



(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)



1-0034282

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 7/00

(13) B

(21) 1-2018-01308

(22) 29/09/2016

(86) PCT/IN2016/000233 29/09/2016

(87) WO 2017/056101 06/04/2017

(30) 3122/Del/2015 30/09/2015 IN

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/07/2018 364A

(73) PANACEA BIOTEC LTD. (IN)

B-1 Extn./A-27, Mohan Co-Operative Industrial Estate, Mathura Road, New
Delhi 110044, India

(72) JAIN, Rajesh (IN); SINGH, Sukhjeet (IN); JAMBU, Lavit (IN).

(74) Văn phòng Luật sư Tân Hà (VPLS TAN HA)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN CHỨA VIRUT DENGUE SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC TÁI TỔ
HỢP VÀ KIT VACXIN BAO GỒM CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin chứa (a) bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp bao gồm virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31) và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30); và (b) albumin huyết thanh người và/hoặc gelatin hoặc gelatin thủy phân và/hoặc collagen hoặc collagen thủy phân; và kit vacxin bao gồm chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp và phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin ổn định. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ổn định và mô tả phương pháp sử dụng chế phẩm vaccin ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược đệm và tùy ý tá dược đệm, trong đó chủng virus dengue sống giảm độc lực này có nguồn gốc từ chủng virus dengue chứa đột biến hoặc đột biến loại bỏ $\Delta 30$ và/hoặc $\Delta 31$. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến tá dược ổn định để sử dụng trong chế phẩm vaccin và/hoặc chế phẩm miễn dịch đông khô chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vaccin và/hoặc chế phẩm miễn dịch đông khô chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp và tá dược ổn định này. Các khía cạnh khác của sáng chế được thể hiện trong phần mô tả, và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus dengue là virus thuộc chi virus gây sốt vàng da (*Flavivirus*), họ *Flaviviridae* cũng bao gồm virus sốt vàng, virus Tây sông Nin, virus viêm não Nhật Bản và virus viêm não do ve truyền. Bộ gen của virus gây sốt vàng da là phân tử ARN sợi đơn dương có chiều dài bằng 11kb chứa một khung đọc mã mở duy nhất. ARN này được dịch mã thành polyprotein được xử lý thành ít nhất 10 sản phẩm gen bao gồm 3 protein cấu trúc-protein capsit nhân hoặc protein lõi (C), protein tiền màng (prM), và protein vỏ (E) và 7 protein phi cấu trúc-protein NS1, protein NS2A, protein NS2B, protein NS3, protein NS4A, protein NS4B, và protein NS5. Virus dengue có bốn týp huyết thanh kháng nguyên phân biệt (DENV 1-4) được phát hiện bằng thử nghiệm trung hòa. Các týp huyết thanh này đều có khả năng gây ra tình trạng bệnh không triệu chứng cũng như hội chứng sốt dengue và hội chứng sốc dengue nguy hiểm và gây tử vong. Virus dengue lây truyền cho người chủ yếu qua trung gian muỗi vằn *Aedes mosquitoes* (*Aedes aegypti* và *Aedes albopictus*). Tỷ lệ mắc bệnh sốt xuất huyết dengue đặc biệt cao ở khu vực Châu Á Thái Bình Dương và châu Mỹ. Toàn bộ bốn týp huyết thanh của virus dengue hiện đang lưu hành tại các khu vực này. Do sự gia tăng giao thương quốc tế và biến đổi khí hậu, nên nhiều người không ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới cũng có nguy cơ mắc bệnh sốt xuất huyết dengue. Bệnh

sốt xuất huyết dengue đã trở thành một trong các bệnh virus lây lan qua vật truyền trung gian nguy hiểm nhất. Trong 20 năm qua, bệnh sốt xuất huyết dengue đã lây lan nhanh và tử nạn phổ biến ở hơn 100 quốc gia. Ước tính có khoảng 50 triệu ca mắc bệnh sốt xuất huyết dengue trên toàn cầu với khoảng 500000 ca nặng và 20000 ca tử vong mỗi năm. Khoảng hai phần năm dân số thế giới có nguy cơ mắc bệnh sốt xuất huyết dengue. Do đó, việc phòng ngừa và điều trị bệnh sốt xuất huyết dengue là vấn đề quan trọng đối với các chính phủ của nhiều quốc gia.

Bệnh sốt xuất huyết dengue đã trở thành gánh nặng rất lớn cả về tuổi thọ, đặc biệt là trẻ em lẫn trở ngại kinh tế đối với các nền kinh tế mới nổi trên thế giới để phòng ngừa bệnh này. Quá trình lây nhiễm sơ cấp với týp huyết thanh bất kỳ của virus dengue sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch kéo dài chống lại týp huyết thanh cụ thể này nhưng quá trình lây nhiễm thứ cấp với týp huyết thanh khác có thể làm tăng mức độ nghiêm trọng của bệnh do cơ chế tăng cường nhiễm trùng phụ thuộc kháng thể. Do đó, sự phát triển của vaccine an toàn với chi phí thấp và kháng đặc hiệu toàn bộ bốn týp huyết thanh có ý nghĩa quan trọng đối với các đối tượng dễ mắc bệnh là trẻ em và trẻ thanh thiếu niên.

Vaccine chứa virus dengue cần đáp ứng một số tiêu chuẩn thương mại. Thứ nhất, vaccine này phải có tác dụng bảo vệ chống lại một trong số bốn týp huyết thanh của virus dengue để giảm cơ chế tăng cường nhiễm trùng phụ thuộc kháng thể. Thứ hai, đáp ứng miễn dịch phải an toàn và không gây ra tác dụng không mong muốn bởi các kháng thể phản ứng chéo hoặc tế bào T phản ứng chéo. Thứ ba, chi phí phải hợp lý đối với các đối tượng cần sử dụng vaccine nhiều nhất. Vẫn có nhiều trở ngại cho sự phát triển của vaccine chứa virus dengue. Một trở ngại là cơ chế bệnh sinh của bệnh sốt xuất huyết dengue vẫn chưa được hiểu rõ. Một trở ngại khác là thiếu mô hình động vật thích hợp.

Hiện tại chưa hề có vaccine được cấp phép để điều trị bệnh sốt xuất huyết dengue mặc dù đã có vaccine để điều trị một số bệnh virus có mối liên hệ di truyền gần với virus dengue. Tổ chức Y tế Thế giới đã ưu tiên phát triển vaccine chứa virus dengue và được phẩm trong thời gian dài. Hiện nay, vaccine hoặc chế phẩm điều trị bất kỳ chứa virus dengue vẫn chưa được phát triển thành công, và khó duy trì được các chương trình kiểm soát vật truyền và bảo vệ từng đối tượng và các phương pháp này cũng đòi hỏi chi phí cao. Các chương trình kiểm soát vật truyền không đủ để kiểm soát sự lây lan của chúng virus dengue. Trong trường hợp không có phương pháp thay thế, sự phát triển của vaccine chứa virus dengue đã trở thành yêu cầu cấp thiết đối với sức khỏe cộng đồng. Tương tự

như các vacxin virus khác, sự thành công hay thất bại của vacxin chứa virus dengue có thể phụ thuộc vào kháng thể trung hòa. Quá trình lây nhiễm một typ virus dengue duy nhất tạo ra đáp ứng kháng thể kéo dài và tác dụng bảo vệ hữu hiệu chống lại chính typ virus này nhưng vẫn dễ bị lây nhiễm typ huyết thanh khác của virus dengue.

Các nỗ lực phát triển vacxin sống giảm độc lực được xem là một trong các phương pháp hiệu quả. Virus dengue thể đại có thể được giảm độc lực bằng một loạt bước cấy chuyển trong quy trình nuôi cấy mô để có thể được sử dụng trên người và duy trì khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Theo một phương án khác, vacxin thể khảm được sản xuất bằng cách cải biến vacxin chứa virus sốt vàng đã được cấp phép bằng các protein của virus dengue. Một đặc tính quan trọng khác của vacxin sống giảm độc lực là khả năng gây đáp ứng miễn dịch kéo dài rất giống với đáp ứng miễn dịch gây ra bởi virus thể đại. Một số vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực đã được phát triển và đánh giá ở người hoặc động vật linh trưởng không phải là người. Vacxin thứ nhất chứa virus dengue đột biến sống giảm độc lực đặc hiệu vật chủ đã được phát triển bằng một loại quá trình nuôi cấy các virus dengue thể đại trong não chuột nhắt và chọn lọc các đột biến được giảm độc lực cho người (Kimura, R. và Hotta, S. 1944 *Japanese J Bacteriology* 1 :96-99; Sabin, A.B. và Schlesinger, R.W. 1945 *Science* 101 :640; Wisseman, C.L. Jr. et al. 1963 *Am J Trop Med* 12:620-623). Mặc dù các vacxin virus này có khả năng sinh miễn dịch ở người, nhưng sự tiếp tục phát triển của các vacxin này đã bị hạn chế do chúng sinh trưởng kém trong dịch nuôi cấy tế bào. Các vacxin khác chứa virus DEN-1, DEN-2, DEN-3, và DEN-4 sống giảm độc lực đã được phát triển bằng một loạt bước cấy chuyển trong quy trình nuôi cấy mô (Angsubhakorn, S. et al. 1994 *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25:554-9; Bancroft, W.H. et al. 1981 *Infect Immuno* 31:698-703; Bhamarapravati, N. et al. 1987 *Bull World Health Organ* 65:189-95; Eckels, K.H. et al. 1984 *Am J Trop Med Hyg* 33:684-9; Hoke, C.H. Jr. et al. 1990 *Am J Trop Med Hyg* 43:219-26; Kanesa-athan, N. et al. 2001 *Vaccine* 19:3179-88) hoặc bằng phương pháp đột biến hóa học (McKee, K. T. Jr. et al. 1987 *Am J Trop Med Hyg* 36:435-42). Rất khó để đạt được cân bằng thích hợp giữa đặc tính giảm độc lực và đặc tính sinh miễn dịch đặc hiệu một trong số bốn typ huyết thanh của virus dengue bằng các phương pháp này và bảo chế thành công vacxin an toàn và gây đáp ứng miễn dịch chống lại một trong số bốn virus dengue (Kanesa-athan, N. et al. 2001 *Vaccine* 19:3179-88; Bhamarapravati, N. và Sutee, Y. 2000 *Vaccine* 18 Suppl 2: 44-7).

Mục tiêu của quá trình gây miễn dịch là bảo vệ chống lại bệnh sốt xuất huyết dengue bằng cách gây ra đáp ứng kháng thể trung hòa kéo dài chống lại một trong số bốn týp huyết thanh. Toàn bộ bốn týp huyết thanh đều cần được chống lại, do mức độ nghiêm trọng của bệnh có thể gia tăng ở những người đã có kháng thể kháng một virus dengue khác. Quá trình gây miễn dịch này có thể đạt được bằng vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực. Các tác giả sáng chế đã phát triển thành công vaccin như được mô tả trong WO1993006214, WO2002095075, WO2003092592 và WO2008022196. Các chủng virus dengue thể đại đã được giảm độc lực bằng cách tạo ra đột biến loại bỏ 30 nucleotit ở vùng không dịch mã đầu 3' của bộ gen virus tại National Institutes of Health (NIH), Atlanta, USA. Đột biến loại bỏ này đã tạo ra các chủng virus an toàn giảm độc lực hoàn toàn và xuất hiện ít trong máu như được quan sát trong một số nghiên cứu pha I bằng các chế phẩm chứa một chủng virus dengue trên khỉ và người.

Chế phẩm miễn dịch và chế phẩm vaccin chứa các hoạt chất sinh học, như virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, vi nấm, protein, polypeptit, glycoprotein, đặc biệt là vi sinh vật sống giảm độc lực, đặc biệt nhạy cảm với các điều kiện sản xuất, bào chế và bảo quản. Các hoạt chất sinh học này có thể bị biến đổi và phân hủy bởi các phản ứng hóa học (ví dụ phản ứng thủy phân, khử amin hóa, phản ứng Maillard), trong đó nhiều phản ứng này được xúc tác bởi nước. Môi trường nước cho phép các phân tử chuyển động và làm thay đổi cấu trúc protein trong chế phẩm vaccin chứa các hoạt chất sinh học. Để các hoạt chất sinh học ít bị biến đổi và phân hủy, cần hạn chế tiếp xúc với nước hoặc loại bỏ nước. Các phương pháp đã biết để tạo ra độ ổn định cho các hoạt chất sinh học chủ yếu bao gồm bước lạnh đông nước hoặc loại bỏ nước bằng quy trình đông khô.

Các virus dengue có bản chất không bền nhiệt và bị giảm khả năng lây nhiễm khi tiếp xúc với nhiệt độ cao. Để duy trì khả năng sống sót của virus này, cần có điều kiện bảo quản cực kỳ tối ưu (thường ở nhiệt độ thấp hơn -60°C). Tuy nhiên, trên thực tế, điều kiện bảo quản ở nhiệt độ thấp không phải là phương pháp tối ưu do gây biến đổi cấu trúc protein và chi phí bảo quản cao. Trên thực tế, vaccin cần ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C . Để tạo ra độ ổn định nhiệt cho virus dengue, cần có lượng tối ưu của các tá dược khác nhau, được chọn từ nhóm bao gồm tá dược ổn định, tá dược độn, tá dược dẫn thuốc và tá dược đệm.

Để sử dụng thành công vaccin, thì cần có phương pháp để xử lý và bào chế tối ưu chế phẩm này, để đảm bảo độ ổn định và duy trì hiệu lực trong các điều kiện vận chuyển

và bảo quản vacxin trước khi sử dụng. Quy trình đông khô là quy trình hữu hiệu để xử lý một số chế phẩm vacxin, đặc biệt là trong điều kiện áp suất thấp, quy trình đông khô loại bỏ nước bằng cách thăng hoa, và tạo ra chế phẩm dưới dạng bánh đông khô chứa lượng ẩm nhỏ. Quy trình này có thể có lợi cho vacxin, bao gồm vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực nêu trên, do vacxin này có xu hướng ổn định hơn ở môi trường có độ ẩm thấp. Yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình đông khô là công thức bảo chế của vacxin. Ví dụ, khi loại bỏ nước, tốt hơn nếu công thức bảo chế này tăng cường độ ổn định của chế phẩm. Thông thường, chế phẩm vacxin sẽ chứa thành phần bất kỳ hoặc toàn bộ các thành phần sau: tá dược độn, tá dược ổn định, và tùy ý tá dược đệm. Do đó, sự phát triển của các phương pháp và công thức bảo chế hữu hiệu là rất quan trọng đối với sự phát triển của vacxin thành công cả về mặt lâm sàng lẫn thương mại, bao gồm vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực.

Mặc dù có những tiến bộ trong lĩnh vực chế phẩm vacxin, nhưng vẫn có nhu cầu về chế phẩm vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực có độ ổn định và thời gian bán thải được cải thiện. Các chế phẩm đã biết đều không có độ ổn định cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đáp ứng nhu cầu nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp có độ ổn định cao.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ổn định chứa các chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin đông khô ổn định chứa các chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng chế phẩm vacxin chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này được chọn từ các chủng virus dengue chứa đột biến loại bỏ $\Delta 30$, bao gồm virus dengue 1, virus dengue 2, virus dengue 4 và virus dengue 3/4 hoặc các

chủng virus dengue thể khảm, bao gồm virus dengue 1/4, virus dengue 2/4, virus dengue 3/4 và virus dengue 4.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng chế phẩm vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này được chọn từ các chủng virus dengue chứa đột biến loại bỏ $\Delta 30$, bao gồm virus dengue 1, virus dengue 2, virus dengue 4 và virus dengue 3/4 hoặc các chủng virus dengue thể khảm, bao gồm virus dengue 1/4, virus dengue 2/4, virus dengue 3/4 và virus dengue 4.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này chứa đột biến $\Delta 30$ và/hoặc đột biến $\Delta 31$.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng chế phẩm vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này chứa đột biến $\Delta 30$ và/hoặc đột biến $\Delta 31$.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này được chọn từ một hoặc nhiều virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN-1 $\Delta 30$), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN-2/4 $\Delta 30$), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN-3 $\Delta 30/31$), và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN-4 $\Delta 30$).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng chế phẩm vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, tá dược ổn định, tá dược độn và tùy ý tá dược đệm, trong đó virus dengue sống giảm độc lực này được chọn từ một hoặc nhiều virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN-1 $\Delta 30$), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN-2/4 $\Delta 30$), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN-3 $\Delta 30/31$), và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN-4 $\Delta 30$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả thông qua một số phương án sau, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương án được thể hiện trong bộ yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ “sống” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ virus sống chưa bị bất hoạt, tức là virus có khả năng tái bản trên tế bào vật chủ. Virus dengue sống giảm độc lực là virus dengue không gây bệnh như virus dengue thể đại ở người hoặc động vật và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Thuật ngữ “đột biến $\Delta 30$ ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chủng virus dengue được tạo ra bằng cách loại bỏ 30 nucleotit khỏi vùng không dịch mã đầu 3'. Thuật ngữ “đột biến $\Delta 31$ ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chủng virus dengue được tạo ra bằng cách loại bỏ 31 nucleotit khỏi vùng không dịch mã đầu 3'. Đột biến $\Delta 30/31$ bao gồm đột biến $\Delta 30$ ban đầu và đột biến loại bỏ nucleotit thứ 31 không tiếp giáp. Đột biến $\Delta 31$ cũng có thể được thiết kế riêng để phân biệt vai trò của đột biến $\Delta 30$ hoặc đột biến $\Delta 31$ trong đột biến loại bỏ tổ hợp $\Delta 30/31$. WO2008022196 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ “virus thể khảm” và “virus dengue thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật lây nhiễm theo sáng chế chứa các trình tự nucleotit mã hóa khả năng sinh miễn dịch của virus dengue virus có một týp huyết thanh nhất định và các trình tự nucleotit bổ sung thu được từ bộ khung của virus dengue có týp huyết thanh khác.

Thuật ngữ “chứa” và “có” và các thuật ngữ tương tự có nghĩa như quy định theo Luật Patent Mỹ và có thể có nghĩa “bao gồm” và thuật ngữ tương tự; thuật ngữ “cấu thành chủ yếu từ” có nghĩa như quy định theo Luật Patent Mỹ và thuật ngữ này là thuật ngữ mở, cho phép có sự có mặt của nhiều hơn một yếu tố miễn là các đặc tính cơ bản hoặc các đặc tính mới của yếu tố này không bị thay đổi bởi sự xuất hiện của nhiều hơn một yếu tố đã bộc lộ nhưng không bao gồm các phương án đã biết.

Thuật ngữ “chế phẩm sinh miễn dịch” và “chế phẩm miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chế phẩm bất kỳ có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên hoặc tác nhân kháng nguyên quan tâm được biểu hiện từ các vector; ví dụ sau khi sử dụng cho đối tượng, gây đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên hoặc tác nhân kháng nguyên đích. Thuật ngữ “vaccine” và “chế phẩm vaccine” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chế phẩm bất kỳ gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại kháng nguyên quan tâm, hoặc chế phẩm bảo vệ hữu hiệu chống lại kháng nguyên; ví dụ sau khi sử dụng

hoặc tiêm cho đối tượng, tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại kháng nguyên hoặc tác nhân kháng nguyên đích hoặc tạo ra tác dụng bảo vệ hữu hiệu chống lại kháng nguyên hoặc tác nhân kháng nguyên được biểu hiện từ các vector.

Thuật ngữ “quy trình đông khô” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quy trình lạnh đông hỗn dịch, sau đó nước được loại bỏ bằng cách thăng hoa ở áp suất thấp. Thuật ngữ “thăng hoa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay đổi đặc tính vật lý của chế phẩm, trong đó chế phẩm thay đổi trực tiếp từ trạng thái rắn sang trạng thái khí mà không qua trạng thái lỏng.

Thuật ngữ “albumin huyết thanh người” hoặc “HSA” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein monome không được glycosyl hóa cấu thành từ 585 gốc axit amin, có khối lượng phân tử bằng 66 kD. Cấu trúc hình cầu của albumin huyết thanh người được duy trì bởi 17 cầu liên kết disulphit, tạo ra 9 vòng lặp kép nối tiếp. HSA cũng được gọi là albumin huyết tương người. Sáng chế cũng đề cập đến toàn bộ các biến thể của albumin huyết thanh người.

Thuật ngữ “colagen” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các dạng colagen từ nguồn bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, colagen được chiết xuất từ mô hoặc sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp, hợp chất tương tự colagen, dẫn xuất colagen, colagen cải biến, và colagen biến tính, như gelatin. Ví dụ, colagen có thể được chiết xuất và tinh chế từ mô động vật, bao gồm người hoặc động vật có vú khác, như bò hoặc lợn và nhau thai người, hoặc có thể được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc phương pháp khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được phương pháp sản xuất dung dịch chứa colagen tinh chế, gần như không có tính kháng nguyên từ nguồn động vật, như bò và lợn. Ví dụ, colagen, bao gồm colagen týp I, có thể được chiết xuất từ da lợn bằng cách hòa tan trong dung dịch có độ pH axit hoặc phân giải bằng pepsin và tinh chế bằng cách kết tủa muối, sử dụng quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Colagen bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, colagen týp I, II, III, và IV, hoặc hỗn hợp của chúng, có thể được sử dụng trong chế phẩm vắc xin theo sáng chế.

Thuật ngữ “colagen thủy phân” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit colagen thủy phân có khối lượng phân tử nhỏ hơn colagen tự nhiên, tức là nằm trong khoảng từ 100 đến 300000 Dalton, và được điều chế bằng cách thủy phân. Colagen thủy

phân có bán trên thị trường ở dạng bột hoặc dung dịch nước. Collagen thủy phân có bán trên thị trường thường được sản xuất bằng một trong số bốn phương pháp sau: (1) thủy phân bằng kiềm; (2) thủy phân bằng enzym; (3) thủy phân bằng axit; và (4) tổng hợp bằng cách lên men. Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này có thể được sử dụng để sản xuất collagen thủy phân từ bò (xương và da được ưu tiên), lợn, cá, gia cầm hoặc nguồn tổng hợp.

Thuật ngữ “gelatin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dẫn xuất collagen, và gelatin là protein liên kết và cấu trúc thiết yếu trong động vật. Gelatin được điều chế bằng cách biến tính collagen và chứa các trình tự polypeptit có các đoạn lặp Gly-X-Y, trong đó X và Y thường là gốc prolin và hydroxyprolin. Các trình tự này góp phần tạo ra cấu trúc xoắn ốc bậc ba và ảnh hưởng đến khả năng tạo gel của polypeptit gelatin. Gelatin thường được chiết xuất bằng cách xử lý da và xương động vật, thường từ bò và lợn. Thuật ngữ “gelatin thủy phân” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gelatin đã được phân cắt một số liên kết peptit bằng axit hoặc enzym. Sáng chế cũng đề cập đến cả biến thể tự nhiên lẫn biến thể tái tổ hợp của gelatin và gelatin thủy phân.

Sáng chế cũng bao gồm các thành phần peptit là collagen hoặc gelatin.

Vaccin sống giảm độc lực là virus tái bản hoàn chỉnh, có thể gây đáp ứng miễn dịch hoặc ghi nhớ miễn dịch tương đương với virus thể dại. Virus sống giảm độc lực không gây bệnh do mức độ tái bản và gây viêm đều thấp. Ví dụ về vaccin sống giảm độc lực tạo ra đáp ứng miễn dịch kéo dài là vaccin chống lại virus đậu mùa, virus bại liệt (Sabin), và hai virus thuộc họ *Flaviviridae*, bao gồm virus sốt vàng (YF-17D) và virus viêm não Nhật Bản (JEV SA14-14-2). Vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực đã được kiểm chứng là sản sinh các kháng thể trung hòa bảo vệ ở chuột nhắt, khỉ, và người. Ngoài ra, có bằng chứng cho thấy đáp ứng tế bào T cân bằng góp phần tạo ra tác dụng bảo vệ kéo dài, và nhấn mạnh tầm quan trọng của các epitop tế bào T trong vaccin.

Vaccin sống giảm độc lực hoặc chế phẩm miễn dịch có các ưu điểm sau: có thể được sử dụng ở liều lượng thấp, đặc biệt khi tự tái bản; có thể lây nhiễm giống như virus thể dại/tự nhiên ở đối tượng, và tạo ra cho đối tượng tất cả các kháng nguyên có khả năng miễn dịch quan trọng cùng một lúc, tức là trong một lần sử dụng duy nhất. Đã biết rằng chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin chứa vi sinh vật sống giảm độc lực có khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh. Chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin này có ưu

điểm là, khi vật chủ động vật đã được gây miễn dịch, sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh vào vật chủ gây ra miễn dịch nhắc lại nhanh hơn, tức là miễn dịch dịch thể hoặc miễn dịch qua trung gian tế bào, có thể kiểm soát được sự phát triển của tác nhân gây bệnh trước khi lây nhiễm và tạo ra hiệu quả lâm sàng đáng kể. Chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin chứa tác nhân gây bệnh đã được bất hoạt (vaccin bất hoạt) thường không gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh. Tuy nhiên, phụ thuộc vào mức độ giảm độc lực, chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin chứa tác nhân gây bệnh sống có nhược điểm là có thể gây bệnh cho chính vật chủ được gây miễn dịch. Do đó, cần có chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin có đặc tính miễn dịch của tác nhân gây bệnh sống, nhưng không gây tác dụng không mong muốn khi sử dụng cho đối tượng.

Vaccin theo sáng chế là vaccin chứa bốn chủng virus dengue và chứa đột biến loại bỏ nucleotit ở vùng không dịch mã đầu 3' của virus dengue týp 1, 2, 3, và chứa axit nucleic chứa trình tự nucleotit thứ nhất mã hóa ít nhất một protein cấu trúc từ virus dengue thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai mã hóa các protein phi cấu trúc từ virus dengue thứ hai, trong đó virus dengue thứ hai được giảm độc lực bằng cách tạo ra đột biến loại bỏ gồm khoảng 30 nucleotit khỏi vùng không dịch mã đầu 3' của bộ gen virus dengue tương ứng với vùng cấu trúc vòng lặp-mạch bên TL2. Vaccin theo sáng chế được sản xuất bằng cách sử dụng virus dengue hoặc virus dengue thể khảm chứa đột biến ở vùng không dịch mã đầu 3' được chọn từ nhóm bao gồm: (a) đột biến $\Delta 30$ loại bỏ cấu trúc tương đồng TL-2 ở mỗi chủng virus dengue týp huyết thanh 1, 2, 3, và 4, và các nucleotit bổ sung cho đột biến $\Delta 30$ được loại bỏ từ vùng không dịch mã đầu 3' loại bỏ trình tự theo chiều 5' giống như vùng ranh giới đầu 5' của cấu trúc tương đồng TL-3 ở mỗi chủng virus dengue týp huyết thanh 1, 2, 3, và 4; và (b) thay thế vùng không dịch mã đầu 3' của virus dengue có týp huyết thanh thứ nhất bằng vùng không dịch mã đầu 3' của virus dengue có týp huyết thanh thứ hai, tùy ý chứa đột biến $\Delta 30$ và các nucleotit bổ sung cho đột biến $\Delta 30$ được loại bỏ từ vùng không dịch mã đầu 3'.

Các chủng được ưu tiên trong chế phẩm vaccin theo sáng chế là virus gây sốt vàng da có kiểu hình trong đó bộ gen virus được cải biến bằng cách chèn đột biến, riêng hoặc kết hợp, được chọn từ nhóm bao gồm đột biến bất kỳ được thể hiện trong Bảng 1-37 của WO02095075A1. Cụ thể hơn, virus gây sốt vàng da đột biến nhạy cảm với nhiệt độ và đặc hiệu vật chủ 200, 201 được thiết kế, trong đó virus này chứa các đột biến các gốc axit amin mang điện ở vị trí số 2687 và 2688 của gen NS5 thành alanin, trong đó vị trí axit

amin được thể hiện cho polyprotein của virus dengue týp 4, tùy ý virus này còn chứa đột biến $\Delta 30$. Các chủng virus theo sáng chế có thể là virus dengue giảm độc lực chứa đột biến ở vị trí nucleotit số 4995 của gen NS3; trong đó phương pháp đánh số thứ tự này dựa trên chủng virus DEN4 phân lập ban đầu 814669 (Dominica 1981); trong đó đột biến này tạo ra đột biến thay thế nucleotit từ T thành C; và virus dengue giảm độc lực này có độc lực thấp hơn virus dengue thể đại, tùy ý virus này còn chứa đột biến $\Delta 30$ hoặc virus dengue giảm độc lực chứa đột biến, trong đó đột biến này biểu hiện protein NS3 có đột biến thay thế axit amin serin hoặc asparagin thành prolin ở vị trí axit amin số 1632; trong đó phương pháp đánh số thứ tự này dựa trên polypeptit virus mã hóa bởi chủng virus DEN4 phân lập ban đầu 814669 (Dominica 1981); trong đó virus dengue giảm độc lực này có độc lực thấp hơn virus dengue thể đại.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa bốn chủng virus dengue và chứa đột biến loại bỏ nucleotit ở vùng không dịch mã đầu 3' của virus dengue týp 1, 2, 3, và chứa axit nucleic chứa trình tự nucleotit thứ nhất mã hóa ít nhất một protein cấu trúc từ virus dengue thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai mã hóa các protein phi cấu trúc từ virus dengue thứ hai, trong đó virus dengue thứ hai được giảm độc lực bằng cách tạo ra đột biến loại bỏ gồm khoảng 30 nucleotit ra khỏi vùng không dịch mã đầu 3' của bộ gen virus dengue tương ứng với vùng cấu trúc vòng lặp-mạch bên TL2, tùy ý chứa đột biến được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhạy cảm nhiệt độ trong tế bào Hero hoặc dòng tế bào gan HuH-7 của người, trình tự mã hóa độ đặc hiệu tế bào vật chủ trong tế bào muỗi hoặc dòng tế bào gan HuH-7 của người, trình tự đáp ứng tế bào vật chủ để sử dụng cho 25 chu kỳ tái bản được cải thiện trong tế bào Nero. hoặc giảm độc lực trong chuột nhắt hoặc khỉ, chế phẩm vacxin này chứa virus dengue được chọn từ nhóm bao gồm: (1) rDEN130', rDEN230, rDEN3630, rDEN430, (2) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3630, rDEN4/1 Δ 30, (3) rDEN130, rDEN230, rDEN3630, rDEN4/2630, 30 (4) rDEN1630, rDEN230, rDEN3630, rDEN4/3630, (5) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3/1630, rDEN430, (6) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3/130, rDEN4/1630, -118 (7) rDEN130, rDEN230, rDEN3/130, rDEN4/2630, (8) rDEN1630, rDEN230, rDEN3/1630, rDEN4/3630, (9) rDEN130, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4630, (10) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3/230, rDEN4/1630, 5 (11) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4/2630, (12) rDEN1630, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4/3630, (13) rDEN130, rDEN2630, rDEN3/4630, rDEN430, (14) rDEN130, rDEN2630, rDEN3/4630, rDEN4/1630, (15)

rDEN130, rDEN230, rDEN3/4630, rDEN4/2630, (16) rDEN1630, rDEN230,
 rDEN3/430, rDEN4/3630, (17) rDEN1630, rDEN2/130, rDEN3630, rDEN4630, (18)
 rDEN1A30, rDEN2/130, rDEN3630, rDEN4/130, (19) rDEN130, rDEN2/130,
 rDEN3630, rDEN4/2630, (20) rDEN1630, rDEN2/130, rDEN3630, rDEN4/3630, (21)
 rDEN1630, rDEN2/1630, rDEN3/1630, rDEN430, (22) rDEN1630, rDEN2/130,
 rDEN3/1630, rDEN4/1630, (23) rDEN130, rDEN2/130, rDEN3/1630, rDEN4/2630, (24)
 rDEN1630, rDEN2/130, rDEN3/1630, rDEN4/3630, (25) rDEN130, rDEN2/1630,
 rDEN3/2630, rDEN4630, 20 (26) rDEN1630, rDEN2/130, rDEN3/2630, rDEN4/1630,
 (27) rDEN130, rDEN2/130, rDEN3/2630, rDEN4/2630, (28) rDEN1630, rDEN2/130,
 rDEN3/2630, rDEN4/3630, (29) rDEN1630, rDEN2/1630, rDEN3/4630, rDEN430, (30)
 rDEN1630, rDEN2/1630, rDEN3/4630, rDEN4/130, (31) rDEN1630, rDEN2/130,
 rDEN3/4630, rDEN4/2630, (32) rDEN130, rDEN2/1A30, rDEN3/4630, rDEN4/3630,
 (33) rDEN1630, rDEN2/330, rDEN330, rDEN430, (34) rDEN1630, rDEN2/330,
 rDEN330, rDEN4/1630, (35) rDEN130, rDEN2/330, rDEN3630, rDEN4/2630, 30 (36)
 rDEN1630, rDEN2/330, rDEN3630, rDEN4/330, (37) rDEN1630, rDEN2/3630,
 rDEN3/1630, rDEN4630, (38) rDEN1630, rDEN2/330, rDEN3/1630, rDEN4/1630, -119
 (39) rDEN130, rDEN2/330, rDEN3/130, rDEN4/230, (40) rDEN1630, rDEN2/3630,
 rDEN3/130, rDEN4/3630, (41) rDEN130, rDEN2/3630, rDEN3/2630, rDEN430, (42)
 rDEN1630, rDEN2/3630, rDEN3/2630, rDEN4/1630, 5 (43) rDEN1A30, rDEN2/330,
 rDEN3/2630, rDEN4/230, (44) rDEN1630, rDEN2/330, rDEN3/230, rDEN4/3630, (45)
 rDEN1630, rDEN2/330, rDEN3/430, rDEN4630, (46) rDEN130, rDEN2/3630,
 rDEN3/4630, rDEN4/130, (47) rDEN1630, rDEN2/330, rDEN3/4630, rDEN4/230, 10
 (48) rDEN130, rDEN2/3630, rDEN3/4630, rDEN4/3630, (49) rDEN130, rDEN2/430,
 rDEN330, rDEN4630, (50) rDEN1630, rDEN2/430, rDEN3630, rDEN4/1630, (51)
 rDEN1630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/230, (52) rDEN130, rDEN2/430,
 rDEN330, rDEN4/3630, 15 (53) rDEN130, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN430,
 (54) rDEN1630, rDEN2/430, rDEN3/130, rDEN4/1630, (55) rDEN1630, rDEN2/430,
 rDEN3/1630, rDEN4/2630, (56) rDEN1630, rDEN2/4630, rDEN3/1630,
 rDEN4/3630, (57) rDEN1630, rDEN2/430, rDEN3/2630, rDEN430, 20 (58)
 rDEN130, rDEN2/4630, rDEN3/2630, rDEN4/130, (59) rDEN1630, rDEN2/4630,
 rDEN3/2630, rDEN4/2630, (60) rDEN130, rDEN2/4630, rDEN3/2630, rDEN4/3630,
 (61) rDEN1630, rDEN2/430, rDEN3/4630, rDEN4630, (62) rDEN1630,

rDEN2/463O, rDEN3/43O, rDEN4/163O, 25 (63) rDEN163O, rDEN2/463O,
 rDEN3/463O, rDEN4/263O, (64) rDEN13O, rDEN2/4\3O, rDEN3/43O, rDEN4/33O,
 (65) rDEN1/263O, rDEN263O, rDEN363O, rDEN43O, (66) rDEN1/23O, rDEN2\3O,
 rDEN363O, rDEN4/163O, (67) rDEN1/263O, rDEN23O, rDEN33O, rDEN4/23O, (68)
 rDEN1/263O, rDEN23O, rDEN33O, rDEN4/363O, (69) rDEN1/23O, rDEN23O,
 rDEN3/163O, rDEN463O, (70) rDEN1/23O, rDEN263O, rDEN3/163O, rDEN4/163O,-
 120 (71) rDEN1/23O, rDEN23O, rDEN3/163O, rDEN4/263O, (72) rDEN1/23O,
 rDEN263O, rDEN3/13O, rDEN4/363O, (73) rDEN1/263O, rDEN263O, rDEN3/23O.
 rDEN43O, (74) rDEN1/2/3O, rDEN263O, rDEN3/23O, rDEN4/163O, 5 (75) rDEN1/23O,
 rDEN263O, rDEN3/263O, rDEN4/263O, (76) rDEN1/263O, rDEN263O, rDEN3/23O,
 rDEN4/363O, (77) rDEN1/2\3O, rDEN263O, rDEN3/43O, rDEN463O, (78) rDEN1/23O,
 rDEN263O, rDEN3/43O, rDEN4/163O, (79) rDEN1/23O, rDEN263O, rDEN3/43O,
 rDEN4/263O, 10 (80) rDEN1/2\3O, rDEN263O, rDEN3/43O, rDEN4/363O, (81)
 rDEN1/23O, rDEN2/13O, rDEN363O, rDEN463O, (82) rDEN1/23O, rDEN2/163O,
 rDEN363O, rDEN4/163O, (83) rDEN1/263O, rDEN2/13O, rDEN33O, rDEN4/263O, (84)
 rDEN1/23O, rDEN2/163O, rDEN363O, rDEN4/363O, 15 (85) rDEN1/23O, rDEN2/1\3O,
 rDEN3/163O, rDEN463O, (86) rDEN1/23O, rDEN2/163O, rDEN3/163O, rDEN4/163O,
 (87) rDEN1/23O, rDEN2/13O, rDEN3/163O, rDEN4/263O, (88) rDEN1/23O, rDEN2/13O,
 rDEN3/163O, rDEN4/33O, (89) rDEN1/2\3O, rDEN2/163O, rDEN3/263O, rDEN463O, 20
 (90) rDEN1/23O, rDEN2/13O, rDEN3/23O, rDEN4/13O, (91) rDEN1/263O, rDEN2/163O,
 rDEN3/263O, rDEN4/23O, (92) rDEN1/23O, rDEN2/163O, rDEN3/263O, rDEN4/363O,
 (93) rDEN1/263O, rDEN2/163O, rDEN3/43O, rDEN463O, (94) rDEN1/2\3O,
 rDEN2/163O, rDEN3/43O, rDEN4/163O, 25 (95) rDEN1/23O, rDEN2/163O, rDEN3/463O,
 rDEN4/23O, (96) rDEN1/23O, rDEN2/163O, rDEN3/43O, rDEN4/363O, (97) rDEN1/23O,
 rDEN2/33O, rDEN363O, rDEN463O, (98) rDEN1/23O, rDEN2/33O, rDEN3\3O,
 rDEN4/163O, (99) rDEN1/23O, rDEN2/33O, rDEN33O, rDEN4/263O, 30 (100)
 rDEN1/23O, rDEN2/363O, rDEN363O, rDEN4/363O, (101) rDEN1/23O, rDEN2/363O,
 rDEN3/163O, rDEN463O, (102) rDEN1/23O, rDEN2/363O, rDEN3/163O, rDEN4/13O,-
 121 (103) rDEN1/263O, rDEN2/363O, rDEN3/163O, rDEN4/263O, (104) rDEN1/263O,
 rDEN2/363O, rDEN3/163O, rDEN4/363O, (105) rDEN1/23O, rDEN2/33O, rDEN3/263O,
 rDEN43O, (106) rDEN1/23O, rDEN2/33O, rDEN3/263O, rDEN4/13O, 5 (107)
 rDEN1/263O, rDEN2/363O, rDEN3/263O, rDEN4/263O, (108) rDEN1/263O.

rDEN2/3630, rDEN3/2630, rDEN4/330, (109) rDEN1/2630, rDEN2/3630, rDEN3/4630,
 rDEN4630, (110) rDEN1/2630, rDEN2/3630, rDEN3/430, rDEN4/1630, (111)
 rDEN1/230, rDEN2/330, rDEN3/430, rDEN4/2630, 10 (112) rDEN1/230, rDEN2/330,
 rDEN3/430, rDEN4/330, (113) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4630,
 (114) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/1630, (115) rDEN1/230,
 rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/230, (116) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3630,
 rDEN4/3630, 15 (117) rDEN1/230, rDEN2/430, rDEN3/130, rDEN4630, (118)
 rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN4/130, (119) rDEN1/230, rDEN2/4630,
 rDEN3/1630, rDEN4/2630, (120) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3/130, rDEN4/330,
 (121) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3/230, rDEN4630, (122) rDEN1/2630,
 rDEN2/430, rDEN3/2630, rDEN4/1630, (123) rDEN1/230, rDEN2/430, rDEN3/2630,
 rDEN4/230, (124) rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3/230, rDEN4/330, (125)
 rDEN1/2630, rDEN2/4630, rDEN3/4630, rDEN430, (126) rDEN1/230, rDEN2/4630,
 rDEN3/430, rDEN4/1630, 25 (127) rDEN1/230, rDEN2/4630, rDEN3/4630,
 rDEN4/2630, (128) rDEN1/230, rDEN2/4630, rDEN3/4630, rDEN4/3630, (129)
 rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3630, rDEN4630, (130) rDEN1/330, rDEN2630,
 rDEN330, rDEN4/1630, (131) rDEN1/3630, rDEN230, rDEN3630, rDEN4/2630, 30
 (132) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3630, rDEN4/3630, (133) rDEN1/3630,
 rDEN2630, rDEN3/1630, rDEN4630, (134) rDEN1/3630, rDEN230, rDEN3/1630,
 rDEN4/130,-122 (135) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3/130, rDEN4/230, (136)
 rDEN1/330, rDEN2630, rDEN3/1630, rDEN4/3630, (137) rDEN1/3630, rDEN230,
 rDEN3/2630, rDEN4630, (138) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4/1630, 5
 (139) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4/230, (140) rDEN1/3630,
 rDEN230, rDEN3/230, rDEN4/3630, (141) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3/430,
 rDEN4630, (142) rDEN1/3630, rDEN230, rDEN3/430, rDEN4/1630, (143) rDEN1/330,
 rDEN2630, rDEN3/4630, rDEN4/230, 10 (144) rDEN1/3630, rDEN2630, rDEN3/430,
 rDEN4/3630, (145) rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3630, rDEN4630, (146)
 rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3630, rDEN4/1630, (147) rDEN1/3630, rDEN2/1630,
 rDEN330, rDEN4/2630, (148) rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3630, rDEN4/330, 15
 (149) rDEN1/330, rDEN2/130, rDEN3/1630, rDEN4630, (150) rDEN1/330,
 rDEN2/1630, rDEN3/130, rDEN4/1630, (151) rDEN1/3630, rDEN2/1630, rDEN3/130,
 rDEN4/2630, (152) rDEN1/3630, rDEN2/1630, rDEN3/130, rDEN4/330, (153)

rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3/2630, rDEN4630, 20 (154) rDEN1/330, rDEN2/1630,
 rDEN3/230, rDEN4/130, (155) rDEN1/3630, rDEN2/130, rDEN3/2630, rDEN4/2630,
 (156) rDEN1/3630, rDEN2/130, rDEN3/230, rDEN4/3630, (157) rDEN1/330,
 rDEN2/130, rDEN3/4630, rDEN430, (158) rDEN1/3630, rDEN2/1630, rDEN3/430,
 rDEN4/1630, 25 (159) rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3/4630, rDEN4/230, (160)
 rDEN1/330, rDEN2/1630, rDEN3/4630, rDEN4/330, (161) rDEN1/330, rDEN2/3630,
 rDEN3630, rDEN4630, (162) rDEN1/330, rDEN2/3630, rDEN330, rDEN4/130, (163)
 rDEN1/3630, rDEN2/3630, rDEN3630, rDEN4/2630, 30 (164) rDEN1/3630,
 rDEN2/3630, rDEN330, rDEN4/330, (165) rDEN1/3630, rDEN2/3630, rDEN3/1630,
 rDEN4630, (166) rDEN1/330, rDEN2/330, rDEN3/130, rDEN4/1630, -123 (167)
 rDEN1/3630, rDEN2/3630, rDEN3/1630, rDEN4/2630, (168) rDEN1/330, rDEN2/330,
 rDEN3/1630, rDEN4/330, (169) rDEN1/330, rDEN2/330, rDEN3/230, rDEN430, (170)
 rDEN1/330, rDEN2/330, rDEN3/230, rDEN4/130, 5 (171) rDEN1/330, rDEN2/3630,
 rDEN3/2630, rDEN4/2630, (172) rDEN1/3630, rDEN2/330, rDEN3/2630, rDEN4/330,
 (173) rDEN1/3630, rDEN2/3630, rDEN3/4630, rDEN430, (174) rDEN1/330,
 rDEN2/3630, rDEN3/4630, rDEN4/130, (175) rDEN1/330, rDEN2/3630,
 rDEN3/4630, rDEN4/2630, 10 (176) rDEN1/330, rDEN2/3630, rDEN3/4630,
 rDEN4/3630, (177) rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4630, (178)
 rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/1630, (179) rDEN1/3630, rDEN2/4630,
 rDEN3630, rDEN4/2630, (180) rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/330, 15
 (181) rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN430, (182) rDEN1/330,
 rDEN2/430, rDEN3/130, rDEN4/1630, (183) rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3/1630,
 rDEN4/2630, (184) rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN4/330, (185)
 rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3/230, rDEN430, (186) rDEN1/330, rDEN2/4630,
 rDEN3/230, rDEN4/1630, (187) rDEN1/330, rDEN2/430, rDEN3/2630, rDEN4/230,
 (188) rDEN1/3630, rDEN2/430, rDEN3/230, rDEN4/330, (189) rDEN1/3630,
 rDEN2/4630, rDEN3/4630, rDEN4630, (190) rDEN1/3630, rDEN2/430, rDEN3/4630,
 rDEN4/1630, (191) rDEN1/330, rDEN2/430, rDEN3/430, rDEN4/230, (192)
 rDEN1/3630, rDEN2/4630, rDEN3/430, rDEN4/330, (193) rDEN1/4630, rDEN2630,
 rDEN3630, rDEN430, (194) rDEN1/4630, rDEN2630, rDEN330, rDEN4/1630, (195)
 rDEN1/4630, rDEN230, rDEN3630, rDEN4/2630, (196) rDEN1/4630, rDEN230,
 rDEN330, rDEN4/3630, (197) rDEN1/430, rDEN230, rDEN3/130, rDEN4630, (198)

rDEN1/430, rDEN230, rDEN3/1630, rDEN4/1630, (199) rDEN1/4630, rDEN2630,
 rDEN3/130, rDEN4/230, (200) rDEN1/4/30, rDEN2630, rDEN3/130, rDEN4/3630,
 (201) rDEN1/430, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN430, (202) rDEN1/430, rDEN230,
 rDEN3/230, rDEN4/130, 5 (203) rDEN1/430, rDEN2630, rDEN3/2630, rDEN4/2630,
 (204) rDEN1/4/30, rDEN230, rDEN3/2630, rDEN4/330, (205) rDEN1/4630, rDEN230,
 rDEN3/4630, rDEN4630, (206) rDEN1/4630, rDEN2630, rDEN3/4630, rDEN4/130,
 (207) rDEN1/4630, rDEN2630, rDEN3/4630, rDEN4/2630, 10 (208) rDEN1/4630.
 rDEN230, rDEN3/4630, rDEN4/3630, (209) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3630,
 rDEN4630, (210) rDEN1/4630, rDEN2/1630, rDEN330, rDEN4/130, (211) rDEN1/430,
 rDEN2/1630, rDEN330, rDEN4/2630, (212) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3630,
 rDEN4/3630, 15 (213) rDEN1/4630, rDEN2/1630, rDEN3/1630, rDEN4630, (214)
 rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3/130, rDEN4/1630, (215) rDEN1/4630, rDEN2/1630,
 rDEN3/130, rDEN4/230, (216) rDEN1/4A30, rDEN2/1630, rDEN3/130, rDEN4/330,
 (217) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3/230, rDEN4430, 20 (218) rDEN1/4630.
 rDEN2/1630, rDEN3/230, rDEN4/1630, (219) rDEN1/4630, rDEN2/1630, rDEN3/230,
 rDEN4/2630, (220) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3/230, rDEN4/3630, (221)
 rDEN1/4630, rDEN2/1630, rDEN3/430, rDEN4630, (222) rDEN1/4630, rDEN2/1630,
 rDEN3/4630, rDEN4/130, (223) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3/430, rDEN4/2630,
 (224) rDEN1/430, rDEN2/1630, rDEN3/4630, rDEN4/3A30, (225) rDEN1/430,
 rDEN2/3630, rDEN330, rDEN4630, (226) rDEN1/430, rDEN2/3630, rDEN330,
 rDEN4/130, (227) rDEN1/430, rDEN2/3630, rDEN3630, rDEN4/2630, 30 (228)
 rDEN1/430, rDEN2/3630, rDEN3630, rDEN4/3630, (229) rDEN1/430, rDEN2/3630,
 rDEN3/1630, rDEN430, (230) rDEN1/4630, rDEN2/330, rDEN3/130, rDEN4/1630,-125
 (231) rDEN1/4630, rDEN2/3630, rDEN3/1630, rDEN4/2630, (232) rDEN1/4630,
 rDEN2/330, rDEN3/1630, rDEN4/330, (233) rDEN1/4630, rDEN2/330, rDEN3/2630,
 rDEN4630, (234) rDEN1/4630, rDEN2/330, rDEN3/2630, rDEN4/130, 5 (235)
 rDEN1/4630, rDEN2/3630, rDEN3/230, rDEN4/230, (236) rDEN1/4630, rDEN2/3630,
 rDEN3/230, rDEN4/330, (237) rDEN1/4630, rDEN2/3630, rDEN3/430, rDEN4630,
 (238) rDEN1/4A30, rDEN2/3630, rDEN3/430, rDEN4/130, (239) rDEN1/430,
 rDEN2/330, rDEN3/430, rDEN4/230, 10 (240) rDEN1/4630, rDEN2/3630, rDEN3/430,
 rDEN4/330, (241) rDEN1/4630, rDEN2/430, rDEN3630, rDEN4630, (242)
 rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/1630, (243) rDEN1/4630, rDEN2/4630,

rDEN3630, rDEN4/230, (244) rDEN1/430, rDEN2/4630, rDEN3630, rDEN4/3630, (245) rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN430, (246) rDEN1/42\30, rDEN2/4630, rDEN3/1630, rDEN4/130, (247) rDEN1/4630, rDEN2/430, rDEN3/130, rDEN4/230, (248) rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3/130, rDEN4/330, (249) rDEN1/430, rDEN2/4630, rDEN3/2630, rDEN4630, (250) rDEN1/430, rDEN2/4630, rDEN3/2630, rDEN4/1630, (251) rDEN1/430, rDEN2/4630, rDEN3/2630, rDEN4/230, (252) rDEN1/430, rDEN2/4630, rDEN3/230, rDEN4/330, (253) rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3/430, rDEN4630, (254) rDEN1/4\30, rDEN2/430, rDEN3/4630, rDEN4/130, (255) rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3/430, rDEN4/2630, và (256) rDEN1/4630, rDEN2/4630, rDEN3/4630, rDEN4/330.

Quy trình đông khô là quy trình loại bỏ nước để bảo chế các chế phẩm cần khử nước. Nhìn chung, quy trình “đông khô” chế phẩm vacxin chứa nước bao gồm ba bước. Bước thứ nhất, chế phẩm vacxin chứa nước được lạnh đông trong điều kiện nhiệt độ thấp. Bước thứ hai, nước đã lạnh đông được loại bỏ bằng cách thăng hoa trong điều kiện áp suất giảm và nhiệt độ thấp. Trong bước này, chế phẩm thường chứa nước ở hàm lượng khoảng 15%. Bước thứ ba, nước còn dư được tiếp tục loại bỏ bằng cách khử hấp thụ trong điều kiện áp suất giảm và nhiệt độ cao. Ở thời điểm kết thúc quy trình đông khô, chế phẩm đông khô, cũng được gọi là “bột đông khô” hoặc “bánh đông khô” được tạo ra. Chế phẩm đông khô này chứa rất ít nước còn dư với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,2% đến 5% khối lượng và chất khô chủ yếu ở dạng vô định hình.

Tuy nhiên, hoạt tính miễn dịch của các hoạt chất sinh học bị suy giảm đáng kể trong các bước bảo chế này, như trước và trong quy trình đông khô, và cũng trong quá trình bảo quản chế phẩm miễn dịch và chế phẩm vacxin. Độ nguyên vẹn của các hoạt chất sinh học phải được duy trì để đảm bảo hiệu lực miễn dịch của chế phẩm miễn dịch và chế phẩm vacxin. Hoạt tính miễn dịch của các hoạt chất sinh học được đánh giá bằng khả năng gây và kích thích đáp ứng miễn dịch khi sử dụng cho vật chủ hoặc đối tượng.

Để tăng độ tuân thủ của đối tượng và hạn chế số lần sử dụng, cần có chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vacxin chứa nhiều chủng vi sinh vật. Chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vacxin chứa nhiều chủng vi sinh vật là chế phẩm vacxin chứa nhiều hơn một hoạt chất miễn dịch có nguồn gốc hoặc thu được từ cùng tác nhân gây bệnh hoặc ít nhất hai tác nhân gây bệnh khác nhau. Các virus từ các chi khác nhau có thể có độ ổn định khác nhau trong quy trình đông khô và quá trình bảo quản sau đó, dẫn đến làm giảm khả

năng sống sót hoặc lây nhiễm. Trong trường hợp của các virus, như virus dengue, các hoạt chất miễn dịch thường được sử dụng là virus sống giảm độc lực. Để kích thích hiệu quả hệ miễn dịch, virus sống giảm độc lực phải tái bản trong đối tượng được gây miễn dịch. Sự suy giảm khả năng sống sót hoặc lây nhiễm có thể xuất hiện trong quy trình đông khô chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin chứa nhiều chủng vi sinh vật, trong quá trình bảo quản chế phẩm, hoặc trước khi sử dụng chế phẩm sau khi hoàn nguyên. Do đó, tá dược ổn định đã được bổ sung vào các chế phẩm đông khô này. Tuy nhiên, để thu được chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin chứa nhiều chủng vi sinh vật có khả năng lây nhiễm và/hoặc sống sót được duy trì, cần có tá dược ổn định có thể duy trì khả năng sống sót và lây nhiễm của các tác nhân gây bệnh sống giảm độc lực khác nhau.

Vaccin và chế phẩm miễn dịch đã tác động nhiều đến sức khỏe cộng đồng do làm giảm tỷ lệ nhiễm bệnh và tử vong do nhiều tác nhân gây bệnh nguy hiểm. Tuy nhiên, tác dụng không mong muốn của các tá dược trong chế phẩm miễn dịch và chế phẩm vaccin tiếp tục có thể tạo ra nguy cơ tiềm ẩn cao hơn tác dụng bảo vệ và điều trị của chế phẩm miễn dịch và chế phẩm vaccin.

Sáng chế đề xuất công thức bào chế tối ưu với tá dược ổn định để bào chế chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin đông khô sống giảm độc lực, có thể chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp. Các tá dược ổn định này có thể duy trì khả năng sống sót và lây nhiễm của các virus dengue, đặc biệt trong quy trình đông khô và quá trình bảo quản chế phẩm đông khô ở nhiệt độ thấp và nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian đủ để cho phép ổn định trong thời gian ngắn sau khi lấy ra khỏi môi trường bảo quản lạnh. Quan trọng là, tá dược ổn định theo sáng chế để sử dụng trong chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin đông khô ổn định chứa virus dengue sống giảm độc lực an toàn và thích hợp để tiêm cho đối tượng sau khi hoàn nguyên.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tá dược ổn định để sử dụng trong chế phẩm miễn dịch hoặc chế phẩm vaccin đông khô chứa virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, và tá dược ổn định protein, được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc collagen thủy phân hoặc gelatin hoặc gelatin thủy phân. Chế phẩm này có thể còn chứa tá dược ổn định đường được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sucroza, manitol, sorbitol, trehaloza, dextran. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa virus dengue sống giảm độc lực.

trong đó độ ổn định của chế phẩm này được tăng cường bởi albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc gelatin hoặc dẫn xuất thủy phân của chúng.

Hơn nữa, tá được ổn định protein có thể được chọn từ nhóm bao gồm gelatin khối lượng phân tử thấp, gelatin thủy phân, collagen, collagen thủy phân, gelatin tái tổ hợp, collagen tái tổ hợp, dẫn xuất collagen thủy phân, sản phẩm thủy phân protein, succinyl-gelatin, gelatin cá, gelatin bò, gelatin lợn, gelatin gia cầm. Hơn nữa, albumin có thể được chọn từ nhóm bao gồm albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò và albumin tái tổ hợp. Theo phương án ưu tiên nhất, vacxin theo sáng chế là vacxin chứa bốn chủng virut. Theo phương án ưu tiên khác, các chủng virut dengue được sử dụng trong vacxin theo sáng chế mang đột biến $\Delta 30$. Theo phương án ưu tiên khác, chủng virut dengue này được chọn từ virut dengue týp 1, virut dengue týp 2, virut dengue týp 3, và virut dengue týp 4. Theo phương án ưu tiên khác, một hoặc nhiều chủng virut dengue này là virut dengue thể khảm chứa bộ khung của virut dengue 1 hoặc bộ khung của virut dengue 2 hoặc bộ khung của virut dengue 3 hoặc bộ khung của virut dengue 4. Theo một số phương án ưu tiên, các chủng virut dengue này có kiểu hình nhạy cảm với nhiệt độ trong tế bào Vero hoặc dòng tế bào gan HuH-7 của người.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin chứa virut dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp, trong đó độ ổn định của chế phẩm này được tăng cường bởi albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc gelatin. Theo phương án ưu tiên hơn, chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc gelatin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/0,5ml. Theo phương án ưu tiên khác, chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/0,5ml hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 15mg/0,5ml, cụ thể hơn chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng bằng 12,5mg/0,5ml hoặc 10mg/0,5ml. Theo một phương án ưu tiên khác, chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30mg/0,5ml, cụ thể hơn chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng bằng 15mg/0,5ml. Theo phương án ưu tiên khác, chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 25mg/0,5ml, cụ thể hơn chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng bằng 15mg/0,5ml hoặc 22mg/0,5ml.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, vacxin theo sáng chế là vacxin chứa bốn chủng virut dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp. Theo một phương án ưu tiên khác, chủng virut dengue này mang đột biến $\Delta 30$ và/hoặc đột biến $\Delta 31$. Theo phương án ưu tiên nhất,

chủng virus dengue này được chọn từ virus dengue týp 1, virus dengue týp 2, virus dengue týp 3, và virus dengue týp 4. Theo một số phương án, một hoặc nhiều chủng virus dengue này là virus dengue thể khảm chứa bộ khung của virus dengue 1 hoặc bộ khung của virus dengue 2 hoặc bộ khung của virus dengue 3 hoặc bộ khung của virus dengue 4. Theo phương án khác, các chủng virus dengue này có kiểu hình nhạy cảm với nhiệt độ trong tế bào Vero hoặc dòng tế bào gan HuH-7 của người. Theo phương án ưu tiên nhất, các chủng virus dengue này được tăng sinh trong tế bào Vero.

Theo phương án ưu tiên nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin đông khô ổn định chứa bốn chủng virus dengue bao gồm virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31), và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30), và độ ổn định của chế phẩm này được tăng cường bởi albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc gelatin. Theo phương án cụ thể chế phẩm này chứa chủng virus dengue ở liều lượng không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU/0,5ml.

Theo phương án ưu tiên khác, chế phẩm vaccin theo sáng chế còn chứa tá dược độn và/hoặc tá dược đệm. Cụ thể hơn tá dược độn được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, sucroza, manitol, trehaloza và tá dược tương tự và tá dược đệm được chọn từ nhóm bao gồm kali dihydrophosphat, di-kali hydrophosphat, mononatri glutamat và tá dược tương tự. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế còn chứa môi trường bổ sung.

Theo phương án ưu tiên hơn, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin có độ pH cuối cùng nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

Theo một phương án ưu tiên khác, chế phẩm này chứa chủng virus dengue ở liều lượng không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU/0,5ml.

Theo một phương án khác, tá dược ổn định có thể còn bao gồm lactoza, sucroza, manitol, trehaloza, dextran, maltodextrin, polyvinylpyrrolidon, hydroxyetyl tinh bột, hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vaccin ổn định thu được bằng cách hoàn nguyên chế phẩm vaccin đông khô theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế cũng đề xuất tá dược đệm để sử dụng trong chế phẩm vacxin theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm kali dihydrophosphat, di-kali hydrophosphat, mononatri glutamat và tá dược tương tự.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm vacxin theo sáng chế chứa môi trường bổ sung, như môi trường Dulbecco cải biến và môi trường Leibovitz L-15.

Tốt hơn nếu độ pH của chế phẩm vacxin thành phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, tốt nhất nếu khoảng $7,0 \pm 0,5$.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm miễn dịch ổn định chứa a) virus giảm độc lực thứ nhất có tác dụng sinh miễn dịch kháng virus dengue typ huyết thanh 1, b) virus giảm độc lực thứ hai có tác dụng sinh miễn dịch kháng virus dengue typ huyết thanh 2, c) virus giảm độc lực thứ ba có tác dụng sinh miễn dịch kháng virus dengue typ huyết thanh 3, và d) virus giảm độc lực thứ tư có tác dụng sinh miễn dịch kháng virus dengue typ huyết thanh 4, trong đó mỗi virus a), b), c) và d) chứa axit nucleic chứa i) trình tự nucleotit thứ nhất mã hóa ít nhất một protein cấu trúc từ virus dengue thứ nhất, ii) trình tự nucleotit thứ hai mã hóa các protein phi cấu trúc từ virus dengue thứ nhất hoặc virus dengue thứ hai, và iii) vùng không dịch mã đầu 3', trong đó vùng không dịch mã đầu 3' này chứa đột biến loại bỏ gồm khoảng 30 nucleotit tương ứng với vùng cấu trúc vòng lặp-mạch bên TL2, và cả vùng không dịch mã đầu 3' lẫn trình tự nucleotit thứ hai mã hóa các protein phi cấu trúc là từ virus dengue thứ nhất hoặc virus dengue thứ hai. Theo một số khía cạnh ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin, trong đó các chủng virus dengue này được tăng sinh trong tế bào Vero.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm vacxin ổn định theo sáng chế chứa các virus dengue sống giảm độc lực được chọn từ virus dengue typ 1 (rDEN1 Δ 30-1545 và/hoặc rDEN 1/4 Δ 30), virus dengue typ 2 (rDEN2 Δ 30-7169 và/hoặc rDEN2/4 Δ 30-1495, 7163), virus dengue typ 3 (rDEN3/4 Δ 30 và/hoặc rDEN3-3' Δ 4 Δ 30 và/hoặc rDEN3 Δ 30/31), virus dengue typ 4 (rDEN4 Δ 30-7132, 7163, 8308 và/hoặc rDEN4 Δ 30-200, 201 và/hoặc rDEN4 Δ 30-4995).

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin ổn định chứa virus dengue rDEN1 Δ 30-1545 03JB186 TD-1A+V2, rDEN2/4 Δ 30-1495, 7163 04JBV351 TD-1A+V2 9/1/04, rDEN3 Δ 30/31-7164 06JBC577 V6+1A1+V2 5/8/08-Joc và 06JBV591 DEN4 Δ 30-7132,7163,8308 6/8/06 V3-1A1+V2.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin đông khô ổn định chứa virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31), và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30), và độ ổn định của chế phẩm này được tăng cường bởi albumin huyết thanh người và/hoặc gelatin và/hoặc collagen.

Chế phẩm vacxin theo sáng chế chứa virus và các tá được ổn định bao gồm tá được ổn định protein ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/0,5ml được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở albumin huyết thanh người, collagen và gelatin; tá được ổn định đường ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 100mg/0,5ml được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở lactoza, sucroza, manitol và trehaloza và tá được đệm ở lượng đủ để điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5. Tốt hơn nếu môi trường bổ sung được bổ sung vào chế phẩm vacxin theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người và/hoặc collagen hoặc gelatin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/0,5ml. Theo phương án ưu tiên nhất, chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 15mg/0,5ml, tốt hơn nữa nếu chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng bằng 12,5mg/0,5ml. Theo một phương án ưu tiên khác, chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg/0,5ml, tốt hơn nữa nếu chế phẩm này chứa collagen hoặc gelatin ở hàm lượng bằng 15mg/0,5ml.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm vacxin là bột đông khô để hoàn nguyên và sử dụng qua đường tiêm dưới da. Vacxin được bào chế trong tá được ổn định, như albumin huyết thanh người và lactoza monohydrat và tá được đệm là sucroza. Vacxin được pha loãng trong dung dịch đệm chứa kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4) và mononatri glutamat. Môi trường Dulbecco cải biến và/hoặc môi trường Leibovitz L-15 có thể được sử dụng làm môi trường để bổ sung vào vacxin thành phẩm. Độ pH của vacxin thành phẩm khoảng $7,0 \pm 0,5$.

Theo phương án ưu tiên khác, vacxin được bào chế trong tá được ổn định chứa gelatin và trehaloza và tá được đệm là sucroza và manitol. Vacxin được pha loãng trong dung dịch đệm chứa kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4) và mononatri glutamat. Môi trường Dulbecco cải biến và/hoặc môi trường Leibovitz L-

15 được sử dụng làm môi trường để bổ sung vào vacxin thành phẩm. Độ pH của vacxin thành phẩm khoảng $7,0 \pm 0,5$.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm vacxin theo sáng chế chứa chủng virus dengue ở liều lượng không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU/0,5ml.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa bệnh gây ra bởi virus dengue ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm vacxin nêu trên. Vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng làm dược chất phòng ngừa sơ cấp ở người lớn hoặc trẻ em có nguy cơ lây nhiễm, hoặc có thể được sử dụng làm dược chất thứ cấp để điều trị cho đối tượng bị lây nhiễm. Ví dụ, trong trường hợp của virus dengue và virus dengue thể khảm, vacxin có thể được sử dụng cho người lớn hoặc trẻ em có nguy cơ lây nhiễm virus dengue, hoặc có thể được sử dụng làm dược chất thứ cấp để điều trị cho đối tượng bị lây nhiễm virus dengue. Ví dụ về đối tượng có thể được điều trị bằng vacxin chứa virus dengue và phương pháp theo sáng chế bao gồm (i) trẻ em ở vùng lưu hành dịch virus dengue, (ii) du khách nước ngoài, (iii) đối tượng phục vụ trong quân đội, và (iv) đối tượng ở vùng bị lây lan virus dengue. Hơn nữa, các đối tượng cư trú ở các vùng bị lây lan bệnh (ví dụ lây lan qua Sri Lanka, Bắc Phi và Mỹ La-tin), hoặc các vùng có thể bị lây lan bệnh trong tương lai có thể được điều trị theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kit vacxin bao gồm đồ chứa thứ nhất chứa chế phẩm vacxin ổn định nêu trên và đồ chứa thứ hai chứa dung dịch nước để hoàn nguyên chế phẩm vacxin này.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin được bào chế theo công thức sau.

Bảng 1

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	Nằm trong khoảng từ 10 đến 15mg
2	Lactoza monohydrat	Nằm trong khoảng từ 25 đến 50mg
3	Sucroza	Nằm trong khoảng từ 3 đến 25mg
4	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
5	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Theo một phương án ưu tiên khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin được bào chế theo công thức sau:

Bảng 2

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin	Nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg
2	Manitol	Nằm trong khoảng từ 5 đến 25mg
3	Trehaloza	Nằm trong khoảng từ 4 đến 16mg
4	Sucroza	Nằm trong khoảng từ 25 đến 60mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vacxin đông khô chứa bốn chủng virut dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	15mg
3	Trehaloza	8mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh; tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virut dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virut dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá dược ổn định, tá dược đệm và tá dược độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá dược, gelatin thủy phân được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá dược còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH₂PO₄), di-kali hydrophosphat (K₂HPO₄), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = 7,0 ± 0,2 bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng 5 ± 3°C. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virut dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng 7,0 ± 0,2.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin bán thành phẩm cuối cùng được nạp vào ống thủy tinh USP loại I và các khay chứa các ống chứa chế phẩm vaccin đã được bất hoạt một nửa này được đặt vào thiết bị đông khô. Quy trình đông khô được thực hiện theo các thông số sau:

- Các ống được lạnh đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -40°C đến -60°C trong 8 giờ.

- Bước sấy sơ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -50°C đến 15°C , độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 50 giờ.

- Bước sấy thứ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $+0^{\circ}\text{C}$ đến $+30^{\circ}\text{C}$, độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 15 giờ.

Sau khi kết thúc quy trình đông khô, các ống được dùng, bịt kín, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong phòng lạnh.

✱ Kết quả thử nghiệm của ví dụ nêu trên như sau:

✱ Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Bảng 4

Týp huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue có týp huyết thanh khác nhau		
	Sau khi đông khô	$37 \pm 2^{\circ}\text{C}/7$ ngày	$37 \pm 2^{\circ}\text{C}/14$ ngày
rDEN 1A30	0,00	0,40	0,80
rDEN 2/4A30	0,00	0,00	0,30
rDEN 3A30/31	0,10	0,10	0,10
rDEN 4A30	0,00	0,00	0,40

*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Bảng 5

Týp huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue ở các điều kiện bảo quản khác nhau							
	$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$			$2-8^{\circ}\text{C}$				
	15 ngày	1 tháng	2 tháng	1 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng
rDEN 1A30	0,40	0,80	0,60	0,30	0,50	0,40	0,60	0,40
rDEN 2/4A30	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,10	0,20	0,00
rDEN 3A30/31	0,10	0,10	0,60	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20
rDEN 4A30	0,00	0,20	0,20	0,00	0,10	0,20	0,10	0,10

*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của dung dịch chế phẩm vaccin bán thành phẩm chứa bốn chủng virus dengue.

Bảng 6

Typ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng (Log ₁₀ PFU/0,5ml) của dung dịch chế phẩm vaccin bán thành phẩm chứa bốn chủng virus dengue ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C			
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày
rDEN 1Δ30	0,20	0,10	0,10	0,40
rDEN 2/4Δ30	0,20	0,30	0,20	0,30
rDEN 3Δ30/31	0,10	0,20	0,70	0,70
rDEN 4Δ30	0,20	0,20	0,20	0,40

Ví dụ 2

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0.5ml
1	Virus dengue typ huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virus dengue typ huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virus dengue typ huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virus dengue typ huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá được		Hàm lượng
1	Gelatin	22mg
2	Manitol	10mg
3	Trehaloza	5mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 750μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp typ huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, gelatin được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH₂PO₄), di-kali hydrophosphat (K₂HPO₄), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = 7,0 ± 0,2 bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng 5 ± 3°C. Sau đó, liều lượng

đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (típ huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccine bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 3

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccine đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue típ huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
2	Virus dengue típ huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}$ PFU ¹
3	Virus dengue típ huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
5	Virus dengue típ huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccine bán thành phẩm

Chế phẩm vaccine chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp típ huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá dược ổn định, tá dược đệm và tá dược độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá dược, gelatin được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá dược còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (típ huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào

hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vacxin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 4

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vacxin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	35mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vacxin bán thành phẩm

Chế phẩm vacxin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá dược ổn định, tá dược đệm và tá dược dộn.

Để bào chế dung dịch chứa tá dược, gelatin thủy phân được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá dược còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được

bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 5

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá dược ổn định, tá dược đệm và tá dược độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá dược, gelatin được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá dược còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào

hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 6

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}$ PFU ¹
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
Tá được		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	20mg
3	Trehalosa	10mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
10	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được dộn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, gelatin thủy phân được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (manitol, trehalosa, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat, môi trường Dulbecco cải biến và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc

hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 7

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	12,5mg
2	Lactosa monohydrat	37,5mg
3	Sucroza	5mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260μg
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá dược ổn định, tá dược đệm và tá dược dộn.

Để bào chế dung dịch chứa tá dược, lactosa monohydrat được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá dược còn lại (sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,2μm và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó; liều lượng đã được tính toán của dung dịch vô trùng chứa albumin huyết thanh người được bổ sung

vào hỗn hợp này, sau đó bổ sung virus dengue đặc hiệu (típ huyết thanh 1, 2, 3 và 4). Nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin bán thành phẩm cuối cùng được nạp vào ống thủy tinh USP loại I và các khay chứa các ống chứa chế phẩm vaccin đã được bất hoạt một nửa này được đặt vào thiết bị đông khô. Quy trình đông khô được thực hiện theo các thông số sau:

- Các ống được lạnh đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -40°C đến -60°C trong 8 giờ.

- Bước sấy sơ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -50°C đến -15°C , độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 50 giờ.

- Bước sấy thứ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $+0^{\circ}\text{C}$ đến $+30^{\circ}\text{C}$, độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 15 giờ.

Sau khi kết thúc quy trình đông khô, các ống được dừng, bịt kín, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong phòng lạnh.

Kết quả thử nghiệm của ví dụ nêu trên như sau:

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Bảng 13

Típ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue có típ huyết thanh khác nhau		
	Sau khi đông khô	$37 \pm 2^{\circ}\text{C}/7$ ngày	$37 \pm 2^{\circ}\text{C}/14$ ngày
rDEN 1Δ30	0,10	0,40	0,90
rDEN 2/4Δ30	0,00	0,40	0,80
rDEN 3Δ30/31	0,30	0,70	1,00
rDEN 4Δ30	0,00	0,40	0,90
*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.			

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp..

Bảng 14

Typ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue ở các điều kiện bảo quản khác nhau							
	$25 \pm 2^\circ\text{C}$			$2-8^\circ\text{C}$				
	15 ngày	1 tháng	2 tháng	1 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng
rDEN 1Δ30	0,10	0,50	0,80	0,10	0,30	0,20	0,70	0,50
rDEN 2/4Δ30	0,20	0,30	0,50	0,10	0,20	0,30	1,00	0,80
rDEN 3Δ30/31	0,50	0,50	0,70	0,10	0,10	0,20	0,80	0,70
rDEN 4Δ30	0,30	0,50	0,70	0,20	0,30	0,50	0,90	0,60

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của dung dịch chế phẩm vaccin bán thành phẩm chứa bốn chủng virus dengue

Bảng 15

Typ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của dung dịch chế phẩm vaccin bán thành phẩm chứa bốn chủng virus dengue ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C			
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày
rDEN 1Δ30	0,00	0,00	0,10	0,50
rDEN 2/4Δ30	0,00	0,10	0,20	0,60
rDEN 3Δ30/31	0,20	0,00	0,20	0,20
rDEN 4Δ30	0,00	0,00	0,10	0,20
*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.				

Ví dụ 8

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 16.

Bảng 16

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue typ huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue typ huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue typ huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue typ huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	10mg
2	Lactosa monohydrat	50mg
3	Sucroza	10mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng $260\mu\text{g}$
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng $630\mu\text{g}$
6	Mononatri glutamat	Khoảng $460\mu\text{g}$
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng $600\mu\text{g}$
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, lactoza monohydrat được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó; liều lượng đã được tính toán của dung dịch vô trùng chứa albumin huyết thanh người được bổ sung vào hỗn hợp này, sau đó bổ sung virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4). Nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 9

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá được		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	10mg
2	Lactoza monohydrat	25mg
3	Sucroza	6,5mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng $260\mu\text{g}$
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng $630\mu\text{g}$
6	Mononatri glutamat	Khoảng $480\mu\text{g}$
7	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng $900\mu\text{g}$
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, lactoza monohydrat được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của dung dịch vô trùng chứa albumin huyết thanh người được bổ sung vào hỗn hợp này, sau đó bổ sung virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4). Nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 10

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 18.

Bảng 18

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá được		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	14mg
2	Lactoza	40mg
3	Sucroza	25mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng $280\mu\text{g}$
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng $640\mu\text{g}$
6	Mononatri glutamat	Khoảng $440\mu\text{g}$
7	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng $500\mu\text{g}$
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, lactoza monohydrat được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của dung dịch vô trùng chứa albumin huyết thanh người được bổ sung vào hỗn hợp này, sau đó bổ sung virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4). Nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ 1.

Ví dụ 11

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 19.

Bảng 19

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá được		Hàm lượng
1	Colagen thủy phân	22mg
2	Manitol	15mg
3	Trehaloza	8mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh; tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, collagen thủy phân được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (manitol, trehalosa, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH $= 7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin bán thành phẩm cuối cùng được nạp vào ống thủy tinh USP loại I và các khay chứa các ống chứa chế phẩm vaccin đã được bất hoạt một nửa này được đặt vào thiết bị đông khô. Quy trình đông khô được thực hiện theo các thông số sau:

- Các ống được lạnh đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -40°C đến -60°C trong 8 giờ.
- Bước sấy sơ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -50°C đến -15°C , độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 50 giờ.
- Bước sấy thứ cấp được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $+0^\circ\text{C}$ đến $+30^\circ\text{C}$, độ chân không nằm trong khoảng từ 20 mtorr đến 800 mtorr (2,6Pa đến 106,6Pa) trong khoảng 15 giờ.

Sau khi kết thúc quy trình đông khô, các ống được dừng, bịt kín, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong phòng lạnh.

Kết quả thử nghiệm của ví dụ nêu trên như sau:

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Bảng 20

Typ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue có typ huyết thanh khác nhau	
	$37 \pm 2^\circ\text{C}/7$ ngày	$37 \pm 2^\circ\text{C}/14$ ngày
rDEN 1A30	0,47	0,42
rDEN 2/4A30	0,38	0,34
rDEN 3A30/31	0,17	0,17
rDEN 4A30	0,12	0,34

*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.

Kết quả thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp.

Bảng 21

Typ huyết thanh	Mức độ suy giảm liều lượng ($\text{Log}_{10}\text{PFU}/0,5\text{ml}$) của chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue ở các điều kiện bảo quản khác nhau						
	$25 \pm 2^\circ\text{C}$			$2-8^\circ\text{C}$			
	15 ngày	1 tháng	2 tháng	1 tháng	3 tháng	6 tháng	12 tháng
rDEN 1A30	0,00	0,17	0,98	0,12	0,07	0,07	0,12
rDEN 2/4A30	0,17	0,72	0,70	0,38	0,10	0,31	0,29
rDEN 3A30/31	0,03	0,13	0,78	0,00	0,00	0,06	0,20
rDEN 4A30	0,14	0,69	0,39	0,09	0,09	0,00	0,09

*Lưu ý: Khi kết quả của khoảng thời gian tiếp theo cao hơn hoặc bằng kết quả của khoảng thời gian ban đầu, thì mức độ suy giảm liều lượng được xem bằng 0.

Vi dụ 12

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 22.

Bảng 22

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue typ huyết thanh 1 (rDEN 1A30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue typ huyết thanh 2 (rDEN 2/4A30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue typ huyết thanh 3 (rDEN 3A30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue typ huyết thanh 4 (rDEN 4A30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá được		Hàm lượng
1	Colagen	22mg
2	Manitol	10mg
3	Trehaloza	5mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng $260\mu\text{g}$
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng $630\mu\text{g}$
7	Mononatri glutamat	Khoảng $460\mu\text{g}$
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng $750\mu\text{g}$

9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bào chế chế phẩm vaccin bán thành phẩm

Chế phẩm vaccin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đệm và tá được độn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, collagen được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Dulbecco cải biến) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vaccin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ nêu trên.

Ví dụ 13

Thành phần định tính và định lượng của chế phẩm vaccin đông khô chứa bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp được thể hiện trong Bảng 23.

Bảng 23

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1A30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4A30)*	Không nhỏ hơn $4,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3A30/31)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4A30)*	Không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}\text{PFU}^1$
Tá được		Hàm lượng
1	Collagen thủy phân	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480 μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850 μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bào chế chế phẩm vacxin bán thành phẩm

Chế phẩm vacxin chứa bốn chủng virus dengue này được bào chế bằng cách trộn các chủng virus dengue sống giảm độc lực, tái tổ hợp týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4 với dung dịch chứa tá được ổn định, tá được đậm và tá được dòn.

Để bào chế dung dịch chứa tá được, collagen thủy phân được bổ sung vào chai thủy tinh chứa nước vô trùng pha tiêm và phân tán để thu được dung dịch trong suốt. Các tá được còn lại (manitol, trehaloza, sucroza, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4), mononatri glutamat và môi trường Leibovitz L-15) được bổ sung lần lượt vào dung dịch nêu trên. Độ pH của hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH = $7,0 \pm 0,2$ bằng dung dịch HCl 1,0N/NaOH 1,0N. Hỗn hợp thu được được lọc qua màng lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng $0,2\mu\text{m}$ và làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sau đó, liều lượng đã được tính toán của virus dengue đặc hiệu (týp huyết thanh 1, 2, 3 và 4) được bổ sung vào hỗn hợp này và nước vô trùng pha tiêm được bổ sung đến thể tích vừa đủ. Khi cần, độ pH được điều chỉnh một lần nữa đến khoảng $7,0 \pm 0,2$.

Quy trình đông khô chế phẩm vacxin bán thành phẩm: như được thể hiện trong ví dụ nêu trên.

Toàn bộ các patent, đơn công bố và trang tóm tắt được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Mặc dù chỉ một số phương án của sáng chế đã được mô tả, nhưng cần hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện theo nhiều dạng cụ thể khác nhau mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Do đó, các ví dụ và phương án thực hiện sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ và phương án này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vacxin chứa:

(a) bốn chủng virus dengue sống giảm độc lực tái tổ hợp bao gồm virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31) và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30); và

(b) albumin huyết thanh người và/hoặc gelatin hoặc gelatin thủy phân và/hoặc collagen hoặc collagen thủy phân.

2. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó các chủng virus dengue này có kiểu hình nhạy cảm với nhiệt độ trong tế bào Vero hoặc dòng tế bào gan HuH-7 của người.

3. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược độn và/hoặc tá dược đệm

4. Chế phẩm vacxin theo điểm 3, trong đó tá dược độn được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, sucroza, manitol, hoặc trehaloza.

5. Chế phẩm vacxin theo điểm 3, trong đó tá dược đệm được chọn từ nhóm bao gồm kali dihydrophosphat, di-kali hydrophosphat, hoặc mononatri glutamat.

6. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa môi trường bổ sung.

7. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó độ pH cuối cùng của chế phẩm này nằm trong khoảng từ 6 đến 7.

8. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được đông khô.

9. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó các chủng virus dengue này được tăng sinh trong tế bào Vero.

10. Chế phẩm vacxin theo điểm 3, trong đó chế phẩm này chứa mỗi chủng virus dengue ở liều lượng không nhỏ hơn $3,0 \log_{10}$ (Đơn vị tạo vết tan)/0,5ml ($3,0 \log_{10}$ PFU/0,5ml).

11. Chế phẩm vacxin theo điểm 8, trong đó chế phẩm vacxin được đông khô này được hoàn nguyên để thu được chế phẩm vacxin ổn định.

12. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người và/hoặc gelatin hoặc gelatin thủy phân ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30mg/0,5ml và/hoặc collagen hoặc collagen thủy phân ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30mg/0,5ml.

13. Chế phẩm vacxin theo điểm 12, trong đó chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 15mg/0,5ml.

14. Chế phẩm vacxin theo điểm 13, trong đó chế phẩm này chứa albumin huyết thanh người ở hàm lượng bằng 12,5mg/0,5ml hoặc 10mg/0,5ml.
15. Chế phẩm vacxin theo điểm 12, trong đó chế phẩm này chứa gelatin hoặc gelatin thủy phân ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 25mg/0,5ml.
16. Chế phẩm vacxin theo điểm 15, trong đó chế phẩm này chứa gelatin hoặc gelatin thủy phân ở hàm lượng bằng 22mg/0,5ml hoặc 15mg/0,5ml.
17. Chế phẩm vacxin theo điểm 12, trong đó chế phẩm này chứa collagen hoặc collagen thủy phân ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 25mg/0,5ml.
18. Chế phẩm vacxin theo điểm 17, trong đó chế phẩm này chứa collagen hoặc collagen thủy phân ở hàm lượng bằng 22mg/0,5ml hoặc 15mg/0,5ml.
19. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là chế phẩm vacxin đông khô ổn định chứa bốn chủng virus dengue bao gồm virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30), virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30), virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31) và virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30), và albumin huyết thanh người và/hoặc gelatin hoặc gelatin thủy phân và/hoặc collagen hoặc collagen thủy phân.
20. Chế phẩm vacxin theo điểm 19, trong đó chế phẩm này chứa mỗi chủng virus dengue ở liều lượng không nhỏ hơn 3,0 log₁₀PFU/0,5ml.
21. Chế phẩm vacxin theo điểm 19, trong đó chế phẩm này được bào chế theo các công thức được thể hiện trong các Bảng sau:

Bảng 1

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virus dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virus dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virus dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virus dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	Nằm trong khoảng từ 10 đến 15mg
2	Lactosa monohydrat	Nằm trong khoảng từ 25 đến 50mg
3	Sucroza	Nằm trong khoảng từ 3 đến 25mg
4	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
5	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 2

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin	Nằm trong khoảng từ 10 đến 30mg
2	Manitol	Nằm trong khoảng từ 5 đến 25mg
3	Trehaloza	Nằm trong khoảng từ 4 đến 16mg
4	Sucroza	Nằm trong khoảng từ 25 đến 60mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 3

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	15mg
3	Trehaloza	8mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 7

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin	22mg
2	Manitol	10mg
3	Trehaloza	5mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 260μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 750μg

9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
---	------------------------	--------------

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 8

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá được		Hàm lượng
1	Gelatin	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 9

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá được		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	35mg
5	Kali dihydrophosphat (KH ₂ PO ₄)	Khoảng 270μg
6	Di-kali hydrophosphat (K ₂ HPO ₄)	Khoảng 630μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml

*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹PFU: Đơn vị tạo vết tan.

Bảng 10

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá được		Hàm lượng
1	Gelatin	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg

5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480 μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850 μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 11

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3 Δ 30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Gelatin thủy phân	22mg
2	Manitol	20mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480 μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850 μg
9	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500 μg
10	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 12

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3 Δ 30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	12,5mg
2	Lactoza monohidrat	37,5mg
3	Sucroza	5mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260 μg
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 460 μg
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500 μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 16

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3 Δ 30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4 Δ 30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng

1	Albumin huyết thanh người	10mg
2	Lactoza monohydrat	50mg
3	Sucroza	10mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260 μg
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 460 μg
7	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 600 μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 17

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	10mg
2	Lactoza monohydrat	25mg
3	Sucroza	6,5mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260 μg
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 480 μg
7	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 900 μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 18

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
Tá dược		Hàm lượng
1	Albumin huyết thanh người	14mg
2	Lactoza	40mg
3	Sucroza	25mg
4	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 280 μg
5	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 640 μg
6	Mononatri glutamat	Khoảng 440 μg
7	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 500 μg
8	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 19

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹

	Tá dược	Hàm lượng
1	Colagen thủy phân	22mg
2	Manitol	15mg
3	Trehaloza	8mg
4	Sucroza	37,5mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460 μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 500 μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 22

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
	Tá dược	Hàm lượng
1	Colagen	22mg
2	Manitol	10mg
3	Trehaloza	5mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 260 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 460 μg
8	Môi trường Dulbecco cải biến	Khoảng 750 μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

Bảng 23

Số thứ tự	Thành phần	Liều lượng/0,5ml
1	Virut dengue týp huyết thanh 1 (rDEN 1Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
2	Virut dengue týp huyết thanh 2 (rDEN 2/4Δ30)*	Không nhỏ hơn 4,0 log ₁₀ PFU ¹
3	Virut dengue týp huyết thanh 3 (rDEN 3Δ30/31)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
5	Virut dengue týp huyết thanh 4 (rDEN 4Δ30)*	Không nhỏ hơn 3,0 log ₁₀ PFU ¹
	Tá dược	Hàm lượng
1	Colagen thủy phân	15mg
2	Manitol	12mg
3	Trehaloza	10mg
4	Sucroza	55mg
5	Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	Khoảng 270 μg
6	Di-kali hydrophosphat (K_2HPO_4)	Khoảng 630 μg
7	Mononatri glutamat	Khoảng 480 μg
8	Môi trường Leibovitz L-15	Khoảng 850 μg
9	Nước vô trùng pha tiêm	Vừa đủ 0,5ml
*Tế bào vật chủ được sử dụng để tăng sinh: tế bào Vero. ¹ PFU: Đơn vị tạo vết tan.		

22. Kit vacxin bao gồm đồ chứa thứ nhất chứa chế phẩm vacxin ổn định theo điểm 19 và đồ chứa thứ hai chứa dung dịch nước để hoàn nguyên chế phẩm vacxin này.