



(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)



1-0034254

(51)⁸ A61K 39/12; A61K 31/115; A61K
39/39; A61K 31/045; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2018-01158

(22) 13/09/2016

(86) PCT/KR2016/010313 13/09/2016

(87) WO/2017/048038 23/03/2017

(30) 10-2015-0131157 16/09/2015 KR

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/06/2018 363A

(73) LG CHEM, LTD. (KR)

128, Yeoui-daero Yeongdeungpo-gu, Seoul 07336, Republic of Korea

(72) CHOI, Suk Young (KR); NOH, Yoon Ae (KR); KIM, Eun Ji (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐA LIỀU DÙNG CHO VACXIN KẾT HỢP ĐA
GIÁ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vacxin kết hợp đa giá, trong đó (i) vacxin kết hợp đa giá gồm vacxin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vacxin ho gà vô bào (aP), và vacxin bại liệt đã bất hoạt Sabin (sIPV); và (ii) chế phẩm chứa 2-phenoxyetanol (2-PE) và formaldehyt (HCHO) làm chất bảo quản; và phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vacxin kết hợp đa giá.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, trong đó vaccin kết hợp đa giá gồm vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV); và chế phẩm chứa 2-phenoxyetanol (2-PE) và fomaldehyt (HCHO) làm chất bảo quản; và phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các vaccin kết hợp là những vaccin chứa hai hoặc nhiều kháng nguyên và được dùng để ngăn ngừa ít nhất một bệnh lây nhiễm hoặc dùng để ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm gây ra bởi các kiểu huyết thanh hoặc các dạng khác nhau của cùng một vi sinh vật. Các vaccin kết hợp cho phép cung cấp cùng một lúc các kháng nguyên bạch hầu, uốn ván và các kháng nguyên khác đã được sử dụng từ giữa thế kỷ 20.

Mặc dù hàm lượng và tổng lượng các kháng nguyên có trong vaccin thay đổi theo độ tuổi sử dụng (tức là, trẻ sơ sinh, trẻ mới biết đi, trẻ em, thanh thiếu niên, và người lớn), gần đây các vaccin kết hợp trên cơ sở DTwP và trên cơ sở DTaP đã được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Cụ thể là, các vaccin trên cơ sở DTwP được xuất khẩu sang các nước kém phát triển thông qua các tổ chức thế giới như liên hợp quốc.

Để điều chế vaccin bạch hầu (D), độc tố bạch hầu được giải độc với fomalin để tạo ra độc tố bạch hầu bị bất hoạt, là chất được sử dụng làm vaccin. Các triệu chứng của bệnh bạch hầu, lây nhiễm đường hô hấp trên, có thể bao gồm sự phát triển của các màng không thể bóc ra được trên các vùng amidan, hầu, và mũi mà không có nguyên nhân cụ thể, do đó gây ra đau họng và sốt nhẹ. Thỉnh thoảng, bạch hầu cũng có thể gây ra lây nhiễm ở da, màng kết và cơ quan sinh dục.

Để điều chế vaccin uốn ván (T), độc tố uốn ván được giải độc với fomalin để tạo ra độc tố uốn ván bất hoạt, là chất được sử dụng làm vaccin. Tác nhân gây bệnh gây ra bệnh uốn ván là *Clostridium tetani*, trực khuẩn *Bacillus* gram dương, kỵ khí, sinh bào tử. Uốn ván là rối loạn thần kinh, trong đó *Clostridium tetani* tiết ra ngoại độc

tổ, do đó gây co thắt cơ nghiêm trọng. Tác nhân gây bệnh đi vào thông qua các vết thương trên da hoặc niêm mạc, do đó gây bệnh uốn ván, và các triệu chứng xuất hiện chậm và dần phát triển thành các cơn co thắt cơ nghiêm trọng hơn.

Để điều chế vaccin ho gà toàn tế bào (wP), vi khuẩn ho gà được giải độc bằng xử lý nhiệt/fomalin, v.v., và vi khuẩn ho gà thu được được sử dụng làm vaccin, được gọi là vaccin ho gà toàn tế bào. Vaccin ho gà vô bào (aP) là vaccin được điều chế bằng cách chỉ sử dụng protein của vi khuẩn ho gà làm kháng nguyên. Tác nhân gây bệnh gây ra bệnh ho gà là *Bordetella pertussis*, trực khuẩn *Bacillus* gram dương đa hình, rất khó để nuôi cấy. Ho gà có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi, nhưng xuất hiện thường xuyên hơn ở trẻ em tầm từ 5 tuổi trở xuống, và bệnh nhân hầu hết là trẻ sơ sinh dưới một tháng tuổi, và tỉ lệ bệnh nhân giảm đi theo độ tuổi tăng dần. Các triệu chứng lâm sàng của ho gà có thể liên tục trong từ 6 đến 10 tuần khi không có biến chứng. Các ví dụ về biến chứng có thể bao gồm co giật, viêm phổi, bệnh não, v.v., và có thể dẫn tới tử vong.

Vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) là vaccin có cấu trúc là các hạt tương tự virus (VLP) được tạo ra bằng thao tác di truyền trên kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg). Viêm gan B là bệnh do sự tấn công của virus viêm gan B lên tế bào gan, do đó làm mất chức năng gan, xơ gan hoặc ung thư gan.

Vaccin *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) là vaccin liên hợp được điều chế bằng cách liên hợp protein mang với polyribozo ribitol phosphat (PRP), là polysaccarit trên bề mặt màng của *Haemophilus influenzae* typ b. Khoảng 95% các bệnh xâm lấn như viêm màng não và nhiễm trùng máu là do *Haemophilus influenzae* typ b, và do đó *Haemophilus influenza* là tác nhân gây bệnh chính trong số vi khuẩn gây viêm màng não ở trẻ sơ sinh, và cụ thể là, tỷ lệ lây nhiễm cao nhất ở trẻ nhỏ từ 6 tháng tuổi đến 5 tuổi.

Vaccin virus bại liệt bất hoạt Sabin để tiêm được điều chế thành hai loại khác nhau: vaccin virus bại liệt bất hoạt thuộc chủng Sabin (kiểu đã làm suy yếu) (sIPV) và vaccin virus bại liệt bất hoạt thuộc chủng Salk (kiểu đại) (wIPV). Vaccin bại liệt suy yếu dạng uống được nghiên cứu bởi tiến sĩ Albert Sabin năm 1961 và những loài còn sống nhưng được làm yếu đi được nghiên cứu bởi tiến sĩ Sabin được gọi là virus bại liệt chủng Sabin. Gần đây, virus bại liệt bất hoạt Sabin, được tạo ra bằng cách làm bất

hoạt virus bại liệt chủng Sabin bằng fomalin, đã được nghiên cứu để tiêm và cũng có sẵn trong các sản phẩm thương mại. Vaccine sIPV gồm 3 chủng khác nhau: typ 1, typ 2, và typ 3. Vào năm 1955, tiến sĩ Jonas Salk đã thành công trong việc làm bất hoạt virus bại liệt kiểu đại, do đó cho phép nó ở dạng chế phẩm dạng tiêm, và được đặt tên là chủng Salk, gồm Mahoney typ 1, MEF typ 2, và Saukett typ 3. Cho đến nay, vaccine wIPV đã được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, theo chính sách xóa bỏ virus bại liệt kiểu đại của WHO, sIPV đã được nghiên cứu và phát triển thành các sản phẩm thương mại.

Trong khi đó, thuốc tiêm vaccine đa liều bắt buộc phải sử dụng chất bảo quản để tránh nhiễm bẩn bởi vi sinh vật. Đối với các sản phẩm vaccine kết hợp được xuất khẩu sang những nước kém phát triển bởi liên hợp quốc, v.v., các vaccine đa liều chứa chất bảo quản được ưu tiên hơn, xem xét đến môi trường của các quốc gia nơi mà các vaccine được sử dụng, cách thức phân phối, chi phí, v.v.. Các ví dụ về chất bảo quản được sử dụng trong các sản phẩm vaccine gồm thimerosal, 2-PE, phenol, v.v., và các liều lượng thông thường của các chất bảo quản đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, thimerosal được sử dụng với nồng độ 100 µg/mL và 2-PE được sử dụng với nồng độ 5 mg/mL, và các sản phẩm vaccine đa liều chứa các chất bảo quản này có thể được điều chế thành sản phẩm thương mại chỉ khi chúng vượt qua được thử nghiệm khả năng kháng khuẩn được mô tả trong Dược điển Châu Âu mục B (EP-B) hoặc Dược điển Mỹ (USP).

Thimerosal (thimerosal, thiomersal, hoặc merthiolat) là dẫn xuất của etyl thủy ngân, là chất được sử dụng làm chất bảo quản cho thuốc tiêm vaccine đa liều từ đầu những năm 1930. Thimerosal đã được sử dụng nhằm mục đích ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật gây nhiễm và duy trì điều kiện vô trùng trong suốt quá trình bảo quản hoặc sử dụng của sản phẩm vaccine, và nhiều vaccine kết hợp hóa trị năm (bao gồm D, T, P, Hib, và HBsAg) đã đạt được tiêu chuẩn thẩm định sơ bộ (PQ) của WHO, chứa thimerosal làm chất bảo quản.

2-PE chủ yếu được sử dụng làm chất bảo quản dùng cho mỹ phẩm và các sản phẩm thuốc dùng cho da và cũng được sử dụng làm chất bảo quản dùng cho thuốc tiêm vaccine.

* Vaccine bại liệt bất hoạt 16 (sau đây gọi là IPV) thường sử dụng 2-PE làm chất bảo quản. Theo như báo cáo trước đó, khi vaccine bại liệt bất hoạt chứa thimerosal,

hiệu lực của vacxin có xu hướng giảm đi 50% hoặc nhiều hơn trong một tuần ngay cả khi được bảo quản trong tủ lạnh, và vì vậy tất cả các sản phẩm vacxin IPV không sử dụng thimerosal làm chất bảo quản, mà thay vào đó là sử dụng 2-PE với nồng độ 5 mg/mL (*Vaccine* 1994 Volume 12 No. 9 851 - 856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine).

Vì những lý do nêu trên, nó đã được báo cáo rằng vacxin kết hợp hóa trị sáu (bao gồm D, T, wP, Hib, HBsAg, và IPV), là vacxin vẫn đang được nghiên cứu mà không được phát triển thành sản phẩm thương mại, cũng sử dụng 2-PE với nồng độ 5 mg/mL (US 2011-0195087, WO 2004-110480, và WO 2012-093406).

Vì vậy, các tác giả sáng chế đã nỗ lực thực hiện thử nghiệm về khả năng kháng khuẩn trên 2-PE, chất thường được sử dụng trong vacxin IPV trong lĩnh vực kỹ thuật, với nồng độ 5 mg/mL, trong khi mà đang nghiên cứu phát triển vacxin kết hợp hóa trị sáu (gồm vacxin D, T, P, Hib, HBsAg, và IPV). Tuy nhiên, bất ngờ là, họ không thu được các kết quả khả quan đạt yêu cầu tuân theo các tiêu chuẩn được mô tả trong Dược điển Châu Âu mục B. Tuy nhiên, việc tăng hiệu lực một cách thiếu thận trọng của hàm lượng 2-PE (chất bảo quản) để đáp ứng các tiêu chuẩn đặt ra có thể dẫn đến các vấn đề về an toàn cho trẻ nhỏ, là những đối tượng nhận vacxin kết hợp, và cũng tác động đến việc sản xuất và độ ổn định của sản phẩm cuối cùng, và do đó quyết định này bắt buộc phải thật cẩn thận.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã phát hiện việc kết hợp mỗi liều lượng 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản dùng cho vacxin kết hợp hóa trị sáu bao gồm vacxin D, T, P, và IPV đáp ứng tiêu chuẩn về khả năng kháng khuẩn, trong khi làm giảm tối thiểu hàm lượng của chúng, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vacxin kết hợp đa giá, trong đó (i) vacxin kết hợp đa giá gồm vacxin bạch hầu (D), vacxin uốn ván (T), vacxin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vacxin ho gà vô bào (aP), và vacxin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV); và (ii) chế phẩm có chứa 2-phenoxyetanol (2-PE)

và fomaldehyt (HCHO) làm chất bảo quản.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá.

Hiệu quả có lợi

Đã xác nhận được rằng việc sử dụng kết hợp 2-PE và fomaldehyt theo sáng chế có thể dùng làm chất bảo quản tuyệt vời có thể duy trì được khả năng kháng khuẩn của vaccin kết hợp và cũng được sử dụng hiệu quả để tạo ra chế phẩm đa liều có thể duy trì khả năng kháng khuẩn của vaccin kết hợp đa giá. Theo đó, 2-PE và fomaldehyt có thể được sử dụng hiệu quả trong lĩnh vực điều chế vaccin kết hợp đa liều.

Để đạt được mục đích ở trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, trong đó (i) vaccin kết hợp đa giá gồm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV); và (ii) chế phẩm có chứa 2-phenoxyetanol (2-PE) và fomaldehyt (HCHO) làm chất bảo quản.

Theo một phương án minh họa, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa liều còn chứa thêm với tư cách là vaccin kết hợp đa giá, vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib).

Theo phương án minh họa khác, chế phẩm có chứa 2-PE với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL.

Vẫn theo phương án minh họa khác, chế phẩm có chứa fomaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL.

Vẫn theo phương án minh họa khác, chế phẩm có chứa 2-PE với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL và fomaldehyt với hàm lượng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL.

Vẫn theo phương án minh họa khác, chế phẩm có chứa chất phụ gia được dùng, trong đó chất phụ gia là nhôm photphat, nhôm hydroxit, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo phương án minh họa khác, chế phẩm có chứa chất phụ gia với hàm lượng là 1,25 mg/mL hoặc ít hơn.

Vẫn theo phương án minh họa này, chế phẩm có chứa chất vận chuyển được

dụng, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất đẳng trương, chất nhũ hóa, hoặc chất làm ẩm.

Vẫn theo phương án minh họa này, chế phẩm có pH từ 5,5 đến 8.

Vẫn theo phương án minh họa này, vaccin kết hợp đa giá gồm vaccin bạch hầu (D) với lượng nằm trong khoảng từ 10 Lf/mL đến 50 Lf/mL; vaccin uốn ván (T) với lượng nằm trong khoảng từ 5 Lf/mL đến 30 Lf/mL; vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với lượng nằm trong khoảng từ 20 OU/mL đến 50 OU/mL; vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 30 µg/mL; vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 20 µg/mL; và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV), gồm typ 1, typ 2, và typ 3, trong đó typ 1 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 5 DU/mL đến 100 DU/mL, typ 2 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 DU/mL đến 100 DU/mL, và typ 3 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 DU/mL đến 120 DU/mL.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, bao gồm các bước (a) trộn vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với nhôm photphat, nhôm hydroxit hoặc tổ hợp của chúng; (b) bổ sung thêm vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) vào hỗn hợp trong bước (a) và trộn đều; và (c) bổ sung thêm 2-PE và fomaldehyt vào hỗn hợp trong bước (b), trộn đều, và điều chỉnh pH cuối cùng của hỗn hợp thành từ 5,5 đến 8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, trong đó:

(i) vaccin kết hợp đa giá bao gồm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV); và

(ii) chế phẩm chứa 2-phenoxyetanol (2-PE) và fomaldehyt (HCHO) làm chất

bảo quản.

Đặc biệt là, vaccin kết hợp đa giá còn có thể chứa thêm vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đa liều” dùng để chỉ chế phẩm sinh miễn dịch chứa vaccin với lượng vượt quá một liều dùng duy nhất, cái mà được dùng cho một đối tượng hoặc các đối tượng vượt quá một trong số các bước dùng khác nhau theo thời gian.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vaccin kết hợp đa giá” dùng để chỉ việc kết hợp hai hoặc nhiều vaccin, là những vaccin có thể sinh miễn dịch chống lại các kháng nguyên, và có thể chứa hai hoặc nhiều vaccin có khả năng sinh miễn dịch liên quan đến các vùng trong cùng một kháng nguyên, hoặc có thể gồm (các) vaccin dùng cho hai hoặc nhiều kháng nguyên. Đối với mục đích của sáng chế, vaccin kết hợp đa giá theo sáng chế có thể gồm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV), và cụ thể là, vaccin kết hợp hóa trị sáu còn chứa thêm cả vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), nhưng không chỉ giới hạn ở các vaccin này.

Vaccin kết hợp đa giá được sử dụng ở dạng lỏng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, độc tố bạch hầu được giải độc với fomalin để tạo ra độc tố bạch hầu bất hoạt, được sử dụng làm vaccin. Các triệu chứng của bạch hầu, bệnh lây nhiễm đường hô hấp trên, có thể bao gồm sự phát triển của các màng không thể bóc ra được trên các vùng amidan, hầu, và mũi mà không có nguyên nhân cụ thể, do đó gây ra đau họng và sốt nhẹ. Thỉnh thoảng, bạch hầu cũng có thể gây ra lây nhiễm ở da, màng kết và cơ quan sinh dục.

Theo sáng chế, độc tố uốn ván được giải độc với fomalin để tạo ra độc tố uốn ván bất hoạt, được sử dụng làm vaccin. Tác nhân gây bệnh gây ra uốn ván là *Clostridium tetani*, là trực khuẩn *Bacillus* gram dương kỵ khí sinh bào tử. Uốn ván là rối loạn thần kinh, trong đó *Clostridium tetani* tiết ra ngoại độc tố, do đó gây co thắt cơ

ng nghiêm trọng. Tác nhân gây bệnh đi vào thông qua các vết thương trên da hoặc niêm mạc, do đó gây bệnh uốn ván, và các triệu chứng xuất hiện chậm và dần phát triển thành các cơn co thắt cơ nghiêm trọng hơn.

Theo sáng chế, vaccin ho gà toàn tế bào (wP) là vaccin trong đó vi khuẩn ho gà được giải độc bằng cách xử lý nhiệt/fomalin, v.v., và sau đó vi khuẩn ho gà thu được được sử dụng làm vaccin. Trong khi đó, vaccin ho gà vô bào (aP) là vaccin được điều chế bằng cách chỉ sử dụng protein của vi khuẩn ho gà làm kháng nguyên. Tác nhân gây bệnh gây ra bệnh ho gà là *Bordetella pertussis*, một trực khuẩn *Bacillus* gram dương đa hình, rất khó để nuôi cấy.

Theo sáng chế, vaccin virus bại liệt bất hoạt có hai loại khác nhau: vaccin virus bại liệt bất hoạt thuộc chủng Sabin (kiểu đã làm suy yếu) (sIPV) và vaccin virus bại liệt bất hoạt thuộc chủng Salk (kiểu đại) (wIPV). Vaccin bại liệt đã suy yếu dạng uống đã được nghiên cứu trước đó và các loài còn sống nhưng được làm yếu đi được nghiên cứu bởi tiến sĩ Sabin được gọi là virus bại liệt chủng Sabin. Gần đây, virus bại liệt bất hoạt Sabin, được tạo ra bằng cách làm bất hoạt virus bại liệt chủng Sabin bằng fomalin, đã được nghiên cứu ở dạng thuốc tiêm và cũng đã bắt đầu được phát triển thành các sản phẩm thương mại. Vaccin sIPV gồm 3 chủng khác nhau: typ 1, typ 2, và typ 3. Cho đến nay, vaccin wIPV đã được sử dụng rộng rãi. Gần đây, tuy nhiên theo chính sách xóa bỏ virus bại liệt kiểu đại của WHO, sIPV đã được nghiên cứu và phát triển thành các sản phẩm thương mại.

Theo sáng chế, vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) là vaccin có cấu trúc là các hạt tương tự virus (VLP) được điều chế bằng thao tác di truyền trên kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg). Viêm gan B là bệnh gây ra bởi sự tấn công của virus viêm gan B lên tế bào gan, do đó làm mất chức năng gan, xơ gan hoặc ung thư gan.

Theo sáng chế, vaccin *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) là vaccin liên hợp được điều chế bằng cách kết hợp một protein mang với polyribozo ribitol phosphat (PRP), là polysaccarit trên bề mặt màng của *Haemophilus influenzae* typ b. Khoảng 95% các bệnh truyền nhiễm như viêm màng não và nhiễm trùng máu là do *Haemophilus influenzae* typ b gây ra, và do đó *Haemophilus influenzae* là tác nhân gây bệnh chính trong số vi khuẩn gây viêm màng não ở trẻ sơ sinh.

Trong khi đó, theo sáng chế, thuốc tiêm vaccin đa liều bắt buộc phải sử dụng chất bảo quản để tránh lây nhiễm bởi vi sinh vật trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng. Đối với các sản phẩm vaccin kết hợp xuất khẩu sang các nước kém phát triển bởi liên hợp quốc, v.v., vaccin đa liều có chứa chất bảo quản được ưu tiên hơn, khi xét đến môi trường ở các quốc gia mà vaccin được sử dụng, cách phân phối, chi phí, v.v..

Các ví dụ về chất bảo quản được sử dụng trong các sản phẩm vaccin gồm thimerosal, 2-PE, phenol, v.v., và liều lượng thông thường của các chất bảo quản này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản. Cụ thể là, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa 2-PE với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL hoặc có thể chứa fomaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL, và đặc biệt là, có thể chứa 2-PE với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL và fomaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL.

Theo phương án minh họa, các chế phẩm chứa vaccin kết hợp hóa trị sáu, gồm vaccin (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP), vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HDsAg), và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) và nhôm photphat; và 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản theo nồng độ được điều chế, và khả năng kháng khuẩn của chế phẩm được đo lại. Vì thế mà, khi chế phẩm chứa 2-PE với hàm lượng khoảng từ 7,2 mg/mL hoặc 8,5 mg/mL và fomaldehyt với hàm lượng khoảng từ 135 µg/mL hoặc 150 µg/mL, các hàm lượng này được xác định là có khả năng kháng khuẩn thỏa mãn yêu cầu bởi Dược điển Châu Âu mục B (EP-B).

Từ những điều nêu trên, xác nhận được rằng khi vaccin kết hợp hóa trị sáu chỉ chứa 2-PE với nồng độ đã mô tả ở trên hoặc chỉ chứa fomaldehyt, vaccin kết hợp hóa trị sáu theo sáng chế có thể không có được khả năng kháng khuẩn thỏa mãn các yêu cầu của Dược điển Châu Âu mục B, trong khi việc sử dụng kết hợp 2-PE và fomaldehyt có hiệu quả hiệp đồng trong khả năng kháng khuẩn và khi 2-PE và fomaldehyt được sử dụng với nồng độ đã mô tả ở trên, vaccin kết hợp hóa trị sáu theo sáng chế có thể có khả năng kháng khuẩn thỏa mãn các yêu cầu của Dược điển Châu Âu mục B.

Trong khi đó, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa thêm chất phụ gia được dụng, và chất phụ gia có thể là nhôm photphat, nhôm hydroxit, hoặc tổ hợp của chúng. Cụ thể là, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa chất phụ gia với hàm lượng là 1,25 mg/mL hoặc thấp hơn, và cụ thể là với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 mg/mL đến 1,25 mg/mL.

Như đã sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất phụ gia” dùng để chỉ chất giúp cải thiện tính sinh miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Theo đó, chất phụ gia thường được sử dụng nhằm mục đích tăng cường đáp ứng miễn dịch và được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Có thể dễ dàng thu được chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bằng cách sử dụng phương pháp và kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và chế phẩm có thể được dùng theo nhiều đường khác nhau, tốt hơn nếu dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc qua mũi. Chế phẩm theo sáng chế còn có thêm chất vận chuyển được dụng, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất đẳng trương, chất nhũ hóa, hoặc chất làm ẩm. Các ví dụ về chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc qua mũi bao gồm dung dịch dạng tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước, là dung dịch chứa chất tan tạo thành chế phẩm cho chất chống oxi hóa, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn, và dịch thể của đối tượng trong đẳng trương mô; và huyền phù vô trùng chứa nước và không chứa nước có chứa chất tạo huyền phù hoặc chất làm đặc. Các thành phần sinh miễn dịch hoạt hóa thường được trộn lẫn với tá dược được dụng, ví dụ, nước, nước muối, dextrozơ, glyxerol, etanol, v.v.. Ngoài ra, chế phẩm sinh miễn dịch còn có thể chứa một lượng nhỏ các chất bổ trợ, ví dụ, chất làm ẩm, chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất kết dính, chất mang, hoặc chất bảo quản.

Chế phẩm vaccin kết hợp hóa trị sáu có thể còn chứa chất đệm. Đệm trong chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế đóng vai trò duy trì pH của dung dịch để ngăn không cho pH thay đổi quá nhanh, và các ví dụ ưu tiên về đệm có thể bao gồm đệm photphat, đệm histidin, đệm xitrat, đệm Tris, v.v..

Chế phẩm theo sáng chế còn chứa chất đẳng trương. Các ví dụ về chất đẳng trương bao gồm amino axit, rượu đa trị, natri clorua, v.v., và chất đẳng trương đóng vai trò duy trì áp suất thẩm thấu *in vivo* thích hợp khi vaccin được dùng dưới dạng lỏng vào trong cơ thể.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa tá dược được dụng. Các ví dụ về tá dược có thể bao gồm đường và polyol, chất hoạt động bề mặt, polyme, v.v.. Các ví dụ về đường và polyol có thể được sử dụng bao gồm sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, galactoza, mannitol, sorbitol, glyxerol, v.v.. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt gồm chất hoạt động bề mặt phi ion như polysorbat 20, polysorbat 80, v.v.. Các ví dụ về polyme bao gồm dextran, cacboxymetylxenluloza, axit hyaluronic, xyclodextrin, v.v..

Các chất này được sử dụng một mình hoặc sử dụng kết hợp với hai hoặc nhiều chất khác, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể lựa chọn chất thích hợp để sử dụng.

Chế phẩm theo sáng chế có pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0, nhưng không chỉ giới hạn ở giá trị pH này.

Theo phương án minh họa, các tác giả sáng chế đã điều chế chế phẩm sinh miễn dịch sử dụng vaccin kết hợp hóa trị sáu, gồm vaccin (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP), vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HDsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) và điều chỉnh giá trị pH của chế phẩm thành 6,7.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa vaccin kết hợp đa giá, gồm vaccin (D), vaccin uốn ván (T) hoặc vaccin ho gà toàn tế bào (wP), vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HDsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin, và cụ thể là vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) có thể gồm typ 1, typ 2, và typ 3. Vaccin kết hợp đa giá gồm vaccin bạch hầu (D) với lượng nằm trong khoảng từ 10 Lf/mL đến 50 Lf/mL; vaccin uốn ván (T) với lượng nằm trong khoảng từ 5 Lf/mL đến 30 Lf/mL; vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với lượng nằm trong khoảng từ 20 OU/mL đến 50 OU/mL; vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 30 µg/mL; vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 20 µg/mL; và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV), bao gồm typ 1, typ 2, và typ 3, trong đó typ 1 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 5 DU/mL đến 100 DU/mL, typ 2 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 DU/mL đến 100 DU/mL, và typ 3 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 DU/mL đến 120 DU/mL.

Theo phương án minh họa, các tác giả sáng chế đã điều chế chế phẩm sinh miễn dịch sử dụng vaccin kết hợp hóa trị sáu, gồm vaccin bạch hầu (D) với hàm lượng khoảng 30 Lf/mL; vaccin uốn ván (T) với hàm lượng khoảng 20 Lf/mL; vaccin ho gà toàn tế bào (wP) với hàm lượng khoảng 36 OU/mL; vaccin viêm gan B (HBsAg) với hàm lượng khoảng 20 µg/mL; vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b với hàm lượng khoảng 10 µg/mL; và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV), trong đó typ 1 có hàm lượng là 10 DU/mL, typ 2 có hàm lượng là 16 DU/mL, typ 3 có hàm lượng là 32 DU/mL; hoặc chế phẩm sinh miễn dịch, gồm vaccin bạch hầu (D) với hàm lượng khoảng 30 Lf/mL; vaccin uốn ván (T) với hàm lượng khoảng 20 Lf/mL; vaccin ho gà toàn tế bào (wP) với hàm lượng khoảng 36 OU/mL; vaccin viêm gan B (HBsAg) với hàm lượng khoảng 20 µg/mL; vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b với hàm lượng khoảng 10 µg/mL; và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV), trong đó typ 1 có hàm lượng là 60 DU/mL, typ 2 có hàm lượng là 64 DU/mL, typ 3 có hàm lượng là 90 DU/mL.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, bao gồm các bước:

(a) trộn vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với nhôm photphat, nhôm hydroxit hoặc tổ hợp của chúng;

(b) bổ sung thêm vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) vào hỗn hợp trong bước (a) và trộn đều; và

(c) bổ sung thêm 2-PE và fomaldehyt vào hỗn hợp trong bước (b), trộn đều và điều chỉnh pH cuối cùng của hỗn hợp thành 5,5 đến 8.

Theo sáng chế, vaccin kết hợp đa giá, đa liều, vaccin bạch hầu, vaccin uốn ván, vaccin ho gà toàn tế bào hoặc vaccin ho gà vô bào, vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), vaccin bại liệt bất hoạt Sabin, v.v., là giống nhau như đã giải thích ở trên.

Theo phương án minh họa, các tác giả sáng chế đã cho thêm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP), và nhôm photphat

(Brenntag) với nồng độ 1 mg/mL được thêm vào và khuấy đều để trộn chúng lại với nhau. Hỗn hợp sau đó được xử lý với vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) theo thứ tự này và trộn đều. Cuối cùng, bổ sung thêm 2-PE và fomaldehyt theo nồng độ, trộn đều, và cuối cùng pH của hỗn hợp được điều chỉnh thành 6,7.

Theo phương án minh họa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa lây nhiễm ở cá thể bao gồm cho đối tượng dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng theo cách thông thường và theo bất kỳ cách nào có hiệu quả bao gồm cung cấp cục bộ, theo đường miệng, theo đường hậu môn, trong tĩnh mạch, trong bụng, trong cơ, dưới da, trong mũi, và trong da.

Như đã sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ động vật nhân thực đa bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở động vật đa bào, động vật có vú, ovids, bò, chim, linh trưởng và con người.

Theo sáng chế, lây nhiễm ở trên có thể gọi là lây nhiễm được gây ra bởi vi khuẩn ho gà, virus bại liệt, virus bạch hầu, virus uốn ván, virus viêm gan B, và virus *Haemophilus influenzae* typ b.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết cùng với các phương án minh họa kèm theo. Tuy nhiên, các phương án minh họa này được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được coi là làm giới hạn phạm vi kỹ thuật của sáng chế.

Ví dụ 1: Quy trình và tiêu chuẩn đối với thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của các vaccin

Theo sáng chế, thử nghiệm khả năng kháng khuẩn được thực hiện theo tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu mục B (EP-B) do WHO đặt ra đối với các sản phẩm vaccin, giữa Dược điển châu Âu và Dược điển Mỹ (USP).

Theo các chi tiết cụ thể của thử nghiệm, có tổng số bốn loại vi sinh vật khác nhau bao gồm hai loại vi khuẩn khác nhau (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO.

9027, PA) và *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA)), một nấm men (*Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA)), và một nấm (*Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN)) lần lượt được cấy với hàm lượng từ khoảng từ 10^5 đến 10^6 đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU)/mL vào trong chế phẩm vaccin tại 0 giờ. Sau đó, thu lấy các mẫu tại 24 giờ, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày, nuôi cấy trong môi trường rắn, và đếm số lượng khuẩn lạc từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5.

Các tiêu chuẩn để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bởi Dược điển Châu Âu mục B và Dược điển của các quốc gia khác đối với các kết quả theo phương pháp nêu trên sẽ được trình bày trong bảng 1 bên dưới.

Bảng 1

	Tiêu chuẩn dược điển	Giảm theo hàm log (giảm theo hàm log CFU/mL)				
		6 giờ	24 giờ	7 ngày	14 ngày	28 ngày
Vi khuẩn	EP-A	2	3			NR*
	EP-B	-	1	3	-	NI**
	USP	-	-	1	3	NI
	JP	-	-	-	3	NI
Nấm và nấm men	EP-A	-	-	2	-	NI
	EP-B	-	-	-	1	NI
	USP	-	-	NI	NI	NI
	JP	-	-	-	NI	NI

*NR: Không thu được

**NI: Không tăng

Như được xác nhận trong bảng 1 ở trên, tiêu chuẩn được đặt ra bởi Dược điển châu Âu nghiêm ngặt hơn so với tiêu chuẩn của Dược điển Mỹ hoặc Dược điển Nhật Bản, và cụ thể là, Dược điển châu Âu được chia ra thành các mục A và B tùy theo chế phẩm. Tiêu chuẩn được đặt ra bởi WHO là Dược điển Châu Âu mục B (EP-B) (EP 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation, USP 37-51, Antimicrobial effectiveness

testing).

Các tác giả sáng chế, trong khi nghiên cứu vaccin kết hợp hóa trị sáu gồm các vaccin D, T, wP, Hib, HBsAg, và IPV, có thực hiện thử nghiệm khả năng kháng khuẩn bằng cách bổ sung thêm 2-PE, là chất thường được sử dụng làm chất bảo quản trong vaccin IPV trong lĩnh vực kỹ thuật, với nồng độ là 5 mg/mL vào trong vaccin kết hợp. Tuy nhiên, bất ngờ là kết quả thỏa mãn, không đáp ứng tiêu chuẩn có thể chấp nhận về khả năng kháng khuẩn.

Tuy nhiên, việc tăng hiệu lực một cách không thận trọng của hàm lượng 2-PE (chất bảo quản) để đáp ứng các tiêu chuẩn đặt ra có thể làm tăng các vấn đề về an toàn cho trẻ nhỏ, là những đối tượng nhận vaccin kết hợp, và cũng tác động đến việc sản xuất và độ ổn định của sản phẩm cuối cùng, và do đó quyết định bắt buộc phải thật cẩn thận. Hàm lượng (các) chất bảo quản có trong vaccin nên được lựa chọn để đáp ứng các yêu cầu được chỉ ra trong Dược điển Mỹ, Dược điển châu Âu, Dược điển WHO, hoặc tổ hợp của các dược điển liên quan đến độ an toàn của vaccin.

Về vấn đề này, các tác giả sáng chế đã tiến hành các thử nghiệm cùng với nỗ lực nghiên cứu chế phẩm mới có thể đáp ứng các yêu cầu về khả năng kháng khuẩn bằng cách chứa một lượng rất nhỏ 2-PE làm chất bảo quản trong vaccin kết hợp hóa trị sáu, bao gồm vaccin wP và IPV, và vì thế, thu được các kết quả dưới đây.

Ví dụ 2: Điều chế vaccin kết hợp hóa trị sáu có chứa 2-PE làm chất bảo quản

Vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) được xử lý với nhôm photphat (Brenntag) với nồng độ 1 mg/mL và được khuấy để trộn đều. Sau đó, vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) lần lượt được thêm vào và trộn đều. Cuối cùng, bổ sung thêm 2-PE, trộn đều, và cuối cùng pH của hỗn hợp được điều chỉnh thành 6,7.

Cụ thể là, nồng độ của mỗi thành phần trong vaccin kết hợp như sau: D: 30 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; wP: 36 OU/mL; vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg): 20 µg/mL; Hib: 10 µg/mL; và sabin IPV (typ 1: 60 DU/mL; typ 2: 64 DU/mL; typ 3: 90 DU/mL).

Vaccin kết hợp được điều chế trong ví dụ so sánh từ 1 đến 3 theo nồng độ 2-PE,

và hàm lượng của 2-PE được đo bằng cách sử dụng HPLC và các kết quả thu được được trình bày trong bảng 2 dưới đây. Đối với fomaldehyt, hàm lượng được đo bằng cách phân tích sử dụng phương pháp phản ứng màu. Fomaldehyt giải độc tổ hoặc làm bất hoạt các vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) trong số các kháng nguyên tạo thành vaccin kết hợp hóa trị sáu, và do đó các giá trị đo được đại diện cho fomaldehyt có nguồn gốc từ dung dịch chứa kháng nguyên còn lại trong vaccin kết hợp hóa trị sáu.

Bảng 2

	Nồng độ PE đích	Giá trị thử nghiệm của PE	Giá trị thử nghiệm của fomaldehyt
Ví dụ so sánh 1	5,2 mg/mL	5,2 mg/mL	37,0 µg/mL
Ví dụ so sánh 2	6,5 mg/mL	6,7 mg/mL	37,5 µg/mL
Ví dụ so sánh 3	7,8 mg/mL	8,0 mg/mL	37,3 µg/mL

Như được xác nhận trong bảng 2 ở trên, 2-PE làm chất bảo quản có nồng độ nằm trong nồng độ đích và xác nhận được rằng fomaldehyt có nồng độ là khoảng 37 µg/mL (bảng 2).

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn

Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn được thực hiện theo phương pháp thử nghiệm được mô tả trong EP-B. Chế phẩm vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ so sánh 1 đến 3 được cấy với tổng số bốn vi sinh vật bao gồm hai loại vi khuẩn khác nhau (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO. 9027, PA) và *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA)), một nấm men (*Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA)), và một nấm (*Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN)) với lượng nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6 CFU/mL trong chế phẩm vaccin tại 0 giờ. Sau đó, thu lấy các mẫu vi khuẩn tại 0 giờ, 24 giờ, 7 ngày, và 28 ngày, nuôi cấy trong môi trường rắn và đếm số lượng khuẩn lạc từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 và tính toán độ giảm theo hàm log của các khuẩn lạc. Thu lấy các mẫu nấm men và nấm tại 0 giờ, 14 ngày, và 28 ngày, nuôi cấy trong môi trường rắn và đếm số lượng khuẩn lạc từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 và tính toán độ giảm theo hàm log của các khuẩn lạc. Các kết quả được trình bày trong Bảng 2 bên dưới.

Bảng 3

	Thời gian lấy mẫu	Giảm theo hàm log (giảm theo hàm log CFU/mL)					
		Vi khuẩn			Nấm và nấm men		
		P.A.	S.A.	Tiêu chuẩn EP-B	C.A.	A.N.	Tiêu chuẩn EP-B
Ví dụ so sánh 1 (2-PE: 5,0 mg/mL)	24 giờ	*NR	0,5	1 hoặc lớn hơn	-	-	-
	7 ngày	NR	2,1	3 hoặc lớn hơn	-	-	-
	14 ngày	-	-	-	3,4	0,7	1 hoặc lớn hơn
	28 ngày	NR	NR	**NI	NR	NR	NI
Ví dụ so sánh 2 (2-PE: 6,5 mg/mL)	24 giờ	NR	0,6	1 hoặc lớn hơn	-	-	-
	7 ngày	NR	2,0	3 hoặc lớn hơn	-	-	-
	14 ngày	-	-	-	4,6	1,1	1 hoặc lớn hơn
	28 ngày	NR	NR	NI	NR	4,0	NI
Ví dụ so sánh 3 (2-PE: 8,0 mg/mL)	24 giờ	NR	0,7	1 hoặc lớn hơn	-	-	-
	7 ngày	NR	2,2	3 hoặc lớn hơn	-	-	-
	14 ngày	-	-	-	NR	1,0	1 hoặc lớn hơn
	28 ngày	NR	NR	NI	NR	NR	NI

*NR: Không thu được

**NI: Không tăng

Theo như bảng 3, vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ so sánh 1 đến 3 chứa 2-PE với hàm lượng nằm trong khoảng 5 mg/mL đến 8 mg/mL không vượt qua được tiêu chuẩn của thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của EP-B đối với *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA). Vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ so sánh 1 đến 3 đáp ứng các tiêu chuẩn thử nghiệm của EP-B đối với *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO. 9027, PA) và *Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA) và vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ so sánh 2 và 3 đáp ứng các tiêu chuẩn thử nghiệm của EP-B đối với *Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN). Vì thế mà, xác nhận được rằng khi

vacxin kết hợp chứa 2-PE với hàm lượng nằm trong khoảng 5 mg/mL đến 8 mg/mL, vacxin kết hợp không đáp ứng khả năng kháng khuẩn của EP-B. Các vacxin chứa IPV trong lĩnh vực kỹ thuật thường chứa 2-PE làm chất bảo quản với hàm lượng khoảng 5 mg/mL. Tuy nhiên, trái ngược với mong đợi, vacxin kết hợp hóa trị sáu theo sáng chế không đáp ứng khả năng kháng khuẩn cần có của EP-B, thậm chí khi nồng độ 2-PE tăng lên đến 8,0 mg/mL.

Đối với việc sàng lọc các chất bảo quản, phương pháp sàng lọc đối với các chất bảo quản có thể làm giảm tối thiểu hàm lượng 2-PE nằm trong khoảng các chất bảo quản được sử dụng trong các sản phẩm vacxin hiện có sử dụng 2-PE với độ ổn định được chứng nhận của kháng nguyên IPV trong vacxin chứa IPV đã được thiết kế. Từ những kết quả được trình bày trong bảng 3, vacxin kết hợp hóa trị sáu chứa 2-PE được trình bày có khả năng kháng khuẩn kém đối với *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA), và do đó việc sàng lọc các chất bảo quản được tiến hành trực tiếp hướng tới việc chọn lọc (các) chất bảo quản đáp ứng tiêu chuẩn theo EP-B tại 24 giờ đối với SA.

Ví dụ 4: Điều chế vacxin kết hợp hóa trị sáu có chứa 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản

Vacxin bạch hầu (D), vacxin uốn ván (T), và vacxin ho gà toàn tế bào (wP) được xử lý với nhôm photphat (Brenntag) với nồng độ 1 mg/mL và được khuấy để trộn đều. Sau đó, vacxin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vacxin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vacxin bại liệt bất hoạt lần lượt được thêm vào và trộn đều. Cuối cùng, bổ sung thêm 2-PE và fomaldehyt, trộn đều, và cuối cùng pH của hỗn hợp được điều chỉnh thành 6,7.

Cụ thể làm nồng độ của mỗi thành phần trong vacxin kết hợp như sau: D: 30 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; wP: 36 OU/mL; vacxin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg): 20 µg/mL; Hib: 10 µg/mL; và sabin IPV (typ 1: 10 DU/mL; typ 2: 16 DU/mL; typ 3: 32 DU/mL).

Các nồng độ khác nhau của 2-PE và fomaldehyt trong các ví dụ so sánh đã được tóm tắt trong bảng 4 dưới đây. Trong các ví dụ 1, 4, 7, và 10, fomaldehyt không được thêm vào. Nồng độ của 2-PE được đo bằng phân tích HPLC và nồng độ của fomaldehyt được đo bằng phương pháp phản ứng màu. Các kết quả được trình bày

trong Bảng 4 bên dưới.

Bảng 4

	Nồng độ 2-PE đích (mg/mL)	Giá trị thử nghiệm của 2-PE (mg/mL)	Nồng độ fomaldehyt đích ($\mu\text{g/mL}$)	Giá trị thử nghiệm của fomaldehyt ($\mu\text{g/mL}$)
Ví dụ thử nghiệm 1	5,0	5,1	-	37,3
Ví dụ thử nghiệm 2	5,0	5,0	100	91,0
Ví dụ thử nghiệm 3	5,0	5,0	150	140,9
Ví dụ thử nghiệm 4	6,0	5,8	-	37,5
Ví dụ thử nghiệm 5	6,0	5,6	100	91,5
Ví dụ thử nghiệm 6	6,0	6,0	150	142,3
Ví dụ thử nghiệm 7	7,2	6,9	-	37,2
Ví dụ thử nghiệm 8	7,2	7,1	100	91,8
Ví dụ thử nghiệm 9	7,2	7,2	150	142,9
Ví dụ thử nghiệm 10	8,5	8,2	-	37,3
Ví dụ thử nghiệm 11	8,5	8,3	100	93,7
Ví dụ thử nghiệm 12	8,5	8,5	130	127,1
Ví dụ thử nghiệm 13	8,5	8,5	150	142,8

Như có thể thấy trong bảng 4, xác nhận được rằng nồng độ của 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản có trong vaccin kết hợp hóa trị sáu phù hợp với các giá trị đích. Trong các ví dụ 1, 4, 7, và 10, vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin bại liệt bất hoạt (IPV), trong số các kháng nguyên tạo thành vaccin kết hợp hóa trị sáu mà không có thêm 2-PE, được giải độc tố hoặc làm bất hoạt với fomaldehyt, và do đó fomaldehyt có nguồn gốc từ dung dịch chứa kháng nguyên còn lại trong vaccin kết hợp hóa trị sáu và nồng độ fomaldehyt được xác nhận là khoảng 37 $\mu\text{g/mL}$. Sau khi xác nhận nồng độ của các chất bảo quản, tiến hành thử nghiệm khả năng kháng

khuẩn.

Ví dụ 5: Sàng lọc khả năng kháng khuẩn

Để sàng lọc khả năng kháng khuẩn, *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA), không dễ dàng bị giết bởi 2-PE, được lựa chọn làm vi khuẩn để sàng lọc dựa trên kết quả đã xác nhận trong ví dụ 3, và thử nghiệm được tiến hành trực tiếp hướng tới việc chọn lọc tổ hợp của mỗi liều 2-PE và fomaldehyt, là liều đáp ứng các tiêu chuẩn của EP-B bằng cách đánh giá khả năng kháng khuẩn sử dụng các mẫu được thu tại 24 giờ. Theo đó, tiến hành thử nghiệm theo phương pháp thử nghiệm trong EP-B.

Cụ thể là, chế phẩm vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ thử nghiệm từ 1 đến 3, được điều chế trong ví dụ 4, được cấy với *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA) với lượng nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6 CFU/mL vào trong chế phẩm vaccin tại 0 giờ. Thu lấy các mẫu tại 0 giờ và 24 giờ, nuôi cấy trong môi trường rắn và đếm số lượng khuẩn lạc từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 và tính toán độ giảm theo hàm log của các khuẩn lạc. Các kết quả được trình bày trong Bảng 5 bên dưới.

Bảng 5

	Nồng độ 2-PE đích (mg/mL)	Nồng độ fomaldehyt đích (µg/mL)	Khả năng kháng khuẩn SA (24 giờ) Tiêu chuẩn EP-B
Ví dụ thử nghiệm 1	5,0	-	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 2	5,0	100	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 3	5,0	150	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 4	6,0	-	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 5	6,0	100	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 6	6,0	150	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 7	7,2	-	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 8	7,2	100	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 9	7,2	150	Đạt

Ví dụ thử nghiệm 10	8,5	-	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 11	8,5	100	Thất bại
Ví dụ thử nghiệm 12	8,5	130	Đạt
Ví dụ thử nghiệm 13	8,5	150	Đạt

Như thấy trong bảng 5 ở trên, khả năng kháng khuẩn của SA vượt qua tiêu chuẩn của EP-B, bắt đầu từ tổ hợp của mỗi liều 2-PE (7,2 mg/mL) và fomaldehyt (150 µg/mL). Bất ngờ khi các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng việc kết hợp 2-PE và fomaldehyt, làm chất bảo quản, mang lại hiệu quả hiệp đồng trong khả năng kháng khuẩn và tổ hợp của mỗi liều 2-PE (7,2 mg/mL) và fomaldehyt (150 µg/mL) hoặc cao hơn rất thích hợp làm chất bảo quản dùng cho vaccin kết hợp hóa trị sáu đa liều.

Dựa trên các kết quả ở trên, các tác giả sáng chế tiếp tục nghiên cứu phát triển vaccin kết hợp hóa trị sáu đa liều có chứa 2-PE (5 mg/mL), thường được sử dụng trong vaccin chứa IPV hiện có, để giải quyết vấn đề thiếu khả năng kháng khuẩn.

Ví dụ 6: Điều chế vaccin kết hợp hóa trị sáu có chứa 2-PE (8,5 mg/mL) và fomaldehyt (150 µg/mL)

Vaccin kết hợp hóa trị sáu với chế phẩm thể hệ mới, tức là, chế phẩm trong ví dụ thử nghiệm 14, được điều chế dựa trên các kết quả trong ví dụ 5. Cụ thể là, vaccin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ thử nghiệm 14 được điều chế theo phương pháp được mô tả ở trên. Vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) được xử lý với nhôm photphat (Brenntag) với nồng độ 1 mg/mL và được khuấy để trộn đều. Sau đó, vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vaccin bại liệt bất hoạt lần lượt được thêm vào và trộn đều. Cuối cùng, 2-PE (8,5 mg/mL) và fomaldehyt (115 µg/mL) được thêm vào đó để nồng độ cuối cùng là 150 µg/mL, trộn đều, và điều chỉnh pH cuối cùng của hỗn hợp thành 6,7. Cụ thể làm nồng độ của mỗi thành phần trong vaccin kết hợp như sau: D: 30 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; wP: 36 OU/mL; vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg): 20 µg/mL; Hib: 10 µg/mL; và sabin IPV (typ 1: 60 DU/mL; typ 2: 64 DU/mL; typ 3: 90 DU/mL).

Theo kết quả được thực hiện trong thử nghiệm khả năng kháng khuẩn trên

vacxin kết hợp hóa trị sáu trong ví dụ thử nghiệm 14 theo phương pháp trong ví dụ 3, vacxin kết hợp được xác nhận là đáp ứng tiêu chuẩn của EP-B. Hàm lượng của chất bảo quản được thử nghiệm sau khi bảo quản vacxin kết hợp tại 37°C trong hai tuần và tỷ lệ thu hồi của hàm lượng 2-PE và fomaldehyt được bộc lộ nằm trong khoảng từ 90% đến 110%, do đó xác nhận rằng vacxin kết hợp được giữ ổn định mà không mất đi chất bảo quản.

Ví dụ 7: Điều chế vacxin kết hợp hóa trị sáu và thử nghiệm khả năng kháng khuẩn

Sản phẩm vacxin kết hợp hóa trị sáu cuối cùng được điều chế bằng cách thay đổi thành phần trong vacxin ho gà bị bất hoạt, là thành phần của vacxin kết hợp hóa trị sáu, và sản phẩm được đưa đi thử nghiệm khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp trong ví dụ 3. Trong điều chế sản phẩm vacxin, vacxin bạch hầu (D), vacxin uốn ván (T), và vacxin ho gà toàn tế bào (wP) được xử lý với nhôm photphat (Brenntag) với nồng độ 1 mg/mL và được khuấy để trộn đều. Sau đó, vacxin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vacxin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vacxin bại liệt bất hoạt lần lượt được thêm vào và trộn đều. Cuối cùng, 2-PE được thêm vào với nồng độ cuối cùng là 8,5 mg/mL và fomaldehyt được thêm vào thành nồng độ cuối cùng là 130 µg/mL, trộn đều, và điều chỉnh pH cuối cùng của hỗn hợp thành 6,7. Cụ thể làm nồng độ của mỗi thành phần trong vacxin kết hợp như sau: D: 30 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; wP: 36 OU/mL; vacxin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg): 20 µg/mL; Hib: 10 µg/mL; và IPV (chế phẩm của vacxin ho gà bị bất hoạt được trình bày trong bảng 6 bên dưới).

Bảng 6

Vacxin ho gà Sabin bất hoạt (DU/mL)				Các kháng nguyên khác	Chất bảo quản
Typ 1	Typ 2	Typ 3		D: 30 Lf/mL; T: 20 Lf/mL; wP: 36 OU/mL; vacxin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg): 20	(2-PE: 8,5 mg/mL Fomaldehyt: 130 µg/mL

				Hib: 10 µg/mL	
Ví dụ thử nghiệm 15	10	64	32		
Ví dụ thử nghiệm 16	10	32	32		
Ví dụ thử nghiệm 17	10	16	32		

Bởi vì thử nghiệm khả năng kháng khuẩn trong vaccin kết hợp trong ví dụ thử nghiệm 15 đến 17 được đưa đi thử nghiệm khả năng kháng khuẩn theo phương pháp trong ví dụ 3, và tất cả chúng đều được xác nhận là đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn EP-B.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra việc kết hợp tối ưu đối với mỗi liều 2-PE và fomaldehyt làm chất bảo quản, vaccin kết hợp hóa trị sáu đa liều gồm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP), vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), và vaccin bại liệt bất hoạt được cải thiện (IPV), có đó có khả năng tạo ra chế phẩm đa liều có khả năng duy trì khả năng kháng khuẩn của vaccin kết hợp hóa trị sáu trên cơ sở vaccin ho gà toàn tế bào (wP).

Tổng quát từ những kết quả ở trên, xác nhận được rằng tổ hợp của 2-PE và fomaldehyt theo sáng chế là chất bảo quản tuyệt vời có khả năng duy trì được khả năng kháng khuẩn của vaccin kết hợp và cũng được sử dụng hiệu quả để tạo ra chế phẩm đa liều có khả năng duy trì khả năng kháng khuẩn của vaccin kết hợp đa giá.

Từ những điều nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế liên quan đến có thể hiểu rõ rằng sáng chế được thể hiện ở các dạng cụ thể mà không thay đổi khái niệm kỹ thuật hoặc đặc tính cần thiết của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án minh họa được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được coi là làm giới hạn phạm vi kỹ thuật của sáng chế. Ngược lại, sáng chế được dự định để bao phủ không chỉ các phương án minh họa mà còn các phương án thay thế khác nhau, các biến thể, các phương án tương đương, và các phương án khác nằm trong nội dung và phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ đính kèm

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, trong đó:
 - (i) vaccin kết hợp dạng lỏng đa giá gồm vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP), và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV); và
 - (ii) chế phẩm chứa 2-phenoxyetanol (2-PE) và fomaldehyt (HCHO) làm chất bảo quản;trong đó chế phẩm có chứa 2-phenoxyetanol với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL và fomaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vaccin kết hợp đa giá còn chứa thêm vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) và vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib).
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm còn chứa thêm chất phụ gia được dùng, trong đó chất phụ gia là nhôm photphat, nhôm hydroxit, hoặc tổ hợp của chúng.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm có chứa chất phụ gia với lượng nằm trong khoảng 1,25 mg/mL hoặc ít hơn.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm còn có thêm chất vận chuyển được dùng, tá dược, chất kết dính, chất mang, chất bảo quản, chất đệm, chất đẳng trương, chất nhũ hóa, hoặc chất làm ẩm.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có pH từ 5,5 đến 8.
7. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó vaccin kết hợp đa giá bao gồm vaccin bạch hầu (D) với lượng nằm trong khoảng từ 10 Lf/mL đến 50 Lf/mL; vaccin uốn ván (T) với lượng nằm trong khoảng từ 5 Lf/mL đến 30 Lf/mL; vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với lượng nằm trong khoảng từ 20 OU/mL đến 50 OU/mL; vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 30 µg/mL; vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) với lượng nằm trong khoảng từ 5 µg/mL đến 20 µg/mL; và vaccin bại liệt bất

hoạt Sabin (sIPV), bao gồm typ 1, typ 2, và typ 3, trong đó typ 1 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 5 DU/mL đến 100 DU/mL, typ 2 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 DU/mL đến 100 DU/mL, và typ 3 có hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 DU/mL đến 120 DU/mL.

8. Phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch đa liều dùng cho vaccin kết hợp đa giá, gồm các bước:

(a) trộn vaccin bạch hầu (D), vaccin uốn ván (T), và vaccin ho gà toàn tế bào (wP) hoặc vaccin ho gà vô bào (aP) với nhôm photphat, nhôm hydroxit hoặc tổ hợp của chúng;

(b) bổ sung thêm vaccin viêm gan B (kháng nguyên viêm gan B, HBsAg), vaccin liên hợp *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) và vaccin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) vào hỗn hợp trong bước (a) và trộn đều; và

(c) bổ sung thêm 2-phenoxyethanol (2-PE) và fomaldehyt vào hỗn hợp trong bước (b), trộn đều, và điều chỉnh pH cuối cùng của hỗn hợp thành 5,5 đến 8;

trong đó chế phẩm có chứa 2-phenoxyetanol với lượng nằm trong khoảng từ 7 mg/mL đến 9,5 mg/mL và fomaldehyt với lượng nằm trong khoảng từ 120 µg/mL đến 180 µg/mL.