



(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)



1-0030940

(51)⁷ A61K 39/295; A61P 31/12; A61P 31/04 (13) B

(21) 1-2014-02729

(22) 17/01/2013

(86) PCT/FR2013/050106 17/01/2013

(87) WO/2013/107988 25/07/2013

(30) 1250464 17/01/2012 FR

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/11/2014 320A

(73) SANOFI PASTEUR (FR)

2 avenue Pont Pasteur F-69367 Lyon cedex 07 - France

(72) BERTAUX, Landry (FR); CHACORNAC, Isabelle (FR); FRANCON, Alain (FR);
HAU, Jean-Francois (FR); LENTSCH GRAF, Sandrine (FR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM VACXIN LỎNG CHỨA ÍT NHẤT HAI
KHÁNG NGUYÊN CÓ KHẢ NĂNG ĐƯỢC HẤP PHỤ TRÊN NHÔM OXIT
HYDROXIT VÀ CHẾ PHẨM VACXIN THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bảo chế chế phẩm vacxin chứa ít nhất là nhôm oxit hydroxit (AlOOH), và ít nhất là kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và kháng nguyên của *Haemophilus influenzae* thuộc kiểu b (Hib). Theo sáng chế, kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH, trong khi kháng nguyên Hib được giữ ở trạng thái không được hấp phụ. Để thực hiện điều đó: kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên AlOOH để thu được phức hợp AlOOH/HBsAg, sau đó phức hợp AlOOH/HBsAg này được trộn với kháng nguyên Hib cùng với các cation axit amin ở nồng độ ít nhất là 100mg/l và các ion phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/l. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm vacxin thu được từ phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin chứa giá thể viêm gan B bao gồm kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (hepatitis B virus surface antigen - HBsAg) và giá thể *Haemophilus influenzae* kiểu b, gồm polysaccharit vỏ của nó, gọi là polyribosylribitol phosphat (PRP), để có hiệu quả cho trẻ dưới 2 tuổi, được liên hợp với protein mang, ví dụ protein uốn ván. Chế phẩm này dự định được dùng cho trẻ nhỏ thường chứa các kháng nguyên khác mà khiến cho nó có thể được tiêm chủng để kháng nhiều bệnh trong một lần tiêm duy nhất, và cũng chứa tá chất dựa trên nhôm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do đó, công bố đơn quốc tế số WO 99/13906 bộc lộ chế phẩm vaccin chứa, như được nêu trong trang 13, các kháng nguyên kháng lại bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, bệnh ho gà, viêm gan B và việc nhiễm *Haemophilus influenzae* kiểu b. Một số kháng nguyên trong số các kháng nguyên này cần được hấp phụ trên muối nhôm để sinh miễn dịch. Cụ thể, đây là trường hợp đối với kháng nguyên bề mặt viêm gan B hoặc HBsAg.

Tuy nhiên, như được nêu trong trang 12 của WO 99/13906, giá thể Hib, gồm polysaccharit vỏ được liên hợp với protein uốn ván, có xu hướng mất tính sinh miễn dịch của nó theo thời gian khi nó được hấp phụ trên muối nhôm. Để tránh hạn chế này, giải pháp được đề xuất trong lĩnh vực kỹ thuật này, như đã được khuyến cáo trong đơn ưu tiên số PCT/FR96/00791, là thêm vào các anion và cụ thể là ion phosphat, cacbonat hoặc xitrat.

Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã lưu ý rằng, khi thêm các ion, cụ thể là phosphat hoặc cacbonat, thực sự có thể ngăn cản sự hấp phụ PRP-T trên nhôm oxit hydroxit (AlOOH), và do đó, duy trì được tính sinh miễn dịch theo thời gian, tuy nhiên việc thêm này cũng có hạn chế là giải hấp phụ kháng nguyên bề mặt viêm gan B khi kháng nguyên còn lại cũng đã được hấp phụ trên nhôm oxit hydroxit.

Do đó, cần tìm ra phương pháp bào chế chế phẩm vaccin chứa nhôm oxit hydroxit, trong đó kháng nguyên bề mặt viêm gan B bị giữ ở trạng thái được hấp phụ

trên AlOOH , trong khi kháng nguyên Hib bị giữ ở trạng thái được hấp phụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm vaccin lỏng chứa ít nhất:

- một kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg),
- một kháng nguyên *Haemophilus influenzae* kiểu b (Hib) gồm polysaccharit vỏ được liên hợp với protein mang,
- nhôm oxit hydroxit (AlOOH),

trong đó kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH , trong khi kháng nguyên Hib được giữ ở trạng thái không được hấp phụ, trong đó:

- kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên AlOOH để thu được phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$,
- phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$ này được trộn với kháng nguyên Hib với sự có mặt của cation axit amin ở nồng độ ít nhất là 100mg/l và các ion phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/l.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ của phương pháp trong giải pháp kỹ thuật đã biết trong đó việc trộn được thực hiện sau khi thêm mỗi thành phần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhờ phương pháp theo sáng chế, sự cân bằng giữa việc giữ kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên nhôm oxit hydroxit với việc giữ kháng nguyên Hib không hấp phụ có thể đạt được như mong muốn.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên HBsAg được hấp phụ trên nhôm bằng cách trộn hỗn dịch của AlOOH với hỗn dịch của HBsAg kèm theo khuấy trong ít nhất 4 giờ, tốt hơn là ít nhất 12 giờ, tốt hơn là từ 20 đến 24 giờ.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, cation axit amin được thêm vào phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$ trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

Theo một phương án khác của sáng chế, cation axit amin được thêm vào kháng nguyên Hib trước khi trộn với phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$.

Theo một phương án của sáng chế, các ion phosphat được thêm vào phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$ trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

Theo một phương án của sáng chế, độ pH của chế phẩm chứa phức hợp AlOOH/HBsAg được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$ trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vaccin thu được theo phương pháp được bảo hộ và chứa ít nhất là các thành phần sau:

- kháng nguyên bề mặt viêm gan B,
- kháng nguyên bạch hầu ở dạng độc tố bạch hầu D,
- kháng nguyên uốn ván ở dạng độc tố uốn ván T,
- các kháng nguyên ho gà ở dạng độc tố tinh khiết (PTxd) và ở dạng ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi (Filamentous Hemagglutinin - FHA),
- kháng nguyên *Haemophilus influenzae* kiểu b, ở dạng polyribosylribitol phosphat được liên hợp với protein uốn ván (PRP-T),
- kháng nguyên bại liệt ở dạng virus kiểu 1, 2 và 3 bị bất hoạt.

Chế phẩm vaccin nêu trên có ưu điểm là ở dạng lỏng, do đó bỏ qua được bước hấp thu sản phẩm đông khô; nó được chứng minh là đủ ổn định để vẫn giữ được tính sinh miễn dịch cho đến ngày sử dụng, thậm chí là 36 tháng sau ngày sản xuất.

Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg). Cụ thể, kháng nguyên này có thể là kháng nguyên bề mặt viêm gan B như kháng nguyên có mặt trong vaccin Recombivax HB™, hoặc trong vaccin viêm gan B khác bất kỳ. Cụ thể, kháng nguyên có thể là kháng nguyên tái tổ hợp thu được bằng cách lên men sử dụng nấm men *Hansenula polymorpha* đã được cải biến, theo công nghệ được phát hiện bởi Crucell, như kháng nguyên có mặt trong vaccin Hepavax-Gene™. Cho các mục đích của sáng chế, lượng HBsAg có mặt trong liều 0,5 ml tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 15µg, và cụ thể là 10µg.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin chứa kháng nguyên *Haemophilus influenzae* kiểu b (Hib). Kháng nguyên này gồm polysacarit vỏ của vi khuẩn hoặc PolyribosylRibitol Phosphat (PRP) được liên hợp với protein mang. Protein mang có thể là protein bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực vaccin. Ví dụ, protein có thể là độc tố bạch hầu D, độc tố uốn ván T, lipoprotein D của *Haemophilus influenzae*, CRM 197 hoặc protein màng ngoài của *N. meningitidis* (outer membrane protein - OMP). Tốt hơn là sử dụng protein uốn ván để thu được dạng liên hợp với PRP-T. Đối với mục đích của sáng chế, dạng liên hợp PRP-T có thể có mặt với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1 đến 30µg của PRP trong liều 0,5 ml; tốt hơn là từ 5 đến 25 µg PRP trong một liều; tốt hơn là từ 10 đến

15µg PRP trong một liều; hoàn toàn tốt hơn là từ 10 đến 12µg của PRP trong một liều, và cụ thể hơn là 12µg PRP được liên hợp với 22-36µg protein uốn ván.

Theo sáng chế, chế phẩm vaccin chứa nhôm oxit hydroxit AlOOH. Muối nhôm được gọi không chính xác rất phổ biến là nhôm hydroxit. AlOOH có thể được sử dụng cho mục đích của sáng chế có thể là, ví dụ, muối AlOOH được bán bởi Brenntag AG, hoặc Rehydragel HPA từ tập đoàn Reheis Corp. (Berkeley Heights, NJ), mặc dù phương pháp sản xuất hai tá chất nêu trên của mỗi hãng là khác nhau. Lượng AlOOH sử dụng được tính sao cho cho phép thu được đáp ứng miễn dịch thỏa mãn; cụ thể, lượng này phụ thuộc vào số lượng và bản chất của các kháng nguyên có mặt trong chế phẩm và cũng phụ thuộc vào lượng của mỗi kháng nguyên này.

Thuần túy chỉ mang tính cung cấp thông tin, lượng HBsAg tối đa được hấp phụ trên AlOOH vào khoảng 780µg protein trên mg nhôm (thông thường, lượng AlOOH được thể hiện bằng lượng nhôm Al^{3+}). Với liều vaccin chứa 10µg HBsAg, mà không có các kháng nguyên khác bất kỳ, thì 13µg nhôm sẽ là đủ, tuy nhiên lượng này không đủ để thu được hiệu lực mong muốn khi các kháng nguyên khác được thêm vào. Do đó, tùy thuộc vào việc bổ sung một hoặc nhiều kháng nguyên khác, 10µg HBsAg có thể được cho tiếp xúc với từ 0,01mg đến 1,25mg nhôm, đây là lượng tối đa được khuyến cáo trong Dược điển Châu Âu.

Ví dụ, liều 0,5ml vaccin cho trẻ em chứa kháng nguyên bạch hầu, uốn ván, ho gà và viêm gan B có thể thường chứa nhôm nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,7mg, tốt hơn là khoảng 0,6mg nhôm.

Theo sáng chế, kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH, có nghĩa là ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 65%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 75%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95% tổng lượng kháng nguyên này có mặt trong chế phẩm có mặt ở dạng được hấp phụ.

Theo sáng chế, kháng nguyên Hib được giữ ở trạng thái không được hấp phụ trên AlOOH, có nghĩa là ít nhất 65%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 75% tổng lượng kháng nguyên này có mặt trong chế phẩm có mặt ở dạng không được hấp phụ.

Theo sáng chế, khoảng thời gian mà kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH và kháng nguyên Hib được giữ ở trạng thái không được hấp phụ ít nhất là 3 tháng, tốt hơn là ít nhất 6 tháng, tốt hơn là ít nhất 12 tháng, tốt

hơn là ít nhất 18 tháng, tốt hơn là ít nhất 24 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất 36 tháng kể từ ngày sản xuất chế phẩm, khi nhiệt độ bảo quản là $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Tốt hơn, nếu lượng kháng nguyên được hấp phụ hoặc không được hấp phụ ổn định theo thời gian, nhưng lượng này có thể cũng thay đổi, miễn là vẫn nằm trong các giới hạn cho phép. Do đó, khi ít nhất 85% tổng lượng HBsAg có mặt trong chế phẩm được hấp phụ trên AlOOH được bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong 3 tháng kể từ ngày sản xuất chế phẩm, thì hoàn toàn có thể là, sau một năm và vẫn trong cùng điều kiện bảo quản, thì 80% tổng lượng HBsAg có mặt trong chế phẩm được giữ ở trạng thái được hấp phụ.

Để đánh giá lượng kháng nguyên được hấp phụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ.

Để xác định phần trăm HBsAg được hấp phụ, có thể sử dụng phương pháp ELISA bán kẹp theo các nguyên tắc được xác định trong Dược điển Châu Âu 2.7.1. Tóm tắt như sau: HBsAg được bắt giữ bởi kháng thể đơn dòng thứ nhất kháng HbsAg thuộc kiểu IgM, trong các lỗ của đĩa 96 lỗ. HBsAg theo đó ở trạng thái liên kết được bao bọc bởi kháng thể đơn dòng thứ hai kháng HbsAg thuộc kiểu IgG, mà bản thân kháng thể này được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng IgG kết cặp peroxidaza. Cơ chất sinh màu cho peroxidaza, tetrametylbendizin (TMB), đóng vai trò làm chất hiện màu. Khi được thêm vào, màu xuất hiện, cường độ màu tỷ lệ thuận với lượng HBsAg bị bắt giữ trong lỗ. Kết quả được phân tích theo phương pháp đường song song được mô tả trong Dược điển Châu Âu 5.3.3. Phần trăm hấp phụ thu được từ việc xác định tổng lượng HBsAg và lượng HBsAg không được hấp phụ.

Liên quan đến lượng PRP-T không được hấp phụ, việc đánh giá có thể được thực hiện bằng phương pháp phát hiện xung dòng điện – sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao (high-performance ion exchange chromatography — pulsed amperometric detection - HPAEC-PAD).

Theo phương pháp của sáng chế, kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên AlOOH. Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho kháng nguyên bề mặt viêm gan B tiếp xúc với AlOOH mà không có mặt kháng nguyên bất kỳ khác và cho phép kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên AlOOH trong ít nhất 4 giờ, tốt hơn là ít nhất 12 giờ, hoàn toàn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 24 giờ, để thu được chế phẩm chứa phức hợp AlOOH/HBsAg. Bước hấp phụ này có thể được thực hiện, theo sáng chế, khi không có các ion phosphat. Điều này đạt được bằng cách kéo dài thời

gian tiếp xúc giữa kháng nguyên bề mặt viêm gan B và AlOOH , từ đó tối đa hóa các tương tác tĩnh điện và thúc đẩy các tương tác ổn định, theo đó có thể dẫn đến sự hấp phụ bằng cách trao đổi phối tử. Việc tiếp xúc này tốt hơn là được tiếp tục kèm theo khuấy.

Theo phương pháp của sáng chế, phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$ được trộn với kháng nguyên Hib khi có mặt các cation axit amin và các ion phosphat.

Đối với mục đích của sáng chế, thuật ngữ "cation axit amin" được dự định chỉ axit amin mà có độ pH cao hơn độ pH của chế phẩm vacxin và theo đó, sẽ ở dạng cation ở độ pH của vacxin; cụ thể, các axit amin này là Lysin (Lys), Arginin (Arg) hoặc Histidin (His); mỗi axit amin trong số các axit amin này có thể được sử dụng một mình, cũng như ở dạng hỗn hợp của các cặp axit amin (Lys + Arg; Lys + His; Arg + His) hoặc toàn bộ ba axit amin với nhau (Lys + Arg + His). Theo một phương án cụ thể, cation axit amin có thể được kết hợp ở dạng dipeptit. Các dipeptit có thể đặc biệt được kể đến là Lys-Lys, Lys-Arg, Lys-His, Arg-Arg, Arg-Lys, Arg-His, His-His, His-Lys và His-Arg. Theo một cách khác, dipeptit sử dụng cho các mục đích của sáng chế có thể được tạo thành từ cation axit amin và axit amin không mang điện được chọn từ Ala, Val, Leu, Iso, Pro, Met, Phe, Trp, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp và Gln. Do đó, trong thực hành, chế phẩm chứa một hoặc nhiều (các) cation axit amin ở dạng tự do và/hoặc dạng dipeptit có thể được sử dụng. Cũng có thể sử dụng các chế phẩm axit amin chứa cation axit amin với lượng mong muốn, dưới dạng hỗn hợp với axit amin khác. Để không làm giảm quá mạnh độ pH khi thêm các axit amin, có thể thực hiện việc tăng độ pH của chế phẩm chứa axit amin trước khi thêm nó vào phức hợp $\text{AlOOH}/\text{HBsAg}$, bằng một bazơ, cụ thể là natri hydroxit.

Theo sáng chế, lượng cation axit amin cuối cùng có mặt trong chế phẩm vacxin phải là ít nhất 100 mg/l, tốt hơn là ít nhất 300 mg/l, tốt hơn là ít nhất 400 mg/l, hoàn toàn tốt hơn là ít nhất 500 mg/l. Không có liều tối đa giới hạn. Tuy nhiên, có thể ưu tiên đối với liều tối đa là nhiều nhất 2 mg/ml, tốt hơn nhiều nếu nhiều nhất 1 mg/ml, tốt hơn nữa nếu nhiều nhất 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hoàn toàn tốt hơn nếu nhiều nhất 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Khi tính toán lượng cation axit amin được thêm vào, nên tính đến lượng cation axit amin có thể được đưa vào thông qua môi trường chứa các kháng nguyên không phải là HBsAg và kháng nguyên Hib.

Theo một phương án thay thế của phương pháp theo sáng chế, có thể xác định lượng cation axit amin theo trọng lượng của polysacarit vỏ Hib và để tạo ra tỷ lệ trọng

lượng polysaccharit Hib/cation axit amin nằm trong khoảng từ 1: 4 đến 1: 100, tốt hơn là từ 1: 10 đến 1: 80, tốt hơn là từ 1: 15 đến 1: 60, hoặc cụ thể tốt hơn là từ 1: 20 đến 1:30 hoặc 40.

Theo phương pháp của sáng chế, phức hợp AlOOH/HBsAg được trộn với kháng nguyên Hib không những với sự có mặt của cation axit amin, mà còn với sự có mặt của các ion phosphat. Theo một phương án của sáng chế, các ion phosphat được thêm vào phức hợp AlOOH/HBsAg trước khi nó được cho tiếp xúc với kháng nguyên Hib. Các ion phosphat, ví dụ, có thể được thêm vào bằng cách thêm natri hydro phosphat hoặc kali hydro phosphat, hoặc theo cách khác, hỗn hợp của cả hai ion này. Lượng các ion phosphat được tính toán sao cho kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH ở lượng tối đa đồng thời tránh được sự hấp phụ kháng nguyên Hib. Lượng này thay đổi theo bản chất và số lượng kháng nguyên có mặt, và cụ thể phụ thuộc vào các kháng nguyên khác với các kháng nguyên HBsAg và Hib.

Do đó, với chế phẩm vacxin chứa các kháng nguyên thường được sử dụng trong các vacxin cho trẻ em, nghĩa là, ngoài HBsAg và kháng nguyên Hib, kháng nguyên bạch hầu, uốn ván và ho gà, tốt hơn nếu bổ sung thêm các ion phosphat để nồng độ ion phosphat trong chế phẩm vacxin cuối cùng thu được ít nhất bằng 35 mmol/l, và cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/l, các đầu giá trị khoảng được bao gồm; tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 38 đến 44 mmol/l, các giá trị đầu khoảng được bao gồm; hoàn toàn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 38 đến 42 mmol/l, các giá trị đầu khoảng được bao gồm. Theo một phương án ưu tiên, nồng độ ion phosphat trong chế phẩm vacxin cuối cùng thu được là 40 mmol/l.

Theo một phương án khác, các ion phosphat được thêm vào với lượng sao cho chúng có mặt trong chế phẩm vacxin ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 35 đến 38 mmol/l, các giá trị đầu khoảng được bao gồm. Việc này được hoàn thành cũng bằng cách thêm vào các ion cacbonat, tuy nhiên với một lượng giới hạn, do trong thực tế lưu ý rằng ion cacbonat được sử dụng với lượng quá nhiều sẽ bất lợi. Tốt hơn, nếu chúng có thể được thêm vào với lượng sao cho chúng có mặt trong chế phẩm vacxin ở nồng độ cuối cùng nhỏ hơn hoặc bằng 10 mmol/l.

Để tránh việc thay đổi do lượng ion quá nhiều mà có thể làm mất ổn định HBsAg và thúc đẩy việc giải hấp chúng, việc thêm các ion phosphat được khuyến cáo là nên được thực hiện trong vài bước (ví dụ, trong 2) riêng biệt (các bước). Do đó, các ion

phosphat có thể được thêm vào bước đầu tiên, với lượng để có thể đạt được nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 20 đến 30 mmol/l, các giá trị đầu khoảng được bao gồm; sau đó, ở bước thứ hai, với lượng để có thể đạt được nồng độ cuối cùng như chỉ rõ ở trên.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, độ pH của chế phẩm thu được còn được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$, trước khi trộn kháng nguyên Hib với phức hợp ALOOH/HBsAg. Trong thực tế, lưu ý rằng giá trị pH này có ảnh hưởng tích cực đến việc giữ kháng nguyên Hib ở trạng thái không được hấp phụ.

Theo một phương án cụ thể, độ pH còn được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$ sau giai đoạn trộn.

Do đó, bằng phương pháp của sáng chế, có thể thu được chế phẩm vacxin trong đó:

(i) ít nhất 60% hoặc 80%, tốt hơn là ít nhất 85% tổng lượng kháng nguyên bề mặt viêm gan B có mặt trong chế phẩm được hấp phụ trên ALOOH trong ít nhất 3 tháng kể từ ngày sản xuất khi chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$; và

(ii) ít nhất 65%, 70% hoặc 75% tổng lượng kháng nguyên Hib có mặt trong chế phẩm không được hấp phụ trên ALOOH.

Thuật ngữ "phức hợp ALOOH/HBsAg" nên được hiểu theo nghĩa là phức hợp chứa ít nhất là HBsAg kháng nguyên được hấp phụ trên ALOOH. Phức hợp này có thể chứa các kháng nguyên khác, cho dù các kháng nguyên khác này được chỉ rõ hoặc không được chỉ rõ.

Ngoài ra, một hoặc nhiều kháng nguyên khác có thể đưa vào để tạo thành phức hợp. Cụ thể, chúng có thể là độc tố bạch hầu (D), giải độc tố uốn ván (T), các kháng nguyên ho gà không tế bào như: độc tố được khử độc tính của *Bordetella pertussis* (PTxd), ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi (FHA), pertactin (kháng nguyên 69 kDa) và ngưng kết nguyên (fimbriae) của cùng vi khuẩn này. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, các kháng nguyên D, T, PTxd và FHA có thể được thêm vào để tạo thành phức hợp.

Các kháng nguyên khác có thể được thêm vào theo nhiều cách. Chúng có thể được thêm tuần tự sau khi kháng nguyên bề mặt viêm gan B đã được hấp phụ sẵn (i) trên tổng lượng ALOOH cần có mặt trong chế phẩm vacxin; (ii) hoặc trên một phần, sau đó được thêm vào để đạt được tổng lượng. Theo một cách khác, các kháng nguyên khác có thể được hấp phụ riêng biệt, mỗi loại trên một phần ALOOH giống như HBsAg. Một quá

trình hấp phụ hỗn hợp có thể cũng được cung cấp cho- một số kháng nguyên được hấp phụ riêng biệt, các kháng nguyên còn lại được hấp phụ tuần tự.

Theo một phương án cụ thể của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm thu được được khuấy sau khi thêm mỗi kháng nguyên vào.

Theo một phương án ưu tiên, được đưa ra chỉ để làm ví dụ, HBsAg được hấp phụ riêng biệt trên một phần AlOOH tương ứng với khoảng 30% (một phần ba) tổng lượng AlOOH có mặt trong chế phẩm cuối cùng. Song song với việc hấp phụ nêu trên, kháng nguyên D và T được hấp phụ tuần tự trên phần AlOOH khác. Kháng nguyên ho gà PTxd và FHA sau đó được thêm vào chế phẩm chứa phức hợp AlOOH-D-T, bản thân mỗi kháng nguyên trong số hai kháng nguyên ho gà này được hấp phụ riêng biệt sẵn trên AlOOH. Cuối cùng, hai chế phẩm (phức hợp AlOOH - HBsAg và phức hợp AlOOH - D-T-PTxd-FHA) được kết hợp lại để tạo thành chế phẩm chứa AlOOH - HBsAg-D-T-PTxd-FHA trong đó lượng của mỗi thành phần được chọn sao cho thu được liều vacxin 0,5ml thường chứa:

- từ 5 đến 15 μ g HBsAg/liều; tốt hơn là 10 μ g/liều,
- từ 20 đến 40 Lf D/liều; tốt hơn là từ 25 đến 35 Lf/liều; hoàn toàn tốt hơn là 30 Lf/liều (Lf = giới hạn kết bông) (được biểu diễn theo một cách khác, lượng D lớn hơn hoặc bằng 20 IU/liều),
- từ 5 đến 25 Lf T/liều; tốt hơn là từ 10 đến 15 Lf/liều; hoàn toàn tốt hơn là 10 Lf/liều (được biểu hiện theo một cách khác, lượng T lớn hơn hoặc bằng 40 IU/liều),
- từ 20 đến 30 μ g FHA/liều; tốt hơn là 25 μ g/liều,
- từ 20 đến 30 μ g PTxd/liều; tốt hơn là 25 μ g/liều.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, các kháng nguyên bại liệt, mà thường bao gồm các virus bất hoạt, cũng được thêm vào. Có thể thêm virus bại liệt thuộc 3 kiểu thường có mặt trong vacxin cho trẻ em, nghĩa là kiểu 1, 2 hoặc 3, hoặc theo một cách khác, trong trường hợp không cần tiêm chủng kháng 3 kiểu này, thì chỉ cần thêm vào một kiểu duy nhất mà tác dụng bảo vệ chống lại kiểu này được mong muốn. Cụ thể, lượng virus bại liệt trong một liều có thể là:

- từ 20 đến 43 DU (đơn vị kháng nguyên D), cụ thể 40 cho kiểu 1,
- từ 5 đến 9 DU, cụ thể 8, cho kiểu 2,
- từ 17 đến 36 DU, cụ thể 32, cho kiểu 3.

Các kháng nguyên này không cần được hấp phụ sẵn trên muối nhôm trước khi

được thêm vào chế phẩm vaccin.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp theo sáng chế là phương pháp trong đó:

(i) (a) HBsAg và AlOOH được cho tiếp xúc với nhau mà không có mặt bất kỳ kháng nguyên khác, và HBsAg được cho hấp phụ trên AlOOH trong ít nhất 4 giờ, tốt hơn là ít nhất 12 giờ, hoàn toàn tốt hơn là khoảng 24 giờ, để thu được chế phẩm chứa phức hợp AlOOH/HBsAg;

(i) (b) chế phẩm chứa kháng nguyên D, T, PTxd và FHA, được hấp phụ sẵn trên AlOOH, và tùy ý các kháng nguyên khác của *Bordetella pertussis* như pertactin và các ngưng kết nguyên, được thêm vào chế phẩm thu được ở mục (i) (a);

(ii) các ion phosphat được thêm vào chế phẩm thu được ở mục (i) (b) để thu được nồng độ cuối cùng trong vaccin là 40 mmol/l;

(iii) các kháng nguyên bại liệt tùy ý được thêm vào chế phẩm thu được ở mục (ii);

(iv) chế phẩm chứa kháng nguyên Hib được thêm vào chế phẩm thu được ở mục (ii) hoặc (iii);

(v) độ pH được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$; và

(vi) (a) ít nhất một cation axit amin được thêm vào để hoàn thành chế phẩm thu được ở mục (ii) hoặc (iii) trước khi thêm kháng nguyên Hib, hoặc

(b) ít nhất một cation axit amin được thêm vào kháng nguyên Hib;

cation axit amin này được thêm vào với lượng đủ để thu được nồng độ cuối cùng trong vaccin là ít nhất 100 mg/l.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm vaccin theo sáng chế là chế phẩm chứa HBsAg, độc tố bạch hầu D, độc tố uốn ván T, kháng nguyên ho gà PTxd và FHA đã được hấp phụ sẵn trên AlOOH, kháng nguyên Hib và, tùy ý, giá thể bại liệt, trong đó:

(i) ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90% tổng lượng HBsAg có mặt trong chế phẩm được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH trong ít nhất 3 tháng kể từ ngày sản xuất khi chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$; và

(ii) ít nhất 65%, 70% hoặc tốt hơn là 75% tổng lượng kháng nguyên Hib có mặt trong chế phẩm không được hấp phụ trên AlOOH, lượng này giữ tương đối ổn định theo thời gian.

Ngoài ra, bằng phương pháp theo sáng chế, các kháng nguyên không phải là HBsAg mà đã được chỉ ra là có lợi khi chúng được hấp phụ trên nhôm oxit hydroxit để sinh miễn dịch, cũng được giữ ở trạng thái được hấp phụ.

Do đó, như đã nêu trên, ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa:

- từ 10 đến 30 μ g HBsAg /ml; tốt hơn là 20 μ g/ml;
- từ 40 đến 80 Lf D/ml, tốt hơn là từ 50 đến 70 Lf /ml;
- từ 10 đến 50 Lf T/ml, tốt hơn là từ 10 đến 30 Lf /ml;
- từ 40 đến 60 μ g FHA /ml; tốt hơn là 50 μ g/ml;
- từ 40 đến 60 μ g PTxd/ml; tốt hơn là 50 μ g/ml;
- từ 2 đến 60 μ g PRP/ml; tốt hơn là 20-24 μ g/ml;
- từ 1 đến 2mg AlOOH/ml; tốt hơn là 1,2mg AlOOH/ml;
- các ion phosphat với nồng độ nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/lít, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 38 đến 42 mmol/lít ion phosphat;
- từ 100 đến 1000 μ g/ml cation axit amin, tốt hơn là từ 400 đến 800 μ g/ml; và tùy ý
- virus bại liệt kiểu 1, 2 và 3 ở dạng bất hoạt, với lượng tương ứng 80, 16 và 64 DU/ml.

Như đã nêu ở trên, chế phẩm theo sáng chế có thể cũng chứa các kháng nguyên khác của *Bordetella pertussis*, như pertactin (69 kDa) hoặc ngưng kết nguyên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ - Bào chế ở quy mô công nghiệp khối (250 l) vacxin sáu giá thể HepB-Dt-Tt-ho gà-bại liệt-HiB

Việc bào chế này được thực hiện trong các điều kiện vô trùng và cùng với việc khuấy liên tục.

A – Chuẩn bị HBsAg được hấp phụ trên AlOOH

Hỗn dịch đồng nhất của gel nhôm oxit hydroxit (AlOOH) được bán bởi Brenntag AG, với lượng 8g nhôm/l, được đưa vô trùng vào thùng 50 lít.

Sau khi lọc qua bộ lọc 0,22 μ m, thể tích HBsAg cần để thu được nồng độ 20 μ g/ml trong thành phẩm vacxin liên tục được thêm vào thùng đã chứa AlOOH. Hỗn hợp được để lại để khuấy trong từ 20 đến 24 giờ ở nhiệt độ môi trường để thu được hỗn dịch đồng nhất.

B – Chuẩn bị D + T + PTxd + FHA được hấp phụ trên gel nhôm

Song song với việc chuẩn bị nêu trên, hỗn hợp của gel nhôm, giải độc tố bạch hầu (D), giải độc tố uốn ván (T), giải độc tố *Bordetella pertussis* (PTxd) và ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi của *Bordetellapertussis* (FHA) được điều chế theo cách sau:

Hỗn dịch đồng nhất của gel AlOOH được bán bởi Brenntag AG, với lượng 8g nhôm/l, được đưa vô trùng vào thùng 250 l.

Dung dịch của D và sau đó, sau khi đồng hóa, của T được đưa vào liên tục, sau khi lọc qua bộ lọc 0,22µm, vào thùng 250 lít đã chứa AlOOH, để thu được các nồng độ của D và T tương ứng trong vaccin thành phẩm là 60 Lf (giới hạn kết bông)/ml và 20 Lf/ml.

Ngay sau khi thu được hỗn hợp đồng nhất, hỗn dịch của PTxd đã được hấp phụ sẵn trên AlOOH và sau đó, hỗn dịch của FHA được hấp phụ sẵn trên AlOOH liên tục được thêm vô trùng vào thùng này, để thu được nồng độ của PTxd và FHA trong vaccin thành phẩm là 25µg/ml.

Cuối cùng, thể tích dung dịch đệm phosphat 500mM cần để thu được nồng độ ion phosphat nằm trong khoảng từ 20 đến 30 mmol/lít được thêm sau khi lọc qua bộ lọc 0,22µm.

Hỗn dịch D-T-PTxd-FHA-AlOOH thu được được để lại để khuấy trong ít nhất 14 giờ ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

C – Chuẩn bị hỗn hợp của HBsAg + D + T + PTxd + FHA được hấp phụ trên gel nhôm

Chế phẩm thu được ở mục A được thêm vô trùng vào chế phẩm thu được ở mục B.

Hỗn hợp thu được được để lại để khuấy để thu được hỗn dịch đồng nhất.

Thể tích dung dịch đệm phosphat 500mM cần để thu được nồng độ ion phosphat là 40 mmol/l trong chế phẩm cuối cùng sau đó được thêm vào sau khi lọc qua bộ lọc 0,22µm.

D - Bảo hòa các vị trí tĩnh điện của gel nhôm/phức hợp HBsAg + D + T + PTxd + FHA với dung dịch axit amin

Dung dịch axit amin chứa 12 axit amin thiết yếu, có thành phần như sau, được điều chế chế:

- Arginin hydroclorua.....	2,1 g/l, nghĩa là 1,73 g/l arginin
- Cystin.....	1,2 g/l
- Histidin	0,8 g/l
- Isoleuxin	2,6 g/l
- Leuxin.....	2,6 g/l
- Lysin hydroclorua.....	3,65 g/l, nghĩa là 2,91 g/l lysin

- Metionin	0,75 g/l
- Phenylalanin	1,65 g/l
- Threonin	2,4 g/l
- Tryptophan.....	0,4 g/l
- Tyrosin.....	1,8 g/l
- Valin.....	2,35 g/l

Nghĩa là, 21,2 g/l axit amin, bao gồm 5,44 g/l cation axit amin (His - Arg-Lys).

450ml natri hydroxit 2,5N (NaOH) được thêm vào (0,5 l/phút). Tiếp tục đồng hóa bằng cách khuấy trong 10 phút.

Dung dịch axit amin này được lọc qua bộ lọc 0,22 µm, được thêm liên tục vào hỗn hợp thu được ở mục C, để thu được nồng độ 572pg/ml cation axit amin trong chế phẩm cuối cùng.

E - Điều chỉnh độ pH

Độ pH của hỗn dịch thu được ở mục D được điều chỉnh đến độ pH 7,1 (7,0 - 7,2) bằng cách sử dụng dung dịch gốc đã lọc của natri hydroxit ở nồng độ 2,5N.

F - Thêm các kháng nguyên bại liệt

Chế phẩm chứa virus bại liệt kiểu huyết thanh 1, 2 và 3 ở dạng bất hoạt (lần lượt thuộc các chủng Mahoney, MEF-1 và Saukett), được lọc qua bộ lọc 0,22 µm, sau đó đưa vào thùng chứa hỗn dịch thu được ở mục E.

G - Thêm PRP-T

Đầu tiên, dung dịch trung gian chứa PRP-T được điều chế theo cách sau: dung dịch đệm Tris-sucroza, được lọc sơ bộ qua bộ lọc 0,22 µm, được thêm vào chế phẩm chứa PRP-T đã lọc qua bộ lọc 0,22 µm, để tạo thành hỗn hợp trung gian.

Hỗn hợp này được đưa vô trùng vào hỗn hợp thu được ở mục F.

H – Giai đoạn điều chỉnh cuối cùng

Sau khi đồng hóa hỗn dịch thu được ở mục G, thêm vào một lượng nước dùng để tiêm đã lọc sơ bộ đủ để đạt đến thể tích mong muốn là 250 lít. Sau đó, nếu cần, độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$ bằng cách thêm vào dung dịch natri hydroxit 2,5N đã lọc sơ bộ hoặc dung dịch axit axetic 10%.

Hỗn hợp này được bảo quản ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sau đó được phân phối vào ống tiêm hoặc chai với lượng 0,5 ml/liều.

Theo đó, một liều 0,5 ml chứa 600µg Al^{3+} , 10µg HBsAg, không nhỏ hơn 20 IU

D, không nhỏ hơn 40 IU T, 25µg Pt, 25µg FHA, kháng nguyên bại liệt kiểu 1 nằm trong khoảng từ 20 đến 43 DU (các đơn vị kháng nguyên D), kháng nguyên bại liệt kiểu 2 nằm trong khoảng từ 5 đến 9 DU, kháng nguyên bại liệt kiểu 3 nằm trong khoảng từ 17 đến 36 DU, 12µg PRP (ở dạng PRP-T), các ion phosphat với nồng độ 40 mmol/l, dung dịch đệm Tris-sucroza với nồng độ 2,5 mmol/lít Tris và sucroza 2,125%, và cũng chứa 286µg cation axit amin (His - Arg - Lys).

Thử nghiệm lâm sàng

Chế phẩm vaccin được bào chế theo ví dụ ở trên được thử nghiệm trong thử nghiệm lâm sàng, để so sánh với vaccin 6 giá thể hiện đã được bán trên thị trường, được gọi là Infanrix Hexa™, vaccin này có thể chủng cho trẻ em để chống lại các bệnh tương tự như vaccin được bào chế theo sáng chế (bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván, bệnh ho gà, bệnh bại liệt, nhiễm trùng Hib và viêm gan B), nhưng cụ thể, nó có nhược điểm là một phần của nó được đông khô và do đó, cần bước hấp thu sản phẩm đông khô trước khi sử dụng.

Trong toàn bộ thử nghiệm lâm sàng này, 2 loại chế phẩm vaccin nêu trên được dùng cho trẻ em, theo chế độ chủng bao gồm 3 liều được dùng ở thời điểm 2, 4 và 6 tháng. Vaccin lỏng được bào chế theo phương pháp của sáng chế đã được chứng minh là được dung nạp rất tốt, và có tính sinh miễn dịch như vaccin hiện đang được bán trên thị trường.

Dữ liệu thử nghiệm

Phần trăm hấp phụ HBsAg/lượng PRP-T không được hấp phụ

Ba lô sản phẩm khối cuối cùng (PFV39-41-42) và cả ba lô này đều được phân phối vào chai (SI2-13-14) - tất cả các lô đều thu được theo ví dụ đã cung cấp - được bảo quản ở + 5°C và được phân tích ở các thời điểm khác nhau trong khoảng thời gian tương ứng là 9 và 22 tháng. Phần trăm hấp phụ HBsAg và lượng PRP-T không được hấp phụ được phân tích.

Phần trăm hấp phụ HBsAg được xác định, như được nêu ở trên, từ tổng lượng HBsAg và lượng HBsAg không được hấp phụ, việc xác định HBsAg được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA bán kẹp theo các nguyên tắc được xác định theo Dược điển Châu Âu 2.7.1. Tóm tắt như sau: HBsAg bị bắt giữ bởi kháng thể đơn dòng thứ nhất kháng HBsAg thuộc kiểu IgM, trong các lỗ của đĩa 96 lỗ. HBsAg theo đó ở trạng thái liên kết được bao bọc bởi kháng thể đơn dòng thứ hai kháng HbsAg thuộc

kiểu IgG, mà bản thân kháng thể này được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng IgG kết cặp peroxidaza. Cơ chất sinh màu cho peroxidaza, tetrametylbenzidin (TMB), đóng vai trò làm chất hiện màu. Khi được thêm vào, màu xuất hiện, cường độ màu tỷ lệ thuận với lượng HBsAg bị bắt giữ trong lỗ. Kết quả được phân tích theo phương pháp đường song song được mô tả trong Dược điển Châu Âu 5.3.3.

Để xác định phần trăm hấp phụ HBsAg, vaccin được ly tâm (8800 g; 5 phút; 20°C), để có thể thu hồi dịch nổi chứa HbsAg không được hấp phụ. Các mẫu dịch nổi cần thử nghiệm được pha loãng trong đệm ELISA chứa đệm giải hấp, thành các dịch pha loãng theo bậc 2 lần trong khoảng bao gồm, ví dụ, từ 1/400 đến 1/12 800.

Mẫu vaccin tổng và mẫu khoảng chuẩn được pha loãng trong đệm ELISA chứa đệm giải hấp, thành các dịch pha loãng theo bậc 2 lần trong khoảng bao gồm, ví dụ, từ 1/8 đến 1/12 600.

Đĩa 96 lỗ được phủ bằng kháng thể đơn dòng thứ nhất được ủ trong 12 giờ ở 5°C và sau đó rửa bằng dung dịch PBS-Tween 20. Các dịch pha loãng của dịch nổi của mẫu vaccin tổng và mẫu khoảng chuẩn được phân phối vào các lỗ. Sau đó, kháng thể thứ hai được thêm vào và việc hiện màu được thực hiện bằng kháng thể liên hợp peroxidaza và TMB (tetrametylbenzidin). Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm HCl 1N. Sau mỗi bước, đĩa được ủ trong 30 phút ở 25°C và sau đó tiếp tục rửa bằng dung dịch PBS-Tween 20. Mẫu trống (chỉ chứa đệm pha loãng) được thêm vào các lỗ có sẵn và trải qua các xử lý tương tự. Đĩa này được đọc OD ở 450 và 630 nm.

Lượng PRP-T không được hấp phụ được đánh giá bằng HPAEC-PAD theo cách như sau:

Đầu tiên, khoảng chuẩn của PRP-T tham chiếu từ 0,5 đến 12,5 µg/ml được pha chế.

Các mẫu cần thử nghiệm và tương tự, các mẫu khoảng chuẩn được ly tâm ở tốc độ 5000 g trong 5 phút ở nhiệt độ môi trường. Dịch nổi được thu gom và sau đó được thủy phân bằng dung dịch NaCl 1,5N chứa glucosamin-1 -phosphat làm chất chuẩn nội. Mẫu trống (chứa NaCl 0,9%; NaOH 1,5N + chất chuẩn nội) được thêm vào.

Sắc ký được tiến hành với pha động bao gồm NaOH 35 mM và natri axetat 114 mM, được tiêm vào cột với tốc độ 1,2 ml/phút.

Nồng độ PRP không được hấp phụ (µg/ml) được tính bằng cách sử dụng đẳng thức sau:

(Diện tích bề mặt của đỉnh PRP/diện tích bề mặt của đỉnh của chất chuẩn nội) = a
X [nồng độ PRP] + b trong đó "a" là độ dốc và "b" là đoạn thẳng bị chặn trên trục y, a và b đã được xác định từ đường hồi quy.

Kết quả được đưa ra trong 4 bảng dưới đây:

Phần trăm HBsAg được hấp phụ trong chế phẩm của thành phẩm dạng khối lớn (PVF 39-41-42) ở +5°C			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	PFV39	PFV41	PFV42
0	95	97	98
1 tháng	92	93	95
2 tháng	92	92	93
3 tháng	91	90	91
4 tháng	89	90	92
5 tháng	85	88	91
6 tháng	89	88	89
9 tháng	88	86	91

Phần trăm HBsAg được hấp phụ ở chế phẩm được bảo quản trong chai (các lô S12-S13-S14) ở +5°C			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	S12	S13	S14
0	95	97	98
4 tháng	88	88	90
5 tháng	85	86	88
7 tháng	85	80	86
10 tháng	83	84	87
13 tháng	82	86	84
16 tháng	81	83	85
22 tháng	83	78	86

PRP-T không được hấp phụ (µg/ml) trong dạng chế phẩm của thành phẩm dạng khối lớn (PVF 39-41-42) ở +5°C			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	PFV39	PFV41	PFV42
0	22,6	20,0	21,0

1 tháng	23,1	19,5	20,4
2 tháng	23,3	21,6	22,0
3 tháng	24,9	22,6	23,1
4 tháng	24,2	22,0	20,7
5 tháng	22,2	22,7	24,5
6 tháng	27,7	22,9	21,6
9 tháng	27,0	24,8	23

PRP-T không được hấp phụ ($\mu\text{g/ml}$) trong chế phẩm được bảo quản trong chai (các lô S12-S13-S14) ở $+5^{\circ}\text{C}$			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	S12	S13	S14
0	22,6	20,0	21,0
4 tháng	21,1	21,1	19,8
5 tháng	23,0	19,6	18,6
7 tháng	23,1	21,0	19,5
10 tháng	25,0	23,4	21,8
13 tháng	24,6	22,6	20,8
16 tháng	23,5	22,3	20,8
22 tháng	23,9	22,0	19,9

Để so sánh, mức hấp phụ theo thời gian của HBsAg có trong ba lô thành phẩm dạng khối lớn (FDN5-6-7) và tương tự, trong ba lô được phân phối vào chai (S 44-45-46), của chế phẩm lỏng bao gồm các kháng nguyên giống nhau nhưng thu được theo phương pháp phối chế theo tỷ lệ được mô tả trên Fig.1 và do đó, khác so với phương pháp được mô tả trong ví dụ ở trên, cũng được thử nghiệm. Chế phẩm này chứa, trong 0,5 ml: 10 μg HBsAg, 30 Lf Dt, 10 Lf Tt, 25 μg Pt, 25 μg FHA, 40 DU virus bại liệt kiểu 1, 8 Du virus bại liệt kiểu 2, 32 DU virus bại liệt kiểu 3, 12 μg PRP (ở dạng PRP-T), 0,6mg Al, các ion phosphat với nồng độ 55 mmol/l, các ion cacbonat với nồng độ 20 mmol/l, đệm Tris-sucroza với nồng độ 2,5 mmol/lít cho Tris và 2,125% cho sucroza, và 14 μg cation axit amin (His - Arg - Lys) từ môi trường M199 (giá thể bại liệt), pH 6,8 - 7,2.

Kết quả thu được như sau:

Phần trăm HbsAg được hấp thụ ở chế phẩm của thành phẩm dạng khối lớn (FDN5-6-7) ở +5°C			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	FDN5	FDN6	FDN7
0	81	85	81
1 tháng	78	82	62
2 tháng	74	78	63
3 tháng	66	84	62
6 tháng	61	77	61

Phần trăm HBsAg được hấp thụ ở chế phẩm được bảo quản trong chai (các lô S44-S45-S46) ở +5°C			
Thời gian trôi qua sau hoạt động bào chế	S44	S45	S46
0	81	85	81
7 tháng	63	64	77
10 tháng	57	65	51
13 tháng	47	54	53
16 tháng	33	56	38
22 tháng	44	47	36
28 tháng	44	51	44
34 tháng	45	54	42
40 tháng	49	52	48

Các lượng PRP-T không được hấp phụ được xác định trong cùng khoảng thời gian đã cho thấy rằng có rất ít thay đổi so với thời điểm 0, và do đó đáp ứng yêu cầu. Tuy nhiên, các kết quả này cho thấy rằng, trong trường hợp mà không tương ứng với chế phẩm thu được nhờ phương pháp theo sáng chế, kháng nguyên bề mặt viêm gan B đã không được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên nhôm oxit hydroxit.

Dữ liệu thử nghiệm liên quan đến cation axit amin

Cuối cùng, chế phẩm theo sáng chế trực tiếp thu được từ quy trình thực nghiệm được thực hiện trong ví dụ nêu trên và chế phẩm thu được bằng quy trình cải biến trong

đó chế phẩm chỉ chứa ba cation axit amin (Arg - Lys - His) thay thế cho chế phẩm chứa 12 axit amin thiết yếu được so sánh về lượng PRP-T không được hấp phụ. Không quan sát thấy chênh lệch về lượng PRP-T không được hấp phụ, theo đó cho thấy rằng chỉ các cation axit amin đóng vai trò quan trọng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bào chế chế phẩm vacxin lỏng chứa ít nhất là các thành phần sau:

- nhôm oxit hydroxit (AlOOH),
- một kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg),
- một kháng nguyên của *Haemophilus influenzae* kiểu b (Hib) gồm polysaccharit vỏ

được liên hợp với protein mang,

trong đó, kháng nguyên bề mặt viêm gan B được giữ ở trạng thái được hấp phụ trên AlOOH, trong khi kháng nguyên Hib được giữ ở trạng thái không được hấp phụ,

trong đó:

- kháng nguyên bề mặt viêm gan B được hấp phụ trên AlOOH để thu được phức hợp AlOOH/HBsAg,

- phức hợp AlOOH/HBsAg này được trộn với kháng nguyên Hib với sự có mặt của các cation axit amin ở nồng độ ít nhất là 100mg/l và các ion phosphat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/l.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên HBsAg được hấp phụ trên nhôm bằng cách trộn hỗn dịch của AlOOH với hỗn dịch của HBsAg kèm theo khuấy trong ít nhất là 4 giờ, tốt hơn là ít nhất là 12 giờ, tốt hơn là từ 20 đến 24 giờ.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, các cation axit amin được thêm vào phức hợp AlOOH/HBsAg trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, các cation axit amin được thêm vào kháng nguyên Hib trước khi trộn với phức hợp AlOOH/HBsAg.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, các ion phosphat được thêm vào phức hợp AlOOH/HBsAg trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, độ pH của chế phẩm chứa phức hợp AlOOH/HBsAg được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$ trước khi trộn với kháng nguyên Hib.

7. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, phương pháp này còn bao gồm các bước sau:

- điều chế chế phẩm chứa ít nhất một kháng nguyên được chọn từ kháng nguyên bạch hầu, uốn ván, bại liệt và ho gà, và cả nhôm oxit hydroxit, và
- trộn phức hợp AlOOH/HBsAg với chế phẩm nêu trên, trước khi thực hiện trộn

với kháng nguyên Hib.

8. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, phương pháp này còn bao gồm bước điều chế chế phẩm nêu trên bằng cách thêm lần lượt từng kháng nguyên vào hỗn dịch của nhôm oxit hydroxit và khuấy giữa mỗi lần thêm kháng nguyên.

9. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ:

- HBsAg được hấp phụ trên một lượng AlOOH chiếm một phần ba tổng lượng AlOOH có mặt trong chế phẩm cuối cùng, trong một khoảng thời gian từ 20 đến 24 giờ, để tạo thành phức hợp AlOOH/HBsAg,

- song song với việc hấp phụ nêu trên, các thành phần sau đây lần lượt được hấp phụ trên một lượng AlOOH khác: độc tố bạch hầu D, độc tố uốn ván T, độc tố tinh khiết của *Bordetella pertussis* PTxd, bản thân độc tố này được hấp phụ sẵn trên AlOOH, và ngưng kết tổ hồng cầu dạng sợi của *Bordetella pertussis* FHA, bản thân ngưng kết tổ này được hấp phụ sẵn trên AlOOH, sau đó các ion phosphat được thêm vào đó, sau đó phức hợp AlOOH/HBsAg được thêm vào đó,

- các ion phosphat được thêm lần nữa với lượng để có thể đạt được nồng độ 40 mmol/l trong chế phẩm cuối cùng,

- ít nhất một cation axit amin được thêm vào với lượng để có thể đạt được nồng độ ít nhất 100 mg/l trong chế phẩm cuối cùng,

- độ pH được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$,

- kháng nguyên bại liệt ở dạng virus bị bất hoạt kiểu 1 và/hoặc kiểu 2 và/hoặc kiểu 3 được thêm vào,

- kháng nguyên Hib được thêm vào,

- độ pH được điều chỉnh đến $7,1 \pm 0,1$,

- chế phẩm thu được được phân phối vào các ống tiêm hoặc vào chai.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, ít nhất 250 lít chế phẩm vaccin được bào chế trên quy mô công nghiệp.

11. Chế phẩm vaccin thu được theo phương pháp được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, và chứa ít nhất là kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và kháng nguyên Hib gồm polyribosylribitol phosphat được liên hợp với protein uốn ván (PRP-T).

12. Chế phẩm vaccin theo điểm 11, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này còn chứa kháng nguyên bạch hầu, uốn ván, bại liệt và ho gà.

13. Chế phẩm vacxin theo điểm 11 hoặc 12, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa ít nhất:

- kháng nguyên bề mặt viêm gan B, HBsAg,
- kháng nguyên bạch hầu ở dạng độc tố bạch hầu D,
- kháng nguyên uốn ván ở dạng độc tố uốn ván T,
- kháng nguyên ho gà ở dạng độc tố tinh khiết (PTxd) và ở dạng ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi (FHA),

- kháng nguyên của *Haemophilus influenzae* kiểu b, ở dạng polyribosylribitol phosphat được liên hợp với protein uốn ván (PRP-T),

- các kháng nguyên bại liệt ở dạng virus bị bất hoạt được chọn từ kiểu 1, 2 và 3.

14. Chế phẩm vacxin theo điểm 13, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa ít nhất:

- từ 10 đến 30µg HBsAg/ml, tốt hơn là 20µg/ml;
- từ 40 đến 80 Lf D/ml, tốt hơn là từ 50 đến 70 Lf/ml;
- từ 10 đến 50 Lf T/ml, tốt hơn là từ 10 đến 30 Lf/ml;
- từ 40 đến 60µg FHA/ml, tốt hơn là 50µg/ml;
- từ 40 đến 60µg PTxd/ml, tốt hơn là 50µg/ml;
- từ 2 đến 60µg PRP/ml, tốt hơn là 20-24µg/ml, ở dạng PRP-T liên hợp;
- từ 1 đến 2mg AlOOH/ml, tốt hơn là 1,2mg AlOOH/ml;
- từ 35 đến 45 mmol/l, tốt hơn là từ 38 đến 42 mmol/l, các ion phosphat;
- từ 100 đến 1000 mg/l các cation axit amin, tốt hơn là từ 400 đến 800 mg/l;
- virus bại liệt kiểu 1, 2 và 3 ở dạng bị bất hoạt, với lượng tương ứng là 80, 16 và 64 DU/ml.