



(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)



1-0031212

(51)⁷ C12N 7/04; A61K 39/13; C12N 7/06;
C12N 7/00; A61K 39/00; A61K 39/39

(13) B

(21) 1-2017-03703

(22) 06/10/2015

(86) PCT/IN2015/000376 06/10/2015

(87) WO 2016/063291 A1 28/04/2016

(30) 3180/MUM/2014 07/10/2014 IN

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/12/2017 357A

(73) SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED (IN)

212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra, 411 028 Pune (IN)

(72) DHERE, Rajeev Mhalasakant (IN); PISAL, Sambhaji Shankar (IN); ZADE, Jagdish Kamalaji (IN); SABALE, Rajendra Narayan (IN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA HẠT VIRUT ĐƯỜNG RUỘT

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất chế phẩm chứa hạt virus đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước bất hoạt virus đường ruột bằng formaldehyt được cải tiến khi có mặt dung dịch đệm tromethamin nhờ đó thu hồi được kháng nguyên D với lượng tối đa. Hấp phụ IPV này trên nhôm hydroxit sau đó tạo ra chế phẩm IPV được giảm liều đáng kể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sản xuất vaccin, cụ thể hơn sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm chứa hạt virus đường ruột.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mức độ phổ biến của virus bại liệt đã được giảm mạnh nhờ việc sử dụng Vaccin bại liệt bằng đường miệng (Oral Polio Vaccine: OPV), dựa trên các chủng Sabin polio sống-giảm độc lực. Tuy nhiên, OPV có nhiều hạn chế trong thời kỳ sau khi thanh toán bệnh. Do đó, sự phát triển của Sabin-IPV đóng vai trò quan trọng trong chiến lược thanh toán bệnh bại liệt của WHO. Việc sử dụng Sabin giảm độc lực thay cho các chủng Salk polio kiểu đại sẽ mang lại độ an toàn cao hơn trong quá trình sản xuất vaccin. Ngoài ra, để phòng ngừa sự trỗi dậy của các virus bại liệt có nguồn gốc từ vaccin đang lưu thông (cVDPV), việc sử dụng OPV nên được ngừng sau khi thanh toán được bệnh bại liệt, và được thay thế bằng IPV. Các cVDPV này có thể lây truyền và có thể gây độc thần kinh (tương tự như các poliovirus đại) dẫn đến bệnh bại liệt thể liệt do vaccin. Các chủng này có thể gieo rắc lại virus bại liệt ra khắp thế giới và phủ nhận sự thanh toán bệnh đã thành công.

IPV được phân phối bằng cách tiêm trong cơ (IM) hoặc tiêm sâu dưới da (SC). Hiện nay, IPV đã có ở dạng chế phẩm đơn không có chất bổ trợ, hoặc ở nhiều dạng kết hợp khác nhau, bao gồm DT-IPV (với biến độc tố bạch hầu và uốn ván) và các vaccin sáu giá DTPHepB-Hib-IPV (được bổ sung thêm với thành phần ho gà, viêm gan B và Haemophilus influenzae b. Liều chuẩn của vaccin bại liệt được chấp nhận hiện nay chứa các kháng nguyên D ở dạng 40 đơn vị virus bại liệt typ 1 (Mahoney) bất hoạt, 8 đơn vị virus bại liệt typ 2 (MEF-I) bất hoạt và 32 đơn vị virus bại liệt typ 3 (Saukett) bất hoạt (ví dụ, Infanrix-IPV™). Các chế phẩm IPV đơn hiện nay không chứa chất bổ trợ.

Hầu hết các chuyên gia đều nhất trí rằng việc sử dụng rộng rãi IPV được ưu tiên hơn vì độ an toàn và hiệu quả bảo vệ đã được chứng minh của nó. Tuy nhiên, khi được so sánh với OPV, giá thành của IPV lại cao hơn đáng kể. Điều này chủ yếu là do các yêu cầu về: (i) nhiều virus hơn cho mỗi liều; (ii) quy trình thu hồi sản phẩm (nghĩa là, cô đặc, tinh chế và bất hoạt), và quy trình thử nghiệm QC liên quan (iii) sự mất kháng nguyên hoặc khả năng thu hồi kém trong quy trình thu hồi sản phẩm và iv) đồ chứa. Đến nay, thách thức về tài chính vẫn là nhược điểm lớn đối với việc cải tiến và triển khai IPV ở các nước có thu nhập trung bình và thấp. Giá thành sản xuất của sIPV hiện nay được ước tính tương đương với giá thành sản xuất cho IPV, đắt hơn khoảng 20 lần so với OPV. Nhu cầu toàn cầu trong tương lai đối với IPV sau khi thanh toán các virus bại liệt có thể gia tăng từ mức hiện tại là 80 triệu liều đến 450 triệu liều mỗi năm. Do đó, các phương pháp để “mở rộng” việc cung cấp IPV chắc chắn là cần thiết.

Các chế phẩm vaccin hiệu quả giảm liều có tác dụng bảo vệ chống lại sự lây nhiễm bằng cách sử dụng liều kháng nguyên IPV thấp hơn được mong muốn trong các trường hợp mà việc cung cấp vaccin thông thường là không đủ để đáp ứng các nhu cầu toàn cầu hoặc khi giá thành sản xuất của vaccin thông thường cản trở việc vaccin này được bán ở mức giá chấp nhận được đối với các nước đang phát triển. Việc tiếp cận với liều IPV thấp hơn; so với các chế phẩm đang được bán trên thị trường cũng có thể là an toàn hơn. Do đó, nhiều chiến lược khác nhau để làm cho IPV sẵn có với giá thành dễ chấp nhận hơn cần được đánh giá.

Trong trường hợp các vaccin cúm đại dịch, việc sử dụng chất bổ trợ cho phép giảm liều, tăng độ khả dụng và làm giảm giá thành của vaccin. Do đó, đã được nghiên cứu là chế phẩm vaccin có chất bổ trợ chứa sIPV làm giảm giá thành và còn làm tăng số lượng liều sIPV sẵn có trên toàn thế giới.

Các nhóm nghiên cứu khác nhau trên toàn cầu đã đánh giá việc tiết kiệm liều đối với các vaccin (cụ thể là vaccin cúm) bằng cách sử dụng một số chất bổ trợ cụ thể là phèn, nhũ tương, chất chủ vận TLR (MPL, CpG, poly-IC, imiquimod), dmLT, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, CAF01, poly [di (carboxylatophenoxy)-phosphazene] (PCPP) và các hạt replicon gây viêm não ngựa Venezuela (VEE). Hầu hết các loại chất bổ trợ đang được nghiên cứu này đều gặp phải các rào cản sau đây i) độ an toàn chưa biết hoặc được

xếp loại là chất độc bởi cơ quan quản lý ii) có các hạn chế về đường sử dụng iii) không có khả năng tái sản xuất iv) độ ổn định của chất bổ trợ.

Các chất bổ trợ nhũ tương (MF-59, AS03, AF3) trước đây đã được báo cáo là có hiệu quả giảm liều mạnh (> 30 lần) đối với vaccin Cúm hoặc Viêm gan B. Các chất bổ trợ này hoạt động bằng cách tạo ra một kho dự trữ ở vị trí tiêm, cho phép giải phóng định liều nguyên liệu kháng nguyên và kích thích các tế bào huyết tương sản xuất kháng thể. Tuy nhiên, các chất bổ trợ này là quá độc để được sử dụng rộng rãi để phòng bệnh cho người và thường được dự trữ cho các tình trạng bệnh nặng và/hoặc giai đoạn cuối như bệnh ung thư mà có khả năng chấp nhận các tác dụng phụ cao hơn.

Ngoài ra, các muối nhôm được xem là an toàn, đang được sử dụng trong các vaccin kết hợp chứa sIPV, có các rào cản phát triển thấp nhất và không quá đắt để sản xuất. Tuy nhiên, các chất bổ trợ nhôm chưa được biết là có cho phép giảm liều đáng kể hay không.

Một trong các bước quan trọng nhất trong quy trình sản xuất vaccin chống lại các tác nhân gây bệnh, cụ thể là vaccin virus, là bước bất hoạt virus. Trong trường hợp bất hoạt virus, formalin là chất bất hoạt được sử dụng thường xuyên nhất trong việc sản xuất vaccin. Formaldehyt bất hoạt virus bằng cách liên kết chéo không thuận nghịch các nhóm amin bậc 1 trong các protein bề mặt với các nguyên tử nitơ khác gần đó trong protein hoặc ADN qua liên kết —CH_2 . Vấn đề tiềm tàng đối với việc sử dụng formalin để bất hoạt virus là ở chỗ nó liên quan đến một chuỗi các phản ứng hóa học tạo ra các sản phẩm phản ứng có thể gây ra sự liên kết chéo giữa các protein của virus và kết tụ các hạt virus. Điều này có thể gây cản trở tác dụng bất hoạt của formalin và có thể phá hủy một phần khả năng gây miễn dịch của kháng nguyên trong vaccin. Theo đó, trước đây đã có báo cáo rằng việc bất hoạt virus bại liệt bằng formalin có thể ảnh hưởng đến khả năng gây miễn dịch của virus cũng như tính kháng nguyên. Tham khảo tài liệu Morag Ferguson và đồng tác giả, *Journal of General Virology* (1993), 74, 685-690. Quan trọng nhất, đã được mô tả trước đây rằng các phương pháp bất hoạt bằng formaldehyt thường được thực hiện khi có mặt dung dịch đệm phosphat trong đó sự mất kháng nguyên D đáng kể được quan sát thấy cùng với sự biến đổi epitop đối với Sabin Typ I/II/III (tỉ lệ phục hồi kháng nguyên D sau bất hoạt: 22% đối với sabin typ I, 15% đối với sabin typ II, 25% đối với

sabin typ III), do đó không giữ được cấu hình epitop. Do đó, có thể là các kháng thể được sản sinh bởi người nhận virus bại liệt được bất hoạt bằng formalin (khi có mặt dung dịch đệm phosphat) có thể không tham gia vào đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Bằng cách kết hợp bất hoạt bằng formalin và UV, các nhà khoa học cố gắng khắc phục các hạn chế của việc bất hoạt bằng UV riêng hoặc bất hoạt bằng formalin riêng, khi bất hoạt virus bại liệt đặc biệt khó diệt. Xem, ví dụ, McLean, và đồng tác giả, "Experiences in the Production of Poliovirus Vaccines," *Prog. Med. Virol.*, vol 1, trang 122-164 (1958.) Taylor và đồng tác giả (*J. Immunol.* (1957) 79:265-75) mô tả việc bất hoạt virus bại liệt bằng cách kết hợp formalin và tia cực tím. Molner và đồng tác giả (*Am. J. Pub. Health* (1958) 48:590-8) mô tả sự tạo ra mức nồng độ kháng thể tuần hoàn có thể đo được trong máu của các đối tượng được chủng ngừa bằng vaccin bại liệt đã bất hoạt bằng tia cực tím- formalin. Truffelli và đồng tác giả (*Appl. Microbiol.* (1967) 15:516-27) báo cáo về việc bất hoạt Adenovirus và Simian Virus 40 gây ung thư ở chuột đồng bằng quy trình bất hoạt ba giai đoạn bao gồm formalin, tia UV và β -propiolacton (BPL). Miyamae (*Microbiol. Immunol.* (1986) 30:213-23) mô tả việc bào chế các kháng nguyên của virus Sendai bằng cách xử lý với tia UV và formalin. Tuy nhiên, các phương pháp tiềm năng đã được thảo luận trước đây để thay thế formaldehyt như β -propiolacton (BPL) đã được báo cáo là tạo ra phản ứng phức hợp miễn dịch khi được kết hợp với các thành phần khác của vaccin đại. Thêm vào đó, nó cũng được chỉ ra là gây ra bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh u lympho và bệnh u gan ở chuột.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, đặc biệt mong muốn sử dụng các điều kiện bất hoạt bằng formaldehyt có lợi để duy trì sự toàn vẹn cấu trúc của cấu trúc kháng nguyên của các chủng Sabin cũng như sử dụng các chất bổ trợ an toàn và hiệu quả về mặt chi phí mà có thể tạo ra các chế phẩm vaccin sIPV (Sabin IPV) được giảm liều đáng kể (nghĩa là, 8 đến 10 lần) nhờ đó làm giảm giá thành sản xuất, làm tăng nguồn cung cấp vaccin và tạo ra các vaccin rẻ tiền hơn cho các nước đang phát triển.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra là sự mất kháng nguyên D sau khi bất hoạt bằng formaldehyt có thể là do sự có mặt của dung dịch đệm phosphat, bất ngờ là

đệm này gây ra sự kết tụ không mong muốn các virus bại liệt. Sáng chế đề xuất quy trình bất hoạt bằng formaldehyt được cải tiến khi có mặt dung dịch đệm TRIS, nhờ đó đảm bảo các biến đổi epitop là nhỏ nhất và do đó làm giảm tối đa sự mất kháng nguyên D. Do đó, các chế phẩm vaccin IPV Sabin được giảm liều đáng kể với mức giảm liều ít nhất là 8 lần đối với chủng Sabin Typ I và mức giảm liều 3 lần đối với chủng Sabin Typ III có thể đạt được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Gel nhôm phosphat được tạo ra trong 0,9% NaCl (độ pH theo điện thế Zeta ở các nồng độ khác nhau của gel nhôm phosphat).

Fig.2: Gel nhôm phosphat được tạo ra trong nước để tiêm (độ pH theo điện thế Zeta ở các nồng độ khác nhau của gel nhôm phosphat).

Fig.3: Gel nhôm hydroxit được tạo ra trong 0,9% NaCl (độ pH theo điện thế Zeta ở các nồng độ khác nhau của gel nhôm hydroxit).

Fig.4: Gel nhôm hydroxit được tạo ra trong nước để tiêm (độ pH theo điện thế Zeta ở các nồng độ khác nhau của gel nhôm hydroxit).

Mô tả chi tiết sáng chế

Một khía cạnh quan trọng của sáng chế đề xuất quy trình bất hoạt bằng formalin và hấp phụ trên muối nhôm được cải tiến bao gồm các bước sau đây:

- a) Bổ sung bán thành phẩm Sabin IPV đã tinh chế vào dung dịch đệm TRIS (30 đến 50mM) có độ pH từ 6,8 đến 7,2,
- b) Bổ sung môi trường M-199 chứa glyxin (5gm/l) vào hỗn hợp (a),
- c) Bổ sung formaldehyt 0,025% trong lúc trộn,
- d) Ủ hỗn hợp thu được trong bước (c) ở 37°C từ 5 đến 13 ngày trên máy khuấy từ,
- e) Đưa hỗn hợp sau khi ủ vào bước lọc trung gian qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,22 μ vào ngày thứ 7 và bước lọc cuối cùng vào ngày thứ 13,
- f) Bảo quản bán thành phẩm thu được sau bước (e) ở 2-8°C,
- g) Tiến hành D-Ag ELISA để xác định đơn vị kháng nguyên D,

h) Lấy ra thể tích mong muốn của $\text{Al}(\text{OH})_3$ đã thanh trùng để đạt được nồng độ cuối cùng của nhôm (Al^{+++}) từ 0,8 đến 1,2mg/liều trong bình chứa 50ml,

i) Bổ sung bán thành phẩm sIPV có đơn vị D-Ag đã điều chỉnh và điều chỉnh thể tích này bằng chất pha loãng (10x M-199+ 0,5 Glyxin%),

j) Điều chỉnh độ pH của chế phẩm cuối cùng và thu được chế phẩm cuối cùng có độ pH từ 6 đến 6,5,

k) Đưa chế phẩm này đi khuấy từ qua đêm ở 2-8°C và trong đó sự bất hoạt bằng formalin ở bước (a) không xảy ra khi có mặt dung dịch đệm phosphat.

Phương án thứ nhất của sáng chế đề cập đến dung dịch đệm được sử dụng trong quá trình bất hoạt bằng formaldehyt có thể được chọn từ nhóm bao gồm các dung dịch đệm TRIS, TBS, MOPS, HEPES, và bicarbonat.

Khía cạnh được ưu tiên của phương án thứ nhất là sự bất hoạt bằng formaldehyt này có thể xảy ra khi có mặt dung dịch đệm TRIS hoặc TBS (dung dịch nước muối đệm TRIS) có nồng độ được chọn từ 30mM, 40mM và 50mM, tốt hơn là 40mM và ở độ pH được chọn từ 6,8, 6,9, 7, 7,1 và 7,2, tốt hơn, nếu nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2 trong đó bước bất hoạt này không sử dụng dung dịch đệm phosphat bất kỳ.

Phương án thứ hai của sáng chế mô tả bước hấp phụ sIPV đã được bất hoạt bằng formalin có thể được thực hiện trên nhôm hydroxit có nồng độ được chọn từ 1,5mg/liều, 1,8mg/liều, 2,2mg/liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2mg/liều đến 2,4mg/liều và ở độ pH được chọn từ 6,2, 6,3, 6,4 và 6,5, tốt hơn nếu là 6,5.

Phương án thứ ba của sáng chế đề cập đến quy trình bất hoạt bằng formalin và hấp phụ nhôm hydroxit cải tiến có thể phục hồi kháng nguyên D sau khi bất hoạt từ 50% đến 80% và tỉ lệ phần trăm hấp phụ nhôm hydroxit có thể là từ 85 đến 99%.

Một khía cạnh của phương án thứ ba là sáng chế đề xuất quy trình bất hoạt bằng formalin và hấp phụ nhôm hydroxit cải tiến giúp giảm liều ít nhất 8 lần đối với Sabin Typ I, ít nhất 3 lần với Sabin Typ III so với liều chuẩn là 40 DU-8DU-32DU.

Khía cạnh thứ hai của phương án thứ ba là sáng chế đề xuất các phương pháp bất hoạt bằng formaldehyt và hấp phụ nhôm hydroxit cải tiến tạo ra các chế phẩm vacxin chứa i) virus bại liệt bất hoạt typ 1 ở liều ít nhất là 5 đơn vị kháng nguyên D, ii) virus bại

liệt bất hoạt typ 2 ở liều ít nhất là 8 đơn vị kháng nguyên D và iii) virus bại liệt bất hoạt typ 3 ở liều ít nhất là 10 đơn vị kháng nguyên D.

Phương án thứ tư của sáng chế đề xuất chất bổ trợ muối nhôm là nhôm hydroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5mg/liều 0,5ml đến 2,5mg/liều 0,5ml, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2,100mg/liều 0,5ml đến 2,4mg/liều 0,5ml ở độ pH là khoảng 6,5.

Một khía cạnh của phương án thứ tư là tổng hàm lượng nhôm trong vaccin ba giá (typ 1, 2 và 3) có thể là nằm trong khoảng từ 800 đến 1000 μ g, tốt hơn nếu là 800 μ g Al^{3+} mỗi liều 0,5ml, khác biệt ở chỗ trong đó ít nhất 400 μ g Al^{3+} đối với typ 1, ít nhất 200 μ g Al^{3+} đối với typ 2, ít nhất 200 μ g Al^{3+} đối với typ 3.

Một khía cạnh khác của phương án thứ tư là ở chỗ chế phẩm vaccin virus bại liệt giảm liều này có thể chứa typ 1 và typ 3 và không chứa typ 2 trong đó thể tích liều này có thể là từ 0,1 đến 0,4ml.

Các chế phẩm vaccin giảm liều được bào chế bằng các phương pháp này có thể là i) “sIPV đơn” trong đó các kháng nguyên có thể bao gồm sIPV typ 1 hoặc sIPV typ 2 hoặc sIPV typ 3, hoặc sIPV typ 1 và 2, hoặc sIPV typ 1 và 3, hoặc sIPV typ 2 và 3, hoặc sIPV typ 1, 2 và 3 hoặc ii) “Các vaccin kết hợp chứa sIPV” trong đó các kháng nguyên không phải IPV của các vaccin kết hợp có thể được chọn từ nhưng không giới hạn ở biến độc tố bạch hầu, biến độc tố uốn ván, (các) kháng nguyên ho gà nguyên bào, (các) kháng nguyên ho gà vô bào, kháng nguyên bề mặt Viêm gan B, (các) kháng nguyên *Haemophilus influenzae* b, (các) kháng nguyên *Neisseria meningitidis* A, (các) kháng nguyên *Neisseria meningitidis* C, (các) kháng nguyên *Neisseria meningitidis* W- 135, (các) kháng nguyên *Neisseria meningitidis* Y, (các) kháng nguyên *Neisseria meningitidis* X, (các) kháng nguyên mụn nước *Neisseria meningitidis* B hoặc đã tinh chế, (các) kháng nguyên viêm gan A, (các) kháng nguyên *Salmonella typhi*, (các) kháng nguyên *Streptococcus pneumoniae*.

(Các) kháng nguyên không phải IPV có thể được hấp phụ lên muối nhôm như nhôm hydroxit, muối nhôm như nhôm phosphat hoặc lên hỗn hợp của cả nhôm hydroxit và nhôm phosphat, hoặc có thể không được hấp phụ.

Virus bại liệt có thể được nuôi trong môi trường nuôi cấy tế bào. Môi trường nuôi cấy tế bào này có thể là dòng tế bào VERO hoặc PMKC, mà là dòng tế bào liên tục thu

được từ thận khỉ. Thuận lợi nếu các tế bào VERO có thể là vi chất mang được nuôi cấy. Sau khi nuôi cấy, các virion có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật như siêu lọc, lọc thẩm tách và sắc ký. Trước khi sử dụng cho bệnh nhân, các virus này phải được bất hoạt, và việc này có thể được thực hiện bằng cách xử lý bằng formaldehyt.

Các chế phẩm có thể được trình bày trong các lọ thủy tinh, hoặc chúng có thể được trình bày trong các xylanh đã nạp sẵn. Các xylanh này có thể được cung cấp kèm theo kim tiêm hoặc không. Xylanh sẽ bao gồm liều đơn của chế phẩm, trong khi đó lọ thủy tinh có thể bao gồm một liều duy nhất hoặc nhiều liều (ví dụ, 2 liều). Trong một phương án, liều này là cho người. Trong một phương án khác, liều này là cho người trưởng thành, trẻ tập đi, trẻ sơ sinh hoặc trẻ dưới một tuổi và có thể được sử dụng bằng cách tiêm.

Các vacxin theo sáng chế có thể được đóng gói ở dạng liều đơn vị hoặc ở dạng đa liều (ví dụ, 2 liều). Chế phẩm đa liều này có thể được chọn từ nhóm bao gồm 2 liều, 5 liều và 10 liều. Với các dạng đa liều, các lọ thủy tinh được ưu tiên hơn so với các xylanh nạp sẵn. Thể tích liều hữu hiệu có thể được tạo ra một cách thông thường, tuy nhiên liều chế phẩm tiêm dùng cho người thông thường có thể tích là 0,5ml.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tinh chế Sabin IPV (sIPV)

1) Lọc dòng tiếp tuyến (Tangential flow filtration-TFF):

Hỗn hợp thu gom đã làm trong được cô đặc đến 10X bằng cách sử dụng hệ thống lọc dòng tiếp tuyến với các catxet 100Kda (0,5m²) và sau đó lọc thẩm tách 3 lần thể tích thu gom với dung dịch đệm phosphat (40mM, độ pH=7,0)

2) Sắc ký cột:

Việc tinh chế được thực hiện bằng Sắc ký trao đổi ion (Ion exchange chromatography-IEC). Dịch cô TFF 10X được đi qua dòng nhanh DEAE Sepharose (bộ trao đổi anion yếu) được gói trong cột xk-26 sử dụng thiết bị thám hiểm Akta (GE Healthcare). Các tạp chất tích điện âm được phát hiện ra là liên kết với cột này trong khi đó virus bại liệt được thu gom trong dòng đi qua với dung dịch đệm phosphat 40mM.

3) Trao đổi dung dịch đệm TRIS:

Để làm giảm tối đa sự mất kháng nguyên trong quy trình bất hoạt khá công kênh (13 ngày), hỗn hợp thu gom virus đã tinh chế được đổi đệm từ dung dịch đệm phosphat sang đệm TRIS (40mM, độ pH=7) với hệ TFF (100KDa, 0,1m²). Hỗn hợp thu gom virus đã tinh chế được trao đổi bằng ba thể tích dung dịch đệm tris.

Ví dụ 2

A) Bất hoạt sIPV

M-199 được cô đặc 10X với glyxin 0,5% được bổ sung vào để thu được nồng độ cuối cùng 1X. Chất bất hoạt formalin (0,025%) được bổ sung vào bán thành phẩm virus đã tinh chế trong khi trộn đều. Việc bất hoạt được thực hiện ở 37°C trong khi khuấy liên tục trong 13 ngày bao gồm lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,22µ vào ngày thứ 7 và ngày 13.

B) Bất hoạt sIPV trong dung dịch đệm TRIS và dung dịch đệm Phosphat

Formaldehyt 0,025% được sử dụng để bất hoạt trong 13 ngày ở 37°C.

Bảng 1: Hàm lượng kháng nguyên D, bất hoạt bằng formalin khi có mặt dung dịch đệm TRIS và dung dịch đệm phosphat

	Hàm lượng kháng nguyên D (dung dịch đệm phosphat 40mM trong quá trình bất hoạt)	Hàm lượng kháng nguyên D (dung dịch đệm Tris 40mM trong quá trình bất hoạt)
Typ 1	52,70 DU/ml	408,19 DU/ml
Typ 2	22,63	180,20
Typ 3	4,21	21,50

Khi các phương pháp bất hoạt bằng formaldehyt được thực hiện khi có mặt dung dịch đệm phosphat, sự mất kháng nguyên D đáng kể được quan sát thấy đối với Sabin Typ I. Trong khi đó đã phát hiện ra rằng việc bất hoạt bằng formaldehyt khi có mặt dung dịch đệm TRIS gây mất kháng nguyên D ít nhất.

Bảng 2: Các nồng độ khác nhau của dung dịch đệm TRIS được sử dụng trong quá trình bất hoạt

	30mM	40mM	50mM
Typ 1	500 DU/ml	576,80 DU/ml	585 DU/ml
Typ 2	140 DU/ml	165,16 DU/ml	155 DU/ml
Typ 3	16 DU/ml	21,17 DU/ml	19 DU/ml

Dung dịch đệm TRIS ở nồng độ 40mM được nhận thấy là hiệu quả nhất trong việc giữ được hàm lượng kháng nguyên D đối với sIPV 1,2 và 3.

C) Xác định hàm lượng kháng nguyên D bằng ELISA.

Ngày 1: Phủ đĩa

1. 100ul kháng thể bò kháng bại liệt được đưa bằng pipet vào PBS trong mỗi giếng
2. Đĩa vi chuẩn được đặt lại và được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Ngày 2: Phong bế:

1. Các đĩa được rửa (dung dịch đệm rửa/pha loãng-0,05% tween 20 trong 1x PBS) 3 lần.
2. 300ul dung dịch đệm phong bế (1% BSA trong PBS) được hút bằng pipet vào mỗi giếng.
3. Đĩa này được đặt kín và được ủ trong 45 phút ở $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Bổ sung mẫu:

1. Đĩa được rửa 3 lần.
2. 100ul chất pha loãng mẫu được bổ sung vào tất cả các giếng ngoại trừ giếng của hàng A.
3. 100ul chất chuẩn được bổ sung vào hai giếng đầu tiên của cột 2 và 3.
4. 100ul mẫu được bổ sung vào hai giếng đầu tiên của cột 4-12.
5. Pha loãng sơ bộ mẫu đến nồng độ thích hợp.
6. 100ul chất pha loãng mẫu được bổ sung vào hai giếng đầu tiên của cột 1.

7. Việc pha loãng hai lần liên tiếp được thực hiện xuôi theo cột bằng cách chuyển 100ul từ mỗi giếng đến giếng liền kề của cùng một cột và bỏ đi 100ul ở giếng cuối cùng.
8. Ủ ở 37°C trong 2 giờ.
9. Các đĩa được giữ qua đêm ở 4°C.

Ngày 3: bổ sung kháng thể đơn dòng:

1. Đĩa này được rửa 3 lần.
2. 100ul kháng thể đơn dòng đặc hiệu loại đã pha loãng (1:240) được bổ sung vào.
3. Các đĩa được đậy kín và ủ trong 2 giờ ở 37°C.

Tiếp hợp:

1. Đĩa được rửa 3 lần
2. 100ul thể tiếp hợp đã pha loãng (Typ 1-1:2400, Typ 2-1:1500, Typ 3-1: 4800) được bổ sung vào.
3. Đĩa này được đậy kín và được ủ trong 1 giờ ở 37°C.

Bổ sung cơ chất:

1. 100ul cơ chất TMB được bổ sung vào tất cả các giếng.
2. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
3. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 100ul H₂SO₄ 2M.
4. Đĩa được đọc ở 450/630nm.
5. Nồng độ kháng nguyên D được tính bằng cách sử dụng phần mềm KC4.

Ví dụ 3

Hấp phụ sIPV:

1. Dung dịch gốc chứa Al(OH)₃ và AlPO₄ 1% đã thanh trùng được sử dụng để bào chế các chế phẩm.
2. Thể tích mong muốn của Al(OH)₃/AlPO₄ được lấy ra để đạt được nồng độ nhôm cần thiết trong chai thủy tinh 100ml.
3. Bán thành phẩm virus bại liệt đã bất hoạt với đơn vị D-Ag đã biết được bổ sung vào và việc điều chỉnh thể tích được thực hiện với chất pha loãng.

4. Độ pH của chế phẩm cuối cùng được điều chỉnh đến 6,5 bằng HCl/NaOH 1N.
5. Bán thành phẩm của chế phẩm này được giữ trên máy khuấy từ qua đêm ở 2-8°C.

Ví dụ 4

Các nghiên cứu tiền công thức

Các nồng độ khác nhau của $\text{Al}(\text{OH})_3$ & AlPO_4 được tạo ra trong dung dịch nước muối 0,9% và trong nước để tiêm để kiểm tra kích cỡ và điện thế zeta đối với sự thay đổi độ pH.

Đã quan sát được là điện thế zeta của AlPO_4 giảm (âm) khi tăng độ pH từ 5 đến 7,5 khi có mặt WFI cũng như trong dung dịch nước muối (tham khảo Fig.1 và 2).

Trong khi đó, điện thế zeta của $\text{Al}(\text{OH})_3$ trong nước muối vẫn không thay đổi, độc lập với độ pH và nồng độ muối $\text{Al}(\text{OH})_3$ (tham khảo Fig.3 và 4).

Ví dụ 5

Các nghiên cứu về sự hấp phụ của sIPV lên nhôm phosphat và nhôm hydroxit

Bảng 3: Sự hấp phụ Sabin Typ 1, 2 & 3 (hiệu giá $10^{6,0}$ /liều) trên nhôm (nhôm phosphat và nhôm hydroxit)

	Mẫu	Hiệu giá (mỗi liều)	Các hạt virut (trong K)	% tự do trong SUP	% được hấp phụ trên gel
Typ 1, $\text{Al}(\text{OH})_3$	Đối chứng	5,45	284	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	4,15	14	4,98	95,02
	Al^{+++} 250ug/liều	3,85	7	2,49	97,51
	Al^{+++} 500ug/liều	3,8	6,3	2,24	97,78
Typ 1, AlPO_4	Đối chứng	5,84	691	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	3,49	3	0,43	99,57
	Al^{+++} 250ug/liều	3,09	1,2	0,17	99,83
	Al^{+++}	2,94	0,87	0,12	99,87

	500ug/liều				
Typ 2, $\text{Al}(\text{OH})_3$	Đối chứng	5,49	309	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	3,59	3,89	1,25	98,75
	Al^{+++} 250ug/liều	3,49	3,09	1	99
	Al^{+++} 500ug/liều	3,49	3,09	1	99
Typ 2, AlPO_4	Đối chứng	5,49	309	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	3,15	1,41	0,45	99,5
	Al^{+++} 250ug/liều	3,09	1,23	0,39	99,6
	Al^{+++} 500ug/liều	3,09	1,23	0,39	99,6
Typ 3, $\text{Al}(\text{OH})_3$	Đối chứng	5,59	389	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	4,14	13,8	3,54	96,47
	Al^{+++} 250ug/liều	3,94	8,7	2,23	97,77
	Al^{+++} 500ug/liều	3,54	3,4	0,87	99,13
Typ 3, AlPO_4	Đối chứng	5,59	389	NA	
	Al^{+++} 125ug/liều	5,34	218	56,04	43,96
	Al^{+++} 250ug/liều	5,24	173	44,47	55,53
	Al^{+++} 500ug/liều	5,16	144	37,01	62,9

Đã phát hiện ra rằng virus bại liệt Sabin typ-3 chỉ thể hiện mức hấp phụ 50-60% với nhôm phosphat (AlPO_4). Trong khi đó, virus bại liệt Sabin typ-3 thể hiện mức hấp phụ ít nhất 90% với $\text{Al}(\text{OH})_3$. Do đó, nhôm hydroxit được nhận thấy là hiệu quả hơn so với nhôm phosphat đối với sự hấp phụ của Sabin Typ 1,2 và 3.

Ví dụ 6

Các nghiên cứu về khả năng gây miễn dịch của SIPV được hấp phụ bởi nhôm

Để kiểm tra đáp ứng miễn dịch của sIPV có chất bổ trợ ở chuột, thử nghiệm SNT (thử nghiệm trung hòa huyết thanh) được thực hiện. Huyết thanh được tách và được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của các kháng thể trung hòa đối với virus bại liệt đặc hiệu typ. Huyết thanh đối chứng được sử dụng để thẩm định thử nghiệm. Việc chuẩn độ ngược virus cũng được thực hiện để lấy được lượng hạt virus thử đã bổ sung vào.

Mô hình động vật: chuột Wistar (8 tuần, xấp xỉ 200g) 50% đực và 50% cái mỗi nhóm.

Đường chủng: trong cơ.

Thể tích: 0,5ml

Lấy máu: vào ngày thứ 21.

Vị trí chảy máu: đám rối sau hốc mắt.

Bảng 4: Typ 1

Chuột số	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Nhóm 4		Nhóm 5		Nhóm 6		Nhóm 7		Nhóm 15	
	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh
1	1	(1:2)	8	(1:256)	1	(1:2)	4	(1:16)	5	(1:32)	5	(1:32)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	1	(1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)	7	(1:128)	8	(1:256)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
3	0	(<1:2)	7	(1:128)	3	(1:8)	0	(<1:2)	4	(1:16)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
4	0	(<1:2)	11	(1:2048)	2	(1:4)	2	(1:4)	1	(1:2)	5	(1:32)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
5	7	(1:128)	3	(1:8)	7	(1:128)	5	(1:32)	6	(1:64)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
6	4	(1:16)	7	(1:128)	7	(1:128)	1	(1:2)	5	(1:32)	6	(1:64)	3	(1:8)	0	(<1:2)
7	3	(1:8)	5	(1:32)	4	(1:16)	1	(1:2)	8	(1:256)	7	(1:128)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
8	1	(1:2)	7	(1:128)	3	(1:8)	2	(1:4)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
9	3	(1:8)	8	(1:256)	2	(1:4)	3	(1:8)	8	(1:256)	4	(1:16)	4	(1:16)	0	(<1:2)
10	3	(1:8)	7	(1:128)	4	(1:16)	5	(1:32)	6	(1:64)	2	(1:4)	2	(1:4)	0	(<1:2)

Đã ngạc nhiên phát hiện ra là Sabin IPV typ 1 được bổ trợ bởi nhôm hydroxit có 5 DU/liều đạt được mức chuyển đổi huyết thanh tốt hơn so với vaccin Salk IPV với 40DU/liều và Sabin IPV được bổ trợ bởi nhôm phosphat có 5 DU/liều.

Bảng 5: Typ 2

Chuột Số	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3	
	Được bổ trợ với Al(OH)3					
	4DU (0,6mgOH)		8DU (0,6mgOH)		16DU 0,6mgOH	
	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh
1	3	(1:8)	4	(1:16)	7	(1:128)
2	4	(1:16)	6	(1:64)	5	(1:32)
3	0	(<1:2)	3	(1:8)	5	(1:32)
4	3	(1:8)	4	(1:16)	6	(1:64)
5	5	(1:32)	7	(1:128)	6	(1:64)
6	6	(1:64)	4	(1:16)	9	(1:512)
7	4	(1:16)	7	(1:128)	4	(1:16)
8	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)
9	7	(1:128)	8	(1:256)	8	(1:256)
10	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)

sIPV typ 2 có 8 DU/liều với chất bổ trợ đạt được mức chuyển đổi huyết thanh tương đương so với vaccin IPV Salk với 8DU/liều.

Bảng 6: Typ 3

Chuột Số	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3	
	Được bổ trợ với Al(OH)3					
	10DU 0,6mgOH		5DU 0,6mgOH		2,5DU 0,6mgOH	
	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh	SNT +ve	Hiệu giá huyết thanh
1	3	(1:8)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	0	(<1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)
3	2	(1:4)	3	(1:8)	1	(1:2)
4	4	(1:16)	2	(1:4)	0	(<1:2)
5	4	(1:16)	2	(1:4)	1	(1:2)
6	4	(1:16)	1	(1:2)	1	(1:2)
7	9	(1:512)	0	(<1:2)	2	(1:4)
8	7	(1:128)	2	(1:4)	2	(1:4)
9	1	(1:2)	0	(<1:2)	1	(1:2)
10	5	(1:32)	7	(1:128)	1	(1:2)

Đã nhận thấy rằng sIPV typ 3 có 10DU/liều với chất bổ trợ đạt được mức chuyển đổi huyết thanh tương đương so với vacxin IPV Salk với 32DU/liều.

Bảng 7: Mức giảm liều tối đa được quan sát đối với từng Sabin Typ 1, 2 & 3 sau các nghiên cứu.

sIPV	Liều chuẩn	Liều *SIIL	Mức giảm liều
Typ 1	40DU	5DU	~8 lần
Typ 2	8DU	8DU	Tương đương
Typ 3	32DU	10DU	~3 lần

SIIL: chế phẩm IPV được giảm liều do nội bộ Viện nghiên cứu huyết thanh của Ấn Độ sản xuất.

I. Đáp ứng miễn dịch của các virus bại liệt SABIN được bổ trợ.

Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng nếu các virus được bổ trợ với $Al(OH)_3$ sẽ thể hiện sự tiết kiệm liều rất tốt.

Trong trường hợp các tác giả sáng chế xem xét phác đồ dùng liều đơn để gây miễn dịch thì 5-16-10 D-Ag là sự kết hợp tốt nhất cho các vacxin bại liệt của Sabin typ 1, 2 và 3 tương ứng.

Trong trường hợp các tác giả sáng chế xem xét phác đồ dùng hai liều để gây miễn dịch thì 2,5-8-5 tạo ra tính miễn dịch vượt trội.

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Các đơn vị kháng nguyên D của chủng Sabin	5	16	10
	2,5	8	5
	7,5	16	10

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với Sabin

Chuột số	5-16-10 với nhóm						2,5-8-5 với nhóm						7,5-16-10 với nhóm					
	Liều đơn			Liều đôi			Liều đơn			Liều đôi			Liều đơn			Liều đôi		
	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	8	4	10	12	7	12	5	5	3	7	7	12	8	4	10	9	8	10
2	6	7	12	11	7	12	5	5	8	5	9	8	9	2	9	12	6	12
3	6	2	9	6	8	12	5	4	3	8	7	12	11	0	10	8	7	12
4	6	4	9	7	7	12	6	3	11	9	7	12	7	7	7	7	6	12
5	8	4	11	9	10	12	10	0	7	10	7	12	11	6	10	9	8	12
6	6	4	11	10	8	12	6	3	7	9	8	12	6	6	11	9	6	12
7	6	6	8	11	9	12	5	4	8	8	6	12	6	5	10	11	6	12
8	6	6	9	9	7	12	7	3	7	10	9	11	6	4	9	9	5	10
9	7	8	5	10	6	12	5	5	11	10	9	12	7	4	12	10	5	11
10	5	3	5	11	9	12	7	5	8	10	10	12	10	3	9	9	7	12

Chuột số	Đối chứng dương - Tri. Salk IPV						Đối chứng âm					
	Liều đơn			Liều đôi			Liều đơn			Liều đôi		
	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	1	4	2	4	7	9	0	0	0	0	0	0
2	0	3	0	3	4	8	0	0	0	0	0	0
3	0	5	4	2	4	9	0	0	0	0	0	0
4	0	5	3	6	7	7	0	0	0	0	0	0
5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	0	0
6	2	6	5	1	7	6	0	0	0	0	0	0
7	0	6	2	7	10	9	0	0	0	0	0	0
8	0	5	1	5	8	8	0	0	0	0	0	0
9	0	4	2	5	7	9	0	0	0	0	0	0
10	4	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

II. Đáp ứng miễn dịch của các virus bại liệt SALK được bổ trợ.

Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng nếu các virus được bổ trợ với $Al(OH)_3$ thể hiện sự tiết kiệm liều rất tốt.

Trong trường hợp các tác giả sáng chế xem xét phác đồ dùng liều đơn để gây miễn dịch thì 8-2-5 D-Ag là sự kết hợp tốt nhất đối với vacxin bại liệt của Salk typ 1, 2 và 3 tương ứng.

Trong trường hợp các tác giả sáng chế xem xét phác đồ dùng hai liều để gây miễn dịch thì 5-2-5 tạo ra tính miễn dịch vượt trội.

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Các đơn vị kháng nguyên D	8	2	5
đối với chủng của Salk	5	2	5

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với Salk

Salk 8 - 2 - 5 có nhôm						Salk 5 - 2 - 5 có nhôm					
Liều đơn			Liều đôi			Liều đơn			Liều đôi		
Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3
3	8	1	9	10	6	2	8	1	10	11	12
5	6	2	9	12	8	2	6	2	10	10	10
4	7	5	12	11	12	4	5	2	9	10	11
7	5	6	11	11	10	6	7	1	12	12	9
8	6	3	10	12	11	5	5	5	8	9	6
5	8	4	10	10	9	2	8	4	11	10	8
2	7	2	8	9	8	3	6	6	8	12	8
4	5	1	9	12	7	6	9	2	9	9	9
5	6	2	8	9	6	2	8	1	10	8	10
3	9	1	12	10	10	1	7	3	12	12	11
Đối chứng dương - Tri. Salk IPV						Đối chứng âm					
Liều đơn			Liều đôi			Liều đơn			Liều đôi		
Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ 1	Typ 2	Typ 3
2	8	2	2	6	1	0	0	0	0	0	0
3	10	0	4	5	5	0	0	0	0	0	0
4	7	3	5	7	8	0	0	0	0	0	0
0	4	7	5	7	5	0	0	0	0	0	0
4	5	4	3	9	11	0	0	0	0	0	0
0	6	3	8	9	7	0	0	0	0	0	0

2	10	2	7	8	8	0	0	0	0	0	0
NS	NS	NS	9	10	9	0	0	0	0	0	0
3	8	4	3	7	6	0	0	0	0	0	0
1	9	6	3	8	8	0	0	0	0	0	0

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với liều đơn Salk (10-2-5)

Vaccin bại liệt Salk 10-2-5 có chất bổ trợ		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	5	7
3	5	6
4	9	3
4	8	2
3	9	5
1	7	7
3	9	7
3	11	6
2	9	5
1	10	6

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với liều đơn Salk (10-2-12)

Vaccin bại liệt Salk 10-2-12 có chất bổ trợ		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
3	6	9
2	10	9
4	9	8
1	9	10
2	9	11
2	7	9
4	9	9
3	8	11
1	10	10
2	6	12

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với liều đơn Salk (5-8-10)

Vaccin bại liệt Salk 5-8-10 có chất bổ trợ		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	8	9
2	10	7
1	9	8

0	11	10
2	9	11
1	10	8
0	9	9
3	11	12
0	9	10
1	8	7

Số liệu thử nghiệm chứng minh đối với liều đơn Salk (7,5-16-10)

Vaccin bại liệt Salk 7,5-16-10 có chất bổ trợ		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	11	8
2	12	9
1	10	7
4	11	10
3	10	8
0	9	11
3	9	10
2	11	12
0	12	9
1	10	7

Đối chứng tham chiếu dương (IPV08-143)		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
1	8	4
2	9	5
0	2	2
0	3	0
1	4	6
2	4	3
2	5	2
3	9	5
1	6	3
3	6	5

Theo nhiều phương án có thể có mà các nguyên tắc của sáng chế được mô tả có thể được áp dụng, thì cần hiểu rằng các phương án được minh họa chỉ là các ví dụ được ưu tiên của sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Đúng hơn là,

phạm vi của sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ dưới đây. Do đó các tác giả sáng chế yêu cầu bảo hộ toàn bộ nội dung thuộc phạm vi của yêu cầu bảo hộ này dưới dạng sáng chế.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa các hạt virus đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) tinh chế các hạt virus đường ruột trong môi trường chứa dung dịch đệm phosphat;

b) trao đổi dung dịch đệm phosphat chứa các hạt virus đường ruột đã tinh chế thu được từ bước a) bằng dung dịch đệm TRIS;

c) làm ổn định các hạt virus đường ruột đã tinh chế và đã trao đổi đệm thu được ở bước b);

d) làm bất hoạt các hạt virus đường ruột thu được ở bước c) bằng cách:

(i) bổ sung formalin vào các hạt virus đường ruột đã tinh chế và khuấy trong 7 ngày;

(ii) lọc sản phẩm thu được ở bước (i);

(iii) bổ sung formalin vào sản phẩm thu được ở bước (ii) và khuấy trong 6 ngày; và

(iv) lọc sản phẩm thu được ở bước (iii); trong đó:

dung dịch đệm TRIS có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30 đến 70 mM; sự kết tụ các hạt virus đường ruột được ngăn ngừa hoặc làm giảm; và sự mất kháng nguyên D được làm giảm sau khi bất hoạt từ 8 đến 10 lần so với khi bất hoạt trong dung dịch đệm phosphat; và

e) hấp phụ các hạt virus đường ruột đã bất hoạt lên chất hỗ trợ muối nhôm, nhờ đó tỷ lệ phần trăm hấp phụ lên chất hỗ trợ muối nhôm ít nhất là 95%.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm TRIS có độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2 và ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30 mM đến 70 mM.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất hỗ trợ muối nhôm ở bước (e) là nhôm hydroxit, nhôm phosphat, hoặc hỗn hợp của chúng.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất bổ trợ muối nhôm này là nhôm hydroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5mg/liều 0,5ml đến 2,5mg/liều 0,5ml ở độ pH bằng 6,5.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó tổng lượng nhôm trong chế phẩm là nhỏ hơn 1,2 mg Al^{3+} mỗi liều 0,5 mL, trong đó ít nhất 0,4 mg Al^{3+} cho Typ 1, ít nhất 0,2 mg Al^{3+} cho Typ 2, ít nhất 0,2 mg Al^{3+} cho Typ 3.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là vaccin.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó các hạt virus đường ruột bao gồm các virus bại liệt có các typ huyết thanh Sabin 1, 2 và 3.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó các hạt virus đường ruột bao gồm virus bại liệt có typ huyết thanh Salk IPV typ 1 (chủng Mahoney), IPV typ 2 (chủng MEF-1); và/hoặc IPV typ 3 (chủng Saukett).

9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vaccin này là vaccin bại liệt đã bất hoạt được giảm liều (Inactivated Polio Vaccine-IPV).

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó vaccin bại liệt đã bất hoạt được giảm liều chứa:

i) virus bại liệt typ 1 đã bất hoạt ở liều nhỏ hơn 15 đơn vị kháng nguyên thay vì liều chuẩn là 40DU; và/hoặc

ii) virus bại liệt typ 2 đã bất hoạt ở liều nhỏ hơn 18 đơn vị kháng nguyên D; và/hoặc

ii) virus bại liệt typ 3 đã bất hoạt ở liều nhỏ hơn 17 đơn vị kháng nguyên D thay vì liều chuẩn là 32DU.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó vaccin bại liệt đã bất hoạt được giảm liều chứa các virus bại liệt Salk hoặc Sabin được sản xuất bằng cách:

a) tinh chế virus bại liệt từ môi trường;

b) làm ổn định virus bại liệt đã tinh chế bằng cách bổ sung môi trường M-199 chứa glyxin;

c) bất hoạt virus bại liệt bằng cách sử dụng formaldehyt 0,025% ở 37°C trong 5 đến 13 ngày khi có mặt dung dịch đệm TRIS ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30 mM đến 60 mM để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự kết tụ của các hạt virus bại liệt nhờ đó làm giảm sự mất kháng nguyên D sau khi bất hoạt từ 8 đến 10 lần so với khi bất hoạt trong dung dịch đệm phosphat; và

d) hấp phụ virus bại liệt đã bất hoạt lên chất bổ trợ nhôm hydroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 2,5 mg/liều, nhờ đó tỷ lệ phần trăm hấp phụ lên nhôm hydroxit là lớn hơn 95% đối với Typ 1, Typ 2 và Typ 3.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó vaccine bại liệt đã bất hoạt được giảm liều chứa virus bại liệt Salk hoặc Sabin được sản xuất bằng cách:

a) tinh chế virus bại liệt từ môi trường chứa virus bại liệt;

b) làm ổn định virus bại liệt đã tinh chế bằng cách bổ sung môi trường M-199 chứa glyxin;

c) bất hoạt virus bại liệt bằng cách sử dụng formaldehyt 0,025% ở 37°C trong 5 đến 13 ngày khi có mặt dung dịch đệm TRIS ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30 mM đến 60 mM để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự kết tụ của các hạt virus bại liệt nhờ đó làm giảm sự mất kháng nguyên D sau khi bất hoạt từ 8 đến 10 lần so với khi bất hoạt trong dung dịch đệm phosphat; và

d) hấp phụ virus bại liệt đã bất hoạt lên chất bổ trợ nhôm hydroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 2,5 mg/liều, trong đó tỷ lệ phần trăm hấp phụ lên nhôm hydroxit là lớn hơn 95% đối với Typ 1 và Typ 3.

13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó vaccine bại liệt đã bất hoạt được giảm liều là:

i) chế phẩm đơn liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-16-10;

ii) chế phẩm hai liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-16-10;

- iii) chế phẩm đơn liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 2,5-8-5;
- iv) chế phẩm hai liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 2,5-8-5;
- v) chế phẩm đơn liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-8-10;
- vi) chế phẩm hai liều Sabin chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-8-10;
- vii) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 6,5-16-10;
- viii) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Sabin Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 6,5-16-10;
- ix) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 8-2-5;
- x) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 8-2-5;
- xi) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-5;
- xii) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-5;
- xiii) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-12;
- xiv) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-12;
- xv) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-2-5;
- xvi) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 5-2-5;
- xvii) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-10;

xviii) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-10;

xix) chế phẩm đơn liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-16; hoặc

xx) chế phẩm hai liều Salk chứa hỗn hợp Salk Typ 1, Typ 2, Typ 3 theo tỷ lệ 10-2-16.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó vaccin bại liệt đã bất hoạt Salk hoặc Sabin được giảm liều này không chứa Typ 2.

15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó vaccin này chứa một hoặc nhiều kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* typ A, *Neisseria Meningitidis* typ C, *Neisseria meningitidis* typ W, *Neisseria meningitidis* typ Y, *Neisseria meningitidis* typ X, *Neisseria meningitidis* typ B, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, viêm gan A, viêm gan B, giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, ho gà nguyên bào, hoặc ho gà vô bào.

16. Phương pháp sản xuất vaccin bại liệt đã bất hoạt giảm liều chứa virus bại liệt Salk hoặc Sabin, bao gồm các bước:

a) tinh chế virus bại liệt từ môi trường chứa virus bại liệt và dung dịch đệm phosphat;

b) đổi dung dịch đệm phosphat chứa các hạt virus đường ruột đã tinh chế sang dung dịch đệm TRIS;

c) làm ổn định virus bại liệt đã tinh chế và đã trao đổi dung dịch đệm thu được ở bước b) bằng cách bổ sung môi trường M-199 chứa glyxin;

d) làm bất hoạt virus bại liệt thu được ở bước c) bằng cách sử dụng formaldehyt 0,025% ở nhiệt độ 37°C trong 5 đến 13 ngày khi có mặt dung dịch đệm TRIS ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30 mM đến 60 mM để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự kết tụ các hạt virus bại liệt nhờ đó làm giảm sự mất kháng nguyên D sau khi hoạt hóa từ 8 đến 10 lần so với khi bất hoạt trong dung dịch đệm phosphat; và

e) hấp phụ virus bại liệt đã bất hoạt lên chất bổ trợ nhôm hydroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 2,5 mg/liều, nhờ đó tỷ lệ phần trăm hấp phụ lên nhôm hydroxit là lớn hơn 95% đối với Typ 1, Typ 2 và Typ 3.

17. Phương pháp theo điểm 3, trong đó dung dịch đệm TRIS có nồng độ 40 mM.

18. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất bổ trợ muối nhôm có nồng độ nằm trong khoảng từ 2,100 mg/liều 0,5 ml đến 2,4 mg/liều 0,5 ml ở độ pH bằng khoảng 6,5.

19. Phương pháp theo điểm 5, trong đó tổng lượng nhôm trong chế phẩm là nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2 mg Al^{3+} mỗi liều 0,5 mL.

20. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa các hạt virus đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) tinh chế các hạt virus đường ruột bao gồm:

(i) cô dung dịch chứa các hạt virus đường ruột bằng cách lọc dòng tiếp tuyến;

(ii) lọc thẩm tách sản phẩm thu được từ bước a-i bằng môi trường chứa dung dịch đệm phosphat; và

(iii) cô sản phẩm thu được từ bước a-ii bằng sắc ký cột và dung dịch đệm phosphat;

b) trao đổi dung dịch đệm phosphat chứa sản phẩm thu được từ bước a-iii bằng dung dịch đệm TRIS có nồng độ nằm trong khoảng từ 30 đến 50 mM và độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2;

c) làm ổn định các hạt virus đường ruột đã tinh chế và đã trao đổi đệm bằng cách bổ sung môi trường chứa glyxin vào sản phẩm thu được ở bước b;

d) làm bất hoạt các hạt virus đường ruột thu được ở bước c) bằng cách:

(i) bổ sung formalin vào các hạt virus đường ruột đã tinh chế và khuấy trong 7 ngày;

(ii) lọc sản phẩm thu được ở bước (i);

(iii) bổ sung formalin vào sản phẩm thu được ở bước (ii) và khuấy trong 6 ngày; và

(iv) lọc sản phẩm thu được ở bước (iii), trong đó:

sự kết tụ các hạt virus đường ruột được ngăn ngừa hoặc làm giảm; và sự mất kháng nguyên D được làm giảm sau khi bất hoạt từ 8 đến 10 lần so với dung dịch đệm phosphat; và

e) hấp phụ các hạt virus đường ruột lên chất hỗ trợ $\text{Al}(\text{OH})_3$, nhờ đó tỷ lệ phần trăm hấp phụ lên chất hỗ trợ ít nhất là 95%.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó bước a bao gồm dung dịch đệm phosphat ở nồng độ 40 mM ở độ pH 7,0 và bước c bao gồm glyxin 0,5%.

Fig. 1

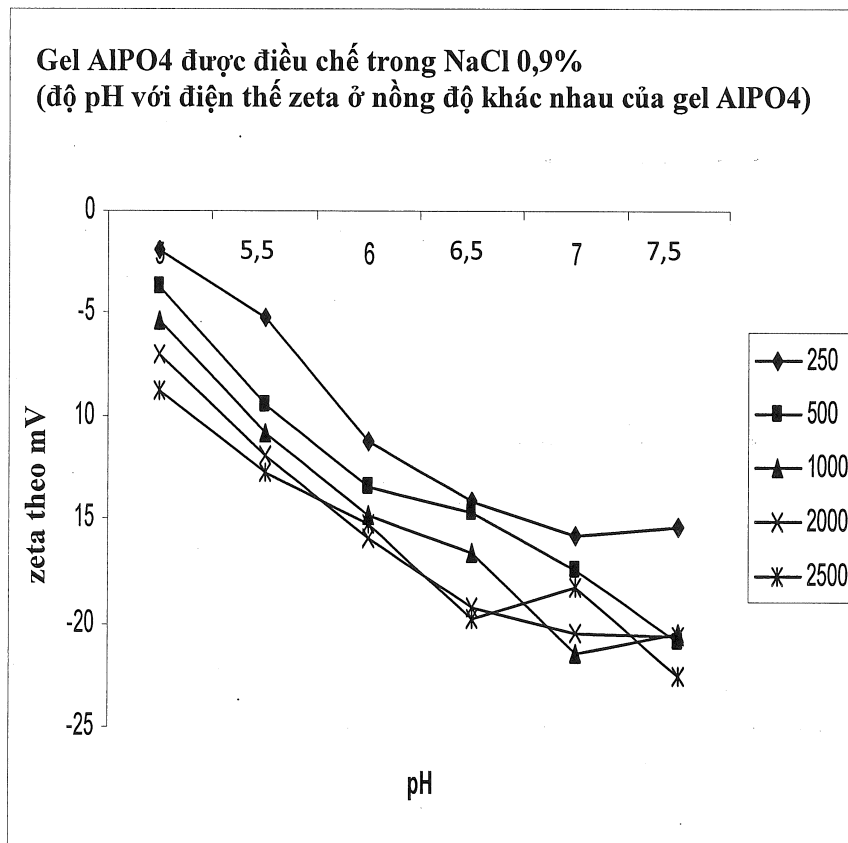


Fig. 2

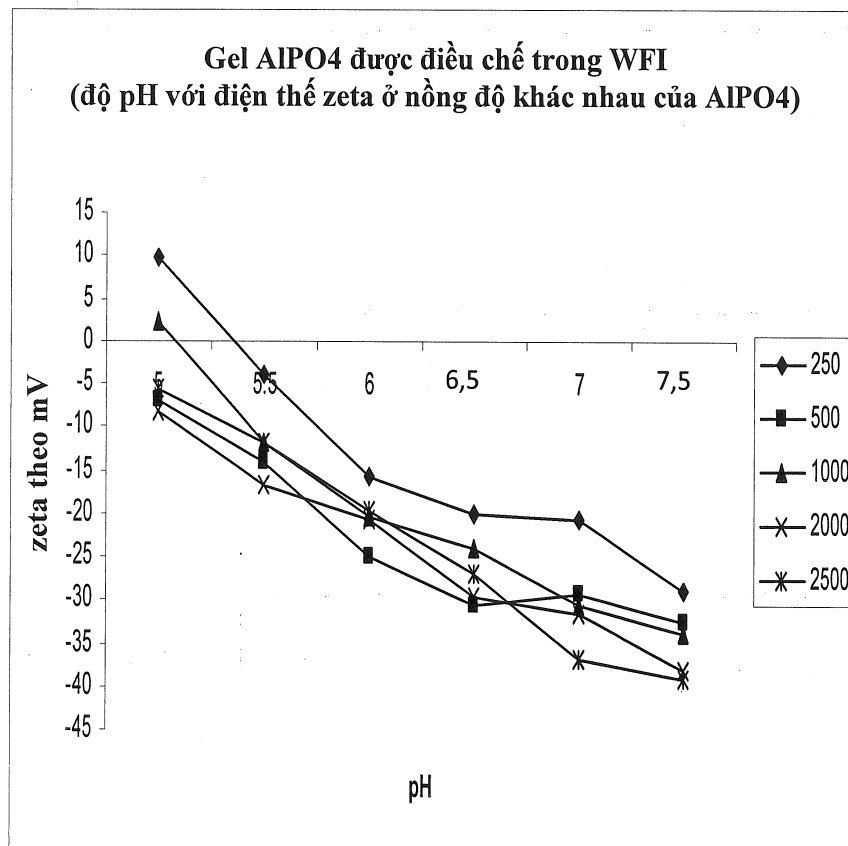


Fig. 3

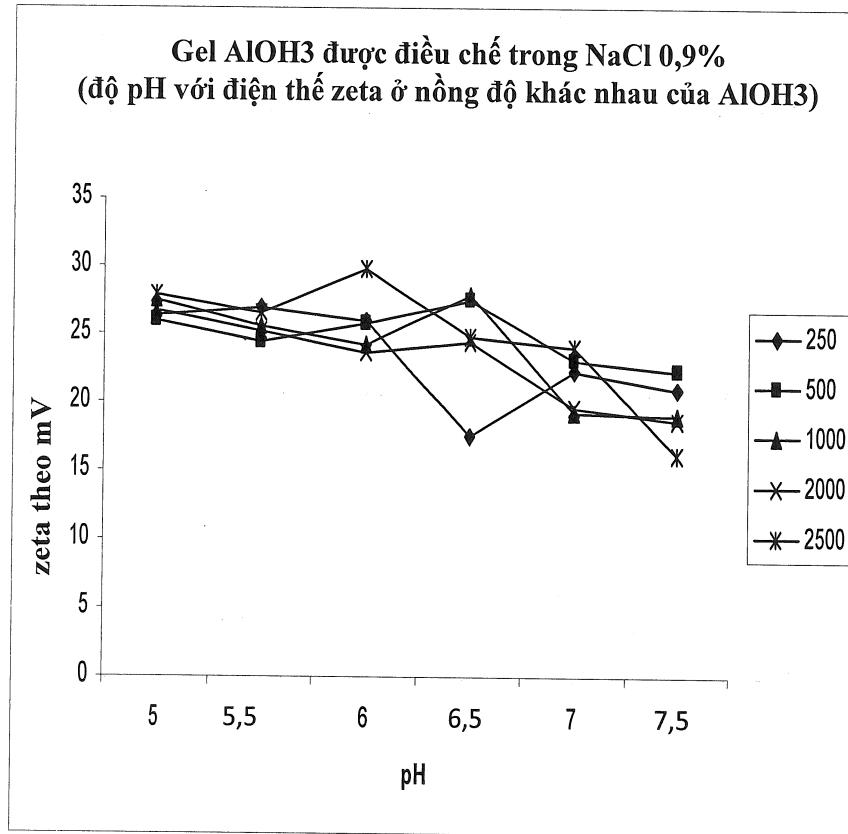


Fig. 4

