



(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)



1-0031837

(51)⁸ A61K 39/02; A61P 31/00; A61K 39/12; (13) B
A61K 39/00

-
- (21) 1-2017-02131 (22) 10/12/2015
(86) PCT/EP2015/079212 10/12/2015 (87) WO 2016/091998 16/06/2016
(30) 14197477.4 11/12/2014 EP
(45) 25/05/2022 410 (43) 27/11/2017 356A
(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxtmeer, the Netherlands
(72) WITVLIET, Maarten, Hendrik (NL); JANSEN, Theodorus (NL); JAYAPPA,
Huchappa, Gowda (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM KHÁNG NGUYÊN CHO VACCIN KẾT HỢP SẴN SÀNG ĐỂ DÙNG CHO LỢN, CHẾ PHẨM KHÁNG NGUYÊN THU ĐƯỢC BẰNG QUY TRÌNH NÀY, VACCIN SẴN SÀNG ĐỂ DÙNG CHO LỢN CHỨA CHẾ PHẨM KHÁNG NGUYÊN NÀY VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VACCIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm kháng nguyên, chế phẩm kháng nguyên này có thể được sử dụng để sản xuất vaccin sẵn sàng để dùng cho lợn, để ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 gây ra và các triệu chứng liên quan của bệnh. Quy trình này đặc trưng ở chỗ bao gồm bước trộn kháng nguyên PCV2 với phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ đã được tạo trước của kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phụ trợ nhôm-hydroxit. Theo đó, vaccin kết hợp PCV2/M.hyo theo sáng chế có hiệu lực cao ngay sau một lần dùng, chống lại việc lây nhiễm và bệnh do M.hyo và PCV2 gây ra khi nhiễm một hoặc cả hai mầm bệnh này. Vaccin này cũng rất an toàn khi sử dụng, ở dạng sẵn sàng để dùng, và về mặt kinh tế có thể triển khai sản xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thuốc thú y, cụ thể là vaccin cho lợn kháng *Mycoplasma hyopneumonie* và kháng circovirut typ 2 trên lợn. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chứa kháng nguyên vaccin. Sau đó, chế phẩm này sẽ được dùng để sản xuất vaccin kết hợp ở dạng sẵn sàng để dùng cho lợn và có hiệu quả. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế, vaccin được sản xuất từ chế phẩm kháng nguyên này, và các phương pháp và việc sử dụng chế phẩm kháng nguyên và vaccin theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mycoplasma hyopneumonie (M.hyo) là tác nhân chính gây ra bệnh viêm phổi địa phương (EP) (lợn), một bệnh phổi mạn tính ở lợn, xuất hiện trên toàn thế giới. Trong các tài liệu trước đây, vi khuẩn này còn được gọi là *M. suis* pneumoniae. Vi khuẩn này có kích thước khá nhỏ, không có thành tế bào, và thuộc lớp Mollicutes. Đặc biệt lợn con rất dễ mắc bệnh có khả năng lây truyền cao này, và thường lây truyền qua không khí hoặc bằng cách tiếp xúc trực tiếp.

Bệnh phổi do M.hyo gây ra phần lớn là bệnh lý qua trung gian miễn dịch, dẫn đến viêm phổi đông đặc. Mặc dù không tiết ra chất độc nổi bật, nhưng vi khuẩn này tạo thành các tập đoàn và phá hủy biểu mô có lông nhung trong phổi, làm cho lông nhung mất độ hoạt động. Phụ thuộc vào điều kiện nuôi nhốt và áp lực môi trường, hậu quả khó khắc phục nhất của bệnh này là dẫn đến các nhiễm trùng thứ cấp khác ở hệ hô hấp của lợn, do các mầm bệnh vi khuẩn và virus khác gây ra. Điều này làm tăng bệnh được gọi là: Bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (PRDC), biểu hiện bằng sự tổn thương phổi nghiêm trọng. Sau đó gây khó chịu cho động vật, EP và PRDC gây ra tổn thất kinh tế nghiêm trọng cho ngành công nghiệp chăn nuôi lợn do năng suất liên quan đến tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn giảm, cũng như chi phí chăm sóc thú y và

sử dụng thuốc kháng sinh (Thacker & Minion, 2012, Mycoplasmosis, in: Disease of swine, 10th ed., J. Wiley & Sons, p. 779 - 797).

Các mầm bệnh trên lợn khác liên quan đến PRDC là: virus như: circovirus typ 2 trên lợn, virus cúm lợn, và virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn; và vi khuẩn như: *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* và *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Do thuốc kháng sinh chỉ có hiệu quả một phần nên phương pháp điều trị chính chống lại bệnh và khắc phục các tổn thất trong chăn nuôi liên quan đến M.hyo, là bằng cách chủng ngừa, tốt hơn là ở giai đoạn sớm trong đời. Để tham khảo, xem: Maes et al. (2008, Vet. Microbiol., vol. 126, p. 297-309). Thông thường, lợn con được chủng ngừa từ giai đoạn sơ sinh, đến 4 tuần tuổi, tùy ý chủng ngừa nhắc lại một vài tuần sau đó.

Cơ chế chính xác của việc kiểm soát bệnh thông qua miễn dịch được vaccin kháng M.hyo tạo ra vẫn chưa được hiểu hoàn toàn. Mặc dù việc chủng ngừa không thể hoàn toàn ngăn ngừa được sự xâm nhập của vi khuẩn vào phổi hoặc sự lan truyền của chúng, nhưng việc chủng ngừa vẫn có hiệu quả trong việc làm giảm đáng kể các triệu chứng lâm sàng như sự xâm nhập của vi khuẩn vào phổi, tổn thương phổi, và viêm phổi, giảm lây lan, và phục hồi năng suất kinh tế, như mức tăng cân trung bình hàng ngày. Để kiểm soát hiệu lực của vaccin, các thông số bệnh lâm sàng khác nhau có thể được tính điểm và được kiểm soát như tỷ lệ mắc bệnh, viêm phổi, bệnh viêm màng phổi, nhưng cũng có thể bằng cách phát hiện hoặc định lượng M.hyo được phân lập lại, như bằng huyết thanh học, mô học, hoặc PCR.

Một cách thông thường để xác định hiệu lực và tác dụng bảo vệ của vaccin M.hyo là tính điểm tỷ lệ giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi. Các tổn thương này thường được tính điểm trong quá trình mổ xác thông qua việc đánh giá tổng quát sự xâm nhập của vi khuẩn vào phổi, ví dụ theo thang điểm Goodwin (Goodwin et al., 1969, J. Hyg. Camb., vol. 67, p. 465-476), thang điểm này chạy từ 0 đến tối đa là 55 điểm khi phổi bị ảnh hưởng hoàn toàn. Với vaccin hữu hiệu, điểm số tổn thương phổi giảm trên 50% có thể quan sát được khi so sánh hiệu quả của thử thách nhiễm khuẩn ở động vật được chủng ngừa so với động vật không được chủng ngừa. Việc giảm điểm số tổn thương phổi là dấu hiệu cho thấy việc bảo vệ miễn dịch có hiệu quả, và tương quan với sức khỏe của lợn cũng như năng suất của lợn được

phục hồi đáng kể khi được đo bằng tỷ lệ chuyển hóa thức ăn và mức tăng cân trung bình hằng ngày (Maes et al., 2008, Vet. Microbiol., vol. 126, p. 297-309).

M.hyo có thể được nuôi cấy in vitro, nhưng cần môi trường nuôi cấy rất giàu dinh dưỡng do bộ gen có kích thước nhỏ của nó không có khả năng tự chuyển hóa các dưỡng chất cần thiết. Một ví dụ là môi trường do Friis mô tả (1975, Nord Vet. Med., vol. 27, p. 337-339), là một môi trường phức tạp chứa chất chiết nấm men, huyết thanh động vật và các chất chiết khác nhau có nguồn gốc từ lợn và bò. Khi được sinh trưởng đầy đủ, môi trường nuôi cấy M.hyo hoàn chỉnh thường bị bất hoạt bằng phương pháp hóa học phương pháp hoặc vật lý, ví dụ bằng cách sử dụng formalin, để tạo ra kháng nguyên loại 'vaccine vi khuẩn': kháng nguyên toàn bộ môi trường nuôi cấy tế bào M.hyo được tiêu diệt. Sau đó, môi trường nuôi cấy đã bất hoạt có thể được cô đặc (ví dụ 10-20 lần), ví dụ bằng cách lọc và được dùng để sản xuất vaccine. Từ việc sử dụng môi trường giàu dinh dưỡng và cô đặc, kháng nguyên vaccine vi khuẩn M.hyo chứa nhiều protein, axit béo từ môi trường, v.v., mà có thể ảnh hưởng đến việc xử lý tiếp theo thành vaccine.

Hiện nay trên thị trường có nhiều loại vaccine kháng M.hyo và các vaccine này thường được sử dụng trong phần lớn các hoạt động chăn nuôi lợn thương mại. Thông thường các vaccine này là các vaccine bị bất hoạt được sản xuất từ vaccine vi khuẩn được phụ trợ mà được dùng bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa. Một số ví dụ về vaccine này là: RespiSure™ (Zoetis), Ingelvac™ M. hyo, và MycoFLEX™ (Boehringer Ingelheim), Hyoresp™ (Merial), Stellamune™ Mycoplasma (Elanco Animal Health), và M+Pac™ (Merck Animal Health).

Các chủng M.hyo đã được biết rõ được sử dụng trong sản xuất hoặc phát triển vaccine là: chủng J (số nộp lưu ATCC là 25934), chủng 11, hoặc chủng 232.

Có thể biến đổi và tinh chế các vaccine này, ví dụ sử dụng loại chất phụ trợ (dầu khoáng, không dầu khoáng, muối nhôm, polyme tổng hợp, v.v.), liều lượng được sử dụng (1 hoặc 2 ml), độ tuổi được chủng ngừa (1 ngày, 7 ngày hoặc lớn hơn, 3 tuần, 6 tuần hoặc lớn hơn, v.v.), hoặc đường dùng (trong cơ, dưới da, hoặc trong da).

Vaccine M+Pac bao gồm chất phụ trợ kép, Emunade™ là nhũ tương dầu trong nước của dầu khoáng được phân tán trong chất mang chứa nước, nhờ đó chất mang

chứa nước bao gồm chất phù trợ nhôm-hydroxit. Vacxin M+Pac được bán trên thị trường từ năm 1996.

Việc phát triển vacxin M.hyo gần đây phù hợp với chế độ dùng theo liều, bằng cách cung cấp vacxin không cần chủng ngừa nhắc lại, được gọi là: vacxin “một liều” hoặc “liều đơn”. Theo cách khác, vacxin mà có thể dùng theo liều linh hoạt đã được phát triển: liều đơn hoặc liều đôi, được gọi là: ‘liều linh hoạt’, ví dụ 2 lần 1 ml, hoặc một lần 2 ml.

Bên cạnh chất phù trợ nhũ tương trên cơ sở dầu, muối nhôm được sử dụng làm chất phù trợ cho vacxin M.hyo. Muối nhôm là chất phù trợ đã được biết rõ, và đối với vacxin dùng cho người thì chúng là loại chất phù trợ chính. Các muối khác được sử dụng: ‘Chất phù trợ nhôm-hydroxit’, là tinh thể nhôm oxyhydroxit ($\text{AlO}(\text{OH})$); ‘chất phù trợ’ Nhôm-phosphat, là nhôm hydroxyphosphat vô định hình ($\text{Al}(\text{OH})_m(\text{PO}_4)_n$); và ‘Nhôm-sulphat chất phù trợ’, hoặc: ‘Alum’, là nhôm hydroxysulphat vô định hình ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$). Hai loại chất phù trợ được đề cập sau là các dẫn xuất của nhôm oxyhydroxit, bằng cách tương ứng thay thế nhóm hydroxyl bằng nhóm sulphat hoặc phosphat. Để tham khảo: Hem & HogenEsch (2007, Expert Rev. Vaccine, vol. 6, p. 685-698).

Cơ chế tác động của chất phù trợ muối nhôm vẫn chưa được hiểu hoàn toàn; trên cơ sở là sự hấp phụ của kháng nguyên với muối nhôm, và cách giải phóng của chúng bên trong cơ thể của đích được chủng ngừa. Việc liên kết kháng nguyên với muối nhôm là kết quả của các kiểu liên kết khác nhau, như bẫy theo cách vật lý, và cả tương tác tĩnh điện giữa các phân tử tích điện trái dấu. Ngoài liên kết cộng hóa trị có thể được tạo ra thông qua việc trao đổi phối tử anion nhờ đó nhóm phosphat từ kháng nguyên thay thế cho nhóm hydroxyl trên muối nhôm. Thông qua các loại liên kết khác nhau này, kháng nguyên và chất phù trợ muối nhôm tạo thành phức hợp trong đó kháng nguyên đã liên kết có thể có cấu trúc được biến đổi, nhưng cũng có thể được làm ổn định.

Bên trong cơ thể của đối tượng, phức hợp chất phù trợ-kháng nguyên sẽ được phân giải bằng các điều kiện và enzym trong dịch mô kẽ, và kháng nguyên sẽ tách ra và sẵn sàng để đi vào hệ miễn dịch. Nhờ đó muối nhôm kích thích việc hấp thu của kháng nguyên bằng tế bào trình diện kháng nguyên. Muối nhôm cũng gây ra đáp ứng

Th2 mạnh, và vì thế sản xuất kháng thể (Exley et al. 2010, Trends in Immunol., vol. 31, p. 103 - 109).

Trong chất phù trợ nhôm-hydroxit, muối nhôm ở dạng tinh thể boehmit. Dạng tinh thể này làm cho muối có cấu trúc sợi mà trong nước sẽ tạo ra dung dịch gel keo. Đây cũng là dạng sản phẩm được bán trên thị trường, ví dụ: Alhydrogel™ (Brenntag Biosector), Rehydragel™ (Reheis), và Rehsorptar™ (Armour Pharmaceutical). Các sản phẩm này sẵn có ở các nồng độ và lượng khác nhau, và cũng khác nhau về kích thước tinh thể; tinh thể nhỏ hơn có khả năng liên kết kháng nguyên tốt hơn. Chất phù trợ nhôm-hydroxit có điểm điện tích không bằng khoảng 11, có nghĩa là ở độ pH nhỏ hơn 11, nó tích điện dương. Kết quả là, ở độ pH sinh lý nằm trong khoảng từ 6 đến 8, chất phù trợ có thể hấp phụ protein kháng nguyên tích điện âm (Al-Shakshir et al., 1994, Vaccine, vol. 12, p. 472 - 474).

Việc hấp phụ và tạo thành phức hợp bắt đầu nhanh, nhưng để hấp phụ hoàn toàn thì có thể cần vài giờ. Mức độ hấp phụ cũng phụ thuộc vào khả năng liên kết của muối nhôm được dùng. Để định lượng khả năng liên kết protein của muối nhôm, thử nghiệm liên kết sử dụng lượng đã biết của protein chuẩn có thể được sử dụng; thử nghiệm liên kết chuẩn đối với chất phù trợ nhôm-hydroxit được quy định trong Chuyên khảo dược điển châu Âu 1664. Chất phù trợ nhôm-hydroxit bán trên thị trường thường có thể liên kết với 2,5mg albumin trong mỗi mg nhôm ở độ pH sinh lý.

Một mầm bệnh rất quan trọng khác ở lợn gây ảnh hưởng lớn đến kinh tế là circovirut typ 2 trên lợn (PCV2). Để tham khảo, xem Gillespie et al. (2009, J. Vet. Intern. Med., vol. 23, p. 1151-1163). PCV2 ban đầu được xác định là tác nhân gây bệnh của “hội chứng còi cọc sau cai sữa” (PMWS), quan sát thấy ở lợn con. Triệu chứng lâm sàng và bệnh lý học bao gồm ngày càng còi cọc, khó thở, nhịp thở nhanh, và vàng da ngẫu nhiên và bệnh vàng da. Lợn circovirut thuộc họ Circoviridae, và là virut có kích thước nhỏ (17nm), không có vỏ, gồm 20 mặt, với capsit chứa bộ gen ADN mạch đơn, dạng vòng khoảng 1760 nucleotit. Bộ gen chỉ chứa vài khung đọc mở, ORF2 của chúng mã hóa protein capsit của virut bằng khoảng 28 kDa. Nó chứa epitop trung hòa virut chính.

PCV2 khá ổn định, và có khả năng lây nhiễm cao. Nó được lây qua các loại dịch tiết khác nhau của cơ thể, và lây lan theo cả chiều ngang và chiều dọc trong đàn

lợn. Do PCV2 là virus gây u lympho, nên các tổn thương chính do nhiễm PCV2 là giảm mô lympho. Kết quả là gây ức chế miễn dịch làm cho động vật bị nhiễm PCV2 trở nên dễ nhiễm trùng thứ cấp. Kết quả là bên cạnh PMWS, PCV2 cũng tham gia vào nhiều triệu chứng bệnh ở lợn khác được gọi chung là: bệnh (liên quan đến) circovirus lợn hPCVD, hoặc PCVAD). Các bệnh PCVD được quan tâm nhất là bệnh hô hấp phức hợp ở lợn, hội chứng viêm da suy thận ở lợn, xáo trộn sinh sản, bệnh viêm ruột sinh u hạt, chứng run bần sinh, và viêm ngoài da.

Không có các dấu hiệu rõ ràng của nhiễm trùng thứ cấp, tuy nhiên, phần lớn lợn bị nhiễm PCV2 không thể hiện hội chứng lâm sàng rõ ràng của bệnh. Triệu chứng nhiễm PCV2 cận lâm sàng chỉ tự biểu hiện thông qua tốc độ tăng trưởng kém và năng suất thấp ở lợn có vẻ khỏe mạnh.

Các triệu chứng (cận) lâm sàng của PCVD do PCV2 có thể quan sát được ở lợn thường trong giai đoạn từ 3 hoặc 4 tuần tuổi trở đi, là thời điểm mà lợn con cai sữa và kháng thể bảo vệ từ mẹ bắt đầu giảm.

Để bảo vệ kháng lại PCV2, các vaccine bán trên thị trường đã được phát triển, và các vaccine này được sử dụng trên toàn thế giới. Có nhiều loại vaccine khác nhau là: vaccine trên cơ sở virus PCV2 toàn phần bị bất hoạt (Circovac™, Merial), hoặc virus kháng PCV1/PCV2 bị bất hoạt (Suvaxyn™ PCV/Fostera™ PCV, Zoetis); hoặc vaccine có cấu trúc dưới phân tử trên cơ sở protein capsit được biểu hiện tái tổ hợp (Ingelvac™ CircoFLEX, Boehringer Ingelheim; Porcilis™ PCV/Circumvent™ PCV, Merck/MSD AH). Loại vaccine có cấu trúc dưới phân tử được sản xuất bằng cách biểu hiện tái tổ hợp PCV2 ORF2 trong hệ thống biểu hiện baculovirus/tế bào côn trùng. Capsit được biểu hiện tự lắp ghép vào trong phân tử giống virus (VLP). Capsit này tương tự virion PCV2 tự nhiên, ngoại trừ nó thiếu bộ gen của virus, vì thế không có khả năng sao chép. Vaccine trên cơ sở PCV2 VLP này đã được chứng minh là an toàn và hữu hiệu, ở lượng khoảng 20 microgam PCV2 VLP trong mỗi liều dùng cho động vật, được phủ trợ bằng nhũ tương dầu trong nước (xem: WO 07/028.823).

Phụ thuộc vào loại chất phủ trợ được sử dụng, hiệu lực của vaccine PCV2 có thể phần lớn được dựa vào miễn dịch hormon hoặc miễn dịch tế bào. Hiệu giá có thể được đo ví dụ bằng cách sử dụng Elisa thương mại: Synbiotics SERELISA™ PCV2 Ab

Mono Blocking ELISA. Theo cách khác Elisa gián tiếp nội bộ (in-house) có thể được sử dụng, như Haake et al. đã mô tả (2014, Vet. Microbiol., vol. 168, p. 272-280)

Vaccin PCV2 làm giảm sự sao chép và lây lan của virus PCV2. Nhờ đó làm giảm tải lượng virus PCV2 trong phổi và mô lympho, và bảo vệ chống lại việc giảm mô lympho, PCVD, và lây nhiễm theo chiều ngang. Kết quả là vaccin này phục hồi sức khỏe chung và năng suất của đàn lợn được chủng ngừa như bằng cách: tỷ lệ chết giảm, mức tăng cân trung bình hàng ngày tốt hơn và hiệu suất chuyển hóa thức ăn được cải thiện.

Hiệu lực và tác dụng bảo vệ của vaccin có thể được đo bằng cách xác định nồng độ kháng thể đặc hiệu PCV2, hoặc bằng cách phát hiện tải lượng virus PCV2 trong huyết thanh hoặc trong chất bài tiết (dịch tiết ở miệng, mũi, phân, nước tiểu), hoặc bằng cách phát hiện các mầm bệnh khác tham gia vào bệnh PCVD, bằng PCR, (miễn dịch) mô học, lai hóa, hoặc huyết thanh học.

Chủng PCV2 được sử dụng để phát triển vaccin thường có kiểu gen PCV2a; các vaccin này cũng bảo vệ chéo kháng chủng có kiểu gen PCV2b.

Vaccin chứa chất phù trợ dầu kháng PCV2 như Porcilis PCV, đã được thông báo là gây ra phản ứng cục bộ từ vừa đến mạnh ở vị trí tiêm. Xem ví dụ Astrup & Larsen (2010, áp phích số P.049, trong: Proceedings 21st IPVS Congress, Canada, 18-21 July). Trong thời gian vài ngày sau khi tiêm, quan sát thấy có hiện tượng sưng cục bộ với kích thước lên đến vài xentimet. Tuy nhiên, các phản ứng tại vị trí tiêm này không đau và xuất hiện trong thời gian ngắn và vì thế nằm trong giới hạn chấp nhận được. Ngoài ra, chúng không tương quan với phản ứng toàn thân nhất quán, và không ảnh hưởng đến hiệu quả chủng ngừa. Tuy nhiên, đây là lý do để cải thiện độ an toàn của loại vaccin này.

Các triệu chứng bệnh do nhiễm PCV2 có thể bị trầm trọng thêm khi nhiễm M.hyo, và ngược lại. Vì thế để bảo vệ lợn hữu hiệu, việc chủng ngừa kháng cả PCV2 và M.hyo là cần thiết để duy trì sức khỏe tốt cho lợn cũng như lợi nhuận kinh tế. Vì thế, việc chủng ngừa kép có thể được áp dụng bằng cách sử dụng các vaccin kháng nguyên đơn riêng rẽ kháng PCV2 và kháng M.hyo. Tuy nhiên thuận tiện cho việc sử dụng và tiết kiệm chi phí nhân công, vaccin kết hợp được ưu tiên. Ngoài ra, lợn con rất miễn cảm với các yếu tố gây áp lực trong môi trường, vì thế việc giảm số lần chủng

được chủng ngừa sẽ trực tiếp có lợi cho sức khỏe và năng suất của chúng. Thậm chí còn tốt hơn khi vaccin kết hợp không cần phải chủng ngừa nhắc lại, khiến cho chỉ cần chủng ngừa một lần mà có thể bảo vệ kháng nhiều bệnh trong suốt giai đoạn vỗ béo.

Vaccin kết hợp thương mại kháng PCV2 và M.hyo sẵn có cho phép chủng ngừa kháng cả hai mầm bệnh trong một lần chủng, xem Kim et al. (2011, Vaccine, vol. 29, p. 3206-3212). Các ví dụ về vaccin này là: Circumvent™ PCV-M (MSD AH) và Foster™ PCV MH (Zoetis), đều là vaccin kết hợp sẵn sàng để dùng với liều linh hoạt, và là nhũ tương dầu trong nước với chất phù trợ dầu. Trong tờ rơi sản phẩm trên Foster PCV MH, Zoetis mô tả rằng chúng khắc phục được sự giao thoa giữa kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV, bằng cách tinh chế kháng nguyên M.hyo bằng sắc ký cột protein A, trước khi kết hợp với kháng nguyên PCV2. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng việc tinh chế cẩn thận khó khăn và tốn kém, và giảm tính khả thi về mặt kinh tế của sản phẩm vaccin.

Cũng liên quan là Ingelvac™ CircoFLEX/MycoFLEX™ (Boehringer Ingelheim), sử dụng chất phù trợ dung dịch polyme. Tuy nhiên vaccin này không phải là loại sẵn sàng để dùng và cần phải trộn bên ngoài hai thành phần vaccin từ các chai riêng rẽ, ngay trước khi dùng, điều này là không thực tế.

Vì thế, mặc dù tất cả các vaccin này đều hữu hiệu, nhưng vẫn cần tiếp tục điều chỉnh và cải thiện độ an toàn, độ hữu hiệu, hoặc tính dễ sử dụng để tăng lợi ích cho lĩnh vực chăn nuôi.

Vaccin thử nghiệm PCV2/M.hyo trong chất phù trợ Emunade đã được mô tả trước đây (Eggen et al., 2010. Oral presentation no. O.072, trong: Proceedings 21st IPVS Congress, Canada, 18-21 July). Vaccin này chứng tỏ là làm giảm tổn thương phổi gây ra bởi M.hyo khá tốt (NB: với n=8, và được điều chỉnh cho các giá trị ngoại lệ), và nồng độ cảm ứng của kháng thể kháng PCV2 được coi là có hiệu quả cho loại vaccin này. Vaccin này được điều chế bằng cách trộn kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV2 với nhũ tương dầu trong nước Emunade trong. Các tác giả sáng chế đã kết luận rằng về nguyên tắc kháng nguyên PCV2 và M.hyo có thể được kết hợp thành vaccin sẵn sàng để dùng, mà không gây giao thoa miễn dịch ở đối tượng.

Tuy nhiên, vaccin này không thích hợp cho thương mại hóa quy mô lớn, do kháng nguyên PCV2 VLP được sử dụng đã được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn

90% bằng cách siêu ly tâm trên gradien CsCl. Bước này được thực hiện với nỗ lực nhằm tăng độ an toàn và ngăn ngừa phản ứng vị trí cục bộ. Do việc xử lý sau đối với kháng nguyên này cần nhiều nhân công và cực kỳ tốn kém, nên nó không khả thi về mặt kinh tế để áp dụng ở quy mô lớn, đặc biệt là không thể áp dụng trong lĩnh vực vaccin thú y cần chi phí lớn.

Công bố đơn quốc tế WO 2014/182872 gần đây mô tả vaccin kết hợp PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng. Vaccin này được điều chế bằng cách đầu tiên hòa tan kháng nguyên M.hyo, sau đó trộn hỗn hợp này với saponin; tiếp theo hòa tan kháng nguyên PCV2, và bổ sung chúng vào hỗn hợp M.hyo/saponin. Cuối cùng hỗn hợp của các kháng nguyên được kết hợp với chất phù trợ dầu hoặc chất phù trợ nhôm. Chưa có ví dụ mô tả việc điều chế hoặc sử dụng vaccin chứa chất phù trợ nhôm.

Một tài liệu công bố gần đây cũng chứng tỏ rằng việc phát triển vaccin kết hợp PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng là rất khó: Boehringer Ingelheim, người đã tạo ra và bán vaccin Ingelvac™ CircoFLEX/MycoFLEX™ để trộn bên ngoài, gần đây đã đưa ra một thông cáo báo chí rằng họ đã chấm dứt nỗ lực trong việc phát triển vaccin kết hợp PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng. Lý do là họ đã thất bại trong việc đạt được mức độ an toàn và hiệu quả chấp nhận được. Boehringer Ingelheim, thông cáo báo chí của công ty vào ngày 1/9/2014 (www.boehringer-ingelheim.com/news/news_releases/press_releases/2014/01_september_2014animal.html) đã nêu rằng:

“Boehringer Ingelheim Animal Health, nhà sản xuất vaccin cho lợn hàng đầu trên thị trường, đã quyết định vẫn tập trung vào vaccin Circovirut typ 2 trên lợn (PCV2)/Mycoplasma hyopneumonie (M.hyo) được trộn khi dùng và không đi theo xu hướng phát triển hỗn hợp vaccin PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng (RTU). Kết quả là, công ty không tiếp tục chương trình nghiên cứu PCV2/M.hyo RTU. Mặc dù số liệu ban đầu là hứa hẹn, nhưng qua thời gian rõ ràng là trong trường hợp này, mô hình RTU không đáp ứng được tiêu chuẩn cao về độ hữu hiệu và độ an toàn mà Boehringer Ingelheim's FLEXcombo® platform được biết”.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Từ tình trạng trên, kết quả là, trong lĩnh vực này vẫn cần có vaccin kết hợp cải tiến kháng M.hyo và PCV2, hữu hiệu và an toàn, thân thiện với đối tượng sử dụng, và khả thi về mặt kinh tế.

Vì thế, mục đích của sáng chế là khắc phục được các nhược điểm trong tình trạng kỹ thuật, và phù hợp với nhu cầu trong lĩnh vực thú y bằng cách cung cấp vacxin kết hợp PCV2/M.hyo rất hữu hiệu chống lây nhiễm và bệnh gây ra bởi PCV2 và M.hyo, dưới dạng vacxin liều đơn, có độ an toàn cao khi sử dụng, và ở dạng sẵn sàng để dùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Kết quả của các nghiên cứu thử thách PCV2:

Khởi phát miễn dịch và khoảng thời gian miễn dịch, được thể hiện qua hiệu giá kháng thể kháng PCV2, và tải lượng virus PCV2, khi được phát hiện bằng qPCR.

Fig. 2: Kết quả của các nghiên cứu thử thách M.hyo:

Khởi phát miễn dịch và khoảng thời gian miễn dịch, được thể hiện qua hiệu giá kháng thể kháng M.hyo, và điểm số tổn thương phổi.

Fig. 3: Số liệu PCV2 từ thử nghiệm hiệu lực trên thực địa:

Kết quả của thử nghiệm hiệu lực trên thực địa trong đó việc nhiễm PCV2 trên thực địa diễn ra từ tuần 8 đến 12 của thử nghiệm. Kết quả được thể hiện qua huyết thanh học và phát hiện ADN virus.

Fig. 4: Số liệu M.hyo từ thử nghiệm hiệu lực trên thực địa:

Kết quả của thử nghiệm hiệu lực trên thực địa trong đó việc nhiễm M.hyo trên thực địa diễn ra ở khoảng tuần 12 của thử nghiệm. Kết quả được thể hiện qua huyết thanh học và điểm số tổn thương phổi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ban đầu, các tác giả sáng chế đã rất thất vọng khi biết rằng kết quả như được công bố bởi Eggen et al. (supra) không thể thu được khi sử dụng kháng nguyên PCV2 VLP chuẩn. Kháng nguyên chuẩn này là kháng nguyên được sử dụng trong các vacxin PCV2 VLP thương mại như vacxin Porcilis PCV/Circumvent PCV. Nó có độ an toàn chấp nhận được và độ hữu hiệu cao. Tuy nhiên thay vì được tinh chế kỹ, nó được sản xuất với mức độ xử lý sau có tính khả thi về mặt kinh tế. Phương pháp này làm cho kháng nguyên có độ tinh khiết thấp hơn nhiều.

Theo quy trình được sử dụng bởi Eggen et al., các tác giả sáng chế đã thực hiện

việc kết hợp đơn giản vaccin vi khuẩn M.hyo và kháng nguyên PCV2 VLP chuẩn với chất phù trợ Emunade trống. Không may là vaccin thu được có mức độ bảo vệ thấp hơn một nửa so với mức độ bảo vệ thông thường trong thử thách nhiễm M.hyo: tổn thương phổi chỉ giảm 30%, so với mức giảm 66% khi sử dụng vaccin chỉ chứa kháng nguyên M.hyo trong Emunade (M+Pac™). Kết quả được nêu trong phần ví dụ dưới đây.

Vì thế, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng hiệu lực của vaccin M.hyo trong vaccin kết hợp PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng cho lợn chỉ có thể đạt mức độ bảo vệ mong muốn, bằng cách sử dụng quy trình sản xuất chế phẩm chứa kháng nguyên vaccin: mà chỉ bổ sung kháng nguyên PCV2 sau khi phức hợp của kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit đã được tạo thành.

Tương tự, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng vaccin kết hợp PCV2/M.hyo như đã mô tả trong bản mô tả này đã chứng tỏ profin an toàn được cải thiện đáng kể so với vaccin chứa một kháng nguyên PCV2.

Vaccin kết hợp PCV2/M.hyo có thể được tạo ra từ chế phẩm kháng nguyên được điều chế đặc biệt này, có hiệu lực cao chống lây nhiễm và bệnh gây ra bởi M.hyo và PCV2 sau khi một lần dùng, rất an toàn khi sử dụng, là loại sẵn sàng để dùng, và khả thi về mặt kinh tế trong đó vaccin này có thể chứa kháng nguyên PCV2 không có độ tinh khiết cao. Trên thực tế, hiệu lực của vaccin này bằng với hiệu lực của vaccin chứa một kháng nguyên kháng M.hyo hoặc PCV2. Vaccin này cũng hoàn toàn an toàn khi sử dụng trong đó không thấy có phản ứng cục bộ hoặc toàn thân đáng kể khi sử dụng vaccin này cho lợn.

Về khía cạnh quy mô lớn tiềm năng để vaccin kết hợp có thể được sử dụng trong ngành chăn nuôi lợn, hiệu quả và sự cải thiện này rất có ý nghĩa, và là hiệu quả kỹ thuật bất ngờ mà có ý nghĩa lớn trong thương mại. Vì thế, theo cách này mục đích của sáng chế có thể được đáp ứng, và kết quả là các nhược điểm trong tình trạng kỹ thuật có thể được khắc phục.

Hiện nay không biết tại sao kháng nguyên PCV2 không nên có mặt trong quá trình kháng nguyên M.hyo hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit. Người ta cũng chưa biết tại sao độ an toàn của vaccin kết hợp PCV2/M.hyo lại rất cao.

Mặc dù các tác giả sáng chế không muốn bị ràng buộc bởi giả thuyết hoặc mô

hình bất kỳ mà có thể giải thích được các quan sát này, các tác giả sáng chế suy đoán rằng khi kháng nguyên PCV2 xuất hiện trong quá hình thành phức hợp giữa kháng nguyên M. hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit, bằng cách nào đó kháng nguyên PCV2 có thể gây cản trở hoặc tạo ra sự hấp phụ hiệu quả của kháng nguyên M.hyo lên chất phù trợ nhôm-hydroxit. Tương tự, kháng nguyên PCV2, không liên kết với chất phù trợ nhôm hydroxit như kháng nguyên M.hyo, có thể gây cản trở phức hợp tạo thành. Bằng cách này hoặc cách khác, tác động này gây cản trở đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên M.hyo sau này.

Suy đoán tương tự đối với nguyên nhân khiến cho độ an toàn của vacxin kết hợp theo sáng chế được tăng lên. Độ an toàn có thể được cải thiện bởi một số kiểu tương tác của kháng nguyên này với các thành phần trong chất phù trợ kép Emunade: dầu khoáng và chất phù trợ nhôm-hydroxit, là kiểu tương tác không xuất hiện trong chất phù trợ dầu không chứa nhôm. Tương tác này có thể làm giảm (hiệu quả của) các chất trong kháng nguyên PCV2 mà nếu không thì sẽ gây ra phản ứng tại vị trí tiêm.

Vì thế, theo khía cạnh thứ nhất sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm kháng nguyên cho vacxin kết hợp sẵn sàng để dùng cho lợn, chế phẩm này chứa kháng nguyên của *Mycoplasma hyopneumonie* (M.hyo) và kháng nguyên của circovirut typ 2 trên lợn (PCV2), đặc trưng ở chỗ quy trình này bao gồm bước trộn kháng nguyên PCV2 với phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ đã được tạo trước của kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Trong sáng chế, thuật ngữ “sẵn sàng để dùng” có nghĩa là: không cần phải kết hợp (một phần của) thành phần được chứa trong 2 hoặc nhiều vật chứa để có thể dùng cho động vật mục tiêu. Ví dụ: không cần bước hòa tan hoặc trộn, và có thể sử dụng cho đối tượng dùng cuối ở dạng nhũ tương trong chai.

Đối với vacxin sẵn sàng để dùng, việc kết hợp cần thiết của các hợp chất được thực hiện bởi nhà sản xuất vacxin, trong môi trường được kiểm soát. Điều này có lợi thế khác biệt so với việc trộn bên ngoài, chủ yếu là thuận tiện để sử dụng cho đối tượng dùng cuối, đặc biệt là khi phải chủng ngừa số lượng lớn động vật. Các ưu điểm khác là nhà sản xuất có thể thực hiện việc kết hợp trong điều kiện vô trùng, và có thể áp dụng các thử nghiệm đảm bảo chất lượng khác nhau trên hỗn hợp cuối cùng, để đảm bảo thành phần và số lượng chính xác của nó.

Tuy nhiên điều này không loại trừ việc vaccin sẵn sàng để dùng vẫn có thể cần một số phương pháp xử lý trước đơn giản, như lắc nhẹ bằng tay để ngăn cản hiện tượng lắng hoặc tách lớp của nhũ tương, như làm ấm trước khi dùng khi vaccin được bảo quản trong tủ lạnh.

Thuật ngữ “lợn” được dùng để chỉ động vật thuộc họ Suidae, và tốt hơn là động vật thuộc giống Sus, còn được gọi là heo. Các ví dụ về lợn là: lợn hoang dã hoặc lợn nuôi, lợn đực thiến, lợn rừng, lợn hươu, hoặc lợn lòi. Thuật ngữ này cũng bao gồm lợn được gọi bằng tên tùy ý, ví dụ khi dùng để chỉ giới tính hoặc độ tuổi như: lợn nái, lợn đê, lợn đực, lợn thiến, lợn đực thiến, lợn cái con, lợn con cai sữa, hoặc lợn con.

Thuật ngữ “*Mycoplasma hyopneumoniae*” (M.hyo) và “circovirut typ 2 trên lợn” (PCV2) được dùng để chỉ lần lượt là vi sinh vật vi khuẩn và virus biểu hiện dấu hiệu đặc trưng của các thành viên thuộc nhóm phân loại của nó như các đặc điểm về hình thái, bộ gen, và sinh hóa, cũng như đặc điểm sinh học của nhóm đó, như các biểu hiện sinh lý, miễn dịch, hoặc gây bệnh của nó. Thuật ngữ này cũng bao gồm vi khuẩn M.hyo, tương ứng là virus PCV2 được xếp vào lớp phụ theo cách bất kỳ, ví dụ như loài phụ, chủng, thể phân lập, kiểu gen, biến thể, kiểu phụ hoặc nhóm phụ và dạng tương tự.

Cả hai vi sinh vật này đều đã được biết rõ trong lĩnh vực, và ví dụ được mô tả trong các sổ tay, như: “The Merck veterinary manual” (10th ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X), và: “Diseases of Swine” (10th ed., 2012, J. Zimmerman et al., ed., ISBN-10: 081382267X).

Sẽ hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là mặc dù vi khuẩn M.hyo, hoặc virus PCV2 theo sáng chế hiện nay được phân loại theo loài và giống cụ thể, là cách phân loại theo khóa phân loại mà có thể thay đổi theo thời gian khi có các hiểu biết mới dẫn đến việc phân loại lại thành nhóm phân loại mới hoặc khác nhau. Tuy nhiên, điều này không làm thay đổi bản thân vi sinh vật, hoặc khả năng kháng nguyên của nó, mà chỉ là sự thay đổi về tên khoa học hoặc cách phân loại, vi sinh vật được phân loại này vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trong sáng chế, “kháng nguyên của” vi sinh vật về nguyên tắc có thể là loại nguyên liệu kháng nguyên bất kỳ có nguồn gốc từ vi khuẩn M.hyo hoặc từ virus PCV2, miễn là nó có thể gây ra đáp ứng miễn dịch (bởi chính nó hoặc cùng với chất

phù trợ). Tốt hơn là, nguyên liệu kháng nguyên tương ứng là nguyên liệu có kích thước, cấu trúc, dạng, hoặc phẩm chất sao cho đáp ứng miễn dịch mà nó gây ra trên đối tượng lợn được chủng ngừa có tác dụng bảo vệ, tức là cường độ đủ để có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh.

Kháng nguyên để sử dụng trong sáng chế có thể là vi sinh vật bị bất hoạt, hoặc có thể là một phần của chúng như cấu trúc dưới đơn vị, chất chiết, phân đoạn, thể đồng nhất hoặc sản phẩm nghiền bằng sóng siêu âm. Kháng nguyên có thể tạo thành từ một hoặc nhiều loại phân tử như protein, lipoprotein, glycoprotein, và axit nucleic. Kháng nguyên có thể có nguồn gốc sinh học hoặc (bán) tổng hợp, và có thể thu được trực tiếp hoặc gián tiếp từ vi sinh vật như vi khuẩn M.hyo, hoặc virus PCV2.

Một ví dụ của kháng nguyên M.hyo là vacxin vi khuẩn. Vacxin này có thể được sản xuất theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bằng cách bất hoạt toàn bộ hoặc một phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Việc bất hoạt có thể được thực hiện bằng cách xử lý bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ như bằng nhiệt, phóng xạ, hoặc bằng hóa chất như formalin, beta-propiolacton, etylenimin kép (BEI), hoặc beta-etanolamin. Vacxin vi khuẩn thu được sau đó là hỗn hợp phức tạp của các tế bào vi khuẩn đã chết hoặc nguyên vẹn và bị phá hủy, mảnh tế bào, thành phần tế bào, và các yếu tố được tiết ra từ tế bào trong khi nuôi cấy, cũng như các yếu tố từ môi trường nuôi cấy và các thành phần khác nhau của nó.

Một ví dụ của kháng nguyên PCV2 là vacxin có cấu trúc dưới phân tử, ví dụ trên cơ sở protein capsit của virus, thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Protein này có thể được sản xuất bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trình tự bộ gen ORF2 của virus, ví dụ bằng hệ thống baculovirus/tế bào côn trùng. Sau đó, VLP tự lắp ghép có thể được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng, ví dụ bằng cách ly tâm.

Thuật ngữ “bao gồm” (cũng như các biến thể như “gồm có”, “chứa”, và “được bao gồm”) như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ tất cả các yếu tố, và trong hỗn hợp có thể bất kỳ có thể hiểu được trong sáng chế, được bao hàm hoặc được bao gồm trong phần, đoạn, yêu cầu bảo hộ, v.v., trong đó thuật ngữ này được sử dụng, ngay cả khi các yếu tố hoặc tổ hợp đó không được nêu rõ ràng; và không được dùng để hiểu là sự loại trừ bất kỳ trong số các yếu tố hoặc tổ hợp này. Kết quả là phần, đoạn,

yêu cầu bảo hộ bất kỳ này, v.v., cũng có thể đề cập đến một hoặc nhiều phương án trong đó thuật ngữ “bao gồm” (hoặc các biến thể của nó) được thay thế bằng thuật ngữ như “chứa”, “bao gồm”, hoặc “về cơ bản bao gồm”.

Thuật ngữ “phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ” được dùng để chỉ cấu trúc đại phân tử được tạo ra khi (các thành phần của) kháng nguyên M.hyo hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit, như được xác định trong bản mô tả này. Do việc hấp phụ này diễn ra qua nhiều tương tác vật lý và hóa học, vì thế thành phần của phức hợp không thể được xác định chính xác về mặt hóa học. Thành phần và cấu trúc của phức hợp cũng phụ thuộc vào thành phần và đặc điểm của kháng nguyên và chất phù trợ được sử dụng, cũng như trong các điều kiện mà nó được tạo thành. Các yếu tố này đã được biết rõ trong lĩnh vực, và được chấp nhận trong lĩnh vực này. Các đặc điểm yêu cầu và ưu tiên của kháng nguyên và chất phù trợ, và các điều kiện để tạo thành phức hợp của chúng, được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “được tạo thành trước” cho biết rằng việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ mà thuật ngữ này được dùng để chỉ, đã diễn ra ở thời điểm trước đó. Trong sáng chế, thuật ngữ này có nghĩa là phức hợp giữa kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit đã được tạo thành trước khi kháng nguyên PCV2 bất kỳ được bổ sung vào chế phẩm, và vì thế việc tạo thành phức hợp diễn ra trong điều kiện không có mặt kháng nguyên PCV2.

Các tác giả sáng chế suy đoán rằng điều này cho phép một kháng nguyên M.hyo đã biết trở nên có thể được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit càng hoàn toàn càng tốt trong các trường hợp này, mà không gây trở ngại cho hoặc bất giữ đồng thời kháng nguyên PCV2. Kết quả là với vacxin được sản xuất từ chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên M.hyo là tối ưu.

Điều kiện chung để kháng nguyên hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ từ sổ tay dược phẩm, chỉ thị của nhà nước về sản xuất vacxin dùng cho người, và hướng dẫn của nhà sản xuất chất phù trợ. Tuy nhiên, chất phù trợ nhôm-hydroxit và kháng nguyên vacxin vi khuẩn M.hyo không có thành phần được xác định rõ ràng. Điều này khiến cho khó xác định cụ thể điều kiện xử lý, và mức độ cuối cùng thu được đối với việc tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ theo sáng chế. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh

vực sản xuất dược phẩm, như nhà hóa sinh hoặc dược sỹ, hoặc một nhóm có kỹ năng như vậy, sẽ dễ dàng có thể thay đổi và tối ưu hóa các điều kiện này, để kháng nguyên M.hyo theo sáng chế có thể hấp phụ tối đa lên chất phù trợ nhôm hydroxit. Mức độ hấp phụ đạt được sau đó có thể xác định được, sao cho tác động của các điều kiện và nguyên liệu khác nhau có thể so sánh được.

Ví dụ, trên thực tế kháng nguyên M.hyo bất kỳ có được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit hay không, và nếu có sự hấp phụ thì mức độ hấp phụ là bao nhiêu, có thể thuận lợi được xác định bằng phương pháp sinh hóa, do tinh thể nhôm-hydroxit có thể dễ dàng tạo viên bằng cách ly tâm. Đặc điểm này cho phép xác định lượng kháng nguyên M.hyo trong viên tạo thành, cho biết mức độ tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ; theo cách khác đặc điểm này cho phép xác định được lượng kháng nguyên M.hyo còn lại trong dịch nổi, khi không tạo thành phức hợp, hoặc tạo thành phức hợp không hoàn toàn.

Việc phát hiện kháng nguyên M.hyo trong viên hoặc dịch nổi có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở kháng thể, ví dụ bằng cách sử dụng Elisa, như được nêu trong phần ví dụ. Một cách khác là phân tách kháng nguyên M.hyo đã liên kết bất kỳ ra khỏi chất phù trợ nhôm-hydroxit trong viên, và phân tích kháng nguyên được giải phóng, ví dụ bằng cách điện di. Việc phân tách này có thể thực hiện bằng cách khác nhau, ví dụ bằng cách điều chỉnh phù hợp độ pH, sử dụng ion phosphat, hoặc nghiền bằng sóng siêu âm viên này. Tất cả các phương pháp này là các phương pháp đã được mô tả trong lĩnh vực này.

Điều kiện tối ưu hóa có thể được xác định bằng cách thử nghiệm mức độ hấp phụ của chất phù trợ nhôm-hydroxit trên thực tế được sử dụng trong các điều kiện tạo thành phức hợp với kháng nguyên M.hyo. Thử nghiệm này có thể được thực hiện bằng cách tạo thành phức hợp sau đó bằng cách sử dụng lượng xác định của protein đã biết, và xác định lượng protein thử nghiệm có thể được liên kết thêm; ví dụ bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết như đã mô tả trong Chuyên khảo dược điển châu Âu 1664. Thử nghiệm này sẽ cho biết có diễn ra sự hấp phụ hay không và mức độ hấp phụ là bao nhiêu.

Đối với kháng nguyên M. hyo đã biết hoặc chất phù trợ nhôm-hydroxit đã biết, việc tạo thành phức hợp càng hoàn toàn càng tốt khi lượng kháng nguyên M.hyo trong

phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ không thể tăng thêm đáng kể, ví dụ bằng cách làm phù hợp các thông số hấp phụ, như nhiệt độ, độ pH, thời gian hoặc lượng tương đối của các thành phần. Ngoài ra, việc tạo thành phức hợp càng hoàn toàn càng tốt khi khả năng liên kết của chất phù trợ nhôm-hydroxit được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo càng nhiều càng tốt, và không thể giảm thêm đáng kể.

Ví dụ, chế phẩm kháng nguyên này có thể được tạo ra theo quy trình theo sáng chế. Chế phẩm này có thể được ly tâm, sau đó viên tạo thành và dịch nổi có thể được thử nghiệm riêng rẽ. Bằng cách sử dụng kháng huyết thanh đa dòng thử kháng M.hyo, khoảng pha loãng của dịch nổi, hoặc viên được tạo huyền phù lại có thể được thử nghiệm, ví dụ trong thử nghiệm Elisa, đối với lượng tương đối kháng nguyên M.hyo có thể được phát hiện.

Các điều kiện nhất định được phát hiện là hữu ích cho việc tối ưu hóa việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ của kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Vì thế, theo một phương án của quy trình theo sáng chế, phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ được tạo trước bằng các bước sau đây:

- a. trộn chất phù trợ nhôm-hydroxit và kháng nguyên M.hyo, trong chất mang chứa nước ở độ pH mà tại đó chất phù trợ nhôm-hydroxit tích điện dương, và
- b. ủ hỗn hợp trong bước a. để cho phép kháng nguyên M.hyo hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit và tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ.

“Chất mang chứa nước” về nguyên tắc có thể là chất lỏng chứa nước bất kỳ, miễn là chất lỏng này cho phép tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ một cách hiệu quả và hoàn toàn. Theo một phương án ưu tiên, chất mang chứa nước khá đơn giản, chỉ chứa chất đệm hoặc muối trong nước tinh khiết, ví dụ chất mang chứa nước là chất đệm sinh lý, như dung dịch muối cân bằng, hoặc dung dịch muối sinh lý, còn được gọi là ‘dung dịch muối bình thường’; chất mang là natri clorua đã được biết rõ và có nồng độ 0,85% khối lượng/thể tích trong nước tinh khiết. Trong sáng chế, chất lỏng là ‘nước’ nếu nó bao gồm lớn hơn 50% thể tích hoặc trọng lượng là nước.

‘Nước tinh khiết’ tốt hơn là ‘nước để tiêm’; thường được pha chế từ nước cất, nước cất hai lần, nước vi lọc, hoặc nước tinh khiết thẩm thấu, mà vô trùng và về cơ bản không chứa chất gây sốt.

Như đã biết trong lĩnh vực này: “tích điện dương” đề cập đến hợp chất có điện tích dương mạng lưới trong dung dịch nước, trong điều kiện xác định.

Khoảng pH trong đó chất phù trợ nhôm-hydroxit tích điện dương là từ 0 đến khoảng 11, trong đó 11 là điểm điện tích không. Kết quả là, trong điều kiện độ pH bằng khoảng 11, thì kháng nguyên M.hyo có thể liên kết hữu hiệu với chất phù trợ nhôm-hydroxit. Tuy nhiên, do kháng nguyên M.hyo có thể bị biến tính ở mức độ nào đó trong độ pH cao hoặc thấp, nên độ pH sinh lý được ưu tiên hơn. Vì thế độ pH của chất mang chứa nước tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 10, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5,5 đến 9, nằm trong khoảng từ 6 đến 8, hoặc thậm chí nằm trong khoảng từ 6,2 đến 7,8. Được ưu tiên nhất khi độ pH của chất mang chứa nước nằm trong khoảng từ 6,5 đến khoảng 7,5, ở các giá trị này, kháng nguyên M.hyo được duy trì trong điều kiện sinh lý, trong khi chất phù trợ nhôm-hydroxit vẫn có tích điện dương sao cho kháng nguyên M.hyo có thể hấp phụ hữu hiệu.

Các điều kiện “ủ hỗn hợp thu được trong bước a.” không quá hạn chế, mặc dù việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ hữu hiệu được yêu cầu.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc hấp phụ kháng nguyên M.hyo lên chất phù trợ nhôm-hydroxit bắt đầu nhanh chóng sau khi hai thành phần được trộn, nhưng để đạt được sự hấp phụ hoàn toàn, thì cần phải có thời gian thích hợp. Vì thế, khoảng thời gian được ưu tiên để ủ hỗn hợp như đã mô tả trong bước a., ít nhất là 15 phút, tốt hơn là: ít nhất là 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 hoặc 24 giờ, theo thứ tự ưu tiên. Trong trường hợp thực tế, việc ủ tốt hơn là được thực hiện “qua đêm”, mà tương ứng với thời gian trong khoảng từ 12 đến khoảng 18 giờ.

Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng quá trình hấp phụ kháng nguyên M.hyo lên chất phù trợ nhôm-hydroxit có thể chịu được nhiệt độ ủ trong khoảng khá rộng; việc hấp phụ hiệu quả quan sát được khi được làm lạnh ở 4°C cũng như ở nhiệt độ phòng. Tuy nhiên, như đã được biết rõ trong lĩnh vực, chất phù trợ nhôm-hydroxit không nên bị đông lạnh, và việc đông lạnh sẽ phá hủy cấu trúc tinh thể. Tương tự, ở nhiệt độ cao hơn thân nhiệt bình thường của động vật có vú, với lợn là nằm trong khoảng từ 38°C đến 40°C, có thể làm biến tính kháng nguyên M.hyo. Vì thế nhiệt độ ưu tiên để ủ hỗn hợp như đã mô tả trong bước a., nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 45°C. Tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4°C đến 40°C, hoặc thậm chí từ 10°C

đến 38°C. Ưu tiên nhất là ‘nhiệt độ phòng’, còn được gọi là ‘nhiệt độ môi trường’, nằm trong khoảng từ khoảng 15°C đến khoảng 30°C.

Để phù hợp với bản chất nhớt của gel là chất phù trợ nhôm-hydroxit, việc ủ hỗn hợp thu được trong bước a. trong quy trình theo sáng chế, tốt hơn là được thực hiện trong khi hỗn hợp ở trạng thái động. Tuy nhiên, như đã được biết rõ trong lĩnh vực, việc trộn mạnh chất phù trợ nhôm-hydroxit có thể phá hủy cấu trúc tinh thể. Vì thế kiểu khuấy nhẹ hỗn hợp được ưu tiên. Một ví dụ về việc khuấy là sử dụng que khuấy từ, hoặc bằng các loại máy rung hoặc bàn khác nhau mà tạo ra quỹ đạo nhẹ nhàng, hoặc chuyển động lắc dọc. Tất cả các thiết bị này đều sẵn có. Trong sáng chế, việc khuấy nhẹ là chuyển động khuấy hoặc quay 250 vòng/phút hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 150 vòng/phút hoặc nhỏ hơn; một ‘vòng quay’ là chuyển động theo vòng tròn đầy đủ, cho đến khi trở về vị trí xuất phát. Đối với chuyển động lắc dọc: 200 vòng/phút hoặc ít hơn, tốt hơn là 100 vòng/phút hoặc ít hơn. Một ‘chu kỳ’ là trình tự đầy đủ của chuyển động lên và xuống, cho đến khi trở về vị trí xuất phát.

Khi nói đến kháng nguyên được sử dụng trong quy trình theo sáng chế:

Tốt hơn là kháng nguyên M.hyo là vacxin vi khuẩn được sản xuất từ môi trường nuôi cấy đầy đủ; tốt hơn là vacxin vi khuẩn bị bất hoạt bằng BEI; tốt hơn là vacxin vi khuẩn được cô đến khoảng 10 - 30 lần bằng cách ví dụ (siêu) lọc hoặc thẩm tách. Như đã nêu, thành phần của vacxin vi khuẩn chưa được biết chính xác, nhưng nó có thể được mô tả đặc điểm ví dụ bằng cách cho biết số lượng tế bào M.hyo trong môi trường nuôi cấy tại thời điểm bất hoạt, và điều chỉnh số lần cô. Trong sáng chế, kháng nguyên M.hyo, khi ở dạng vacxin vi khuẩn, thu được từ môi trường nuôi cấy M.hyo chứa từ 10^1 đến 10^{10} tế bào M. Hyo trong mỗi ml trong toàn bộ môi trường nuôi cấy. Tốt hơn là tế bào M.hyo/ml trong môi trường nuôi cấy với lượng từ 10^4 đến 10^{10} ; từ 10^6 đến 10^{10} ; từ 10^7 đến 5×10^9 ; và từ 5×10^7 đến 5×10^9 , theo thứ tự ưu tiên. Kháng nguyên M.hyo được sử dụng cho chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế được lấy từ thể huyền phù của môi trường nuôi cấy bị bất hoạt. Môi trường nuôi cấy cũng có thể được cô bằng cách lọc hoặc ly tâm.

Tốt hơn là, lượng kháng nguyên M.hyo được bổ sung trong bước a. được tính với việc xem xét sự kết hợp sau đó của chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình tạo thành vacxin. Điều này có nghĩa là khi vacxin thành phẩm cũng chứa một

lượng thể tích của pha dầu, thì lượng kháng nguyên M.hyo trong chế phẩm kháng nguyên được bù trong bước pha loãng sau đó.

Thể tích của vaccin vi khuẩn M.hyo từ môi trường nuôi cấy bị bất hoạt và được cô có thể nằm trong khoảng từ 1 và 50 % thể tích/thể tích, so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm. Tốt hơn là lượng này nằm trong khoảng từ 2% đến 40%, nằm trong khoảng từ 3% đến 30%, nằm trong khoảng từ 4% đến 20%, hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến khoảng 15% thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm, theo thứ tự ưu tiên.

Tốt hơn là kháng nguyên M. hyo được chọn từ chủng M.hyo J, chủng 11, hoặc chủng 232. Tốt hơn nữa là kháng nguyên M.hyo là từ chủng J.

Vì thế, theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, kháng nguyên M.hyo là vaccin vi khuẩn, được điều chế bằng cách bất hoạt theo cách hóa học môi trường nuôi cấy M.hyo từ chủng J, ở mật độ tế bào nằm trong khoảng từ 10^7 đến khoảng 10^9 tế bào/ml, sau đó môi trường nuôi cấy bị bất hoạt được cô bằng cách lọc từ 10 đến 20 lần, và môi trường nuôi cấy bị bất hoạt, đã cô được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 10 % thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm chứa kháng nguyên M.hyo.

Tốt hơn là kháng nguyên PCV2 là cấu trúc dưới đơn vị được mã hóa bởi ORF2, và tốt hơn là ở dạng VLP. Tốt hơn là kháng nguyên VLP không được tinh chế kỹ. Lượng kháng nguyên PCV2 được trộn trong bước b. của quy trình theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến khoảng 200µg/ml PCV2 ORF2 VLP. Tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 và 100 µg/ml PCV2 ORF2 VLP.

Như đối với kháng nguyên M.hyo, lượng kháng nguyên PCV2 được bổ sung tốt hơn là được tính toán đồng thời xem xét việc kết hợp sau đó của chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình này thành vaccin. Điều này có nghĩa là khi vaccin thành phẩm cũng chứa một thể tích dầu khoáng, thì lượng kháng nguyên PCV2 trong chế phẩm kháng nguyên được bù cho bước pha loãng sau đó. Với lượng kháng nguyên PCV2 được bổ sung trong bước b., điều này như vậy là vaccin thành phẩm chứa ít nhất là 20µg ORF2 VLP/liều.

Do kháng nguyên PCV2 chỉ được tinh chế một phần, vì thế nó có thể là mẫu từ môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng/baculovirut bị bất hoạt, sau khi ly tâm, chứa tổng

protein với lượng từ 50 đến 1000 µg/ml. Tương tự, trong điều kiện thực tế, điều này có nghĩa là thể tích kháng nguyên PCV2 nằm trong khoảng từ khoảng 3% đến khoảng 30% thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm. Tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5% đến 25%, hoặc thậm chí nằm trong khoảng từ 10% đến khoảng 20% thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm.

Vì thế, theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, kháng nguyên PCV2 là kháng nguyên cấu trúc dưới đơn vị được mã hóa bởi ORF2, ở dạng VLP, thu được từ mẻ cấy biểu hiện tế bào côn trùng/baculovirut mà bị bất hoạt bằng cách hóa học và ly tâm, và có ít nhất là 20µg ORF2 VLP trong mỗi liều dùng cho động vật trong chế phẩm vaccin thành phẩm chứa kháng nguyên PCV2.

Không có mối quan hệ cụ thể giữa kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV2, như về loại hoặc lượng của chúng trong mỗi liều. Kết quả là, loại và/hoặc lượng tương đối của chúng trong chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế có thể thay đổi độc lập, khi thích hợp; miễn là chúng cho phép tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ một cách hiệu quả, và có tác dụng chủng ngừa hữu hiệu.

Việc xác định lượng kháng nguyên từ mẻ kháng nguyên M.hyo hoặc kháng nguyên PCV2 là cần thiết để được sử dụng để điều chế chế phẩm kháng nguyên và vaccin theo sáng chế, thông thường thử nghiệm công hiệu in vitro được sử dụng. Thử nghiệm này cũng có thể sử dụng để xác định mẻ kháng nguyên M.hyo hoặc kháng nguyên PCV2 mới có khối lượng kháng nguyên yêu cầu. Phép thử thông qua mẻ nội bộ thường là Elisa định lượng kháng nguyên. Phép thử này ví dụ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kháng huyết thanh đa dòng được tạo ra để kháng M.hyo hoặc PCV2, ví dụ thu được bằng cách gây miễn dịch cho thỏ, và sử dụng chất chuẩn tham chiếu của kháng nguyên M.hyo hoặc kháng nguyên PCV2. Công hiệu của kháng nguyên tham chiếu được xác định trong chuỗi thử nghiệm thử thách chủng ngừa, sao cho số lượng nhất định đơn vị kháng nguyên tùy ý có thể kết hợp với hiệu quả chủng ngừa mong muốn. Một ví dụ về cách viết hồ sơ đăng ký: vaccin theo sáng chế cần chứa ít nhất là 2,7 ‘đơn vị công hiệu tương đối’ của kháng nguyên vaccin vi khuẩn M.hyo, và ít nhất là 2800 ‘đơn vị kháng nguyên’ của kháng nguyên PCV2 trong mỗi liều vaccin 2ml. Lượng kháng nguyên này, được bao gồm trong vaccin theo sáng chế,

được xác định để đảm bảo sự bảo vệ hữu hiệu kháng thử thách nhiễm M.hyo và PCV2 nghiêm trọng như đã mô tả trong bản mô tả này.

Để đạt được công hiệu yêu cầu trong mỗi liều vacxin dùng cho động vật theo sáng chế, thông thường kháng nguyên vacxin vi khuẩn M.hyo được sử dụng nằm trong khoảng từ 5 đến 15%, và kháng nguyên PCV2 nằm trong khoảng từ 10 đến 20% thể tích của chế phẩm vacxin thành phẩm chứa các kháng nguyên này,

Việc phát triển phép thử thông qua mẽ, bao gồm việc tạo ra kháng huyết thanh thích hợp và chất chuẩn tham chiếu nằm trong khả năng thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Lượng chất phù trợ nhôm-hydroxit được trộn với kháng nguyên M.hyo cần để cho phép hấp phụ kháng nguyên M.hyo càng hoàn toàn càng tốt. Nói cách khác, lượng chất phù trợ nhôm-hydroxit được sử dụng cần phải nằm trong giới hạn chấp nhận được của lượng nhôm trong mỗi liều dùng cho động vật, và cần phải phù hợp với công thức của vacxin bằng cách sử dụng chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp trong bước a. chứa lượng chất phù trợ nhôm-hydroxit tương ứng với lượng nhôm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/ml; tốt hơn là lượng nhôm nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5 mg/ml. Để đạt được lượng này, ví dụ sản phẩm chất phù trợ nhôm-hydroxit thương mại có thể được sử dụng như Alhydrogel™, là một biến thể có sẵn dưới dạng dung dịch “2%”. Tên này hơi khó hiểu, nhưng thu được từ sản phẩm chứa khoảng nhôm oxit 2% khối lượng/khối lượng, tương ứng với khoảng 3% khối lượng/khối lượng nhôm hydroxit, đến khoảng 1% khối lượng/thể tích nhôm. Sản phẩm như vậy có thể được sử dụng ở thể tích nằm trong khoảng từ 3% đến 30% thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vacxin thành phẩm. Tốt hơn là sản phẩm chất phù trợ nhôm hydroxit được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 4% đến 20% thể tích/thể tích, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5% đến khoảng 15 % thể tích/thể tích so với thể tích của chế phẩm vacxin thành phẩm.

Vì thế theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, chế phẩm kháng nguyên bao gồm lượng kháng nguyên M.hyo nằm trong khoảng từ 5% đến 15% thể tích/thể tích, lượng sản phẩm chất phù trợ nhôm hydroxit nằm trong khoảng từ 5% đến

15% thể tích/thể tích, và lượng kháng nguyên PCV2 nằm trong khoảng từ 10% đến 20% thể tích/thể tích, tất cả đều so với thể tích của chế phẩm vaccin thành phẩm.

Theo một phương án, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế được sử dụng làm cơ sở cho pha nước hoàn chỉnh của vaccin được sản xuất từ chế phẩm kháng nguyên này. Kết quả là khi vaccin được điều chế dưới dạng nhũ tương chứa ví dụ 10% hoặc 20% pha dầu, pha nước tương ứng chiếm 90% hoặc 80% của chế phẩm vaccin thành phẩm. Được bao gồm trong pha nước là chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, với phức hợp của kháng nguyên M.hyo và chất phụ trợ nhôm hydroxit, chất mang chứa nước và kháng nguyên PCV2. Lượng thể tích chính xác của các hợp chất khác nhau trong chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế có thể thay đổi, ví dụ thể tích tương đối của kháng nguyên M.hyo hoặc kháng nguyên PCV2 được sử dụng có thể thay đổi, phụ thuộc vào công hiệu của mẻ kháng nguyên cụ thể được sử dụng, như đã mô tả ở trên. Ngoài ra pha nước của vaccin cũng bao gồm các thành phần khác như chất độn, chất làm ổn định, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt, kháng nguyên bổ sung, và hợp chất hoặc dung dịch khác bất kỳ cần để sản xuất vaccin thành phẩm được điều chế từ đó. Trong sáng chế, sự khác biệt về thể tích của các thành phần trong pha nước của vaccin được điều chế từ đó, được bù bằng thể tích thích hợp của chất mang chứa nước, để đạt được tổng thể tích pha nước mong muốn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thuận lợi để thực hiện việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ theo sáng chế trong một thể tích tương đối thấp; điều này cho phép việc tiếp xúc tối ưu để hấp phụ kháng nguyên M.hyo lên chất phụ trợ nhôm hydroxit. Tuy nhiên, do bản chất gelatin của chất phụ trợ nhôm hydroxit, nên việc chỉ sử dụng hỗn hợp của kháng nguyên M.hyo và một thể tích sản phẩm chất phụ trợ nhôm hydroxit không đem lại kết quả tốt nhất, và chất phụ trợ thường cần phải pha loãng đến một mức độ nào đó. Vì thế việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ được thực hiện trong hỗn hợp cũng bao gồm chất mang chứa nước.

Như đã mô tả, chất mang chứa nước này cũng được sử dụng để điều chỉnh thể tích của pha nước để tạo thành vaccin được điều chế từ đó.

Theo một phương án ưu tiên, việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ theo sáng chế được thực hiện trong hỗn hợp với chất mang chứa nước, nhưng trong đó thể tích của chất mang chứa nước có mặt trong quá trình tạo thành phức hợp nhỏ

hơn tổng thể tích của chất mang chứa nước sẽ được sử dụng để tạo ra pha nước hoàn chỉnh của vaccin sau này. Điều này có nghĩa là khi pha nước hoàn chỉnh của vaccin bao gồm thể tích X nhất định của chất mang chứa nước, sau đó tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, với thể tích nhỏ hơn thể tích X của chất mang chứa nước được sử dụng; tốt hơn là 75% thể tích X, tốt hơn nữa là 50, 40, 33, 30, 25, 20 hoặc thậm chí 10% thể tích X được sử dụng, theo thứ tự ưu tiên. Phần còn lại của thể tích chất mang chứa nước sau đó có thể được bổ sung vào chế phẩm kháng nguyên sau khi tạo thành phức hợp kháng nguyên/kháng thể.

Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng thuận lợi để tạo thành phức hợp của kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm hydroxit, để giữ cho hỗn hợp của bước a. càng đơn giản càng tốt, có nghĩa là: ưu tiên không bao gồm các thành phần khác bất kỳ trong hỗn hợp mà có thể tạo thành pha nước hoàn chỉnh, trước khi tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ. Các thành phần khác này có thể là chất độn, chất làm ổn định, chất bảo quản, chất hoạt động bề mặt, kháng nguyên bổ sung, v.v..

Kết quả là, theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp của bước a. của quy trình theo sáng chế, bao gồm kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit (cả hai đều có thể đã chứa một lượng chất mang chứa nước), và chất mang chứa nước.

Các ví dụ về các hợp chất có thể cần được bổ sung vào pha nước, trước khi nhũ hóa thành vaccin thành phẩm mà tốt hơn là chỉ được bổ sung sau khi tạo thành phức hợp kháng nguyên M.hyo/chất phù trợ nhôm hydroxit, là: chất làm ổn định như etanol hoặc glyxerol, kháng nguyên bổ sung, hoặc chất hoạt động bề mặt như Tween™.

Vì thế, theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, một hoặc nhiều, hoặc tất cả, các điều kiện sau đây phải được đáp ứng:

- kháng nguyên M.hyo là vaccin vi khuẩn M.hyo,
- kháng nguyên PCV2 được mã hóa bằng PCV2 ORF2,
- kháng nguyên được mã hóa bởi PCV2 ORF2 là phần tử giống virus,
- chất mang chứa nước trong bước a. là dung dịch muối cân bằng,
- độ pH chất mang chứa nước trong bước a. nằm trong khoảng từ 6 đến 8,
- thể tích của chất mang chứa nước được sử dụng trong bước a. nhỏ hơn tổng thể tích chất mang chứa nước được sử dụng để tạo ra pha nước cho vaccin thành phẩm,

- hỗn hợp của bước a. về cơ bản không chứa các thành phần khác,
- việc ủ trong bước b. được thực hiện trong khoảng từ 10 đến 20 giờ
- việc ủ trong bước b. được thực hiện ở nhiệt độ phòng, và/hoặc
- việc ủ trong bước b. bao gồm cả việc khuấy nhẹ hỗn hợp được ủ.

Theo một phương án ưu tiên của quy trình theo sáng chế, phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ được tạo trước qua các bước sau đây:

- a. trộn chất phù trợ nhôm-hydroxit và vacxin vi khuẩn M.hyo, trong nước muối sinh lý, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, và
- b. ủ hỗn hợp của bước a. để cho phép hấp phụ vacxin vi khuẩn M.hyo lên chất phù trợ nhôm-hydroxit và tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, theo đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 30°C, và ủ trong thời gian từ 12 đến 18 giờ, đồng thời khuấy nhẹ hỗn hợp này.

Theo sáng chế, thuật ngữ ‘về cơ bản không chứa’ của hợp chất có nghĩa là: không chứa lượng đáng kể bất kỳ của hợp chất, như: nhỏ hơn 10% trọng lượng hoặc thể tích hợp chất, phụ thuộc vào hợp chất là chất lỏng hay chất rắn. Tốt hơn là về cơ bản không chứa có nghĩa là bao gồm nhỏ hơn 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,05, 0,01, hoặc thậm chí nhỏ hơn 0,001% trọng lượng hoặc thể tích hợp chất, theo thứ tự ưu tiên.

Do người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá được rằng, quy trình theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các bước như được nêu trong bản mô tả này; theo thứ tự thời gian là: trộn kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit trong chất mang chứa nước, ủ chúng để tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, và bổ sung kháng nguyên PCV2 vào phức hợp đã tạo thành trước; tất cả các bước này như được xác định trong bản mô tả này.

Tuy nhiên, một hoặc nhiều bước cũng có thể được bổ sung hoặc được chèn vào, giai đoạn bắt đầu, giữa hoặc cuối của quy trình, ví dụ để mở rộng hoặc tối ưu hóa quy trình này. Ví dụ: sau bước b. phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ đã được tạo trước có thể được bảo quản, hoặc có thể được tinh chế, khi cần, ví dụ bằng cách ly tâm và tạo huyền phù lại. Tất cả các bước này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Nhờ quy trình theo sáng chế, chế phẩm kháng nguyên này có thể được tạo ra, mà có thể là cơ sở của pha nước mà có thể được sử dụng để sản xuất vacxin kết hợp

sẵn sàng để dùng cho lợn, là vacxin có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh, ngay sau khi dùng một liều duy nhất.

Vì thế theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế. Chế phẩm kháng nguyên bao gồm kháng nguyên PCV2 và phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ của kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit, tất cả như được xác định trong bản mô tả này.

Chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế khác với các chế phẩm trong tình trạng kỹ thuật trong đó chế phẩm này bao gồm phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ của kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm-hydroxit, trong đó kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit càng hoàn toàn càng tốt đối với mẻ kháng nguyên M.hyo cho trước và chất phù trợ nhôm hydroxit cho trước.

Vì thế theo một phương án ưu tiên, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ ít nhất là 50% kháng nguyên M.hyo có mặt trong chế phẩm kháng nguyên được nằm trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Điều này có thể được khẳng định bằng cách thử nghiệm: sau khi ly tâm chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế trong thời gian từ 1 đến 2 phút ở vận tốc 1000-2000 xg, và phát hiện kháng nguyên M.hyo bằng phương pháp chẩn đoán huyết thanh thích hợp như đã mô tả trong bản mô tả này, ít nhất là 50% kháng nguyên M.hyo trong chế phẩm kháng nguyên được nằm trong viên này.

Điều này cho thấy lượng tương đối của kháng nguyên M.hyo được nằm trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, trong đó kháng nguyên này được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Tốt hơn là lượng tương đối của kháng nguyên M.hyo của chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế có mặt trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit, lớn hơn 60%; tốt hơn nữa là: lớn hơn 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, hoặc là 100%, trong đó theo thứ tự ưu tiên tăng dần.

Vì thế theo một phương án ưu tiên, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ 100% kháng nguyên M.hyo trong chế phẩm, được nằm trong phức hợp

kháng nguyên/chất phù trợ, được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng, phần bù của các tỷ lệ % này là tỷ lệ % của kháng nguyên M.hyo còn lại trong dịch nổi của chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế sau khi ly tâm: khi kháng nguyên M.hyo có mặt trong chế phẩm được nằm trong viên này với lượng lớn hơn 50%, thì theo logic kháng nguyên M.hyo trong chế phẩm kháng nguyên có mặt trong dịch nổi sẽ nhỏ hơn 50%.

Vì thế theo một phương án, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ ít hơn 50% kháng nguyên M.hyo trong chế phẩm, không nằm trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit, tương ứng: được nằm trong dịch nổi sau khi ly tâm.

Tốt hơn là lượng tương đối của kháng nguyên M.hyo của chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế không nằm trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ, được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit, nhỏ hơn 40%; tốt hơn nữa là: nhỏ hơn 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, hoặc bằng 0%, theo thứ tự ưu tiên tăng dần.

Trong sáng chế, phương pháp ưu tiên để mô tả đặc điểm chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế là xác định lượng tương đối của kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm-hydroxit.

Tuy nhiên, ngoài ra, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế khác với các chế phẩm trong tình trạng kỹ thuật trong đó chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế khác bao gồm chất phù trợ nhôm-hydroxit mà khả năng liên kết của nó được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo càng nhiều càng tốt.

Vì thế, theo một phương án chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế bao gồm chất phù trợ nhôm-hydroxit mà lớn hơn 50% khả năng liên kết protein của nó được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo.

Khả năng liên kết này có thể được phát hiện bằng thử nghiệm (như đã mô tả), bằng cách sử dụng việc hấp phụ thêm một lượng protein đã biết, và phát hiện bằng phương pháp chẩn đoán huyết thanh thích hợp lượng protein đã biết có thể được hấp phụ thêm lên chất phù trợ nhôm-hydroxit trong chế phẩm kháng nguyên được thử nghiệm.

Điều này cho biết khả năng liên kết với protein chưa sử dụng của chất phù trợ

nhôm-hydroxit trong chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế.

Tốt hơn là lớn hơn 60% khả năng liên kết protein của chất phù trợ nhôm-hydroxit trong chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo; tốt hơn nữa là: lớn hơn 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, hoặc 100% được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo, trong đó theo thứ tự ưu tiên tăng dần.

Trong tính hữu dụng có lợi của nó, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên khi có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế, có thể được sử dụng để sản xuất vaccin cho lợn có hiệu quả ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do lây nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và ngăn ngừa hoặc làm giảm các triệu chứng liên quan của bệnh, an toàn khi sử dụng, khả thi về mặt kinh tế, và thân thiện với đối tượng sử dụng trong đó nó ở dạng sẵn sàng để dùng.

Vì thế theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin sẵn sàng để dùng cho lợn, để ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh, vaccin này chứa chế phẩm kháng nguyên có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, và chất phù trợ bổ sung.

“Chất phù trợ bổ sung” còn có nghĩa là chất phù trợ này được sử dụng ngoài chất phù trợ nhôm-hydroxit mà đã có trong chế phẩm kháng nguyên. Chất phù trợ bổ sung này đảm bảo rằng vaccin theo sáng chế ít nhất là có hiệu quả như vaccin chứa một loại kháng nguyên trong tình trạng kỹ thuật kháng PCV2 hoặc M.hyo.

“Chất phù trợ” là thành phần của vaccin đã biết kích thích đáp ứng miễn dịch của mục tiêu theo cách không đặc hiệu. Nhiều chất phù trợ khác nhau đã được biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ về chất phù trợ là: chất phù trợ Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh, vitamin E, polyme khối không ion và polyamin như dextran sulphat, Carbopol™, pyran, Saponin, như: Quil A™, hoặc Q-vac™. Các thành phần saponin và vaccin có thể được kết hợp trong ISCOM™.

Ngoài ra, các peptit như muramyl dipeptit, dimethylglyxin, tuftsin, thường được sử dụng làm chất phù trợ, và dầu khoáng ví dụ Bayol™, Drakeol™, Klearol™, hoặc Marcol™, Montanide™ hoặc dầu khoáng (parafin) nhẹ; không dầu khoáng như squalen, squalan; dầu thực vật hoặc các dẫn xuất của chúng, ví dụ etyl-oleat. Các sản

phẩm hỗn hợp như ISA™ từ Seppic hoặc DiluvacForte™ cũng có thể thuận lợi được sử dụng.

Sổ tay về chất phù trợ và cách sử dụng và tác dụng của chúng là: “Chất phù trợ vaccin” (Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O’Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN-10: 0896037355).

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế được sản xuất dưới dạng nhũ tương của pha nước và pha dầu; tốt hơn là nhũ tương là nhũ tương loại: nước trong dầu (w/o), dầu trong nước (o/w), nước trong dầu trong nước (w/o/w), hoặc nhũ tương dầu kép (DOE). Tốt hơn là vaccin theo sáng chế là nhũ tương dầu trong nước, theo đó tốt hơn là ‘chất phù trợ bổ sung’ là pha dầu. Tốt hơn là dầu là dầu khoáng.

Pha dầu tạo ra tác dụng giải phóng chậm trong cơ thể động vật được chủng ngừa bằng cách giải phóng từ từ kháng nguyên, nhờ đó kéo dài việc kích thích hệ miễn dịch của đối tượng. Theo cách này, vaccin là nhũ tương dầu trong nước, thuận lợi thể hiện các đặc điểm của việc kích thích trực tiếp hệ miễn dịch của pha nước, và kích thích chậm hệ miễn dịch của pha dầu.

Vì thế, theo một phương án của vaccin theo sáng chế, vaccin là nhũ tương dầu trong nước.

Theo một phương án khác về vaccin theo sáng chế, chất phù trợ bổ sung là dầu khoáng.

Các chất phù trợ này được biết là có tác động có lợi cho khả năng gây miễn dịch của vaccin thú y.

Theo một phương án của vaccin theo sáng chế, vaccin là nhũ tương dầu trong nước và chất phù trợ bổ sung là dầu khoáng.

Theo một phương án ưu tiên của vaccin theo sáng chế, dầu khoáng là dầu khoáng nhẹ hoặc dầu khoáng trắng hoặc dầu parafin, được bán trên thị trường dưới tên thương mại như: Marcol™ (ExxonMobil), Klearol™ (Sonneborn), hoặc Drakeol™ (Penreco).

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế chứa chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 80% thể tích/thể tích so với thể tích của vaccin thành phẩm. Tốt hơn là nằm trong khoảng từ 40 đến 75% thể tích/thể tích,

nằm trong khoảng từ 45 đến 70% thể tích/thể tích, nằm trong khoảng từ 50 đến 65%, hoặc thậm chí nằm trong khoảng từ 55 đến 65% thể tích/thể tích, so với thể tích của vacxin thành phẩm, theo thứ tự ưu tiên.

Theo một phương án, vacxin theo sáng chế bao gồm dầu khoáng là chất phù trợ bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 3 và 50% thể tích/thể tích so với thể tích của vacxin thành phẩm. Tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 40% thể tích/thể tích, nằm trong khoảng từ 5 đến 30% thể tích/thể tích, nằm trong khoảng từ 5 đến 20% thể tích/thể tích, hoặc thậm chí nằm trong khoảng từ 5 đến 15% thể tích/thể tích, so với thể tích của vacxin thành phẩm, theo thứ tự ưu tiên.

Có thể nói rằng các cách phù trợ khác, việc bổ sung các hợp chất dẫn thuốc hoặc chất pha loãng, nhũ hóa hoặc làm ổn định vacxin theo sáng chế cũng đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “vacxin” để chỉ việc sử dụng một lượng có tác dụng gây miễn dịch của kháng nguyên mà nó kết hợp. Những thành phần cấu thành nên “một lượng có tác dụng gây miễn dịch” cho vacxin theo sáng chế phụ thuộc vào hiệu quả mong muốn và đặc điểm cụ thể của loại vacxin được sử dụng. Việc xác định lượng hữu hiệu là kỹ năng của người hành nghề thông thường, ví dụ bằng cách kiểm soát đáp ứng miễn dịch của đối tượng sau khi chủng ngừa, hoặc sau thử thách nhiễm khuẩn ở mức cho phép, ví dụ bằng cách kiểm soát triệu chứng lâm sàng và các thông số huyết thanh của đối tượng, và so sánh các kết quả này với các đáp ứng quan sát được ở các đối tượng được thử thách không được chủng ngừa.

Lợn có thực sự bị nhiễm M. hyo và/hoặc PCV2 hay không, và ở mức độ nghiêm trọng như thế nào, có thể được đánh giá bởi người có chuyên môn, như nhà chăn nuôi gia súc có kinh nghiệm hoặc bác sĩ thú y, bằng cách sử dụng kiến thức thông thường về các triệu chứng của bệnh, hoặc bằng cách sử dụng công cụ chẩn đoán thích hợp.

Các vacxin thông thường chứa chất mang được dụng, hỗ trợ cho việc sản xuất, sử dụng, hoặc bảo quản vacxin, mà không gây ra các tác dụng bất lợi (nghiêm trọng). Các chất mang này có thể là chất mang chứa nước như được sử dụng trong quy trình theo sáng chế. Ở một dạng phức tạp hơn, dung dịch chất mang ví dụ có thể là chất đậm, mà có thể gồm có các chất phụ gia khác, như chất làm ổn định, chất bảo quản,

hoặc chất phù trợ. Chi tiết và các ví dụ là ví dụ được mô tả trong sổ tay đã biết rõ như: “Remington: the science và practice of pharmacy” (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), và: “Veterinary vaccinology” (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Một ví dụ của vaccin kết hợp PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng theo sáng chế, là vaccin Porcilis® PCV M Hyo (MSD AH) được bán trên thị trường vào năm 2015. Vaccin này được phát hiện là thể hiện tất cả các đặc điểm có lợi của vaccin sáng chế, như hiệu lực của vaccin kháng M.hyo và PCV2 thậm chí sau một lần dùng, với profin an toàn vượt trội, ở dạng sẵn sàng để dùng, và khả thi về mặt kinh tế. Chi tiết của vaccin này được mô tả trong phần ví dụ, và trong báo cáo đánh giá CVMP cho Porcilis PCV M Hyo (EMA/V/C/003796/0000, 11 tháng 9 năm 2014). Báo cáo này mô tả vaccin mới này đáp ứng được tiêu chuẩn về hiệu lực vaccin kháng thử thách nhiễm M. hyo và PCV2, thậm chí sau 27 tháng bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C. Trong số lượng lớn các nghiên cứu chủng ngừa trong phòng thí nghiệm và trên thực địa, vaccin này được phát hiện là an toàn khi tiêm trong cơ một liều 2 ml, cho lợn con từ khoảng 3 tuần tuổi, trong đó không quan sát thấy có phản ứng tại vị trí tiêm khác ngoài hiện tượng sưng do thể tích tiêm, và không thấy có phản ứng toàn thân ngoài việc tăng nhiệt độ trực tràng khoảng 1°C trong thời gian rất ngắn và ngẫu nhiên. Vaccin này cũng hữu hiệu trong đó vaccin có khả năng làm giảm nhiễm virus huyết, của tải lượng virus trong phổi và mô lympho, và sự phát tán của virus do nhiễm PCV2, cũng như giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi do nhiễm M. hyo. Ngoài ra, vaccin này làm giảm việc mất tăng trọng hàng ngày trong giai đoạn kết thúc. Tính miễn dịch gây ra bởi vaccin này có thể được phát hiện trong thời gian lên tới 22 tuần sau khi tiêm, bao gồm toàn bộ khoảng thời gian kết thúc của lợn.

Vì thể hiệu quả y tế trên thú y của vaccin theo sáng chế ở lợn là ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh. Hiệu quả này được dùng để chỉ hiệu quả điều trị bệnh và phòng bệnh của vaccin theo sáng chế là: làm giảm mức độ nhiễm virus huyết và lây nhiễm, bằng cách làm giảm quá trình sao chép và phát tán của M.hyo hoặc PCV2; và giảm hoặc thậm chí ngăn ngừa các triệu chứng lâm sàng, như tổn thương phổi, viêm phổi, giảm ADWG và mức độ chuyển hóa thức ăn, v.v..

Theo một phương án ưu tiên, vaccin theo sáng chế có tác dụng làm giảm tổn thương phổi gây ra do nhiễm M.hyo và/hoặc làm giảm nhiễm virus huyết do PCV2 ở lợn.

Một tác dụng có lợi khác của vaccin theo sáng chế là ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ lây lan của M.hyo và/hoặc PCV2 trong đàn lợn, theo chiều dọc cho con của nó, lẫn theo chiều ngang trong đàn hoặc quần thể, và trong vùng địa lý. Kết quả là việc sử dụng vaccin theo sáng chế dẫn đến việc làm giảm tỷ lệ xuất hiện của M.hyo và/hoặc PCV2.

Vì thế theo một phương án ưu tiên, vaccin theo sáng chế có khả năng làm giảm tỷ lệ xuất hiện của M.hyo và/hoặc PCV2 trong vùng địa lý.

Tương tự, các khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến:

- Việc sử dụng vaccin theo sáng chế để làm giảm tỷ lệ xuất hiện của M.hyo và/hoặc PCV2 trong quần thể hoặc trong vùng địa lý, và
- Vaccin theo sáng chế để làm giảm tỷ lệ xuất hiện của M.hyo và/hoặc PCV2 trong quần thể trong vùng địa lý.

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế cũng có thể chứa chất làm ổn định. Chất làm ổn định có thể sử dụng để cải thiện đặc điểm của nhũ tương vaccin, để bảo vệ các thành phần dễ bị phân hủy, và/hoặc để tăng cường thời gian bảo quản của vaccin. Thông thường, chất làm ổn định là phân tử lớn có trọng lượng phân tử cao, như lipid, hydrat cacbon, hoặc protein; ví dụ sữa bột, gelatin, albumin huyết thanh, sorbitol, sucroza, trehaloza, spermidin, NZ amin, Dextran hoặc polyvinyl pyrrolidon, và chất đệm, như phosphat kim loại kiềm.

Tốt hơn là chất làm ổn định không chứa các hợp chất có nguồn gốc từ động vật, hoặc tương đương: được xác định về mặt hóa học, như được bộc lộ trong WO 2006/094.974.

Vaccin theo sáng chế có thể bao gồm chất bảo quản, như thimerosal, mertiolat, các hợp chất phenol, và/hoặc gentamixin. Tốt hơn là vaccin theo sáng chế không chứa chất bảo quản.

Vaccin theo sáng chế tốt hơn là ổn định trong ít nhất là 12 tháng, tốt hơn nữa là 18 tháng, hoặc thậm chí 24 tháng. Thuật ngữ 'ổn định' được dùng để chỉ việc duy trì

cấu trúc hóa học và vật lý, và hiệu quả sinh học sau thời gian bảo quản kéo dài trong điều kiện thích hợp; cụ thể: duy trì hiệu lực vacxin cho đến khi kết thúc thời hạn sử dụng được đề xuất của nó.

Có thể nói rằng việc trộn các chất phụ gia khác, được yêu cầu hoặc có lợi cho độ ổn định được phẩm hoặc độ hữu hiệu của vacxin theo sáng chế, cũng đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Đối tượng của vacxin theo sáng chế là lợn. Tuổi, cân nặng, giới, tình trạng miễn dịch, và các thông số khác của đối tượng được chủng ngừa không bị giới hạn, mặc dù rõ ràng là thuận lợi khi chủng ngừa cho các đối tượng khỏe mạnh, chưa bị lây nhiễm, và chủng ngừa càng sớm càng tốt để ngăn ngừa việc lây nhiễm bất kỳ PCV2 hoặc M.hyo. Do việc lây nhiễm như vậy có thể đã xuất hiện ở lứa tuổi còn non, vì thế tốt hơn là vacxin theo sáng chế được dùng từ khi khoảng 3 tuần tuổi.

Thuận lợi là, hiệu lực của vacxin theo sáng chế không bị ảnh hưởng bởi mức độ kháng thể thu được từ mẹ mà lợn con có thể mang.

Vì thế, vacxin theo sáng chế có thể sử dụng để chủng ngừa sơ bộ hữu hiệu, mà sau đó có thể theo dõi và được khuếch đại bằng cách chủng ngừa nhắc lại. Ví dụ vacxin theo sáng chế có thể được dùng ở khoảng 2 – 10 ngày tuổi, và dùng lại vào khoảng 3 tuần sau đó, với thể tích mỗi lần chủng ngừa là 1ml. Tuy nhiên, do vacxin theo sáng chế có hiệu quả sau một lần dùng, nên phương án ưu tiên là dùng liều đơn, ví dụ bằng khoảng 2 ml, từ khoảng 3 tuần tuổi. Việc chủng ngừa này sẽ bảo vệ lợn trong suốt giai đoạn vỗ béo.

Khi đối tượng lợn của vacxin theo sáng chế được dự định để duy trì trong thời gian lâu hơn 6 tháng, như lợn nái để gây giống, hoặc lợn đực để cung cấp tinh trùng, các lợn này đều có thể được chủng ngừa nhắc lại đều đặn, 1, 2, hoặc 3 lần mỗi năm, ví dụ với lợn nái: chủng ngừa nhắc lại một lần trước mỗi lần đẻ, trung bình khoảng 2,2 lần/năm.

Vì thế vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng bệnh hoặc điều trị bệnh, hoặc cả hai, do nó can thiệp vào cả sự xâm nhập và tiến triển của việc nhiễm M.hyo, và/hoặc PCV2.

Chế độ dùng vacxin theo sáng chế tốt hơn là được kết hợp với chương trình

chủng ngừa hiện nay của các vaccin khác mà đối tượng lợn có thể cần, để giảm áp lực cho động vật và giảm chi phí nhân công. Các vaccin khác này có thể được dùng theo cách cùng lúc, đồng thời hoặc lần lượt, theo cách phù hợp với cách sử dụng đã được đăng ký của chúng.

Vaccin theo sáng chế, có thể được dùng với thể tích thích hợp cho động vật mục tiêu, và ví dụ có thể có thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 10 ml. Tốt hơn là một liều với thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 5 ml, tốt hơn nữa là một liều cho động vật nằm trong khoảng từ 0,2 đến 3 ml. Tốt hơn là liều trong cơ nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 3 ml, tốt hơn là khoảng 2 ml; và liều trong da nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến khoảng 0,5 ml, tốt hơn là khoảng 0,2 ml.

Vaccin theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng là lợn theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Cách sử dụng được ưu tiên là qua đường tiêu hóa, như tiêm vào trong hoặc qua da, ví dụ: trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong da, dưới niêm mạc, hoặc dưới da. Tốt hơn là đường dùng của vaccin theo sáng chế là tiêm trong cơ hoặc dưới da. Còn tốt hơn là dùng trong cơ ở chân sau, hoặc trong cổ.

Có thể nói rằng đường dùng tối ưu sẽ phụ thuộc vào đặc điểm cụ thể của vaccin được sử dụng, và đặc điểm cụ thể của đối tượng.

Theo một phương án, vaccin theo sáng chế được dùng trong cơ cho lợn từ khoảng 3 tuần tuổi, là liều đơn bằng khoảng 2 ml.

Vị trí được ưu tiên để dùng trong cơ là cổ.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tối ưu hóa thêm vaccin theo sáng chế. Thông thường việc tối ưu hóa bao gồm việc tinh chỉnh hiệu lực của vaccin, sao cho vaccin cung cấp sự bảo vệ miễn dịch thích hợp. Hiệu quả này có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh phù hợp liều, thể tích, hoặc thành phần kháng nguyên của vaccin; bằng cách sử dụng vaccin ở dạng hoặc chế phẩm khác; bằng cách điều chỉnh phù hợp các thành phần khác của vaccin (ví dụ chất làm ổn định hoặc chất phụ trợ bổ sung); hoặc bằng cách sử dụng qua đường dùng, phương pháp, hoặc chế độ dùng khác.

Vaccin theo sáng chế có thể còn chứa các hợp chất khác, như kháng nguyên bổ sung, xytokin, hoặc axit nucleic kích thích miễn dịch chứa CpG không methyl hóa, v.v..

Theo cách khác, vacxin theo sáng chế thuận lợi là có thể được kết hợp với dược chất khác ví dụ thuốc kháng sinh, hormon, thuốc chống viêm hoặc chống ký sinh trùng. Hoặc chính vacxin theo sáng chế có thể được vào một vacxin khác.

Vacxin theo sáng chế thuận lợi là có thể được kết hợp với kháng nguyên khác, ví dụ có nguồn gốc từ mầm bệnh khác. Ưu điểm của vacxin kết hợp này là nó không chỉ tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng M.hyo và PCV2, mà đồng thời cũng kháng mầm bệnh khác trong khi chỉ cần cho động vật mục tiêu chủng ngừa một lần, nhờ đó giảm áp lực do chủng ngừa cho đối tượng, cũng như thời gian và chi phí nhân công.

Vì thế, theo một phương án ưu tiên, vacxin theo sáng chế bao gồm nguyên liệu kháng nguyên bổ sung có nguồn gốc từ vi sinh vật gây bệnh cho lợn.

Bản thân “nguyên liệu kháng nguyên bổ sung” có thể ở dạng có khả năng sao chép hoặc bị bất hoạt, hoặc cấu trúc dưới đơn vị, và có thể chứa chất phù trợ hoặc không. Nguyên liệu kháng nguyên bổ sung có thể là kháng nguyên, và có thể chứa phân tử sinh học hoặc tổng hợp như protein, hydrat cacbon, lipopolysacarit, hoặc phân tử axit nucleic. Theo cách khác, nó có thể là sản phẩm biểu hiện của một mảnh axit nucleic từ vi sinh vật khác, hoặc vec-tơ chứa một mảnh axit nucleic; vec-tơ có thể là vi sinh vật hoặc tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn.

Nguyên liệu kháng nguyên bổ sung có thể “có nguồn gốc từ” vi sinh vật khác gây bệnh cho lợn theo cách bất kỳ, ví dụ chất chiết, phân đoạn, thể đồng nhất hoặc sản phẩm nghiền bằng sóng siêu âm.

“Vi sinh vật gây bệnh cho lợn” theo sáng chế, đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Vì thế, nguyên liệu kháng nguyên bổ sung về nguyên tắc có thể thu được từ virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, nấm, trùng rận, động vật nguyên sinh và/hoặc ký sinh trùng bất kỳ gây bệnh cho lợn

Các ví dụ về vi sinh vật gây bệnh cho lợn là: virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, virus bệnh đại giả, virus parvo lợn, virus sốt lợn cổ điển, virus cúm lợn, virus gây bệnh lở mồm long móng, virus gây tiêu chảy cấp ở lợn, virus viêm dạ dày ruột truyền nhiễm, virus bệnh mụn nước, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Brachyspira*, *E. coli*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Clostridia*, *Pasteurella*, *Erysipelothrix*, *Bordetella*, *Toxoplasma*, *Isospora*, và *Trichinella*.

Theo một phương án ưu tiên, nguyên liệu kháng nguyên bổ sung được bổ sung vào vacxin theo sáng chế, là kháng nguyên không sống được đông khô, có thể được hòa nguyên bằng cách trộn nhũ tương vacxin theo sáng chế. Kháng nguyên này được mô tả chẳng hạn trong WO 2010/106.095.

Theo một phương án ưu tiên của vacxin theo sáng chế, vacxin bao gồm kháng nguyên từ M.hyo, PCV2, *Lawsonia intracellularis*, và PRRSV.

Do đây là các bệnh quan trọng ở lợn, vì thế việc kết hợp chúng thành vacxin sẵn sàng để dùng trong một liều đơn rất thuận lợi.

Vacxin theo sáng chế được điều chế bằng các phương pháp đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vì thế, theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất vacxin theo sáng chế, bao gồm bước trộn chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, và chất phù trợ bổ sung.

Theo một khía cạnh khác sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất vacxin theo sáng chế, bao gồm bước nhũ hóa chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, và dầu khoáng, trong nhũ tương dầu trong nước.

Các quy trình này tạo ra độ khả dụng của vacxin theo sáng chế, vacxin này có hiệu quả có lợi trong việc ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo và/hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh, ở lợn, như đã mô tả ở trên.

Chi tiết và các ví dụ về “quy trình sản xuất vacxin” được mô tả trong bản mô tả này, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng áp dụng. Ví dụ, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách công nghiệp trong các thể tích nhỏ hơn hoặc lớn hơn, sau đó được kết hợp với tá dược được dụng, được phối chế thành vacxin, và được nạp vào trong vật chứa được tạo kích thước thích hợp. Các giai đoạn khác nhau trong quy trình sản xuất sẽ được kiểm soát bằng các thử nghiệm thích hợp, ví dụ thử nghiệm miễn dịch về phẩm chất và lượng kháng nguyên; bằng thử nghiệm vi sinh vật đối với việc bất hoạt, độ vô trùng, và sự vắng mặt của các chất ngoại lai; và cuối cùng là bằng các nghiên cứu trên động vật để khẳng định hiệu

lực và độ an toàn vaccin. Sau khi hoàn thành việc kiểm tra phẩm chất, lượng và độ vô trùng, sản phẩm vaccin có thể được bán trên thị trường.

Các quy trình này đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các kỹ thuật và đánh giá chung sử dụng để sản xuất vaccin được mô tả ví dụ trong chỉ thị của nhà nước và các quy định (được điền) trong sổ tay đã biết rộng rãi.

Vaccin theo sáng chế có thể được sản xuất ở dạng thích hợp để dùng cho lợn mục tiêu, và phù hợp với cách dùng mong muốn, và hiệu quả mong muốn.

Tốt hơn là vaccin theo sáng chế được phối chế thành dạng thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa, tức là chất lỏng tiêm được như: thể huyền phù, dung dịch, thể phân tán, hoặc nhũ tương. Thông thường các vaccin này được sản xuất vô trùng, và ở độ pH sinh lý.

Vì thế trong các khía cạnh khác sáng chế đề cập đến:

- Chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, để sử dụng trong vaccin cho lợn để ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh.
- Sử dụng chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo sáng chế, hoặc chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, để sản xuất vaccin để ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh.
- Sử dụng vaccin theo sáng chế, hoặc vaccin thu được bằng quy trình theo sáng chế, để ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh.
- Phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 ở lợn và các triệu chứng liên quan của bệnh, phương pháp này bao gồm việc dùng vaccin theo sáng chế, hoặc vaccin có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế, cho lợn.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Điều chế kháng nguyên M.hyo

Kháng nguyên vaccin vi khuẩn M.hyo được điều chế theo cách tương tự với phương pháp sản xuất vaccin M+Pac thương mại; phương pháp này về cơ bản là như đã mô tả (WO 1993/016.726). Vắc xin: M. hyo chủng J được nuôi cấy trong thể huyền phù trong môi trường giàu dinh dưỡng, trên cơ sở môi trường được Friis mô tả đầu tiên (1975, *supra*). Môi trường này là môi trường phức chứa chất chiết nấm men, huyết thanh và các chất chiết khác nhau thu được từ lợn và bò. Sau vài lần nuôi cấy trước, việc nuôi cấy chính được thực hiện trong thùng lên men lớn ở nhiệt độ 37°C đồng thời khuấy và kiểm soát độ pH, và thường diễn ra từ 20 đến 60 giờ để đạt đến pha tĩnh. Để bất hoạt môi trường nuôi cấy BEI được bổ sung vào thiết bị lên men, thiết bị lên men được khuấy trong 1 giờ, sau đó toàn bộ thành phần được chuyển sang bình thứ hai, và được ủ đến 24 giờ trong khi được khuấy, ở 37°C. Tiếp theo BEI dư được trung hòa bằng cách sử dụng natri-thiosulphat, bằng cách khuấy đến 24 giờ ở 37°C. Mẻ cấy bị bất hoạt và được trung hòa sau đó được cô đến 15 lần bằng cách siêu lọc. Kháng nguyên vaccin vi khuẩn M.hyo bulk được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng. Khối lượng và công hiệu tương đối kháng nguyên được xác định bằng Elisa nội bộ, bằng cách sử dụng kháng huyết thanh đa dòng thô đặc hiệu M.hyo, và bằng cách so sánh với chất chuẩn tham chiếu chế phẩm vaccin vi khuẩn M.hyo có công hiệu đã biết.

2. Điều chế kháng nguyên PCV2

Kháng nguyên PCV2, ở dạng cấu trúc dưới đơn vị là VLP được mã hóa ORF2, được tạo ra theo phương pháp tương tự với phương pháp tạo ra kháng nguyên Porcilis PCV; phương pháp này về cơ bản như đã được mô tả trước đó (ví dụ WO 2007/028.823). Vắc xin: thể huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Sf21 được cho nhiễm vào baculovirus tái tổ hợp chứa gen PCV2 ORF2 được gắn chèn dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu p10 của baculovirus; mật độ tế bào tại thời điểm lây nhiễm là khoảng $1,4 \times 10^6$ tế bào/ml, mức độ nhiễm (MOI) là 0,01. Sau 4 - 8 ngày nuôi cấy ở khoảng 27°C, toàn bộ mẻ cấy được nghiền bằng sóng siêu âm bằng cách cho nó đi qua máy siêu âm quy mô công nghiệp. Tiếp theo baculovirus tái tổ hợp bị bất hoạt bằng BEI ở 37°C trong 72 giờ, trong khi khuấy và kiểm soát độ pH. Sau khi bất hoạt, BEI được trung hòa bằng natri thiosulphat. Sau khi trung hòa, vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm. Tiếp theo dịch nổi được sử dụng để xác định khối lượng kháng nguyên của VLP capsid PCV2, bằng cách sử dụng điện di gel SDS bằng cách so

sánh với khoảng pha loãng của lượng đã biết của protein đánh dấu, hoặc ELISA nội bộ.

3. Điều chế chế phẩm kháng nguyên của kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV2, và sản xuất vacxin sẵn sàng để dùng

Một quy trình ví dụ để điều chế chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế, và sau đó là vacxin theo sáng chế, là điều chế mẻ vacxin theo sáng chế 100 ml, với 18% pha dầu, như sau: trong cốc thủy tinh được kết hợp theo cách vô trùng: 5ml từ một mẻ kháng nguyên vacxin vi khuẩn M.hyo ở nồng độ khoảng 60 RPU/ml, 10ml alhydrogel 2%, và 12ml dung dịch muối bình thường. Các lượng này là 3 RPU kháng nguyên M.hyo /ml và khoảng 1 mg/ml Nhôm trong vacxin thành phẩm. Các thành phần này được kết hợp với chất mang chứa nước, ở đây là nước muối. Đối với vacxin này 37ml nước muối cũng được bổ sung vào pha nước hoàn chỉnh, ở đây là 33% thể tích, 12 ml được sử dụng để tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ.

Hỗn hợp được điều chỉnh đến độ pH bằng 6,5 bằng cách sử dụng axit clohydric 4N, và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng (khoảng 20°C), qua đêm (16 giờ), trong điều kiện khuấy nhẹ bằng cách sử dụng đĩa trộn từ tính và thanh trộn từ tính vô trùng. Vào sáng ngày tiếp theo, hỗn hợp được kết hợp với thể tích nước muối còn lại, với 17ml mẻ kháng nguyên PCV2 ở khoảng 14000 AU/ml (cung cấp khoảng 2300 AU/ml trong vacxin thành phẩm), và etanol 96% và glyxerol (đã tiệt trùng). Việc trộn được tiếp tục trong 10 phút, sau đó pha nước của vacxin đã sẵn sàng. Tiếp theo, 18 ml pha dầu được bổ sung, bao gồm hỗn hợp của Tween, Span, và Drakeol. Tiếp theo, hai pha này được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy trộn ultra-turrax, trong 2 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút.

Các mẻ vacxin có thể tích lớn hơn, lên đến 100 lít được điều chế về cơ bản theo cách tương tự, và chúng được sử dụng trong các thử nghiệm chủng ngừa trong phòng thí nghiệm và trên thực địa như đã mô tả trong bản mô tả này. Ở quy mô này, bình trộn có thể tích lớn được sử dụng để phù hợp với thể tích lớn hơn, và việc điều chỉnh phù hợp được thực hiện tại thời điểm trộn phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ đã được tạo trước với kháng nguyên PCV2 và các thành phần khác của pha nước: quá trình này được tăng lên 60 phút; độ pH được giữ trong khoảng từ 6,2 đến 7,5, và nhiệt độ ủ là nhiệt độ phòng. Tương tự, thể tích của pha nước và của mẻ kháng nguyên cũng được

thay đổi, để phù hợp với công hiệu của các mẻ kháng nguyên được sử dụng. Rõ ràng là việc nhũ hóa các thể tích này được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất quy mô lớn (Dispax reactor, IKA).

Các thử nghiệm tiếp tục để tối ưu hóa các điều kiện của quy trình theo sáng chế, để tạo thành trước phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ. Ví dụ bằng cách thay đổi nhiệt độ và thời gian ủ, độ pH của hỗn hợp, và tỷ lệ của chất phù trợ nhôm hydroxit và kháng nguyên M.hyo.

Các mẫu để thử nghiệm việc kháng nguyên M.hyo có được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm hydroxit hay không và được hấp phụ với lượng bao nhiêu sau đó được lấy ra từ pha nước trước khi nhũ hóa, và được ly tâm và dịch nổi và viên tròn thu được được thử nghiệm. Khi vacxin được điều chế có dạng nhũ tương dầu trong nước, quy trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các mẫu vacxin thành phẩm.

4. Tác động của các điều kiện khác nhau trong việc tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ

Vacxin kết hợp M.hyo/PCV2 được sản xuất như đã mô tả ở trên, bằng cách sử dụng chế phẩm kháng nguyên được điều chế bằng các quá trình khác nhau: kháng nguyên PCV2 có mặt hoặc không có mặt trong quá trình hình thành phức hợp giữa kháng nguyên M.hyo và chất phù trợ nhôm hydroxit. Bằng cách thử nghiệm các vacxin này trên động vật thử nghiệm cho phép so sánh sự ảnh hưởng của các quá trình khác nhau lên hiệu lực của kháng nguyên M.hyo.

4.1. Vật liệu và phương pháp

Chế phẩm kháng nguyên này được điều chế bằng cách sử dụng 5% (thể tích vacxin thành phẩm) của mẻ vacxin vi khuẩn M.hyo được cô 10x, và lượng kháng nguyên PCV2 chuẩn, tương đương với lượng kháng nguyên PCV2 trong vacxin PCV2 thương mại. Vacxin được sản xuất theo quy trình sau:

Vacxin	Kháng nguyên M.hyo nạp vào (thể tích/thể tích)	Lượng nguyên (AU)/liều	kháng PCV2	Nhôm hydroxit tạo thành phức hợp:
A	5%	-		M.hyo
B	5%	> 2800		M.hyo + PCV2
C	5%	> 2800		M.hyo

Sau bước hấp phụ, các thành phần còn lại của pha nước được bổ sung, sau đó bổ sung pha dầu và nhũ hóa, để thu được sản phẩm vacxin thành phẩm. Vacxin được lưu giữ ở nhiệt độ 2-8°C cho đến khi sử dụng.

Tiếp theo, bốn nhóm gồm 8 lợn con được sử dụng cho thử nghiệm thử thách chủng ngừa: trong đó có ba nhóm mà mỗi nhóm được nhận một loại vacxin cụ thể, một nhóm sử dụng làm nhóm đối chứng không được chủng ngừa. Ba vacxin này được dùng trong cơ với liều 2ml lúc ba tuần tuổi.

Bốn tuần sau, lúc 7 tuần tuổi, tất cả các con lợn được cho thử thách bằng cách truyền qua khí quản 5ml mẻ cấy thể phân lập M.hyo độc hại trong môi trường Friis, trong hai ngày liên tiếp. Sau ba tuần sau (ở 10 tuần tuổi), lợn được mổ xác và tổn thương phổi đông đặc do nhiễm M.hyo được tính điểm theo thang điểm Goodwin.

Trong quá trình thử nghiệm, các mẫu máu để thử nghiệm huyết thanh học được lấy tại thời điểm chủng ngừa, khi thử thách, và khi mổ xác. Mức độ kháng thể kháng PCV2 được xác định bằng đơn vị tùy ý bằng cách sử dụng Elisa.

4.2. Kết quả

Bảng 1: Kết quả của điểm số tổn thương phổi bởi M.hyo và kết quả huyết thanh học của PCV2

Nhóm	Mức độ tổn thương phổi trung bình do M.hyo		Hiệu giá kháng PCV2 (log2) ở độ tuổi:		
	Điểm số	% giảm so với đối chứng	3 tuần	7 tuần	10 tuần
Vacxin A	3,3 ± 4,6*	66	6,7 ± 1,5	5,1 ± 1,1	2,9 ± 0,3
Vacxin B	6,8 ± 6,7	30	6,8 ± 1,6	8,1 ± 1,2	8,2 ± 1,1
Vacxin C	4,1 ± 3,5 *	58	6,9 ± 1,6	8,4 ± 1,0	8,6 ± 1,3
Đối chứng không được chủng ngừa	9,7 ± 7,2	0	6,8 ± 1,6	5,3 ± 0,8	3,5 ± 1,0

*: điểm số tổn thương khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$, thử nghiệm Mann-Whitney U)

Như được thể hiện trong bảng 1, việc chủng ngừa bằng vaccin A chỉ chứa kháng nguyên M.hyo làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi gây ra bởi M.hyo đến 66%, so với mức độ nghiêm trọng của tổn thương ở lợn đối chứng không được chủng ngừa. Vaccin này tương đương với sản phẩm thương mại M+Pac. Tuy nhiên, đối với vaccin B, được sản xuất từ chế phẩm kháng nguyên trong đó kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV2 có mặt trong quá trình tạo thành phức hợp về cơ bản khác biệt: vaccin này chỉ làm giảm mức độ tổn thương phổi là 30%. Hiệu lực vaccin M.hyo có tác dụng phục hồi để làm giảm mức độ tổn thương phổi là 58%, về cơ bản là do hiệu lực của vaccin chứa một kháng nguyên, đối với vaccin C; vaccin này được sản xuất từ chế phẩm kháng nguyên được điều chế theo quy trình theo sáng chế.

Về nồng độ kháng thể PCV2: lợn ở tất cả các nhóm đã được nhận kháng thể từ mẹ kháng kháng nguyên PCV2 tại thời điểm chủng ngừa. Các kháng thể từ mẹ này bị suy giảm ở nhóm tiếp nhận vaccin A và ở nhóm đối chứng. Các nhóm tiếp nhận vaccin B hoặc C, chứa kháng nguyên PCV2, đã thể hiện đáp ứng huyết thanh đến mức độ có tác dụng bảo vệ. Giữa các nhóm không có sự khác biệt đáng kể, cho thấy rằng liệu lực vaccin PCV2 không liên quan đến cách kháng nguyên được hấp phụ lên chất phù trợ nhôm hydroxit.

4.3. Kết luận

Có sự khác biệt rõ ràng và đáng kể về liệu lực vaccin chống lại việc nhiễm M.hyo, phụ thuộc vào phương pháp điều chế chế phẩm kháng nguyên: khi kháng nguyên PCV2 có mặt trong quá trình kháng nguyên M.hyo hấp phụ lên nhôm hydroxit, vaccin tạo thành chỉ có hữu hiệu bằng một nửa, so với khi kháng nguyên PCV2 được bổ sung sau khi đã hình thành phức hợp kháng nguyên M.hyo/chất phù trợ nhôm hydroxit.

5. Thử nghiệm kéo dài độ an toàn và hiệu lực của vaccin PCV2/M.hyo sẵn sàng để dùng

Mục đích của thử nghiệm được mô tả dưới đây là để đánh giá hiệu lực và độ an toàn của vaccin Porcilis PCV M Hyo mới, trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực địa.

5.1. Vật liệu và phương pháp

5.1.1. Vacxin

Vacxin được thử nghiệm chứa kháng nguyên vacxin vi khuẩn M.hyo, kháng nguyên PCV2 ORF2 VLP được biểu hiện trong baculovirut, và chất phụ trợ Emunade, như đã mô tả. Vacxin được dùng trong cơ ở cổ, dưới dạng liều 2ml, cho lợn con 3 tuần tuổi.

5.1.2. Thử nghiệm độ an toàn GLP

Hai nhóm gồm 12 lợn SPF khỏe mạnh được chủng ngừa bằng Porcilis PCV M Hyo lúc 19-21 ngày tuổi (nhóm được chủng ngừa) hoặc được tiêm nước muối đệm phosphat (nhóm đối chứng). Cho đến 14 ngày sau chủng ngừa, lợn con được quan sát hằng ngày về các phản ứng bất thường toàn thân hoặc cục bộ. Nhiệt độ trực tràng được ghi lại một ngày trước khi chủng ngừa, ngay trước khi chủng ngừa, 4 giờ sau khi chủng ngừa và hằng ngày trong bốn ngày. Ở 14 ngày sau khi chủng ngừa, tất cả các con vật được giết để kiểm tra vị trí tiêm.

5.1.3. Thử nghiệm gây miễn dịch và thử nghiệm thử thách

Thời điểm xuất hiện miễn dịch (OOI) và khoảng thời gian miễn dịch (DOI) đối với mỗi vacxin kháng nguyên trong số hai vacxin kháng nguyên được xác định trong nghiên cứu thử thách thực nghiệm. Trong mỗi thử nghiệm, lợn 3 tuần tuổi từ đàn không bị nhiễm M.hyo và huyết thanh dương tính với PCV2 được ngẫu nhiên chia thành hai nhóm (vacxin và đối chứng) tại thời điểm chủng ngừa (PCV2 OOI/DOI: 15 con lợn mỗi nhóm, M.hyo OOI: 19 con mỗi nhóm, DOI: 40 con lợn mỗi nhóm). Các mẫu máu được lấy ngay trước khi chủng ngừa, tại thời điểm thử và 2 (chỉ các thử nghiệm thử PCV) và 3 tuần sau khi thử. Để xác định DOI, các mẫu máu cũng được lấy đều đặn trong quá trình chủng ngừa và thử thách.

Thử thách PCV2 được thực hiện bằng cách nhỏ qua mũi (3 ml mỗi lỗ mũi, với khoảng 10^6 TCID₅₀) của thể phân lập thực địa PCV2 Hà Lan gần đây, lúc 5 hoặc 25 tuần tuổi. Ba tuần sau khi thử PCV2, tất cả các con lợn được mổ xác và hạch bạch huyết màng treo ruột và hạch bạch huyết bẹn, amidan và phổi được thu gom để định lượng tải lượng virut PCV2.

Thử thách M.hyo được thực hiện trong khí quản vào hai ngày liên tiếp với 10ml môi trường nuôi cấy thể phân lập thực địa Đan Mạch (do Dr N. Friis, National

Veterinary Laboratory, Copenhagen cung cấp) chứa khoảng 10^7 đơn vị thay đổi màu/ml (CCU/ml) lúc 7 hoặc 24 tuần tuổi. Ba tuần sau khi thử thách, lợn được mổ xác để đánh giá tổn thương phổi mà được tính điểm như Goodwin et al. (supra) đã mô tả.

Trong tất cả các thử nghiệm, lợn được quan sát hằng ngày về các bất thường về lâm sàng.

5.1.4. Thử nghiệm thực địa

Thử nghiệm độ an toàn trên thực địa được thực hiện ở các con lợn con theo kiểu ngẫu nhiên và mù ở hai trang trại lợn ở Hà lan và trang trại lợn ở Đức. Ở mỗi trang trại, ít nhất là 56 con lợn con đang bú ba tuần tuổi khỏe mạnh từ 17-24 ngày tuổi được phân chia ngẫu nhiên thành một trong hai nhóm. Lợn con trong một nhóm (vacxin) được chủng ngừa bằng Porcilis® PCV M Hyo và lợn con trong nhóm còn lại (đối chứng) được tiêm nước muối vô trùng được đệm. Sức khỏe chung của các lợn con được kiểm tra lúc phân nhóm (một ngày trước khi chủng ngừa), ngay trước khi chủng ngừa, 1 và 4 giờ sau chủng ngừa, và hằng ngày trong 14 ngày. Một ngày trước khi chủng ngừa, ngay trước khi chủng ngừa, 4 giờ sau chủng ngừa, và hằng ngày trong 4 ngày sau chủng ngừa, nhiệt độ trực tràng của tất cả các lợn con được đo. Kiểm tra phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm bằng cách sờ nắn vào lúc 1 và 4 giờ sau chủng ngừa, và sau đó là hằng ngày trong 14 ngày. Tất cả các lợn con thử nghiệm đều được cân trọng lượng lúc phân nhóm (ngày 1), và và khi kết thúc thử nghiệm (21 ngày sau khi chủng ngừa).

Nghiên cứu độ an toàn và hiệu lực kết hợp trên thực địa được thực hiện theo phương pháp được kiểm soát, ngẫu nhiên và mù, ở đàn lợn Pháp bị nhiễm M.hyo và PCV2 trên thực địa. Lợn con đang bú ba tuần tuổi khỏe mạnh được phân chia ngẫu nhiên thành, trong các lứa, thành một trong hai nhóm mỗi nhóm khoảng 300 lợn con. Lợn trong một nhóm (vacxin) được chủng ngừa bằng Porcilis® PCV M Hyo và lợn trong nhóm còn lại (đối chứng) được tiêm nước muối vô trùng được đệm. Các thông số thứ nhất để biết hiệu lực của vacxin là mức độ tổn thương phổi lúc giết thịt, nhiễm virus huyết PCV2 và mức tăng cân trung bình hằng ngày (ADWG) trong giai đoạn vỗ béo, (tức là từ 7 đến 19 tuần sau chủng ngừa (wpv)). Các thông số thứ hai là tổng số ADWG (tức là giữa thời điểm chủng ngừa đến 19 wpv), tỷ lệ chết, tỷ lệ mắc bệnh, tổn thương viêm màng phổi và lây lan PCV2. Ngoài ra, đáp ứng huyết thanh do chủng

ngừa hoặc nhiễm trên thực địa được xác định. Lợn được cân trọng lượng khi chủng ngừa, ở giai đoạn chuyển sang đơn vị hoàn thiện, và trước khi giết thịt. Việc dùng thuốc được ghi lại và lợn chết trong quá trình thử nghiệm được kiểm tra sau khi chết để xác định nguyên nhân chết. Phổi được kiểm tra trên từng con lợn lúc giết thịt để chấm điểm mức độ nghiêm trọng của các tổn thương điển hình do M.hyo và viêm màng phổi. 25 lợn con trong nhóm điều trị được lấy máu cho mẫu huyết thanh và gạt trực tràng và mũi được lấy khoảng 4 tuần một lần. Mặc dù độ an toàn không phải là mục tiêu chính của thử nghiệm này, nhưng nhà nghiên cứu thường xuyên quan sát động vật lúc chủng ngừa, và lập thành nhóm, tại các thời điểm 4 giờ sau chủng ngừa và 1, 4, 7 và 14 ngày sau chủng ngừa.

5.1.5 Huyết thanh học

Đối với huyết thanh học M.hyo, Elisa thương mại (thử nghiệm M.hyo Ab, IDEXX) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả đã thể hiện là âm tính, dương tính hoặc không kết luận được.

Đối với PCV2 huyết thanh học, ELISA nội bộ được thực hiện như đã được mô tả trước đó (Haake et al., supra).

5.1.6. Định lượng ADN của PCV2

Định lượng tải lượng virus PCV2 trong huyết thanh, cơ quan lympho, phổi và chất bài tiết được thực hiện bằng qPCR như đã được mô tả trước đó (Haake et al., supra).

5.1.7. Phân tích thống kê

Vùng dưới đường cong (AUC) của số liệu qPCR đối với các mẫu huyết thanh được thu gom sau thử thách PCV2 được tính bằng quy luật hình thang tuyến tính và được phân tích bằng thử nghiệm dấu của thứ hạng Wilcoxon (Wilcoxon Rank Sum test). Điểm số tổn thương phổi trong các thử nghiệm thử thách và số liệu qPCR của hạch bạch huyết bẹn và hạch bạch huyết màng treo ruột, phổi và amidan cũng được phân tích bằng thử nghiệm dấu của thứ hạng Wilcoxon.

Trong thử nghiệm trên thực địa, số liệu AUC được phân hạng trước khi phân tích bằng ANOVA với nhóm chủng ngừa, mẹ sản xuất và sự tương tác của chúng là ảnh hưởng cố định. Điểm số tổn thương phổi trong thử nghiệm trên thực địa được so

sánh giữa các nhóm bằng cách sử dụng ANOVA kiểu hỗn hợp. Nhóm chủng ngừa, mẹ sản xuất và sự tương tác của chúng được gọi là các ảnh hưởng cố định và lợn nái là ảnh hưởng ngẫu nhiên. Tỷ lệ lợn với viêm màng phổi (không hoặc có), tỷ lệ chết và tỷ lệ mắc bệnh được so sánh giữa nhóm chủng ngừa bằng phương pháp Cochran Mantel Haenszel với mẹ sản xuất là biến số phân loại. Mức tăng cân trung bình hằng ngày được so sánh giữa các nhóm bằng cách sử dụng ANOVA kiểu hỗn hợp. Nhóm chủng ngừa, mẹ sản xuất và giới với sự tương tác thích hợp là ảnh hưởng cố định, và lợn nái là ảnh hưởng ngẫu nhiên. Trọng lượng cơ thể lúc phân nhóm được bao gồm trong mô hình là đồng tham số. Số lượng lợn có phản ứng cục bộ hoặc toàn thân được so sánh bằng kiểm định chính xác Fischer.

5.2. Kết quả

5.2.1 Thử nghiệm độ an toàn

Kết quả kết hợp của tất cả các thử nghiệm độ an toàn được tóm tắt trong bảng 1.

Trong thử nghiệm độ an toàn GLP, không có động vật nào xuất hiện phản ứng toàn thân hoặc cục bộ và không quan sát thấy có bất thường lớn ở vị trí tiêm khi mổ xác. Vào 4 giờ sau chủng ngừa, nhiệt độ trực tràng của động vật được chủng ngừa trung bình là $1,1^{\circ}\text{C}$ cao hơn ở động vật đối chứng ($p < 0,001$) nhưng đã trở lại bình thường vào ngày sau ngày chủng ngừa.

Trong thử nghiệm nghiên cứu độ an toàn trên thực địa, việc điều trị dẫn đến phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm với đường kính tối đa là 1cm ở 13% các con chủng ngừa và 0,3cm ở 4% các con đối chứng. Các phản ứng cục bộ này quan sát được lúc 4 giờ chỉ sau khi chủng ngừa và không biểu hiện gần ngày tiếp theo. Số lượng lợn con với độ lệch so với sức khỏe chung bình thường sau khi điều trị tương tự với cả hai nhóm (6% và 5% tương ứng đối với nhóm chủng ngừa và nhóm đối chứng). Ở nhiệt độ trực tràng trung bình cao hơn $1,1^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,0001$) lúc 4 giờ sau khi chủng ngừa được đo ở các con được chủng ngừa ($40,6^{\circ}\text{C}$ so với $39,5^{\circ}\text{C}$), mà trở lại bình thường vào ngày sau ngày chủng ngừa. Việc tăng trọng lượng không khác biệt giữa các nhóm trong khoảng thời gian quan sát ba tuần sau khi điều trị.

Trong nghiên cứu độ an toàn và hiệu lực trên thực địa, phản ứng cục bộ quan sát thấy ở khoảng 1% lợn ở cả hai nhóm. Kích thước tối đa của phản ứng cục bộ trong nhóm chủng ngừa là 2cm và khoảng thời gian tối đa là một ngày. Độ lệch so với sức

khỏe chung bình thường quan sát thấy ở 3% con được chủng ngừa và 1% con đối chứng. Một số con lợn thể hiện dấu hiệu nhỏ về sự không thoải mái 4 giờ sau chủng ngừa.

5.2.2. Các thử nghiệm thử thách

Không thấy có bất thường trên lâm sàng liên quan đến việc điều trị trong khoảng thời gian từ lúc chủng ngừa đến khi thử nghiệm thử thách. Tuy nhiên, một số lợn được chủng ngừa và lợn đối chứng bị què trong quá trình thử nghiệm, rất có thể là do nhiễm *Streptococcus suis*. Thử thách nhiễm PCV2 không gây ra triệu chứng lâm sàng bất kỳ, nhưng số liệu qPCR rõ ràng đã thể hiện có sự nhiễm khuẩn ở các mô lympho khác nhau và phổi (Fig. 1). Tải lượng virus trung bình nói chung theo thứ tự từ 2 đến 3 log₁₀ thấp hơn ở lợn được chủng ngừa, và sự khác biệt giữa các nhóm có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Đối với Porcilis® PCV M hyo PCV2, hiệu giá kháng thể đặc hiệu bằng khoảng 3 Log₂ và tương quan cao với việc giảm đáng kể tải lượng virus. Trong các thử nghiệm này việc chủng ngừa cũng gây ra đáp ứng kháng thể rõ rệt kháng PCV2 sau khi chủng ngừa, trong khi đó nhóm đối chứng giữ nguyên huyết thanh học âm tính sau khi sụt giảm hiệu giá kháng thể mẹ cho đến thời gian thử thách. Sau thử thách, việc chủng ngừa đã gây ra phản ứng gợi nhớ và động vật trong nhóm đối chứng đã bắt đầu chuyển đổi huyết thanh.

Đáp ứng huyết thanh sau chủng ngừa cũng quan sát thấy trong thử nghiệm thử thách M.hyo với 84% động vật có huyết thanh dương tính ở 4 wpv và 97% động vật có huyết thanh dương tính ở 21 wpv (Fig. 2). Tất cả động vật đối chứng đáp ứng huyết thanh với thử thách nhiễm khuẩn. Khi mổ xác ba tuần sau thử thách, tổn thương phổi trung bình do M.hyo là 77% (thử nghiệm OOI) và 50% (thử nghiệm DOI) thấp hơn ở nhóm được chủng ngừa ($p < 0,05$).

5.2.3. Thử nghiệm hiệu lực trên thực địa

Profin huyết thanh PCV2 của lợn trong thử nghiệm trên thực địa (Fig. 3) là dấu hiệu của việc nhiễm PCV2 trên thực địa từ 8 đến 12 wpv. Thật vậy, lúc 8 tuần sau khi chủng ngừa, sự có mặt của PCV2 có thể được phát hiện với lượng thấp ở các con vật đối chứng đạt đến đỉnh trong chất bài tiết mũi và phân lúc 12 wpv và trong huyết thanh lúc 16 wpv. Tuy nhiên, so với động vật đối chứng, tải lượng virus của động vật được

chủng ngừa (được tính là AUC) được giảm đáng kể gần 79% ($p<0,0001$), 70% ($p<0,0001$) và 55% ($p=0,0159$) trong huyết thanh, mũi và phân chất bài tiết, tương ứng.

Như được thể hiện trên Fig. 4, 46% động vật được chủng ngừa trở nên huyết thanh dương tính với M.hyo lúc 4 wpv. Các con vật đối chứng huyết thanh dương tính M.hyo quan sát được lúc 16 wpv. Lúc giết thịt, điểm số tổn thương phổi trong nhóm được chủng ngừa là 46% thấp hơn ở động vật đối chứng ($p<0,0001$). Cụ thể, tỷ lệ % các con vật có tổn thương phổi nghiêm trọng (điểm số >10) được giảm gần 56%. Số lượng các con vật bị viêm màng phổi thấp hơn ở nhóm được chủng ngừa (32% so với 39%), nhưng mức độ giảm này không có giá trị về mặt thống kê ($p=0,121$).

Ngoài ra, việc chủng ngừa bằng Porcilis® PCV M Hyo làm cho cao hơn 34g ADWG trong giai đoạn vỗ béo lớn hơn 34g ($p<0,0001$) và ADWG trong toàn bộ quá trình thử nghiệm cao hơn 19g ($p=0,0019$) so với động vật đối chứng (bảng 3). Mặc dù tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết ở nhóm được chủng ngừa đều thấp hơn so với nhóm đối chứng, nhưng sự khác biệt này so với đối chứng không có ý nghĩa thống kê.

5.3 Thảo luận

Thử nghiệm này hỗ trợ cho việc kết luận rằng vaccin Porcilis® PCV M Hyo có thể an toàn để dùng cho lợn con 3 tuần tuổi. Tần suất phản ứng toàn thân rất thấp và do các phản ứng này cũng quan sát thấy ở nhóm đối chứng được tiêm nước muối, nên có vẻ là phản ứng toàn thân liên quan đến cách điều trị (tiêm thể tích 2 ml) hơn là do kết quả của việc chủng ngừa. Việc chủng ngừa cũng không có tác động tiêu cực lên sự sinh trưởng của lợn trong giai đoạn sơ sinh và phản ứng cục bộ không đáng kể và trong thời gian ngắn. Nhiệt độ trung bình trực tràng tăng khoảng 1°C lúc 4 giờ sau khi chủng ngừa. Tuy nhiên, khi nhiệt độ trở lại bình thường vào ngày tiếp theo và ngoài ra các biểu hiện chung cũng như sự hấp thụ thức ăn (như được đo bằng trọng lượng cơ thể lúc 3 hoặc 7 tuần sau khi chủng ngừa trong các thử nghiệm thực địa) ở động vật không bị ảnh hưởng, việc nhiệt độ trực tràng tăng trong thời gian ngắn qua là phát hiện liên quan đến vaccin có thể chấp nhận được. Tương tự, tăng trung bình 1°C cũng nằm trong giới hạn $1,5^{\circ}\text{C}$ là nhiệt độ tăng được chấp nhận theo Chuyên khảo được điện châu Âu 2448 (vaccin bệnh viêm phổi địa phương lợn (bị bất hoạt)).

Nghiên cứu thử thách thực nghiệm cho thấy rằng khởi phát miễn dịch diễn ra

càng sớm càng tốt từ 2 tuần (PCV2) đến 4 tuần (M.hyo) sau khi chủng ngừa và kéo dài ít nhất là 21 (M.hyo) đến 22 (PCV2) tuần. Điều này đã chứng tỏ rằng tải lượng virus PCV2 trong cơ quan lympho và phổi giảm đáng kể và tổn thương phổi đặc trưng do M.hyo giảm đáng kể. Do đó, việc chủng ngừa một lần cho động vật lúc 3 tuần tuổi có thể bảo vệ lợn đang vỗ béo kháng lại việc nhiễm PCV2 và M.hyo trong giai đoạn vỗ béo.

Các kết quả quan sát trong các thử nghiệm thử thách được khẳng định trong thử nghiệm hiệu lực trên thực địa: giảm mạnh sự tổn thương phổi gây ra bởi M.hyo và tải lượng virus PCV2 được giảm mạnh. Thử nghiệm hiệu lực trên thực địa đã thể hiện rằng việc chủng ngừa bằng Porcilis® PCV M Hyo không chỉ làm giảm mức tải lượng virus trong huyết thanh của lợn mà còn rút ngắn thời gian virus được bài tiết ra qua đường mũi và phân sau khi lây nhiễm. Việc nhiễm PCV2 gặp phải trong thử nghiệm trên thực địa chủ yếu là cận lâm sàng, nhưng cũng quan sát thấy trong đàn có hiện tượng ho là dấu hiệu của việc nhiễm M.hyo.

Lập profin huyết thanh và virus học của động vật trong thử nghiệm hiệu lực trên thực địa cho biết rằng việc nhiễm PCV2 được bắt đầu ở khoảng 8 wpv và tăng số lượng động vật đáp ứng huyết thanh M.hyo trong khoảng từ 12 đến 16 wpv. Xét rằng việc chuyển hóa huyết thanh kháng M.hyo thông thường diễn ra khoảng 3-4 tuần sau khi nhiễm, profin huyết thanh là dấu hiệu việc cho việc nhiễm M.hyo ở khoảng thời gian xung quanh thời điểm đạt đỉnh nhiễm PCV2 (12-16 wpv, tương ứng với 15 đến 19 tuần tuổi). Trong trường hợp nhiễm cả PCV2 lẫn M.hyo, thì PCV2 thể hiện là nó có khả năng làm cho động vật bị tổn thương do M.hyo ở mức độ nghiêm trọng và M.hyo thể hiện là nó có khả năng làm cho động vật nhiễm virus huyết PCV2 ở mức độ nghiêm trọng. Và việc chủng ngừa chỉ kháng một trong hai mầm bệnh không đủ để bảo vệ động vật khỏi việc lây nhiễm kép với cả hai mầm bệnh. Vì thế, việc lây nhiễm đồng thời đối với năng suất của động vật thường có tác động mạnh mẽ hơn so với việc chỉ nhiễm một trong hai mầm bệnh này. Ưu điểm của vacxin kết hợp PCV2-M.hyo, bảo vệ kháng lại tác dụng hiệp đồng gây bệnh này, được phản ánh trong thử nghiệm trên thực địa qua ADWG trong giai đoạn vỗ béo giá trị cao hơn 34g (khoảng thời gian từ 10 đến 22 tuần tuổi).

5.4. Kết luận:

Độ an toàn:

- Việc chủng ngừa làm tăng nhiệt độ vừa phải vào ngày chủng ngừa và xuất hiện phản ứng toàn thân và cục bộ với mức độ nhẹ ở tỷ lệ % thấp lợn được chủng ngừa.

- Phản ứng cục bộ quan sát được ở mức độ nhỏ (tối đa 2 cm) và trong thời gian rất ngắn (tối đa 1 ngày).

Hiệu lực:

- Các thử nghiệm thử thách trong thời gian ngắn (khởi phát miễn dịch) và thời gian dài (khoảng thời gian miễn dịch) với các mầm bệnh cụ thể, vaccin kết hợp PCV2/M.hyo đã làm giảm đáng kể tải lượng PCV2 trong huyết thanh, mô lympho và phổi, cũng như tổn thương phổi gây ra bởi M.hyo.

- Trong thử nghiệm trên thực địa với đối chứng giả được ở trạng trại nơi xuất hiện cả PCV2 và M.hyo, việc chủng ngừa cho lợn con lúc 3 tuần tuổi đã làm giảm nhiễm virus huyết và lan tràn PCV2, và điểm số tổn thương phổi giảm lúc giết thịt.

- Tương tự, tác dụng tích cực do việc chủng ngừa lên mức tăng cân trung bình hàng ngày (+ 34 g/ngày) trong giai đoạn vỗ béo

5.5. Bảng:

Bảng 2: Phân tích độ an toàn của vaccin kết hợp PCV2/M.hyo

		Vaccin	Đối chứng	Giá trị p
Nghiên cứu độ an toàn toàn GLP	Số lượng lợn (n)	12	12	
	Lợn có phản ứng cục bộ (%)	0	0	1,000
	Lợn có phản ứng cục bộ có thể nhìn thấy được khi đánh giá sát chung lúc mổ xác	0	0	1,000
	Lợn có phản ứng toàn thân (%)	0	0	1,000
	Nhiệt độ trực tràng lúc 4 giờ sau khi chủng ngừa (°C)	40,5 ± 0,4	39,4 ± 0,2	<0,001
Nghiên cứu độ an toàn trên thực địa	Số lượng lợn (n)	84	85	
	Lợn có phản ứng cục bộ (%)	13,1	3,5	0,0276
	Lợn có phản ứng toàn thân (%)	6,0	4,7	0,7464
	Nhiệt độ trực tràng lúc 4 giờ sau khi chủng ngừa (°C)	40,6 ± 0,6	39,5 ± 0,4	<0,0001
	Tăng cân trung bình hàng ngày (g/ngày) trong thời gian quan sát (3-6 tuần tuổi)	245 ± 8	248 ± 8	0,7053
Nghiên cứu	Số lượng lợn (n)	302	303	

độ an toàn và hiệu lực trên thực địa	Lợn có phản ứng cục bộ (%)	1,3	0,7	0,4504
	Lợn có phản ứng toàn thân (%)	2,6	0,7	0,0630
	Tăng cân trung bình hàng ngày (g/ngày) trong thời gian quan sát (3-10 tuần tuổi)	360 ± 4	369 ± 5	0,0839

Bảng 3: Số liệu mô tả động vật thử nghiệm và năng suất của chúng trong thử nghiệm hiệu lực trên thực địa với vaccin kết hợp PCV2/M.hyo.

	Tuổi (tuần)	Vaccin	Đối chứng	Sự chênh lệch ¹	Giá trị p
Số lượng lợn (n)	Bao gồm	302	303		
Số lượng đực/cái (n)	thử	155/147	160/143		
Tuổi (ngày)	thử nghiệm	17,9	17,9		
Tỷ lệ mắc bệnh (%)	3-22	2,6	3,3	-0,7	0,6373
Tỷ lệ chết (%)	3-10	1,3	1,3	0,0	0,9960
	10-22	2,7	3,7	-1,0	0,4890
	3-22	3,6	5,0	-1,4	0,5563
ADWG (g/ngày)	3-10	360 ± 4	369 ± 4	-9	0,0839
	10-22	757 ± 7	723 ± 7	+34	<0,0001
	3-22	612 ± 5	593 ± 5	+19	0,0019

¹ Nhóm vaccin trừ nhóm đối chứng

6. Ảnh hưởng của điều kiện phản ứng lên sự gắn kết của kháng nguyên M.hyo với chất phù trợ nhôm-hydroxit

6.1. Giới thiệu

Trong thử nghiệm bổ sung, các điều kiện để kháng nguyên M.hyo liên kết với chất phù trợ nhôm-hydroxit được thay đổi để nghiên cứu sự ảnh hưởng của chúng lên hiệu quả của việc tạo thành phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ.

Sự ảnh hưởng cụ thể của nhiệt độ, độ pH và lượng nhôm-hydroxit lên khả năng liên kết kháng nguyên M.hyo được đánh giá bằng cách chuẩn bị nhiều chế phẩm vaccin dầu/nước hoàn chỉnh, ở quy mô nhỏ. Tiếp theo, lượng kháng nguyên M.hyo tương đối được liên kết trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ được xác định, trong cả nhũ tương vaccin hoàn chỉnh, và trong các mẫu viên tròn hoặc dịch nổi sau khi ly tâm nhũ tương vaccin.

6.2. Vật liệu và phương pháp

6.2.1 Sản xuất vaccin nhũ tương

Điều chế các chế phẩm vaccin khác nhau về cơ bản như đã mô tả trong ví dụ 3. Từ các mẻ tiêu chuẩn của kháng nguyên M.hyo hoặc kháng nguyên PCV2, kháng nguyên M.hyo được bổ sung vào nồng độ 6% (khối lượng/thể tích) và kháng nguyên PCV2 được bổ sung vào nồng độ cuối cùng là 2500 U/ml. 20 ml nhũ tương vaccin được sản xuất trong các điều kiện khác nhau, xem bảng 4. Sau khi bào chế, tất cả vaccin được lưu giữ ở nhiệt độ từ 2-8°C cho đến khi thử nghiệm.

Bảng 4: Sự thay đổi các thông số đối với các vaccin khác nhau

Số	Nhiệt độ trong khi hấp phụ	pH trong khi hấp phụ	Lượng nhôm-hydroxit (khối lượng/khối lượng)
1	nhiệt độ môi trường (20- 25 °C)	không điều chỉnh (pH 7,0 - 7,3)	9,8 %
2	4°C		
3	30°C		
4	nhiệt độ môi trường	6,0	5 %
5		8,0	
6		không điều chỉnh	25 %
7			

6.2.2 Điều chế mẫu

10ml vaccin được ly tâm ở giá trị g thấp (20 phút ở 600 xg), và dịch nổi (8,5 ml) được loại bỏ. Từ mẫu số 7, chỉ có 7,5 ml dịch nổi có thể được loại bỏ do sản phẩm ly tâm dạng viên có kích thước lớn hơn do lượng nhôm-hydroxit lớn. Viên tròn được bổ sung và được đồng nhất hóa với thể tích nước muối sinh lý 0,9%, mà có thể tích bằng với thể tích của dịch nổi đã được loại bỏ, có thể so sánh với các thể tích ‘viên tròn’ và dịch nổi tương đương.

6.2.3. Định lượng kháng nguyên M.hyo

Lượng kháng nguyên M.hyo trong mẫu thử nghiệm có thể được đo bằng phương pháp Elisa chuẩn, đối với cả dịch nổi lẫn các mẫu viên tròn. Tính lượng kháng nguyên từ phép đo OD được thực hiện bằng chương trình máy tính. Mỗi mẫu được thử nghiệm hai lần và vaccin, viên tròn và dịch nổi của hỗn hợp cụ thể được thử nghiệm đồng thời trên một đĩa vi chuẩn. Kết quả được thể hiện trong bảng 5 là giá trị trung bình của mỗi mẫu được thực hiện hai lần giống nhau. Giá trị đơn vị công hiệu tương đối (RPU) của viên tròn và dịch nổi được tính so với lượng kháng nguyên M.hyo trong nhũ tương vaccin hoàn chỉnh tương ứng của chúng, được đặt là 100%.

6.3. Kết quả

Ly tâm các mẫu được thực hiện ở giá trị g thấp; việc ly tâm là đủ để tạo ra các viên nhôm-hydroxit, mà không cần tạo viên kháng nguyên M.hyo độc lập với việc liên kết của nó với chất phù trợ. Tương tự, ở các giá trị g thấp, dịch nổi vẫn bao gồm nhũ tương dầu trong nước.

Để khẳng định rằng việc ly tâm không tác động quá mạnh, mẫu đối chứng được điều chế bằng cách trực tiếp trộn kháng nguyên M.hyo và kháng nguyên PCV2 với nhũ tương dầu/nước Emunade trống, sau đó bằng cách ly tâm ngay lập tức ở cùng giá trị g thấp. Kết quả của các mẫu đối chứng này chứng tỏ rằng trong các điều kiện này kháng nguyên M.hyo nguyên trạng không bị kết tủa đến mức độ đáng kể: 13% kháng nguyên M.hyo được phát hiện trong viên tròn này, chỉ là một phần thể tích của viên tròn trong tổng thể tích vacxin được thử nghiệm (1,5ml trong 10ml).

Ngoại trừ các mẫu có độ lệch về giá trị độ pH hoặc nhiệt độ ủ, các mẫu khác có độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,3, và nhiệt độ môi trường tại thời điểm thử nghiệm là 22°C.

Các điều kiện chuẩn là: ủ O/N, ở nhiệt độ môi trường, ở độ pH từ 6,5 đến 7,5, và chất phù trợ nhôm-hydroxit với lượng 9,8 % khối lượng/khối lượng.

Tỷ lệ % RPU của kháng nguyên M.hyo được đo trong viên và dịch nổi của các mẫu khác nhau được mô tả trong bảng 5. Quan sát thấy rằng nhiệt độ và độ pH không ảnh hưởng đáng kể lên việc kháng nguyên M.hyo liên kết với chất phù trợ nhôm-hydroxit. Lượng kháng nguyên M.hyo tương đối được phát hiện trong pha nhôm-hydroxit nằm trong khoảng từ 74% đến 82 % trong các điều kiện này.

Tuy nhiên, lượng nhôm-hydroxit trong nhũ tương có tác động đáng kể: làm giảm từ 9,8 đến 5% khối lượng/khối lượng, hầu như giảm một nửa lượng tương đối kháng nguyên M.hyo trong viên (48 %), đồng thời làm tăng lượng nhôm-hydroxit đến 25% đã thể hiện kháng nguyên M.hyo hầu như liên kết hoàn toàn (96%).

Bảng 5: Tỷ lệ % tương đối của kháng nguyên M.hyo có mặt trong viên tròn và dịch nổi

	Kháng nguyên M.hyo trong RPU/ml trung bình, là giá % trong vacxin tương ứng
--	---

Số	Điều kiện	Giá trị	viên tròn	Dịch nổi
1	Chuẩn		74%	26%
2	nhiệt độ ủ @ hấp phụ	4°C	81%	19%
3		30°C	82%	18%
4	Giá trị pH @ hấp phụ	pH = 6	80%	20%
5		pH = 8	75%	25%
6	lượng nhôm-hydroxit	5%	48%	52%
7		25%	96%	4%
Đối chứng	Trộn trực tiếp & ly tâm		13%	87%

6.4. Kết luận

Không có sự khác biệt đáng kể về việc liên kết của kháng nguyên M.hyo với nhôm-hydroxit khi thay đổi điều kiện nhiệt độ và độ pH trong quá trình liên kết. Việc thay đổi lượng nhôm-hydroxit làm ảnh hưởng đến hiệu quả liên kết.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm kháng nguyên cho vacxin kết hợp sẵn sàng để dùng cho lợn, trong đó chế phẩm kháng nguyên chứa kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) và kháng nguyên circovirus typ 2 trên lợn (PCV2), trong đó quy trình này bao gồm bước trộn kháng nguyên PCV2 với phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ đã được tạo trước của kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phụ trợ nhôm-hydroxit để tạo ra hỗn hợp kháng nguyên:

trong đó phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ đã được tạo trước thu được bởi các bước:

a) trộn chất phụ trợ nhôm-hydroxit và kháng nguyên M.hyo, trong chất mang chứa nước ở độ pH mà tại đó chất phụ trợ nhôm-hydroxit tích điện dương để tạo thành hỗn hợp; và

b) ủ hỗn hợp này để kháng nguyên M.hyo được hấp phụ lên chất phụ trợ nhôm-hydroxit để tạo ra phức hợp kháng nguyên/chất phụ trợ.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó kháng nguyên M.hyo là vi khuẩn M.hyo.

3. Quy trình sản xuất vacxin bao gồm bước trộn chế phẩm kháng nguyên theo điểm 1, và chất phụ trợ bổ sung.

4. Quy trình sản xuất vacxin, bao gồm bước nhũ hóa chế phẩm kháng nguyên theo điểm 1, và dầu khoáng, vào nhũ tương nước trong dầu.

5. Quy trình theo điểm 1, trong đó kháng nguyên PCV2 được mã hóa bởi trình tự mã hóa PCV2 ORF2.

6. Quy trình theo điểm 5, trong đó kháng nguyên PCV2 ORF2 là hạt giống virus.

7. Quy trình theo điểm 2, trong đó kháng nguyên PCV2 được mã hóa bởi trình tự mã hóa PCV2 ORF2.

8. Quy trình theo điểm 1, trong đó chất mang chứa nước là dung dịch muối được làm cân bằng.

9. Quy trình theo điểm 8, trong đó độ pH của chất mang chứa nước là nằm trong khoảng từ 6 đến 8.

10. Quy trình theo điểm 1, trong đó hỗn hợp này về cơ bản là không có các thành phần khác.

11. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước ủ này được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 20 giờ ở nhiệt độ phòng.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó bước ủ này bao gồm bước khuấy trộn nhẹ hỗn hợp này.
13. Chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo điểm 1.
14. Chế phẩm kháng nguyên theo điểm 13, khác biệt ở chỗ, ít nhất 50% kháng nguyên M.hyo được nằm trong phức hợp kháng nguyên/chất phù trợ.
15. Chế phẩm kháng nguyên theo điểm 14, khác biệt ở chỗ, ít nhất 50% khả năng liên kết protein của chất phù trợ nhôm-hydroxit được sử dụng bởi kháng nguyên M.hyo.
16. Vacxin sẵn sàng để dùng cho lợn dùng để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh, vacxin này chứa chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo điểm 1, và chất phù trợ bổ sung.
17. Vacxin theo điểm 16, khác biệt ở chỗ, vacxin này là nhũ tương dầu trong nước và chất phù trợ bổ sung là dầu khoáng.
18. Vacxin theo điểm 16, khác biệt ở chỗ, vacxin này còn chứa nguyên liệu kháng nguyên bổ sung có nguồn gốc từ vi sinh vật gây bệnh cho lợn.
19. Chế phẩm kháng nguyên thu được bằng quy trình theo điểm 1 để sử dụng trong vacxin cho lợn để ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm các bệnh do nhiễm M.hyo hoặc PCV2 và các triệu chứng liên quan của bệnh.

Fig. 1

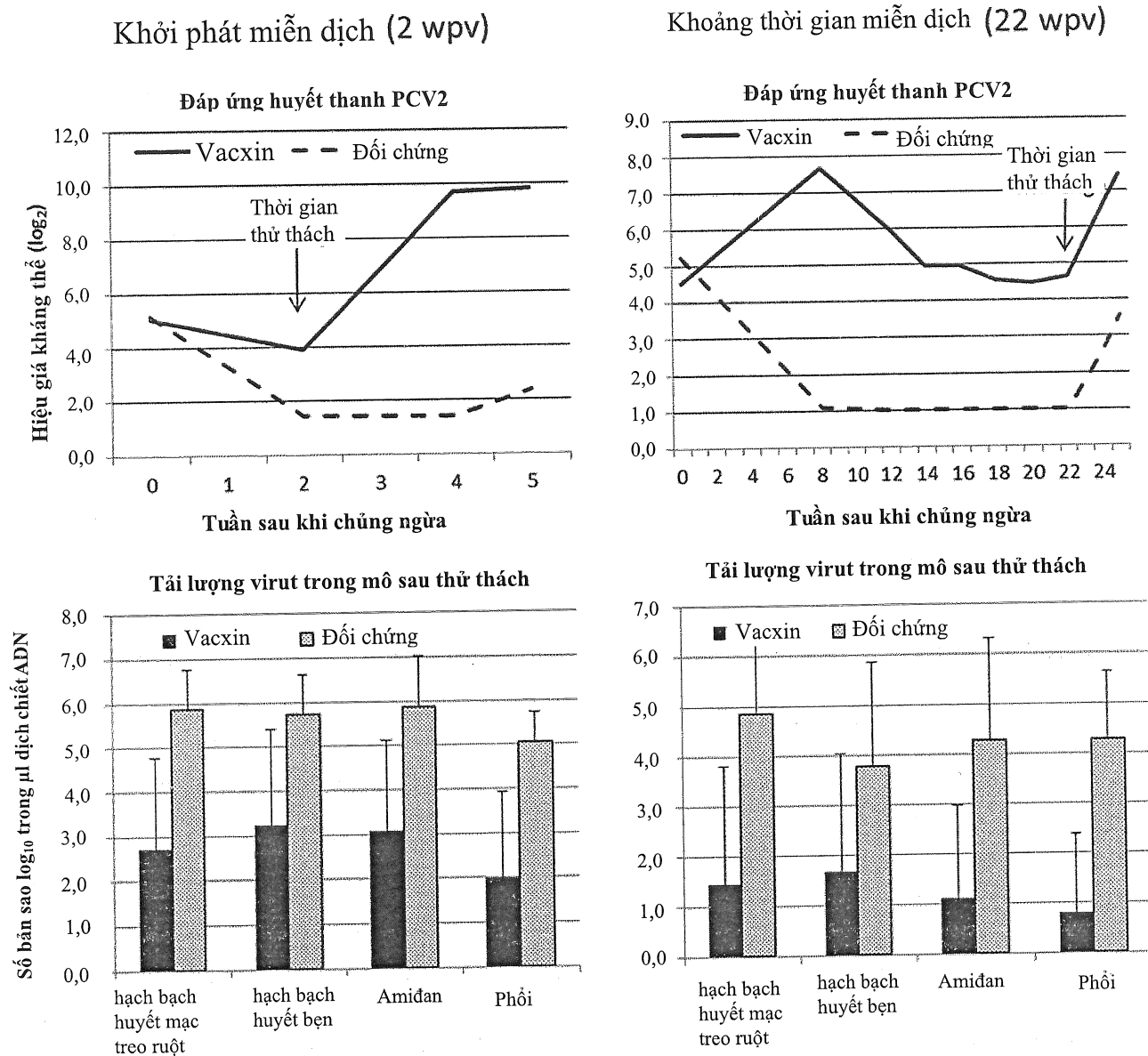


Fig. 2

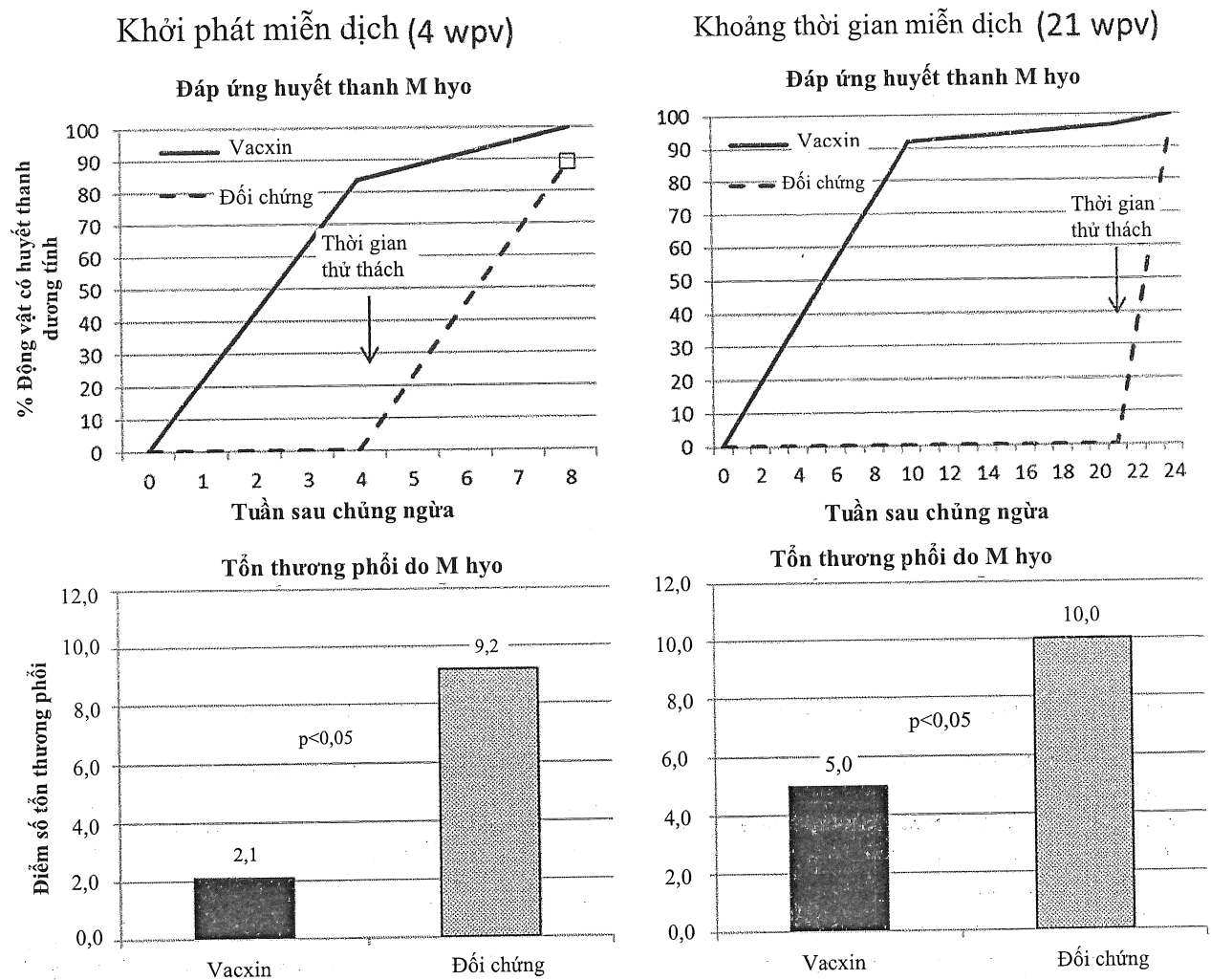


Fig. 3

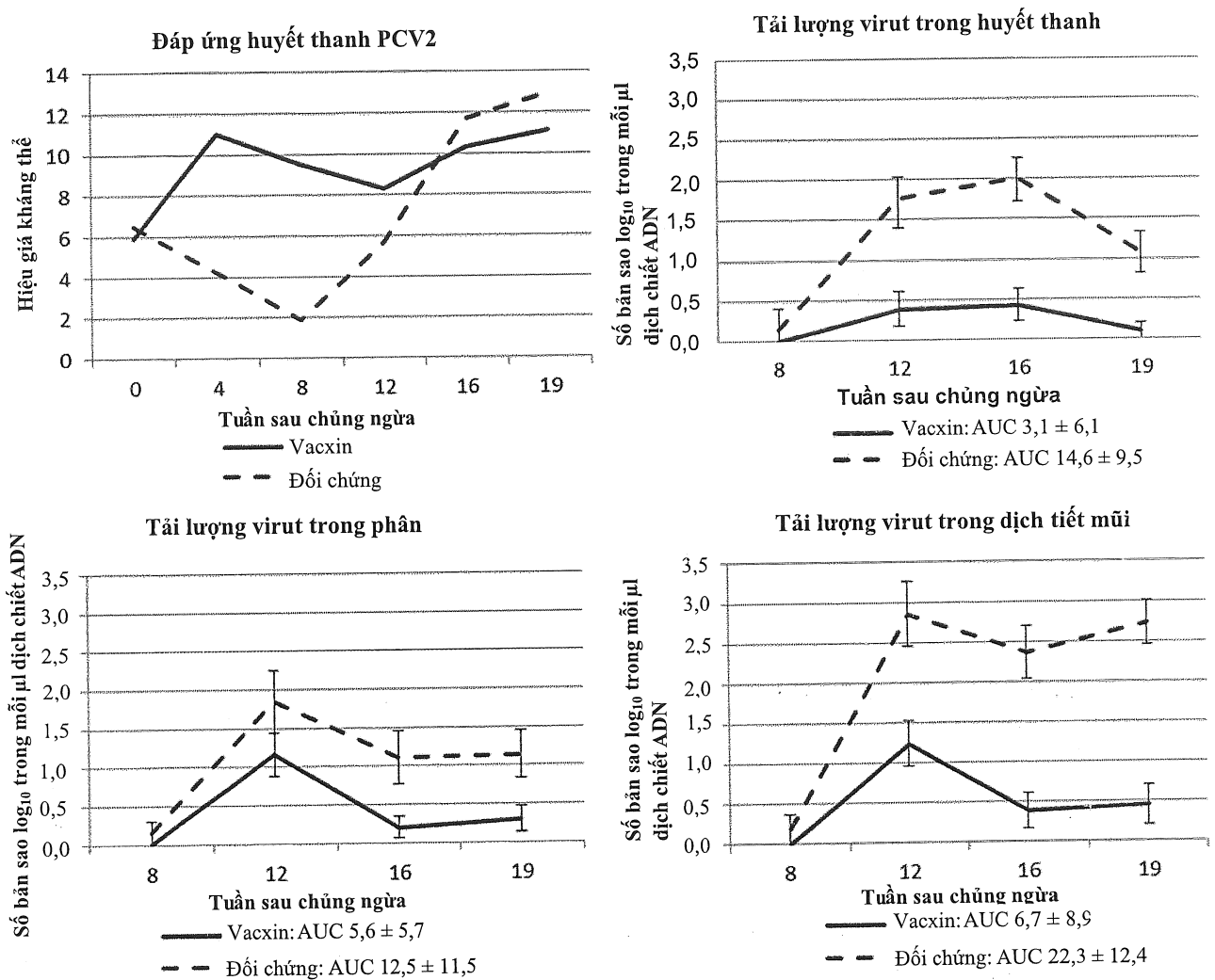


Fig. 4

