleic giống nhau về chức năng sẽ mã hóa protein đã cho bất kỳ. Ví dụ, tất cả các codon GCA, GCC, GCG và GCU đều mã hóa axit amin alanin. Do đó, tại mọi vị trí mà ở đó alanin được xác định bởi codon, thì codon này có thể được biến đổi thành codon bất kỳ trong số các codon tương ứng được mô tả mà không làm biến đổi polypeptit được mã hóa. Các biến thể axit nucleic này là "các biến thể câm", là một loại trong số các biến thể được biến đổi bảo tồn. Mỗi trình tự axit nucleic ở đây mà mã hóa polypeptit cũng mô tả mỗi biến thể câm có thể có của axit nucleic này. Người có hiểu biết trung bình sẽ nhận ra rằng mỗi codon trong axit nucleic (ngoại trừ AUG, thường là codon duy nhất cho methionin, và TGG, thường là codon duy nhất cho tryptophan) có thể được cải biến để tạo ra phân tử giống về mặt chức năng. Do đó, mỗi biến thể câm của axit nucleic mà mã hóa polypeptit đều ẩn trong mỗi trình tự được mô tả.

Đối với các trình tự axit amin, người có hiểu biết trung bình sẽ nhận ra rằng từng đột biến thế, đột biến khuyết đoạn hoặc đột biến bổ sung đối với trình tự axit nucleic, peptit, polypeptit, hoặc protein mà làm biến đổi, bổ sung hoặc làm khuyết một axit amin duy nhất hoặc tỷ lệ phần trăm nhỏ các axit amin trong trình tự được mã hóa

là "biến thể được biến đổi bảo tồn" trong đó sự biến đổi này dẫn đến sự thay thế của axit amin bằng axit amin tương tự về mặt hóa học. Bảng đột biến thể bảo tồn cung cấp các axit amin tương tự về chức năng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các biến thể được biến đổi bảo tồn này là bổ sung vào và không loại trừ các biến thể đa hình, các dạng tương đồng giữa các loài khác nhau, và các alen theo sáng chế.

Tám nhóm sau đây, mỗi nhóm chứa các axit amin là các đột biến thể bảo tồn cho một axit amin khác: 1) Alanin (A), Glyxin (G); 2) Axit aspartic (D), Axit glutamic (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin I, Lysin (K); 5) Isoleuxin (I), Leuxin (L), Methionin (M), Valin (V); 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); 7) Serin (S), Threonin (T); và 8) Xystein (C), Methionin (M) (xem, ví dụ, Creighton, *Proteins* (1984)).

Cụm từ “lai chọn lọc (hoặc đặc hiệu) với” dùng để chỉ sự gắn kết, ghép cặp, hoặc lai các nucleotit bổ sung (hoặc bổ sung phần lớn) trong hỗn hợp phức tạp (ví dụ, toàn bộ ADN hoặc ARN trong thư viện hoặc tế bào).

Các polynucleotit có thể bao gồm trình tự tự nhiên (nghĩa là, trình tự nội sinh mã hóa polypeptit đơn lẻ hoặc dsARN hoặc một phần của chúng) hoặc có thể bao gồm biến thể của trình tự này. Các biến thể polynucleotit có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thể, đột biến bổ sung, đột biến khuyết đoạn và/hoặc đột biến xen đoạn sao cho ít nhất một hoạt tính sinh học của polypeptit được mã hóa (ví dụ, tính sinh miễn dịch) không bị giảm, so với polypeptit chứa các kháng nguyên tự nhiên. Các biến thể polynucleotit có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thể, đột biến bổ sung, đột biến khuyết đoạn và/hoặc đột biến xen đoạn sao cho hoạt tính hỗ trợ của dsARN được mã hóa không bị giảm, so với dsARN không chứa các đột biến thể, đột biến bổ sung, đột biến khuyết đoạn và/hoặc đột biến xen đoạn này. Tốt hơn, nếu các biến thể có tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự ít nhất là khoảng 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit tự nhiên hoặc một phần của nó hoặc dsARN.

Thuật ngữ “đồng nhất” hoặc tỷ lệ phần trăm “đồng nhất”, trong ngữ cảnh của hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit hoặc polypeptit, dùng để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con mà giống nhau hoặc có tỷ lệ phần trăm xác định các gốc axit amin hoặc nucleotit là giống nhau (nghĩa là, tỷ lệ phần trăm đồng nhất là 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,

hoặc cao hơn trên một vùng xác định), khi được so sánh và sắp xếp thẳng hàng để có sự tương ứng tối đa trên cửa sổ so sánh, hoặc vùng được chỉ định như được đo bằng cách sử dụng một trong các thuật toán so sánh trình tự sau đây hoặc bằng cách sắp xếp thẳng hàng thủ công và quan sát bằng mắt thường. Sau đó các trình tự này được mô tả là “gần như đồng nhất”. Định nghĩa này cũng đề cập tính bổ sung của trình tự polynucleotit thử nghiệm. Tùy ý, sự đồng nhất tồn tại trên vùng có chiều dài ít nhất là từ khoảng 10 đến khoảng 100, từ khoảng 20 đến khoảng 75, từ khoảng 30 đến khoảng 50 axit amin hoặc nucleotit.

Mẫu hoặc giá trị “đối chứng” dùng để chỉ mẫu đóng vai trò làm tham chiếu, thường là tham chiếu đã biết, để so sánh với mẫu thử nghiệm. Ví dụ, mẫu thử nghiệm có thể được lấy từ điều kiện thử nghiệm, ví dụ, khi có mặt của hợp chất thử nghiệm hoặc phép điều trị thử nghiệm, và được so sánh với các mẫu từ các điều kiện đã biết, ví dụ, khi không có mặt hợp chất thử nghiệm (đối chứng âm), hoặc khi có mặt hợp chất đã biết (đối chứng dương). Trong ngữ cảnh của sàng chế, ví dụ về đối chứng âm sẽ là mẫu sinh học từ cá thể khỏe mạnh (không bị nhiễm bệnh) đã biết, và ví dụ về đối chứng dương sẽ là mẫu sinh học từ bệnh nhân bị nhiễm bệnh đã biết. Đối chứng cũng có thể là giá trị trung bình hoặc khoảng thu được từ nhiều thử nghiệm hoặc kết quả. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng các đối chứng có thể được thiết kế để đánh giá các thông số bất kỳ. Ví dụ, đối chứng có thể được tạo ra để so sánh lợi ích điều trị bệnh dựa trên dữ liệu được lý (ví dụ, thời gian bán thải) hoặc các số liệu điều trị bệnh (ví dụ, so sánh lợi ích và/hoặc các tác dụng phụ). Các đối chứng có thể được thiết kế cho các ứng dụng in vitro. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được đối chứng nào có giá trị trong trường hợp nhất định và có thể phân tích dữ liệu dựa trên các so sánh với các giá trị đối chứng. Các đối chứng cũng có thể có giá trị trong việc xác định ý nghĩa của dữ liệu. Ví dụ, nếu các giá trị cho một thông số cụ thể là thay đổi nhiều ở các đối chứng, thì sự thay đổi ở các mẫu thử nghiệm không được xem là có ý nghĩa.

Thuật ngữ “chẩn đoán” dùng để chỉ xác xuất tương đối mà đối tượng mắc phải rối loạn như bệnh nhiễm trùng hoặc bệnh ung thư. Tương tự, thuật ngữ “tiền lượng” dùng để chỉ xác xuất tương đối mà kết quả nào đó trong tương lai có thể xuất hiện ở đối tượng. Các thuật ngữ này không được dự định dùng với nghĩa tuyệt đối, như sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực chẩn đoán y học.

Thuật ngữ “liệu pháp”, “phương pháp điều trị”, và “sự cải thiện” dùng để chỉ sự giảm bất kỳ mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng. Trong trường hợp bệnh nhiễm trùng, phương pháp điều trị có thể dùng để chỉ việc làm giảm tác nhân gây nhiễm trùng, giảm các triệu chứng, v.v.. Trong trường hợp điều trị bệnh ung thư, việc điều trị có thể dùng để chỉ, ví dụ, việc làm giảm kích thước khối u, số lượng các tế bào ung thư, tốc độ phát triển, hoạt tính di căn, làm giảm sự chết tế bào của các tế bào không ung thư, v.v.. Các thuật ngữ “điều trị” và “phòng ngừa” không được dự định là các thuật ngữ tuyệt đối. Việc điều trị và phòng ngừa có thể dùng để chỉ sự giảm tương đối hoặc sự vắng mặt rõ ràng của tác nhân gây nhiễm, sự chậm khởi phát bệnh, sự cải thiện các triệu chứng, sự cải thiện khả năng sống của bệnh nhân, sự tăng thời gian hoặc tỷ lệ sống sót, v.v.. Việc điều trị và phòng ngừa có thể là hoàn toàn (các mức nồng độ tác nhân gây nhiễm hoặc tế bào khối u là không thể phát hiện được) hoặc một phần, sao cho tác nhân gây nhiễm hoặc tế bào khối u được tìm thấy ở bệnh nhân ít hơn so với khi xảy ra mà không có các chất sinh học gây miễn dịch được mô tả này. Tác dụng điều trị bệnh có thể được so sánh với một cá thể hoặc tập hợp các cá thể không được điều trị, hoặc với cùng một bệnh nhân trước khi điều trị hoặc ở một thời điểm khác trong quá trình điều trị. Theo một số khía cạnh, mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm trùng hoặc bệnh được giảm đi ít nhất là 10%, so với, ví dụ, cá thể trước khi sử dụng hoặc cá thể đối chứng không trải qua điều trị. Theo một số khía cạnh, mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm trùng hoặc bệnh được giảm đi ít nhất là 25%, 50%, 75%, 80%, hoặc 90%, hoặc trong một số trường hợp, không còn phát hiện được nữa khi sử dụng các kỹ thuật chẩn đoán tiêu chuẩn.

“Đối tượng”, “bệnh nhân”, “cá thể” và các thuật ngữ tương tự được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ, trừ khi được chỉ rõ, động vật có vú như người và động vật linh trưởng không phải người, cũng như thỏ, chuột cống, chuột nhắt, dê, lợn, và các loài động vật có vú khác. Thuật ngữ này không nhất thiết chỉ ra rằng đối tượng đã được chẩn đoán mắc một bệnh cụ thể, nhưng thường dùng để chỉ cá thể đang được theo dõi y tế. Bệnh nhân có thể là cá thể đang tìm kiếm sự điều trị, theo dõi, điều chỉnh hoặc thay đổi chế độ điều trị bệnh hiện tại, v.v..

II. II. Chất sinh học gây miễn dịch

Chất sinh học gây miễn dịch là chất sinh học bất kỳ gây ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ, ví dụ, vật chủ người. Do đó, chất sinh học gây miễn dịch có thể là polypeptit

(ví dụ, glycoprotein, phosphoprotein, hoặc dạng được cải biến khác), hydrat cacbon, lipid, polynucleotit (ví dụ, cromatin, polynucleotit được metyl hóa, hoặc dạng được cải biến khác). Theo một số phương án, chất sinh học gây miễn dịch trực tiếp gây ra đáp ứng miễn dịch, ví dụ, tự nó là chất gây miễn dịch đích (kháng nguyên). Theo một số phương án, chất sinh học gây miễn dịch là polynucleotit mã hóa kháng nguyên đích. Ví dụ, khi polynucleotit mã hóa kháng nguyên đích được biểu hiện trong tế bào trình diện kháng nguyên (APC), đáp ứng miễn dịch tăng lên kháng lại kháng nguyên được biểu hiện này. Chất sinh học gây miễn dịch có thể được sử dụng một mình, kết hợp với chất sinh học gây miễn dịch thứ hai, thứ ba, và/hoặc thứ tư (ví dụ, trong trường hợp vaccin phòng ngừa nhiều đích), và/hoặc kết hợp với chất bổ trợ để làm tăng đáp ứng miễn dịch.

A. Vector biểu hiện

Vector biểu hiện để sử dụng như được mô tả ở đây có thể bao gồm vector có nguồn gốc từ virus, ví dụ, vector virus liên hợp adeno (AAV) tái tổ hợp, vector retrovirus, vector adenovirus, vector virus vaccinia Ankara cải biến (MVA), và vector lentivirus (ví dụ, có nguồn gốc từ HSV-1) (xem, ví dụ, Brouard et al. (2009) *British J. Pharm.* 157:153). Vector có nguồn gốc từ virus để sử dụng trong điều trị bệnh thường được làm cho không đủ khả năng sao chép hoặc giảm độc lực. Ví dụ, trong trường hợp vector adenovirus, hệ gen adenovirus có thể được cải biến để loại bỏ gen E1 và gen E3. Để sản xuất, vector khiếm khuyết về khả năng sao chép có thể được sử dụng cho tế bào biểu hiện gen E1 sao cho adenovirus tái tổ hợp (rAd) được sản xuất ra bởi tế bào. rAd này có thể được thu gom lại và được sử dụng cho một chu kỳ lây nhiễm duy nhất để phân phối chế phẩm chuyển gen vào một tế bào khác ở động vật có vú để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên polypeptit được mã hóa.

Các ví dụ về vector virus thích hợp bao gồm adenovirus 5, bao gồm, ví dụ, Ad5 có đột biến khuyết đoạn ở các vùng E1/E3 và Ad5 có đột biến khuyết đoạn ở vùng E4. Các vector adenovirus thích hợp khác bao gồm chủng 2, các chủng được thử nghiệm qua đường miệng 4 và 7, các adenovirus trong ruột 40 và 41, và các chủng khác (ví dụ, Ad34, Ad26, hoặc Ad35) mà thích hợp để phân phối kháng nguyên và gây ra đáp ứng miễn dịch thích ứng đối với kháng nguyên chuyển gen [Lubeck et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(17), 6763-6767 (1989); Shen et al., *J Virol*, 75(9), 4297-4307 (2001); Bailey et al., *Virology*, 202(2), 695-706 (1994)]. Vector virus không cần phải được

phân lập từ người, nhưng có thể được phân lập từ đối tượng không phải người như adenovirut của tinh tinh 3 (ChAd3) (xem, ví dụ, Colloca et al. (2012) *Sci. Transl. Med.* 4:115; Stanley et al. (2014) *Nat. Med.* doi:10.1038/nm.3702). Theo một số phương án, vectơ adenovirut là vectơ adenovirut sống, không đủ khả năng sao chép (như rAd5 được làm khuyết E1 và E3), vectơ adenovirut sống và được làm giảm độc lực (như virut khuyết đoạn E1B55K), hoặc vectơ adenovirut sống có khả năng sao chép kiểu đại.

Trình tự điều khiển phiên mã và dịch mã trong vectơ biểu hiện để sử dụng như được mô tả ở đây có thể được cung cấp bằng nguồn virut. Ví dụ, gen khởi đầu và yếu tố tăng cường thường được sử dụng có nguồn gốc từ, ví dụ, beta actin, adenovirut, virut khỉ (SV40), và cytomegalovirut người (CMV). Ví dụ, vectơ cho phép biểu hiện protein dưới sự định hướng của gen khởi đầu CMV, gen khởi đầu sớm SV40, gen khởi đầu muộn SV40, gen khởi đầu metallothionein, gen khởi đầu virut khối u ở vú chuột, gen khởi đầu virut xacôm Rous, gen khởi đầu tải nạp, hoặc các gen khởi đầu khác được chỉ ra là hữu hiệu để biểu hiện trong tế bào động vật có vú là thích hợp. Gen khởi đầu virut và không phải virut bổ sung, trình tự tín hiệu và/hoặc trình tự điều khiển có thể được sử dụng, với điều kiện là các trình tự điều khiển này là tương thích với tế bào chủ cần được chuyển nhiễm.

B. Chất kháng nguyên

Chất kháng nguyên để sử dụng như được mô tả ở đây có thể thu được từ các kháng nguyên, như, ví dụ, kháng nguyên virut, kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên ung thư, kháng nguyên nấm, hoặc kháng nguyên ký sinh trùng (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 8,222,224 về danh sách các kháng nguyên có thể được sử dụng như được mô tả ở đây).

Các ví dụ cụ thể về kháng nguyên có thể được sử dụng như được mô tả ở đây là các kháng nguyên thu được từ virut cúm (ví dụ, HA, NA, M1, NP), virut gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV, ví dụ, gag, pol, env, v.v.), virut papilloma ở người (HPV, ví dụ, protein vỏ như L1), virut gây bệnh viêm não ngựa Venezuelan (VEE), virut Epstein Barr, virut herpes simplex (HSV), virut herpes ở người, rhinovirut, cocksackievirut, enterovirut, virut gây bệnh viêm gan A, B, C, E, và G (HAV, HBV, HCV, HEV, HGV ví dụ, kháng nguyên bề mặt), virut quai bị, virut rubela, virut sởi, poliovirut, virut đậu mùa, virut bệnh dại, và virut Varicella-zoster.

Các kháng nguyên virus thích hợp còn bao gồm các protein virus không cấu trúc, ví dụ, protein được mã hóa bởi axit nucleic virus mà không mã hóa polypeptit cấu trúc, trái ngược với các protein tạo thành capsit hoặc protein bao quanh virus. Protein không cấu trúc bao gồm các protein thúc đẩy sự sao chép axit nucleic của virus, sự biểu hiện gen của virus, hoặc quá trình xử lý sau dịch mã, như, ví dụ, protein không cấu trúc 1, 2, 3, và 4 (NS1, NS2, NS3, và NS4, tương ứng) từ virus gây bệnh viêm não ngựa Venezuela (VEE), virus gây bệnh viêm não ngựa miền Đông (EEE), hoặc Semliki Forest.

Kháng nguyên vi khuẩn có thể thu được từ, ví dụ, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma* sp., *Legionella pneumophila*, *Rickettsia typhi*, *Chlamydia trachomatis*, và *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholera* (ví dụ, tiểu đơn vị B của độc tố phẩy khuẩn tả, pilus được cùng điều hòa bởi độc tố phẩy khuẩn tả (TCP)); *Helicobacter pylori* (ví dụ, VacA, CagA, NAP, Hsp, catalaza, ureaza); *E. coli* (ví dụ, độc tố ruột không bền với nhiệt, kháng nguyên bám dính).

Kháng nguyên ký sinh trùng có thể thu được từ, ví dụ, *Giardia lamblia*, *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp., *Trichomonas* sp., *Plasmodium* sp. (ví dụ, kháng nguyên protein bề mặt *P. falciparum* như pfs25, pfs28, pfs45, pfs84, pfs 48/45, pfs 230, Pvs25, và Pvs28); *Schistosoma* sp.; *Mycobacterium tuberculosis* (ví dụ, Ag85, MPT64, ESAT-6, CFP10, R8307, MTB-32 MTB-39, CSP, LSA-1, LSA-3, EXP1, SSP-2, SALSA, STARP, GLURP, MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4, MSP-5, MSP-8, MSP-9, AMA-1, protein màng nguyên vẹn tuýp 1, RESA, EBA-175, và DBA).

Kháng nguyên nấm có thể thu được từ, ví dụ, *Tinea pedis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea unguium*, *Cladosporium carionii*, *Coccidioides immitis*, *Candida* sp., *Aspergillus fumigatus*, và *Pneumocystis carinii*.

Kháng nguyên ung thư bao gồm, ví dụ, các kháng nguyên được biểu hiện hoặc được biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh

ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư da (ví dụ, u hắc tố), bệnh bạch cầu, hoặc u lympho. Kháng nguyên ung thư được lấy làm ví dụ bao gồm, ví dụ, HPV L1, HPV L2, HPV E1, HPV E2, phosphatase kiềm nhau thai, AFP, BRCA1, Her2/neu, CA 15-3, CA 19-9, CA-125, CEA, Hcg, chất hoạt hóa plasminogen loại urokinaza (Upa), chất ức chế hoạt hóa plasminogen, CD53, CD30, CD25, C5, CD11a, CD33, CD20, ErbB2, CTLA-4. Xem Sliwkowski & Mellman (2013) *Science* 341:6151 về các đích khác của bệnh ung thư.

C. Chất bổ trợ

Theo một số phương án, các chế phẩm còn chứa ít nhất một chất bổ trợ. Các chất bổ trợ thích hợp bao gồm, ví dụ, lipid và các hợp chất không phải lipid, độc tố phẩy khuẩn tả (CT), tiểu đơn vị B của CT, CTK63 thu được từ CT, độc tố ruột không bền với nhiệt của *E. coli* (LT), LTK63 thu được từ LT, $Al(OH)_3$, và axit hữu cơ polyion như được mô tả trong, ví dụ, WO2004/020592, Anderson và Crowle, *Infect. Immun.* 31(1):413-418 (1981), Roterman et al., *J. Physiol. Pharmacol.*, 44(3):213-32 (1993), Arora và Crowle, *J. Reticuloendothel.* 24(3):271-86 (1978), và Crowle và May, *Infect. Immun.* 38(3):932-7 (1982)). Các axit hữu cơ polyion thích hợp bao gồm, ví dụ, 6,6'-[axit 3,3'-demityl[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl]bis(azo)bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalen-disulfonic] (Xanh Evans) và 3,3'-[1,1' biphenyl]-4,4'-diylbis(azo)bis[axit 4-amino-1-naphthalensulfonic] (Đỏ Congo). Sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng axit hữu cơ polyion có thể được sử dụng cho phương pháp chủng ngừa dựa trên axit nucleic bất kỳ kết hợp với kiểu sử dụng bất kỳ.

Chất chủ vận TLR-3 (ví dụ, dsARN, và các chất mô phỏng của nó như polyI:C, poly A:U, và polyI:polyC) cũng có thể được sử dụng. Các chất chủ vận TLR-3 bao gồm, ví dụ, ARN kẹp tóc ngắn, ARN thu được từ virus, các đoạn ngắn của ARN mà có thể tạo thành sợi kép hoặc ARN kẹp tóc ngắn, và ARN can thiệp ngắn (sAiRN). Theo một số phương án, chất chủ vận TLR-3 là dsARN thu được từ virus, ví dụ, dsARN thu được từ virus Sindbis hoặc chất trung gian của virus dsARN (Alexopoulou et al. (2001) *Nature* 413:732). Theo một số phương án, chất chủ vận TLR-3 là ARN kẹp tóc ngắn. Trình tự ARN kẹp tóc ngắn thường chứa hai trình tự bổ sung được nối bằng trình tự liên kết. Trình tự liên kết cụ thể không phải là khía cạnh chính của sáng chế. Trình tự liên kết thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó không cản trở

sự liên kết của hai trình tự bổ sung để tạo ra dsARN. Chất chủ vận TLR-3 có thể dẫn đến sự giải phóng xytokin tiền viêm (ví dụ, IL-6, IL-8, TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-beta) khi được tiếp xúc với tế bào đáp ứng (ví dụ, tế bào đuôi gai, tế bào đơn nhân máu ngoại vi, hoặc đại thực bào) in vitro hoặc in-vivo.

Các chất bổ trợ thích hợp khác bao gồm chất điều biến miễn dịch khu trú như, các thành viên thuộc họ imidazoquinolin như, ví dụ, imiquimod và resiquimod (xem, ví dụ, Hengge et al., *Lancet Infect. Dis.* 1(3):189-98 (2001)).

Các chất bổ trợ thích hợp khác đã có trên thị trường như, ví dụ, chất bổ trợ dựa trên phen bổ sung (ví dụ, Alhydrogel, Rehydralgel, nhôm phosphat, Algammulin); chất bổ trợ dựa trên dầu (chất bổ trợ chưa hoàn thiện và chất bổ trợ hoàn thiện của Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), Specol, RIBI, TiterMax, Montanide ISA50 hoặc Seppic MONTANIDE ISA 720); chất bổ trợ dựa trên copolyme khối không ion, xytokin (ví dụ, GM-CSF hoặc phối tử Flat3); chất bổ trợ Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); các muối của canxi, sắt hoặc kẽm; huyền phù không tan chứa tyrosin được axyl hóa; đường được axyl hóa; polysacarit được tạo dẫn xuất cation hoặc anion; polyphosphazen; các vi cầu có thể phân hủy sinh học; monophosphoryl lipid A và Quil A. Xytokin, như GM-CSF hoặc interleukin-2, 7, hoặc 12, cũng là chất bổ trợ thích hợp. Hemoxyanin (ví dụ, hemoxyanin hà (keyhole limpet)) và hemoerythrin cũng có thể được sử dụng làm chất bổ trợ. Chất bổ trợ polysacarit như, ví dụ, chitin, chitosan, và chitin được khử axetyl hóa cũng thích hợp làm chất bổ trợ. Các chất bổ trợ thích hợp khác bao gồm các peptidoglycan vi khuẩn muramyl dipeptit (MDP, N axetylmuramyl L alanyl D isoglutamin) và các dẫn xuất của chúng (ví dụ, threonyl-MDP, và MTPPE). Khung thành tế bào (CWS) BCG và BCG có thể được sử dụng làm chất bổ trợ, có hoặc không có trehaloza dimycolat. Trehaloza dimycolat tự nó có thể được sử dụng một mình (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,579,945). Nội độc tố được giải độc cũng hữu ích để làm chất bổ trợ một mình hoặc kết hợp với các chất bổ trợ khác (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,866,034; 4,435,386; 4,505,899; 4,436,727; 4,436,728; 4,505,900; và 4,520,019). Các saponin QS21, QS17, QS7 cũng hữu ích làm chất bổ trợ (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,057,540; EP 0362 279; WO 96/33739; và WO 96/11711). Các chất bổ trợ thích hợp khác gồm Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, Calif., Mỹ), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), một loạt các chất bổ trợ SBAS

(Ví dụ, SBAS-2, SBAS-4 hoặc SBAS-6 hoặc các biến thể của chúng, có sẵn từ SmithKline Beecham, Rixensart, Bỉ), Detox (Corixa, Hamilton, Mont.), và RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.).

Siêu kháng nguyên cũng được dự kiến để sử dụng làm chất bổ trợ theo sáng chế. Các siêu kháng nguyên bao gồm exoprotein *Staphylococcus*, như độc tố ruột alpha, beta, gama và delta từ *S. aureus* và *S. epidermidis*, và ngoại độc tố alpha, beta, gama, và delta của *E. coli*. Các độc tố ruột *Staphylococcus* phổ biến đã được biết là độc tố ruột *staphylococcus* A (SEA) và độc tố ruột *staphylococcus* B (SEB), với độc tố ruột đến E (SEE) được mô tả (Rott et al., 1992). *Streptococcus pyogenes* B (SEB), độc tố ruột *Clostridium perfringens* (Bowness et al., 1992), protein liên hợp màng tế bào chất (CAP) từ *S. pyogenes* (Sato et al., 1994) và độc tố gây hội chứng sốc độc 1 (TSST 1) từ *S. aureus* (Schwab et al., 1993) cũng có thể được sử dụng.

Đối với các dược phẩm được đề xuất ở đây, (các) chất bổ trợ có thể được thiết kế để gây ra, ví dụ, đáp ứng miễn dịch chủ yếu thuộc typ Th1 hoặc Th2. Mức nồng độ cao của các cytokin typ Th1 (ví dụ, IFN-gama, TNF-alpha, IL-2 và IL-12) có xu hướng ưu tiên gây đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đối với kháng nguyên được sử dụng. Ngược lại, các mức nồng độ cao của các cytokin typ Th2 (ví dụ, IL-4, IL-5, IL-6 và IL-10) có xu hướng ưu tiên gây đáp ứng miễn dịch dịch thể. Sau khi phân phối qua đường miệng dược phẩm chứa polypeptit gây miễn dịch như được đề xuất ở đây, đáp ứng miễn dịch bao gồm các đáp ứng typ Th1 và Th2 thường sẽ được gây ra.

III. Hệ phân phối được gắn đích

Các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây để phân phối vào hồi tràng có thể dựa trên các lớp bao, chất nền, và dụng cụ thích hợp như được mô tả dưới đây.

A. Lớp bao tan trong ruột, chất nền và dụng cụ

Lớp bao tan trong ruột được sử dụng để bảo vệ các chất khỏi môi trường có độ pH thấp của dạ dày và trì hoãn sự giải phóng của chất được bao cho đến khi nó đến được đích mong muốn sau đó trong đường tiêu hóa. Các lớp bao tan trong ruột là đã biết và đã có trên thị trường. Các ví dụ bao gồm polyme nhạy với độ pH, polyme phân hủy sinh học, hydrogel, hệ giải phóng theo thời gian, và hệ phân phối thẩm thấu (xem, ví dụ, Chourasia & Jain (2003) *J. Pharm. Pharmaceutical Sci.* 6:33).

Độ pH của đường tiêu hóa (GIT) thay đổi từ rất axit trong dạ dày (độ pH ~2) đến trung tính hơn trong hồi tràng (độ pH ~ 5,8-7,0). Lớp bao nhạy với độ pH có thể được sử dụng, lớp bao này hòa tan trong hồi tràng hoặc ngay trước hồi tràng. Các ví dụ bao gồm polyme Eudragit® L và S (pH ngưỡng nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0); polyvinyl axetat phtalat (độ pH=5,0), hydroxypropyl metylxenluloza phtalat 50 và 55 (độ pH tương ứng bằng 5,2 và 5,4), và xenluloza axetat phtalat (độ pH=5,0). Thakral et al. (2013) *Expert Opin. Drug Deliv.* 10:131 xem xét các chế phẩm Euragit® để phân phối vào hồi tràng, cụ thể là, hỗn hợp của L và S đảm bảo sự phân phối ở độ pH≤7,0. Crotts et al. (2001) *Eur. J Pharm. Biol.* 51:71 mô tả các chế phẩm Eudragit® có các đặc tính phân rã thích hợp. Vijay et al. (2010) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21:2583 xem xét copolyme dựa trên axit acrylic (AA)-metyl metacrylat (MMA) để phân phối vào hồi tràng ở độ pH=6,8.

Để phân phối vào hồi tràng, lớp bao polyme thường hòa tan ở khoảng pH=6,8 và cho phép giải phóng hoàn toàn trong thời gian khoảng 40 phút (xem, ví dụ, Huyghebaert et al. (2005) *Int. J. Pharm.* 298:26). Để thực hiện việc này, dược chất có thể được bao trong các lớp gồm các màng bao khác nhau, ví dụ, nhờ đó lớp ngoài cùng bảo vệ chất đó qua các điều kiện pH thấp và được hòa tan khi viên nén rời khỏi dạ dày, và ít nhất một lớp bên trong hòa tan khi viên nén này đi vào môi trường có độ pH tăng lên. Các ví dụ về các màng bao được chia lớp để phân phối vào hồi tràng xa được mô tả, ví dụ, trong WO2013148258.

Polyme có thể phân hủy sinh học (ví dụ, pectin, azo polyme) thường dựa trên hoạt tính enzym của hệ vi sinh sống trong GIT. Hồi tràng chứa số lượng vi khuẩn lớn hơn so với các đoạn trước đó, bao gồm lactobacilli và vi khuẩn đường ruột.

Hệ phân phối qua đường miệng giải phóng kiểm soát bằng cơ chế thẩm thấu (OROS®; Alza) là một ví dụ về hệ thẩm thấu phân hủy theo thời gian trong điều kiện có nước. Các nguyên liệu này có thể được xử lý với các lớp bao khác, hoặc có độ dày thay đổi, để phân phối đặc hiệu vào hồi tràng (xem, ví dụ, Conley et al. (2006) *Curr. Med. Res. Opin.* 22:1879).

Polyme hỗn hợp để phân phối vào hồi tràng được báo cáo trong tài liệu WO2000062820. Các ví dụ bao gồm Eudragit® L100-55 (25 mg/ viên nang) với trietyl xitrat (2,4 mg/ viên nang), và Povidone K-25 (20 mg/ viên nén) sau đó là Eudragit® FS30D (30 mg/ viên nén). Polyme nhạy với độ pH có thể được ứng dụng để

phân phối hiệu quả vào hồi tràng, như được mô tả ở trên và, ví dụ, copolyme của axit metacrylic (ví dụ, poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1), xenluloza axetat phtalat, hydroxypropyl metylxenluloza phtalat, hydroxypropyl metylxenluloza axetat suxinat, polyvinyl axetat phtalat, xenluloza axetat trimelitat, carboxymetyl etyl-xenluloza, sen-lắc (shellac) hoặc (các) polyme thích hợp khác. Lớp bao cũng có thể chứa các polyme tạo màng nhạy với các thành phần trong lòng ruột khác ngoài độ pH, như sự phân hủy vi khuẩn hoặc thành phần có độ nhạy khi nó được trộn với một polyme tạo màng khác. Ví dụ về các thành phần tạo ra sự giải phóng chậm vào hồi tràng như vậy là các polyme chứa (các) liên kết azo, polysacarit như pectin và muối của nó, galactomannan, amyloza và chondroitin, polyme disulfua và glycosit.

Các thành phần có sự nhạy với độ pH thay đổi, nước, và enzym có thể được sử dụng kết hợp để gắn đích chế phẩm điều trị bệnh đến hồi tràng. Độ dày của lớp bao cũng có thể được sử dụng để kiểm soát sự giải phóng. Các thành phần này cũng có thể được sử dụng để tạo ra chất nền, trong đó chế phẩm điều trị bệnh được gắn vào. Xem tổng quát, *Frontiers in Drug Design & Discovery* (Bentham Science Pub. 2009) vol. 4.

B. Viên nang được kiểm soát bằng tần số hoặc phóng xạ

Một phương pháp khác để hòa tan các lớp bao và chất nền là sự phân phối đặc hiệu vị trí mà có thể qua các viên nang giải phóng nhờ vào tín hiệu được tạo ra bên ngoài. Các mô hình trước đây giải phóng đối với tín hiệu tần số cao (HF), như được bộc lộ trong Digenis et al. (1998) *Pharm. Sci. Tech. Today* 1:160. Ý tưởng về viên nang HF ban đầu đã được cập nhật và kết quả đã được bán ra thị trường là InteliSite®. Viên nang công nghệ mới là hệ phân phối không phân rã, được hoạt hóa bằng tần số phóng xạ. Việc đánh dấu phóng xạ viên nang cho phép xác định được vị trí viên nang trong vùng cụ thể của đường GI bằng kỹ thuật chụp xạ hình gama. Khi viên nang tiến đến vị trí mong muốn trong đường GI, sự hoạt hóa từ bên ngoài mở ra nhiều cánh cửa đi vào nguồn chứa được chất trong viên nang.

Theo một số phương án, chất sinh học gây miễn dịch có thể được bao trong viên nang được kiểm soát bằng phóng xạ, nhờ đó viên nang này được theo dõi và báo hiệu ngay khi nó tiến đến hồi tràng. Theo một số phương án, viên nang được báo hiệu tại một thời điểm nhất định sau khi sử dụng tương ứng với khi viên nang đó được dự kiến đã đến hồi tràng, được phát hiện hoặc không được phát hiện.

C. Chế phẩm

Dược phẩm có thể được sử dụng nhằm mục đích phòng ngừa và điều trị bệnh như được mô tả ở đây. Như được giải thích ở trên, dược phẩm có thể được bào chế để bảo vệ chống lại sự phân hủy trong dạ dày nhờ đó chất sinh học gây miễn dịch đã sử dụng đến được vị trí mong muốn. Phương pháp bao vi nang ADN và dược chất để phân phối qua đường miệng được mô tả, ví dụ, trong US2004043952.

Dược phẩm sinh miễn dịch có thể chứa muối dược dụng của chất sinh học gây miễn dịch (ví dụ, polypeptit sinh miễn dịch, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit sinh miễn dịch). Các muối này có thể được điều chế từ bazơ không độc dược dụng, bao gồm bazơ hữu cơ (ví dụ, muối của amin bậc một, bậc hai và bậc ba và axit amin bazơ) và bazơ vô cơ (ví dụ, muối natri, kali, lithi, amoni, canxi và magie). Một số ví dụ cụ thể về các muối này bao gồm nước muối đệm phosphat và nước muối (ví dụ, để tiêu hóa, phân phối qua đường mũi, hoặc tiêm).

Lớp bao giải phóng chậm hoặc lớp bao bổ sung của chế phẩm có thể chứa polyme tạo màng khác không nhạy với các điều kiện trong lòng ruột vì các lý do kỹ thuật hoặc để kiểm soát theo kiểu bấm giờ để giải phóng dược chất. Các nguyên liệu được sử dụng cho các mục đích này bao gồm, nhưng không giới hạn ở; đường, polyetylen glycol, polyvinylpyrrolidon, rượu polyvinyl, polyvinyl axetat, hydroxypropyl xenluloza, metylxenluloza, etylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, carboxymethylxenluloza natri và các nguyên liệu khác, được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp.

Các chất phụ gia như chất phân tán, chất tạo màu, chất màu, các polyme bổ sung, ví dụ, poly(etylacrylat, metylmetacrylat), chất chống dính và chất chống tạo bọt có thể được chứa trong lớp bao. Các hợp chất khác có thể được bổ sung vào để làm tăng độ dày của màng và để làm giảm sự khuếch tán của dịch vị có tính axit vào trong nguyên liệu lõi. Các lớp bao cũng có thể chứa các chất dẻo hóa dược dụng để đạt được các đặc tính cơ học mong muốn. Các chất dẻo hóa này là, ví dụ, nhưng không giới hạn ở; triaxetin, este của axit xitric, este của axit phtalic, dibutyl sebacat, rượu xetylic, polyetylen glycol, glyxerol monoeste, polysorbat hoặc các chất dẻo hóa khác và các hỗn hợp của chúng. Lượng chất dẻo hóa có thể được tối ưu hóa cho mỗi dạng bào chế, và liên quan đến (các) polyme được chọn, (các) chất dẻo hóa được chọn và lượng sử dụng của (các) polyme nêu trên.

Các thành phần dược phẩm thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế. Các chất mang thích hợp bao gồm, ví dụ, nước, nước muối, rượu, chất béo, sáp, dung dịch đậm, chất mang rắn, như manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, bột talc, xenluloza, glucoza, sucroza, và magie cacbonat, hoặc vi cầu có thể phân hủy sinh học (ví dụ, polylactat polyglycolat). Các vi cầu có thể phân hủy sinh học thích hợp được bộc lộ, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883. Polypeptit sinh miễn dịch và/hoặc vectơ biểu hiện chất mang có thể được bao nang trong vi cầu có thể phân hủy sinh học hoặc kết hợp với bề mặt của vi cầu này.

Các dược phẩm này cũng có thể chứa dung dịch đậm không sinh miễn dịch (ví dụ, nước muối đậm trung tính hoặc nước muối đậm phosphat), hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, mannoza, sucroza hoặc dextran), manitol, protein, polypeptit hoặc axit amin như glyxin, chất chống oxy hóa, chất kìm khuẩn, chất tạo chelat như EDTA hoặc glutathion, chất bổ trợ (ví dụ, nhôm hydroxit), chất tạo huyền phù, chất làm đặc và/hoặc chất bảo quản. Theo một cách khác, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng sản phẩm đông khô. Các hợp chất cũng có thể được bao nang trong lyposom bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết rõ.

IV. Đáp ứng miễn dịch và vacxin

Dược phẩm để phân phối vào hồi tràng như được mô tả ở đây được thiết kế để gây ra đáp ứng miễn dịch từ cá thể đặc hiệu với chất sinh học gây miễn dịch có trong dược phẩm. Dược phẩm này có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh dưới dạng vacxin để tránh hoặc làm giảm sự nhiễm virus, nhiễm vi khuẩn, nhiễm ký sinh trùng, nhiễm nấm, hoặc bệnh ung thư. Dược phẩm này có thể được sử dụng để điều trị ở giai đoạn bất kỳ, ví dụ, ở giai đoạn tiền ung thư, giai đoạn ung thư, hoặc giai đoạn di căn, hoặc để phòng ngừa bệnh hoặc sự lây nhiễm.

Ví dụ, các dược phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm trùng, như bệnh cúm, bệnh viêm gan, hoặc bệnh HIV, hoặc để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư. Trong các phương pháp này, các dược phẩm thường được sử dụng cho cá thể mà có thể mắc hoặc không mắc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng nhiễm trùng. Theo một số phương án, bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng nhiễm trùng được chẩn đoán trước khi sử dụng, ví dụ, bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn đã được chấp nhận chung trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, tình trạng nhiễm virus

có thể được chẩn đoán bằng phép đo hiệu giá virus trong mẫu lấy từ bệnh nhân, tình trạng nhiễm vi khuẩn có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện vi khuẩn trong mẫu lấy từ bệnh nhân, và bệnh ung thư có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện sự có mặt của khối u ác tính. Dược phẩm có thể được sử dụng trước hoặc sau khi phẫu thuật loại bỏ khối u nguyên phát và/hoặc sau khi điều trị như sử dụng liệu pháp phóng xạ hoặc thuốc hóa trị truyền thống.

Liệu pháp miễn dịch thường là liệu pháp miễn dịch chủ động, trong đó việc điều trị dựa vào sự kích thích in vivo hệ miễn dịch nội sinh của vật chủ để phản ứng chống lại, ví dụ, khối u hoặc tế bào nhiễm vi khuẩn hoặc virus, bằng cách sử dụng các chất cải biến đáp ứng miễn dịch (ví dụ, chất sinh học gây miễn dịch).

Tần số sử dụng chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh được mô tả ở đây, cũng như liều lượng, sẽ thay đổi giữa các cá thể, và có thể được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Thông thường, khoảng từ 1 đến 52 liều có thể được sử dụng trong khoảng thời gian 52 tuần. Theo một số phương án, 3 liều được sử dụng, ở khoảng cách 1 tháng, hoặc từ 2 đến 3 liều được sử dụng mỗi 2 đến 3 tháng một lần. Theo một số phương án, hỗn hợp chứa nhiều hơn một kháng nguyên có thể được sử dụng đồng thời hoặc lần lượt, ví dụ, vắc xin cúm hàng năm chứa các thành phần đơn lẻ được định hướng tại mỗi typ phụ của virus cúm hoặc nhiều nhánh trong một typ phụ. Theo một số phương án, khoảng cách thời gian thường là một lần một năm, ví dụ, vắc xin cúm hàng năm dựa trên chủng cụ thể hiện hành. Các lần chủng ngừa tăng cường có thể được thực hiện định kỳ sau đó. Các quy trình luân phiên có thể là thích hợp đối với từng bệnh nhân và các bệnh và rối loạn cụ thể.

Liều thích hợp là lượng chất sinh học gây miễn dịch mà, khi được sử dụng như được mô tả ở trên, có khả năng thúc đẩy, ví dụ, đáp ứng miễn dịch kháng khối u, kháng virus, hoặc kháng khuẩn, và cao hơn ít nhất từ 15 đến 50% so với mức cơ sở (không được điều trị), hoặc cao hơn ít nhất từ 5 đến 50% (ví dụ, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, gấp 1,5 lần, gấp 2 lần, hoặc hơn 2 lần) so với mức điều trị không được gắn đích hồi tràng. Đáp ứng này có thể được theo dõi bằng cách đo các kháng thể kháng khối u ở bệnh nhân hoặc bằng cách tạo ra theo cách phụ thuộc vắc xin tế bào T dung giải tế bào có khả năng diệt, ví dụ, tế bào khối u ở bệnh nhân, tế bào nhiễm virus ở bệnh nhân, hoặc tế bào nhiễm vi khuẩn ở bệnh nhân in vitro. Các vắc xin này cũng có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch dẫn đến các kết quả lâm sàng cải thiện (ví dụ, sống không có bệnh

tật hoàn toàn hoặc một phần hoặc lâu hơn, hiệu giá của virus giảm) ở bệnh nhân được chủng ngừa so với bệnh nhân không được chủng ngừa, hoặc bệnh nhân được điều trị không gắn đích hồi tràng.

Nói chung, liệu và phác đồ điều trị thích hợp cung cấp (các) hoạt chất với lượng đủ để tạo ra lợi ích điều trị và/hoặc phòng ngừa. Đáp ứng này có thể được theo dõi bằng cách xác định kết quả lâm sàng cải thiện (ví dụ, hiệu giá của virus giảm đi hoặc âm tính, sự thuyên giảm thường xuyên hơn, sống không có bệnh tật hoàn toàn hoặc một phần, hoặc lâu hơn) ở bệnh nhân được điều trị so với bệnh nhân được điều trị bằng phương pháp điều trị không gắn đích hồi tràng, hoặc bệnh nhân không được điều trị. Các đáp ứng miễn dịch này nói chung có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm tăng sinh, gây độc tế bào hoặc xytokin tiêu chuẩn được mô tả ở trên, mà có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các mẫu thu được từ bệnh nhân trước và sau khi điều trị.

Ví dụ, kỹ thuật phát hiện các phức hợp miễn dịch được tạo thành giữa polypeptit sinh miễn dịch và các kháng thể trong dịch thể đặc hiệu đối với polypeptit sinh miễn dịch này có thể được sử dụng để theo dõi hiệu quả của liệu pháp điều trị, ví dụ, đối với bệnh hoặc rối loạn trong đó polypeptit sinh miễn dịch này có liên quan. Các mẫu dịch thể được lấy từ cá thể trước và sau khi bắt đầu liệu pháp điều trị (ví dụ, liệu pháp điều trị gắn đích hồi tràng) có thể được phân tích về các phức hợp miễn dịch bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Nói ngắn gọn, số lượng phức hợp miễn dịch đã phát hiện trong cả hai mẫu được so sánh. Sự thay đổi đáng kể về số lượng các phức hợp miễn dịch trong mẫu thứ hai (sau liệu pháp điều trị gắn đích) so với mẫu thứ nhất (trước liệu pháp điều trị gắn đích) phản ánh liệu pháp điều trị thành công.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương pháp điều trị để phân phối các phân tử nhỏ vào ruột đã được biết, nhưng khả năng phân phối các phân tử sinh học lớn vào ruột để nhận biết miễn dịch chính xác chưa được hiểu rõ. Chuột nhất không có khả năng nuốt thuốc viên, vì thế khó có thể thực hiện các nghiên cứu với viên nén trong mô hình động vật. Ngoài ra, việc xác định vị trí tốt nhất để phân phối vector vacxin để gây ra đáp ứng với kháng nguyên gen chuyển chưa được mô tả ở người. Ở cừu, hồng tràng được chỉ ra là đích hiệu quả nhất để gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên gen chuyển được mã hóa nhờ adenovirus (Mutwari et al. (1999) Immunology 97:455). Ở đây các tác giả

sáng chế chỉ ra kết quả của một vài nghiên cứu ở người hoặc động vật linh trưởng không phải người với các dạng liều dùng qua đường miệng ở người được cải thiện để phân phối các chất sinh học.

Ví dụ 1

Để xác định vùng nào của ruột non là hoạt động nhất để gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên, các thử nghiệm được tiến hành ở người. Viên nang được kiểm soát bằng phóng xạ được sử dụng cho tình nguyện viên bình thường khỏe mạnh, với vacxin được giải phóng sớm trong ruột non (hỗng tràng) hoặc muộn hơn trong ruột non (hồi tràng). Việc sử dụng viên nang được kiểm soát bằng phóng xạ để phân phối các thuốc phân tử nhỏ đã được mô tả, nhưng không phải đối với việc phân phối vacxin (Digenis et al. (1991) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 7:309). (1991) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 7:309).

Vacxin này chứa adenovirut tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên virut cúm HA từ A/CA/04/2009 (rAd-HA-dsARN) (xem, ví dụ, US2012/0244185). Tổng số 10^{11} đơn vị lây nhiễm (IU) được sử dụng cho mỗi đối tượng vào ngày 0. Số lượng các tiền tế bào B huyết thanh tuần hoàn trong máu ngoại vi được đo bằng thử nghiệm tế bào tiết kháng thể (ASC) vào các ngày 0 và 7 sau khi sử dụng vacxin. Các kết quả chỉ đo số lượng các ASC nhận biết kháng nguyên HA.

Các kết quả cho thấy rằng các ASC có thể đo được ở thời điểm 7 ngày sau khi tạo miễn dịch trong mỗi nhóm được điều trị (Fig.1). Các đáp ứng trung bình trong nhóm được sử dụng liều trong hồi tràng cao hơn so với nhóm được sử dụng liều trong hỗng tràng. Các ASC cơ sở vào ngày 0 là không đáng kể. Đối với hồi tràng, đáp ứng trung bình bằng 340 ± 111 (sai số chuẩn) ASC IgG và 74 ± 18 ASC IgA được quan sát vào ngày 7. Đối với hỗng tràng, đáp ứng trung bình và đáp ứng sai số chuẩn là 118 ± 30 ASC IgG và 28 ± 8 ASC IgA. Nhóm hồi tràng khác đáng kể so với nhóm giả được ($P=0,03$ vào ngày 7 đối với ASC IgA, và có xu hướng cao hơn đối với ASC IgG $p=0,07$). Trái ngược với các kết quả ở cừu, kết quả ở người chỉ ra rằng việc phân phối trong hồi tràng là hiệu quả hơn trong việc gây ra đáp ứng kháng thể IgG hoặc IgA so với việc phân phối trong hỗng tràng.

Đáp ứng tế bào T cũng được xác định bằng cách phát hiện sự giải phóng interferon- γ (IFN- γ) bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISPOT®. Fig.2 cho thấy rằng 12/12 đối tượng trong nhóm sử dụng liều trong hồi tràng có mức IFN- γ tăng so với

8/12 đối tượng trong nhóm sử dụng liều trong hồng tràng 7 ngày sau khi sử dụng. Ngoài ra, các mức IFN- γ trong nhóm sử dụng liều trong hồi tràng cao hơn đáng kể so với nhóm được sử dụng liều trong hồng tràng.

Hiệu giá của kháng thể vi trung hòa (MN) đối với virus cúm A/CA/07/2009 được đo. Các mức kháng thể MN tăng là dấu hiệu của đáp ứng kháng thể trung hòa. Sau khi loại trừ các đối tượng có đáp ứng kháng thể trung hòa ban đầu cao hơn 40 (Faix et al. (2012) PloS One 7:e34581), số lần tăng hiệu giá MN được lập đồ thị đối với từng đối tượng. Số lượng các đối tượng có mức tăng dương là 9 trong số 10 đối tượng đối với vacxin phân phối trong hồi tràng so với 6 trong số 10 đối tượng đối với vacxin phân phối trong hồng tràng (Fig.3). Hiệu giá trung bình nhân (GMT) là tương tự giữa hai nhóm, trong đó GMT hồi tràng tăng từ 22 đến 92 so với GMT hồng tràng tăng từ 18 đến 90. Các kết quả chỉ ra rằng sự giải phóng trong hồi tràng có thể đáng tin cậy hơn trong việc gây ra đáp ứng kháng thể trung hòa đối với virus cúm, có thể dẫn đến tỷ lệ phần trăm các đối tượng được bảo vệ chống lại bệnh cúm cao hơn.

Ví dụ 2

Các viên nén được làm bằng tay bằng cách sử dụng xenluloza vi tinh thể (PH-101, FMC) và tinh bột (Starch 1500, Colorcon) kết hợp bari sulfat 10% làm vật liệu chắn bức xạ chứa muối silic làm chất trợ chảy và magie stearat làm chất bôi trơn viên nén. Các viên nén có đường kính 7,14mm và khối lượng 150mg được bao bằng Eudragit® L-100 trong máy bao dạng chảo bằng cách sử dụng một lượng làm tăng thêm 10% tổng lượng chất rắn, đây là chỉ dẫn về việc lớp bao tan trong ruột đã được bổ sung vào hay chưa; các chất rắn bao chứa 4 phần polyme Eudragit® so với một phần trietyl xitrat và 1 phần bột talc. Thử nghiệm ban đầu về hiệu quả của lớp bao tan trong ruột là bốn con khỉ cynomolgus macaques được cho sử dụng viên nén bằng cách dùng ống thông từ miệng xuống dạ dày. Ống thông miệng dạ dày là rắn và cứng, nhưng phần giữa lỏng xuống để dẫn truyền chất lỏng. Nó có ống silicon mềm trên đầu dẫn của ống cứng mà có thể giữ viên nén nhỏ tại chỗ. Ống và thiết bị chứa viên thuốc được lách xuống thực quản của các con khỉ bị giữ cho đến khi đầu dẫn xuyên qua cơ vòng tim và vào trong dạ dày. Việc xối nước cam được sử dụng để đẩy viên thuốc vào trong dạ dày. Tia X được chụp ở các thời điểm đã định, và được kiểm tra về vị trí và sự hòa tan của viên nén. Bảng 1 tổng kết các kết quả.

Bảng 1: Hiệu quả lớp bao L-100				
Động vật	Thời gian và vị trí viên thuốc			
	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ
1	dạ dày	dạ dày	dạ dày	ruột
2	dạ dày	ruột	ruột	hòa tan
3	ruột	ruột	hòa tan	hòa tan
4	dạ dày	dạ dày	ruột	hòa tan

Fig.4 cho thấy rằng các viên nén còn nguyên vẹn hoàn toàn trong môi trường có độ pH thấp của dạ dày; không có bằng chứng nào về sự hòa tan sớm của các viên nén này. Mặc dù có kích thước lớn đối với khí, nhưng các viên nén có thể đi qua dạ dày vào trong ruột mà vẫn nguyên vẹn. Trong ruột, chúng hòa tan ở tốc độ hợp lý và hòa tan hoàn toàn ở 3 trong số 4 con khí. Với con khí thứ 4, viên thuốc rời khỏi dạ dày ở thời điểm nào đó sau 3 giờ và viên thuốc này không hòa tan ở thời điểm chụp tia X lần cuối. Nhìn chung, các viên nén hoạt động theo cách có thể chấp nhận được và lớp bao Eudragit® L-100 được lựa chọn cho các nghiên cứu trong tương lai ở người.

Ví dụ 3

Nghiên cứu lâm sàng pha 1, được kết nạp tuần tự, với đoàn hệ được chọn ngẫu nhiên và có đối chứng giả được để đánh giá độ an toàn, và khả năng sinh miễn dịch của vacxin dùng qua đường miệng dựa trên typ huyết thanh 5 Ad tái tổ hợp (rAd5) chống lại virus gây bệnh cúm mùa H1 được hoàn thành. Vector rAd5 (rAd-HA-dsARN với HA từ A/CA/04/2009) được mô tả trong ví dụ 1. Nghiên cứu này có pha hoạt động là khoảng 3 tháng, và được tiến hành theo các hướng dẫn Thực hành tốt lâm sàng áp dụng được, Bộ quy chế liên bang Hoa Kỳ, và hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm. Sự đồng ý sau khi được giải thích đạt được từ tất cả các đối tượng sau khi thảo luận về các nguy cơ. Sự phê chuẩn IRB được đưa ra trước khi sử dụng liều cho các đối tượng.

rAd-HA-dsARN đạt cấp độ thực hành tốt sản xuất thuốc (GMP) được sản xuất trong các túi Wave® (GE Healthcare, Waukesha, WI) tại Lonza Biologicals (Houston, TX). Việc tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sau đó là trao đổi dung dịch đệm. Vector đã tinh chế được trộn với các tá dược, được làm đông khô, và sau đó được tạo viên nén tại Lonza bằng cách sử dụng xenluloza vi tinh thể và tinh bột làm chất độn tạo viên nén. Các viên nén được bao tan trong ruột bằng Eudragit® L 100 (Evonik Industries, Darmstadt, Đức) bằng cách sử dụng máy

bao Vector HiCoater® LDCS-5 (Vector Freund, Cedar Rapids, IA). Thành phẩm được xuất xưởng trong một lô, và được chuẩn độ bằng thử nghiệm IU tiêu chuẩn. Giả dược được bào chế thành các viên nén có hình dạng và kích cỡ tương tự chứa 150mg xenluloza vi tinh thể, mà không có lớp bao tan trong ruột. Nghiên cứu này so sánh các đối tượng được điều trị bằng 10^9 IU, 10^{10} IU, và giả dược về khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch đối với gen chuyển. Các đối tượng được cho sử dụng các viên nén vào ngày 0 và 28.

Số lượng các tiền tế bào B huyết tương tuần hoàn trong máu ngoại vi được đo bằng các thử nghiệm ASC vào ngày 0 và 7 sau liều ban đầu, và vào ngày 28 và 35 sau liều thứ hai (liều thứ hai được phân phối vào ngày 28). Các kết quả cho thấy rằng số lượng ASC có thể đo được vào thời điểm 7 ngày sau mỗi lần gây miễn dịch trong các nhóm được điều trị, nhưng không phải ở nhóm giả dược (Fig.5). Các đáp ứng trung bình là cao hơn vào ngày 7, và cao hơn trong nhóm liều cao so với nhóm liều thấp. Các giá trị ASC cơ sở vào các ngày 0 và 28 là không đáng kể, và không đáng kể đối với nhóm giả dược tại tất cả các thời điểm. Đối với nhóm liều cao, giá trị ASC trung bình bằng 105 ± 33 và 27 ± 12 được phát hiện lần lượt vào các ngày 7 và 35. Đối với nhóm liều thấp, các giá trị ASC trung bình bằng 41 ± 32 và 14 ± 8 lần lượt vào các ngày 7 và 35. Nhóm giả dược có giá trị trung bình bằng $0,3 \pm 0,3$ và 0, lần lượt vào các ngày 7 và 35. Nhóm liều cao là cao hơn đáng kể so với nhóm giả dược ($P=0,01$ và $0,05$ lần lượt với các ngày 7 và 35).

Đáp ứng kháng thể trung hòa đối với virus cúm được đo bằng thử nghiệm MN. Các kết quả thể hiện sự tăng theo cách phụ thuộc liều của hiệu giá MN trong các nhóm được điều trị so với đối chứng giả dược (Fig.6). Tần số của đối tượng đáp ứng MN có mức tăng ít nhất 2 lần trong nhóm liều cao khác biệt có ý nghĩa so với nhóm giả dược ($P=0,003$ bởi kiểm thử chính xác Fisher), trong khi đó nhóm liều thấp có xu hướng cao hơn, nhưng không cao hơn có ý nghĩa so với nhóm giả dược ($P=0,2$). Sau khi loại bỏ các đối tượng có hiệu giá MN lớn hơn 40, hiệu giá trung bình nhân (GMT) được tính toán ở các đối tượng còn lại (Bảng 2). Đáp ứng hiệu giá gấp hình học (Geometric Fold Titer Response - GMFR) ngày 56 cũng được tính toán (Bảng 2). Các kết quả cho thấy rằng hiệu giá kháng thể trung hòa đối với virus cúm đang được tạo ra bằng cách gây miễn dịch qua đường miệng, với mức tăng GMT lớn hơn 3 lần sau khi

gây miễn dịch trong nhóm liều cao. Các kết quả cho thấy rằng viên nén được bao L 100 có thể được sử dụng để phân phối vacxin vào ruột.

Bảng 2: Các thay đổi GMT ở hiệu giá MN đối với các đối tượng có MN ≤ 40					
Nhóm	N	GMT D0	GMT D28	GMT D56	GMFR
Giả được	8	14,1	14,1	14,1	1
Liều thấp	10	12,3	14,1	16,2	1,3
Liều cao	7	15,6	36,2	53,8	3,4

Ví dụ 4

[0001] Các tác giả sáng chế đã kiểm tra các tham số đối với lớp bao tan trong ruột in vitro để xác định các thời điểm hòa tan theo sự thay đổi độ pH và tỷ lệ phần trăm lớp bao. Số liệu này sẽ cung cấp các hướng dẫn để phân phối tới hồi tràng sau khi tiếp xúc với dịch vị ở độ pH thấp (như ở trong dạ dày) và sau đó đi qua vùng có gradien pH tăng lên (như được phát hiện thấy ở trong tá tràng và hồi tràng) trước khi đến được hồi tràng.

Sự phân rã của viên nén được kiểm tra đối với viên nén 150mg được bào chế như được mô tả ở trên, và được bao bằng một lượng làm tăng thêm 8, 10, hoặc 12% tổng lượng chất rắn, bằng cách sử dụng Eudragit® L100, Eudragit® L100-55, hoặc hỗn hợp tỷ lệ 1:1 (khối lượng/khối lượng) của polyme L100 và L100-55, được phủ dưới dạng huyền phù chứa dung môi hữu cơ. Lặp lại hai lần, các viên nén đã được bào chế với mỗi polyme bao, và ở mỗi mức độ phủ lớp bao, được cho tiếp xúc trước với dịch vị mô phỏng theo USP (SGF, độ pH=1,6, không có pepsin) trong thời gian 120 phút trong thiết bị thử nghiệm độ tan bằng xylanh chuyển động tịnh tiến VanKel Bio-Dis III ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ chuyển động qua lại là 10 lần nhúng mỗi phút (DPM). Sau đó, các viên nén được chuyển vào dịch ruột mô phỏng theo USP (SIF, độ pH=6,8, không có pancreatin). Các viên nén được quan sát về độ phân rã và thời gian phân rã hoàn toàn của cả hai viên nén được ghi lại đến 5 phút gần nhất. Số liệu chỉ ra rằng thời gian phân rã bị ảnh hưởng bởi cả thành phần và độ dày của polyme và cung cấp hướng dẫn liên quan đến việc lựa chọn đúng thành phần bao ảnh hưởng đến tính chất của lớp bao sau khi viên nén ra khỏi dạ dày.

Polyme bao	Thời gian phân rã ở mức độ bao được chỉ ra (phút)		
	8%	10%	12%
L100	20	30	45
L100/L100-55	15	20	30

L100-55	10	20	25
---------	----	----	----

Ảnh hưởng của độ pH đối với thời gian phân rã được thử nghiệm đối với các viên nén 150mg, được bao đến một lượng làm tăng 10% tổng lượng chất rắn với Eudragit® L100 hoặc Eudragit® L100-55. Một loạt các dung dịch đệm được điều chế bằng cách điều chỉnh độ pH của USP SIF (không có pancreatin) đến các giá trị bao hàm mô tả USP là 6,8. Các viên nén được cho tiếp xúc trước với USP SGF (không có pepsin) trong thời gian 120 phút ở nhiệt độ 37°C và 10 DPM, tiếp đó được chuyển vào dung dịch USP SIF đã được cải biến độ pH. Các viên nén được quan sát về độ phân rã và thời gian để phân rã hoàn toàn được ghi lại đến 5 phút gần nhất. Số liệu chỉ ra rằng tốc độ phân rã bị ảnh hưởng bởi độ pH môi trường và khác nhau giữa hai polyme. Các kết quả này lại có thể được sử dụng để lựa chọn thích hợp thành phần bao để thực hiện việc lưu giữ thuốc qua dạ dày và ruột non phía trên.

Độ pH của SIF	Thời gian đến khi phân rã đối với polyme ở độ pH (phút)	
	Eudragit L100	Eudragit L100-55
5,4	250	145
6	110	60
6,4	55	45
7	30	20

Ví dụ 5

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu pha 1, được kết nạp tuần tự, với đoàn hệ được chọn ngẫu nhiên và có đối chứng bằng giả dược để đánh giá độ an toàn, và khả năng gây miễn dịch của vaccin dùng qua đường miệng dựa trên typ huyết thanh 5 Ad tái tổ hợp (rAd5) chống lại virus cúm mùa H1. Các viên nén chứa vaccin được bao như được mô tả ở đây để hòa tan trong hồi tràng. Số liệu cho thấy rằng vaccin dạng viên nén dùng qua đường miệng là tương đương với các vaccin hiện có về tác dụng gây ra đáp ứng kháng thể trung hòa đối với virus cúm.

Các đáp ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) được đo vào ngày 0 và 28 (Fig.7A). Không có đối tượng được điều trị bằng giả dược nào chuyển hóa huyết thanh, nhưng một đối tượng được điều trị bằng giả dược trượt khỏi sàng lọc và có giá trị ngày 0 cao. Không có đối tượng được điều trị bằng vaccin nào có hiệu giá HAI ban đầu > 20. Sau khi gây miễn dịch, chín đối tượng trong nhóm được điều trị bằng vaccin đạt mức bảo vệ huyết thanh ($HAI \geq 40$) (Fig.7A). Hiệu giá trung bình nhân (GMT) đối

với nhóm này là 61,1 (95% CI: 30 - 124), số lần tăng trung bình nhân (Geometric mean fold rise: GMFR) là 7,7 lần so với GMT ban đầu là 7,9 (95% CI: 6 - 11). Trong số mười một đối tượng tăng gấp 4 lần (92%), chín đối tượng chuyển hóa huyết thanh (SC) với 2 đối tượng còn lại thể hiện mức tăng gấp 4 lần về hiệu giá HAI từ 5 lên 20. Nhóm điều trị bằng vaccin có mức tăng có ý nghĩa thống kê về số lượng đối tượng đáp ứng gấp 4 lần so với nhóm điều trị bằng giả dược (11 so với 0, với $P < 0,0000$ bởi kiểm thử chính xác Fisher). Đối tượng được điều trị bằng giả dược có GMT bằng 11,9 (95% CI: 6 - 25) vào ngày 28 so với GMT bằng 11,0 vào ngày 0 (95% CI: 5 - 23).

Độ bền của đáp ứng kháng thể được đo bằng cách đánh giá đáp ứng HAI 180 ngày sau khi gây miễn dịch. Trong nhóm được gây miễn dịch bằng vaccin, 75% (9 trong số 12) các đối tượng được bảo vệ huyết thanh vào ngày 28 và 75% (9 trong số 12) vẫn được bảo vệ huyết thanh vào ngày 180. HAI GMT được lập đồ thị (Fig.7B), và sự giảm GMT được phát hiện ra là 28% trong thời gian từ 28 đến 180 ngày sau khi gây miễn dịch.

Đáp ứng kháng thể trung hòa đối với virus cúm được đo bằng thử nghiệm MN. Sự tăng đáng kể hiệu giá MN ở nhóm được điều trị so với đối chứng giả dược được quan sát (Fig.7C). Tần số của các đối tượng đáp ứng MN gấp 4 lần ở nhóm được điều trị bằng vaccin là khác biệt có ý nghĩa so với nhóm được điều trị bằng giả dược, với 11 đối tượng đáp ứng ở nhóm được điều trị bằng vaccin so với 0 ở nhóm được điều trị bằng giả dược ($P < 0,0000$ theo kiểm thử chính xác Fisher).

Sau khi loại bỏ các đối tượng có hiệu giá MN (và hiệu giá HAI) đường cơ sở lớn hơn 40, thì hiệu giá trung bình nhân (GMT) được tính ở các đối tượng còn lại vào ngày 0 và 28 như được thể hiện trong bảng dưới đây. GMT đối với nhóm được điều trị bằng vaccin tăng lên đến 247 (95 CI: 89-685) so với không có sự gia tăng ở nhóm được điều trị bằng giả dược đối với GMT trong ngày 28 là 9,6 (95 CI: 5-18). Các tính toán này không gây ảnh hưởng gì đến nhóm được điều trị bằng vaccin, do không đối tượng nào có hiệu giá MN hoặc HAI ban đầu cao. Các kết quả này cho thấy rằng hiệu giá kháng thể trung hòa đối với virus cúm được tạo ra bằng cách gây miễn dịch qua đường miệng, với mức tăng GMT lớn hơn 20 lần sau khi gây miễn dịch trong nhóm được điều trị bằng vaccin.

THỬ NGHIỆM	NHÓM	N	GMT D0	GMT D28	GMFR	SC
HAI	Giả dược	11	8,3	8,8	1,1	0%
	Vaccin	12	7,9	61,1	7,7	75%

MN	Giả dược	9	9,3	9,6	1,0	N/A
	Vacxin	12	8,6	247	29	N/A

Để đo các đáp ứng kháng thể toàn phần đối với HA, thì số lượng các tiền tế bào B huyết tương tuần hoàn trong máu ngoại vi được đo bằng thử nghiệm ASC vào các ngày 0 và 7 sau khi gây miễn dịch. Các kết quả cho thấy rằng các ASC có thể đo được một cách đáng tin cậy vào ngày 7 ở nhóm được điều trị bằng vacxin (Fig.7D). Các ASC cơ sở thường không đáng kể vào ngày 0. Đối với nhóm được điều trị bằng vacxin, giá trị trung bình là 992 (+/- sai số chuẩn 209, 95% CI: 532-1452) IgG ASC và 337 IgA ASC (+/- sai số chuẩn 104, 95% CI: 117-580) trên mỗi 1×10^6 PBMC được phát hiện ra vào ngày 7, với duy nhất một đối tượng trong số 12 đối tượng có đáp ứng ASC không phát hiện được. Nhóm được điều trị bằng giả dược không có đốm IgA vào ngày 7, nhưng một đối tượng có vết nền cao và đáp ứng IgG ASC đo được với các đốm nhỏ hơn so với được quan sát bình thường. Nhóm được điều trị này khác biệt có ý nghĩa so với nhóm điều trị bằng giả dược về khả năng gây ra đáp ứng IgG hoặc IgA ASC vào ngày 7 ($P=0,0007$ và $P=0,008$ tương ứng bằng kiểm thử T).

Các đối tượng được đánh giá hồi cứu đối với hiệu giá kháng vector của chúng trước và sau khi gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch qua đường miệng, một vài đối tượng được điều trị bằng vacxin có sự tăng đáp ứng kháng thể trung hòa đối với Ad5, dẫn đến sự tăng hiệu giá kháng thể trung hòa GM gấp 2,6 lần, so với số lần tăng GM gấp 1,0 lần ở các đối tượng được điều trị bằng giả dược. Trong nhóm điều trị bằng vacxin, các đáp ứng HAI và MN có xu hướng tương tự đối với từng đối tượng. Tám đối tượng âm tính với Ad5 trước khi gây miễn dịch, và bốn đối tượng dương tính với Ad5 trước khi gây miễn dịch. Một đối tượng dương tính với Ad5 không chuyển hóa huyết thanh HAI, tuy nhiên, một đối tượng dương tính với Ad5 có mức tăng hiệu giá HAI cao nhất (64 lần) trong số bất kỳ trong số các đối tượng trong nghiên cứu. Cũng đối tượng này có sự tăng hiệu giá MN gấp 362 lần mà không tăng hiệu giá kháng thể trung hòa Ad5 trước và sau khi gây miễn dịch. Không quan sát thấy mối tương quan giữa các hiệu giá Ad5 ban đầu với số lần tăng đáp ứng MN (hoặc đáp ứng HAI) đối với các đối tượng được gây miễn dịch bằng vacxin dạng viên nén.

Hơn nữa, vacxin dạng viên nén được bộc lộ ở đây là ổn định ở nhiệt độ phòng trong thời gian hơn 270 ngày và có thể chịu được các điều kiện ngoài trời trong thời gian ngắn ở nhiệt độ cao hơn, làm cho hướng tiếp cận này khả thi hơn về mặt kỹ thuật.

Ví dụ 5 Thảo luận

Quân đội Mỹ đã tiến hành một nghiên cứu độc lập để đo các tác dụng của các chiến dịch vaccin theo mùa của họ đối với các đáp ứng kháng thể trung hòa ở các quân nhân, và đã báo cáo GMFR hiệu giá MN bằng 5,6 sau khi tiêm vaccin bất hoạt ba giá (TIV) và GMFR bằng 2,2 sau khi sử dụng trong mũi vaccin cúm sống đã giảm độc lực (LAIV), sau khi tính đến các đối tượng có hiệu giá MN cao hơn 40 để bắt đầu (Faix et al. (2012) *PloS one* 7:e34581). Trong một nghiên cứu khác, tỷ lệ SC so với H1N1 được phát hiện ra là 45% cho một lần tiêm 45ug protein HA (không có chất bổ trợ) (Gordon et al. (2012) *Vaccine* 30:5407), trong khi trong một nghiên cứu khác, vaccin H1N1 có khả năng gây miễn dịch cao với tỷ lệ SC là 78% được quan sát thấy sau 1 liều vaccin tách (Greenberg et al. (2009) 361:2405).

Ngược lại với các kết quả dao động được quan sát thấy với vaccin tiêm, trong nghiên cứu này, MN GMFR được tính ở 29 đối với 12 đối tượng được điều trị bằng vaccin với 92% các đối tượng thể hiện sự tăng hiệu giá MN nhiều hơn 4 lần. Trong nghiên cứu về viên nén này, tỷ lệ HAI SC trong số các đối tượng được điều trị bằng vaccin là 75% với trên 92% các đối tượng có sự tăng hiệu giá HAI gấp 4 lần (Fig.7A). Hiệu giá MN cao hơn so với hiệu giá HAI. Có thể là thử nghiệm MN nhạy hơn hoặc vaccin dựa trên rAd dùng qua đường miệng gây ra các đáp ứng trung hòa phía ngoài vùng đầu mạnh hơn so với vaccin tiêm protein.

Các đáp ứng HAI được gây ra bởi vaccin tiêm thương mại, nhưng hiệu giá HAI đã biết là suy yếu dần. Ví dụ, các tình nguyện viên không bị nhiễm HIV có hiệu giá GMT HAI giảm 67% trong thời gian từ 1 đến 6 tháng sau khi gây miễn dịch (Crum-Cianflone et al. (2011) *Vaccine* 29:3183). Tương tự, tỷ lệ phần trăm các đối tượng được bảo vệ huyết thanh giảm từ 75% xuống 56% đối với các đối tượng âm tính với HIV đã tham gia nghiên cứu với hiệu giá HAI huyết thanh âm tính ($\leq 1:10$). Các nghiên cứu về vaccin cúm dịch cũng thể hiện sự giảm về thời gian tác dụng. Trong nghiên cứu vaccin cúm gia cầm AS03, GMT đạt đến 563 sau 2 liều vaccin, nhưng 6 tháng sau khi gây miễn dịch, GMT bị giảm xuống 18, mức giảm 96% (Leroux-Roels et al.(2010) *Vaccine* 28:849). Trong nghiên cứu vaccin dạng viên nén này, tỷ lệ phần trăm các đối tượng được bảo vệ huyết thanh vẫn không đổi là 75% tại thời điểm 1 và 6 tháng sau khi gây miễn dịch, và sự giảm hiệu giá HAI GMT ít hơn thể hiện mức giảm

chỉ là 28% (Fig.7B). Một khả năng là thời gian tác dụng tốt hơn đối với vacxin dựa trên vector do các đáp ứng tế bào T được tăng cường.

Ví dụ 5 Nguyên liệu và phương pháp

Quy trình lâm sàng và điều kiện tuyển chọn. Các đối tượng được sàng lọc trước về hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) trong thời gian 45 ngày tuyển chọn. Để đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu, các đối tượng phải có hiệu giá HAI ban đầu $\leq 1:20$, độ tuổi nằm trong khoảng từ 18 đến 49 tuổi, và có sức khỏe tốt. Pha hoạt động của thử nghiệm này là xuyên suốt đến ngày 28, với pha theo dõi để kiểm tra độ an toàn liên tục trong thời gian 1 năm.

24 đối tượng được tuyển chọn. Tất cả các đối tượng đã tham gia đều hoàn thành các đánh giá về độ an toàn và khả năng gây miễn dịch trong toàn bộ pha hoạt động, và đến ngày 180 của pha theo dõi

Ngẫu nhiên và làm mù. Nghiên cứu được thiết kế để đánh giá vacxin (VXA-A1.1) ở 12 đối tượng ở liều duy nhất là 1×10^{11} đơn vị lây nhiễm (IU) với 12 đối tượng được cho dùng đối chứng giả dược. Có 3 đối tượng được điều trị bằng vacxin dự phòng được tham gia tuần tự, mỗi đối tượng được cho sử dụng liều không nhiều hơn một lần trong mỗi 24 giờ. Sau một tuần theo dõi độc tính liên quan đến vacxin, các đối tượng còn lại trong đoàn hệ được điều trị (9) được chọn ngẫu nhiên cùng với 12 đối tượng giả dược. Việc chọn ngẫu nhiên được tiến hành bằng phương pháp chỉ định được tạo ra trên máy tính, và thuốc nghiên cứu che nhãn mác được phân phối cho nhân viên được làm mù bởi dược sỹ không được làm mù. Tất cả các nhân viên ở khu vực nghiên cứu cũng như người tham gia trực tiếp vào các thử nghiệm miễn dịch hoặc đánh giá độ an toàn lâm sàng vẫn mù đối với các phân phối điều trị. Tất cả các đối tượng đều được làm mù trong nghiên cứu.

Vacxin. Vector rAd (Ad5 không sao chép) mang ADN mã hóa gen chuyển HA (A/CA/04/2009) mà sự biểu hiện của nó được điều khiển bằng gen khởi đầu CMV và kẹp tóc dsARN phân tử được điều khiển bằng gen khởi đầu riêng. Dược chất GMP được sản xuất trong các túi Wave (GE Healthcare, Waukesha, WI) tại Lonza Biologicals (Houston, TX). Việc tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sau đó là trao đổi dung dịch đệm. Vector đã tinh chế được trộn với các tá dược, được làm đông khô, và sau đó được tạo viên nén tại Lonza bằng cách sử dụng xenluloza vi tinh thể và tinh bột làm chất độn tạo viên nén. Các viên nén được bao tan

trong ruột với Eudragit L100® (Evonik Industries, Darmstadt, Đức) bằng cách sử dụng hệ bao Vector Hi-Coater (Vector Freund, Cedar Rapids, IA). Thành phẩm được xuất xưởng trong một lô, và được chuẩn độ bằng thử nghiệm IU tiêu chuẩn tại Lonza. Giả được được bào chế thành các viên nén có hình dạng và kích cỡ tương tự chứa 150mg xenluloza vi tinh thể, mà không có lớp bao tan trong ruột.

Các kết quả. Kết quả chính đối với nghiên cứu này là độ an toàn và kết quả phụ là khả năng gây miễn dịch trong toàn bộ pha hoạt động, chủ yếu bằng hiệu giá HAI và sự chuyển hóa huyết thanh HAI. Các kết quả về miễn dịch khác bao gồm hiệu giá MN và các ASC. Có 5 sự kiện bất lợi trong nhóm giả được và 4 sự kiện trong nhóm vaccin, tất cả các sự kiện này đều có mức độ nghiêm trọng cấp 1. Không có sự kiện bất lợi nghiêm trọng nào được báo cáo trong nghiên cứu.

Phân lập PBMC và bảo quản lạnh. Máu được gom vào các ống K₃ EDTA Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ) và PBMC được phân lập vào cùng ngày bằng cách sử dụng các ống Lymphoprep™ (Axis-Shield, Norway). PBMC được làm đông lạnh và rã đông bằng cách sử dụng các chất phản ứng không chứa huyết thanh theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cellular Technology Ltd [CTL], Shaker Heights, OH).

Tế bào tiết kháng thể (ASC). Kit hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISpot) dùng cho các tế bào B tiết IgG và IgA được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Mabtech, Mariemont, OH). Các tế bào được nuôi cấy (từ $1,5 \times 10^4$ đến 5×10^5 tế bào mỗi giếng) trong ba giếng giống nhau, trong môi trường CTL-Test để tối ưu hóa các đốm. Protein HA (Protein Sciences Corp, Meriden, CT) được biotin hóa và được định lượng bằng cách sử dụng kit biotin hóa (Pierce, Rockford, IL).

Thử nghiệm kháng thể. Việc đo hiệu giá HAI và vi trung hòa (MN) được thực hiện và được xác định lần lượt dựa trên A/CA/07/2009 thu được từ MDCK và A/CA/07/2009 thu được từ trứng. Hiệu giá HAI và MN nhỏ hơn 10 được chấm điểm là 5 như được đề xuất theo tư vấn của nhà quản lý.

Phân tích thống kê. Kiểm thử “t” Student không ghép cặp được thực hiện để kiểm tra các khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm. Kiểm thử chính xác Fisher hai phía được sử dụng để xác định các tần số được quan sát có khác nhau đối với một số phân tích hay không, như được chỉ ra trong phần này. Đối với cả hai kiểm thử, giá trị $p \leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa. Khoảng tin cậy 95 phần trăm (95 CI) được đưa ra cho các giá trị đo được.

Nên hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả ở đây chỉ dùng với mục đích minh họa và các cải biến hoặc thay đổi khác nhau của chúng sẽ được đề xuất đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi của sáng chế và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tất cả các công bố, Patent, đơn sáng chế, trang web, và các mục truy cập cơ sở dữ liệu được trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch để gây ra đáp ứng miễn dịch ở người, trong đó chế phẩm này chứa:

(i) vector adenovirut mã hóa polypeptit sinh miễn dịch khác loại, được bao bằng
(ii) lớp bao tan trong ruột định hướng sự phân phối và giải phóng vector adenovirut vào
hội tràng của người ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,8, trong đó lớp bao tan
trong ruột này có ngưỡng pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,8.

2. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó lớp bao tan trong ruột có pH
ngưỡng bằng 6,0.

3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó lớp bao tan trong ruột phân
rã ít nhất 75% so với độ dày ban đầu của nó trong thời gian 110 phút ở độ pH nằm
trong khoảng từ 5,8 đến 6,8.

4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lớp
bao tan trong ruột chứa poly(axit metylacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1.

5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lớp
bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100.

6. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lớp
bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100 và Eudragit® L100-55.

7. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lớp
bao tan trong ruột chứa Eudragit® L-100, trietyl xitrat và bột talc.

8. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 7, trong đó chế phẩm này chứa từ 1 đến 4 phần
Eudragit® L-100, từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat, và từ 1 đến 2 phần bột talc.

9. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó
lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1
và poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1.

10. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 9, trong đó tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-
metyl metacrylat) 1:1 so với poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1 nằm trong
khoảng từ 1:4 đến 4:1.

11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó
lớp bao tan trong ruột chứa poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 và poly(axit
metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2.

12. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 11, trong đó tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 so với poly(axit metacrylic-co-metyl acrylat) 1:2 nằm trong khoảng từ 1:2 đến 2:1.
13. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, 11 và 12, trong đó lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100 và Eudragit®S100.
14. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó lớp bao tan trong ruột chứa từ 1 đến 4 phần poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:1 và poly(axit metacrylic-co-metyl acrylat) 1:2; từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat; và từ 1 đến 2 phần bột talc.
15. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2 và poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1.
16. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 15, trong đó tỷ lệ của poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2 so với poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:1 nằm trong khoảng từ 1:4 đến 4:1.
17. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, 15 và 16, trong đó lớp bao tan trong ruột chứa hỗn hợp của Eudragit® L-100-55 và Eudragit®S100.
18. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó lớp bao tan trong ruột chứa từ 1 đến 4 phần poly(axit metacrylic-co-metyl metacrylat) 1:2 và poly(axit metacrylic-co-etyl acrylat) 1:2; từ 1 đến 2 phần trietyl xitrat; và từ 1 đến 2 phần bột talc.
19. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vectơ adenovirut còn mã hóa dsARN.
20. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này ở dạng viên nén.

FIG.1

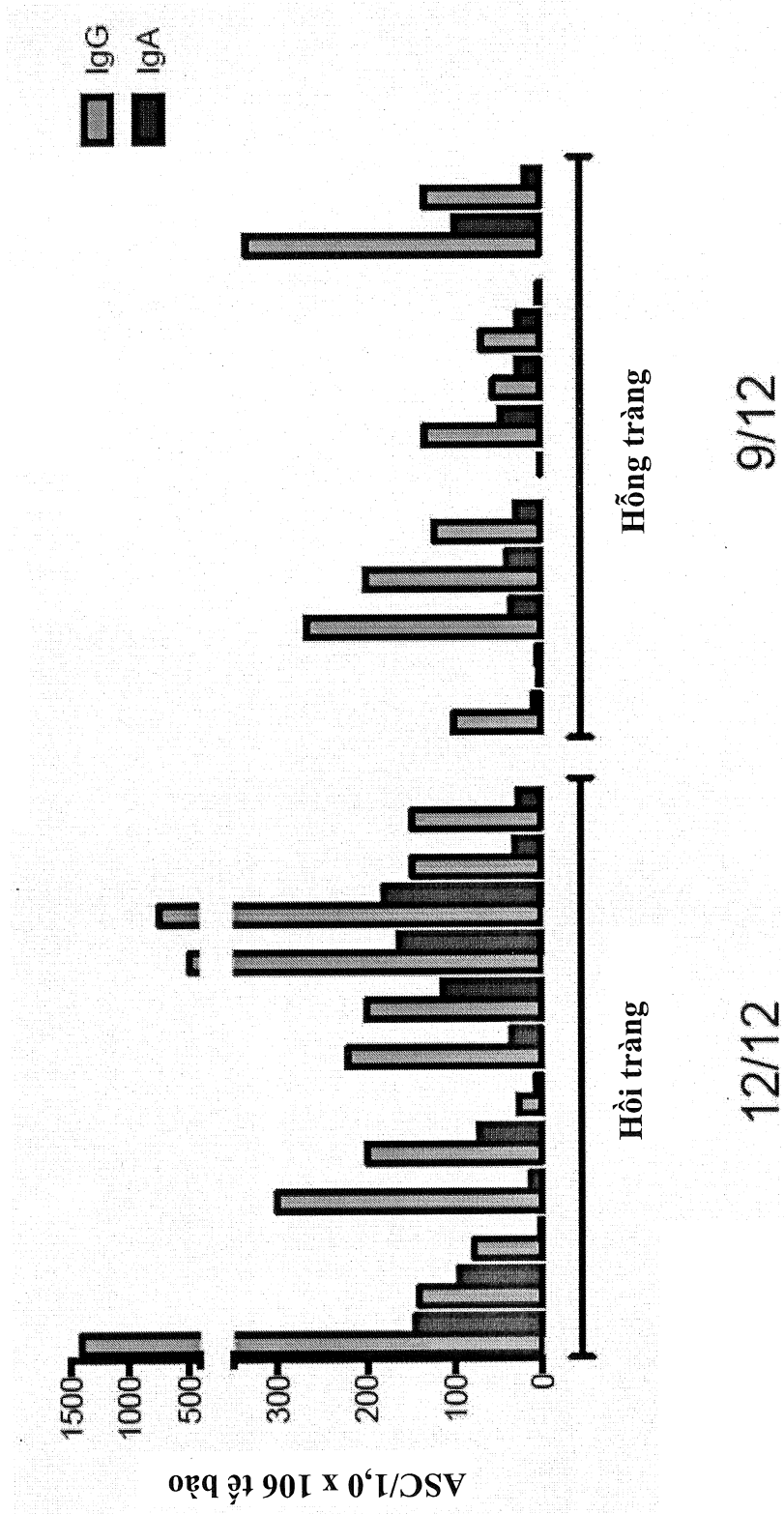


FIG.2

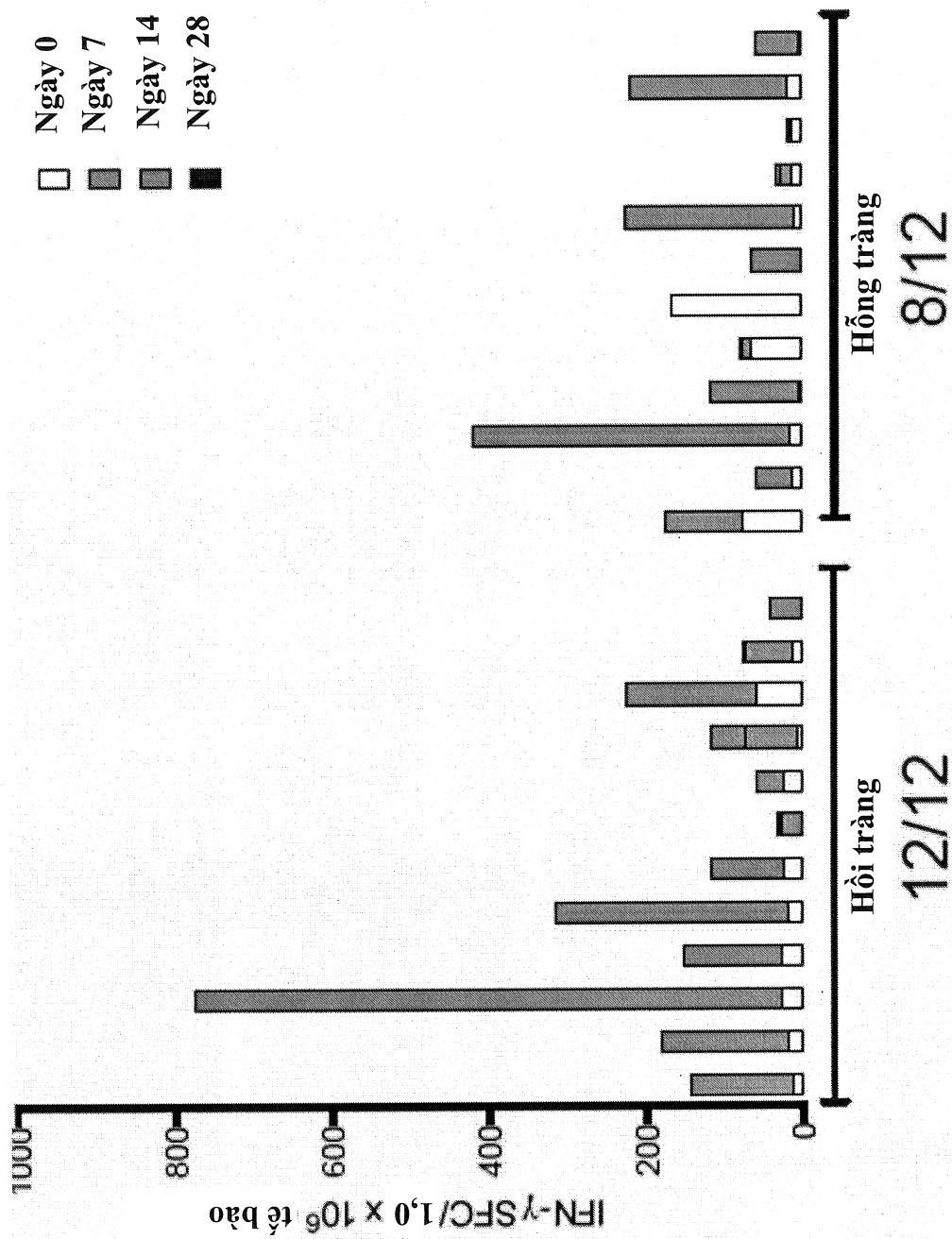


FIG.3

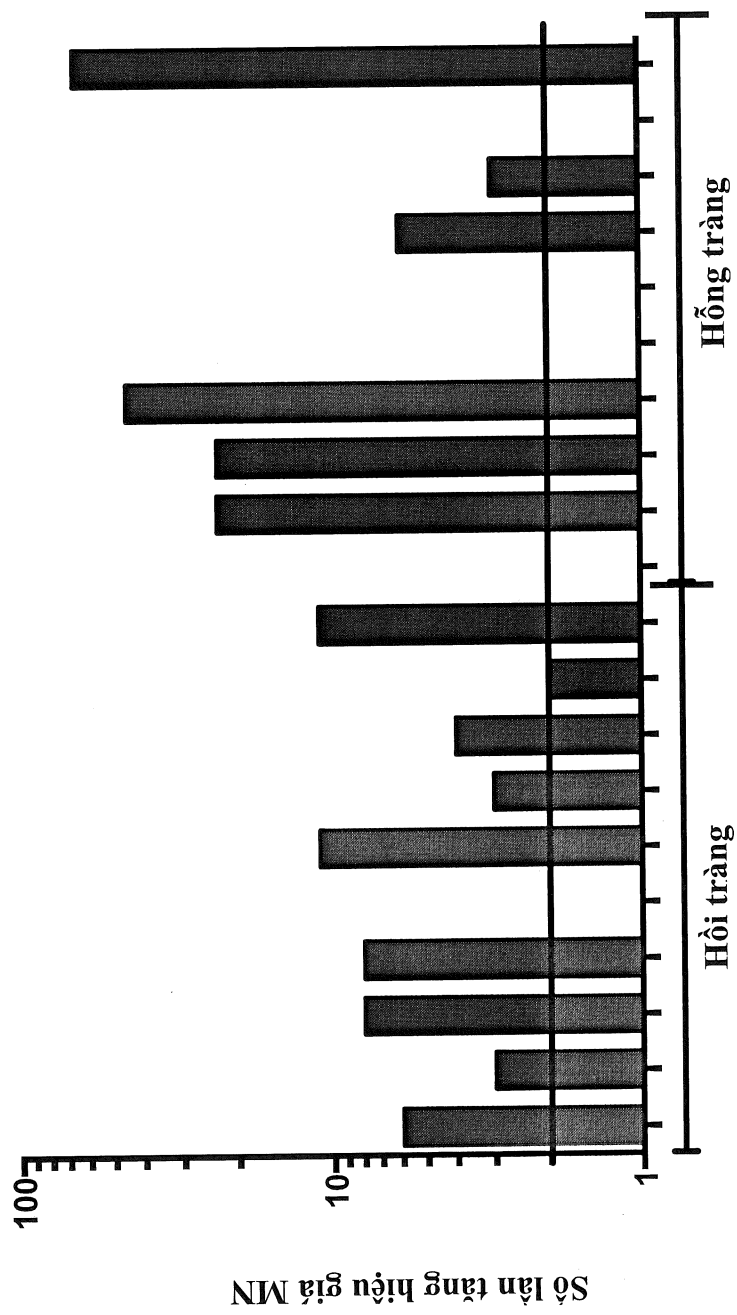


FIG.4

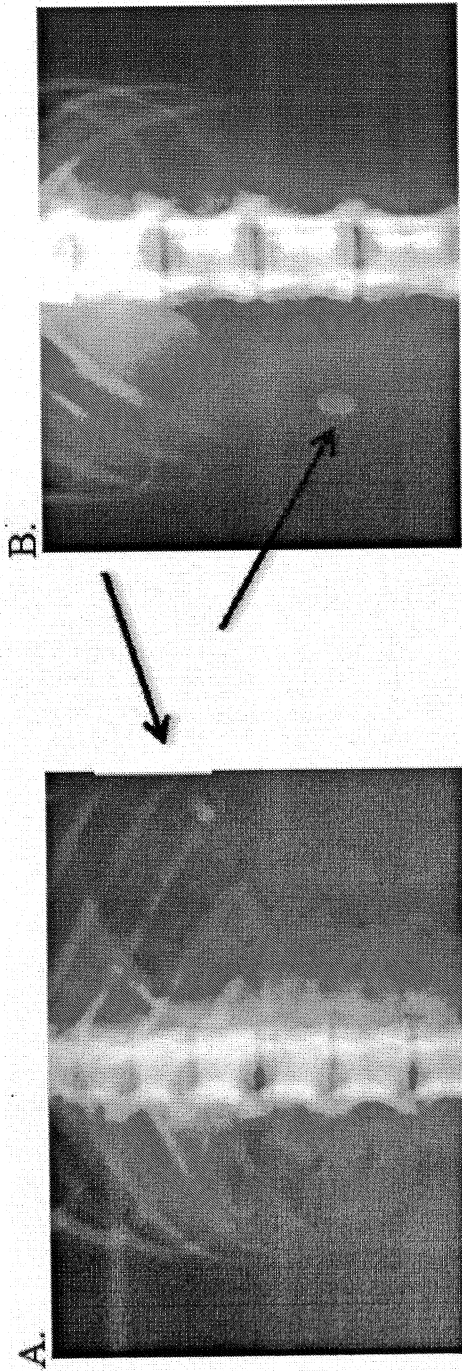


FIG.5

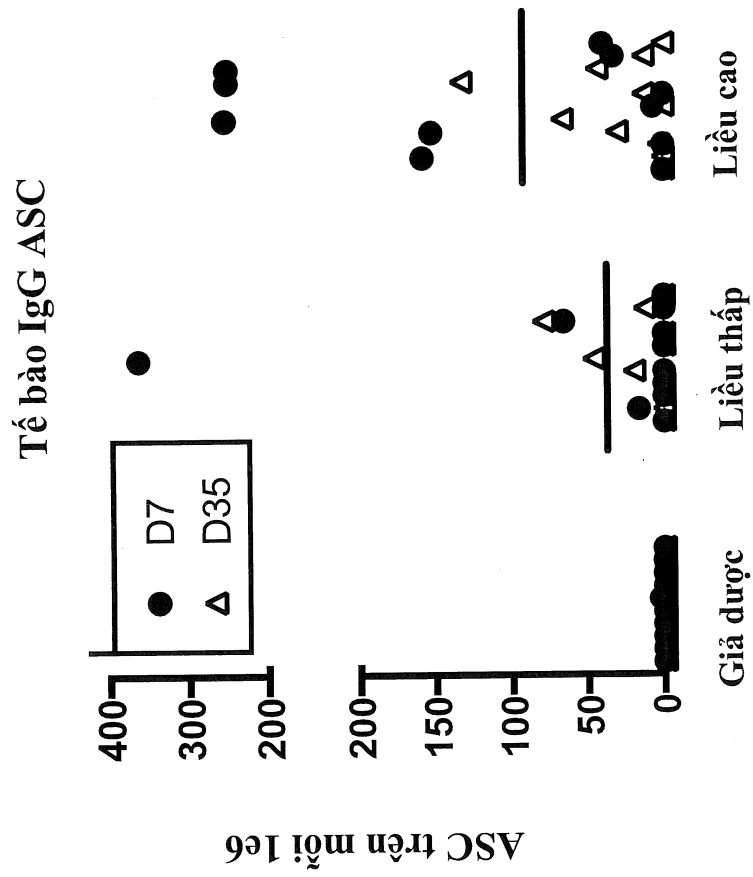


FIG.6

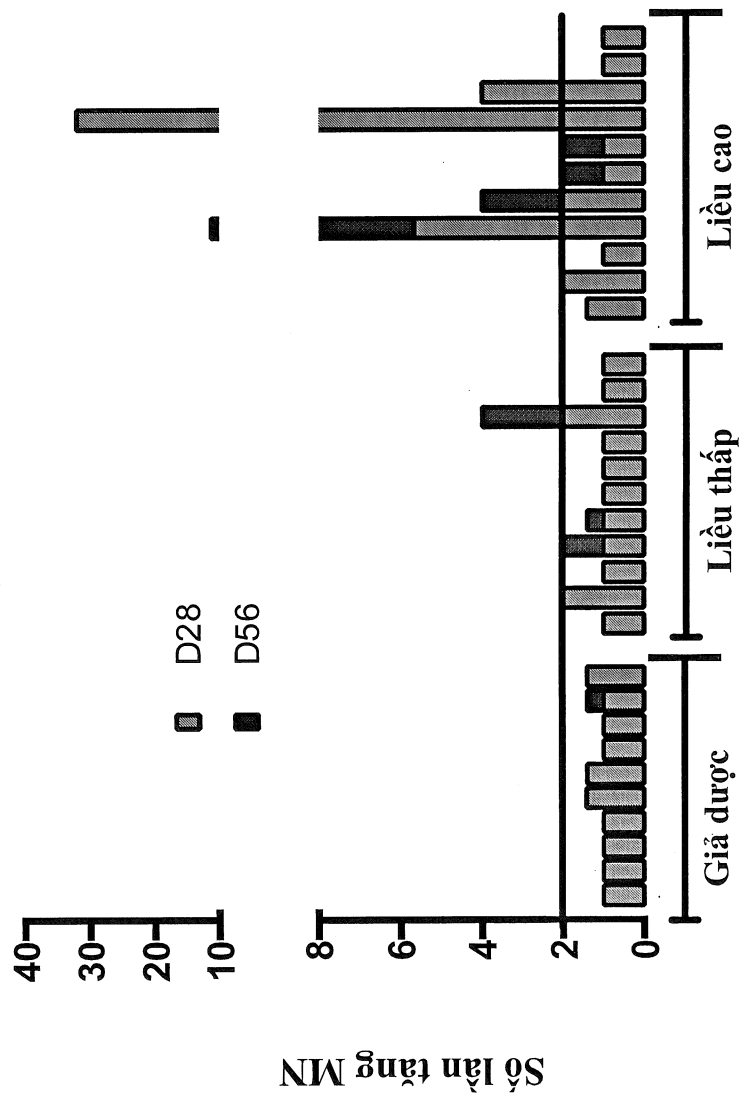
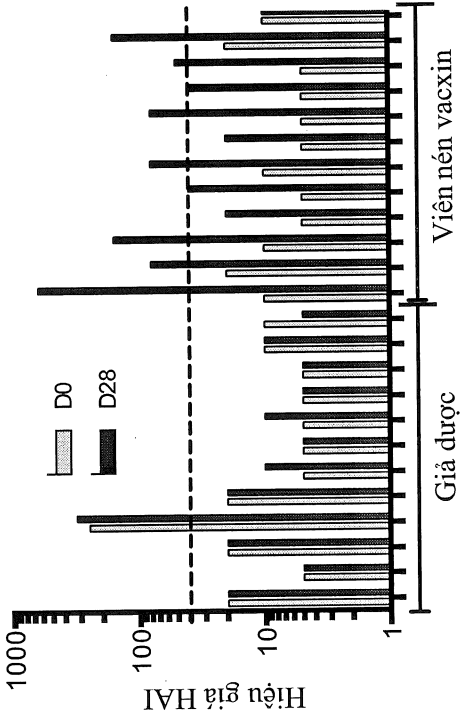
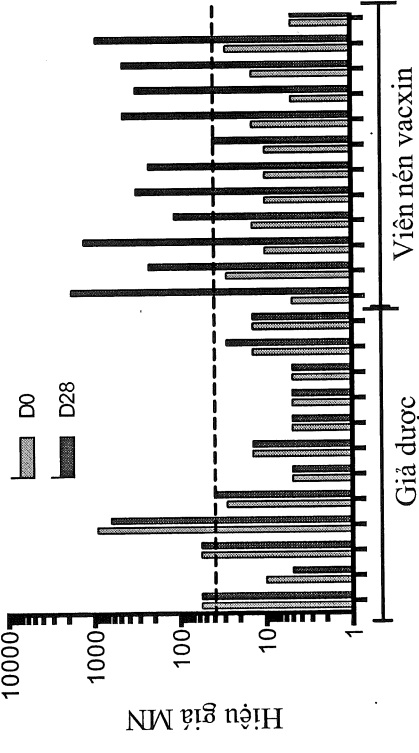


FIG.7

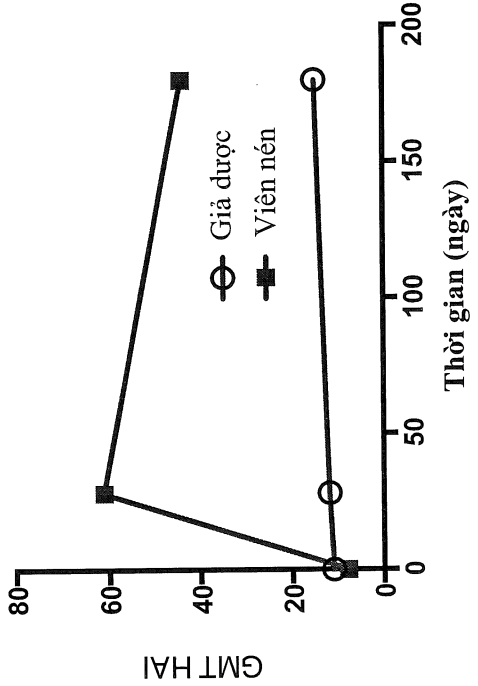
A. Hiệu giá HAI trước và sau khi gây miễn dịch



C. Hiệu giá MN trước và sau khi gây miễn dịch



B. HAI GMT theo thời gian



D. Các ASC được kích thích vào ngày 7

