



(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)



1-0034878

(51)⁷ A61K 47/28; A61K 47/14; A61K 9/19; (13) B
A61K 39/00; A61K 47/24

(21) 1-2014-02863

(22) 25/01/2013

(86) PCT/IB2013/000454 25/01/2013

(87) WO 2013/111012 01/08/2013

(30) 61/591,837 27/01/2012 US

(45) 27/02/2023 419

(43) 25/03/2015 324A

(73) Variation Biotechnologies Inc. (CA)

310 Hunt Club Road East, 2nd Floor, Ottawa, Ontario K1V 1C1, Canada

(72) KIRCHMEIER, Marc, J. (US); ANDERSON, David, E. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM ĐƯỢC LÀM KHÔ LẠNH ỔN ĐỊNH
NHIỆT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất trị liệu (ví dụ, kháng nguyên virus sống giảm độc lực, protein trị liệu, v.v.) và thành phần lipid. Thành phần lipid có thể bao gồm hoặc gồm các loại lipid khác nhau hoặc lipid như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, chất trị liệu là không bền nhiệt. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm, bao gồm chế phẩm được đề cập ở trên (ví dụ, phương pháp nấu chảy và phương pháp phun bụi trong số các phương pháp khác).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất trị liệu và thành phần lipit. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm, bao gồm chế phẩm được đề cập ở trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hầu hết các loại vacxin, bao gồm vacxin virus giảm độc lực, đều giảm hiệu lực theo thời gian và có tốc độ giảm hiệu lực phụ thuộc vào nhiệt độ. Do đó, hệ thống chuỗi bảo quản lạnh được thiết lập để đảm bảo rằng hiệu lực của vacxin được duy trì bằng cách bảo quản chúng ở điều kiện lạnh (trong hầu hết các trường hợp nằm trong khoảng nhiệt độ từ 2 đến 8°C) cho đến thời điểm sử dụng. Việc thiết lập chuỗi bảo quản lạnh để bảo quản và phân phối vacxin là nhiệm vụ chính và việc bảo quản là khá khó khăn. Cũng rõ ràng rằng mặc dù đã nỗ lực rất nhiều, tuy nhiên chuỗi bảo quản lạnh không luôn luôn có được chức năng mong đợi vì nhiều lý do, như thiết bị làm lạnh đã bị lỗi thời hoặc chưa được bảo dưỡng, thiết bị bị hỏng do ngừng cấp điện, không thực hiện đúng theo các quy trình của chuỗi bảo quản lạnh và không được kiểm tra thường xuyên. Kết quả là vacxin trong chuỗi bảo quản lạnh thường phụ thuộc vào khoảng lệch nhiệt độ (tức là, nhiệt độ nằm ngoài khoảng giá trị cuối).

Các chất trị liệu khác, ví dụ, protein trị liệu đã biết cũng bị giảm hiệu lực khi chúng được phơi nhiễm ở nhiệt độ cao. Do đó tồn tại nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật đối với các chế phẩm và phương pháp được cải thiện cho phép các chất trị liệu này có hiệu lực ổn định và giữ lại hiệu lực khi được phơi nhiễm ở nhiệt độ cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa chất trị liệu (ví dụ, kháng nguyên virus sống giảm độc lực, protein trị liệu, v.v.) và thành phần lipit. Thành

phần lipit có thể bao gồm hoặc gồm các loại lipit hoặc lipit khác nhau như được mô tả ở đây (trong bản mô tả này). Theo một số phương án, chất trị liệu không ổn định nhiệt (không bền nhiệt).

Theo một khía cạnh, thành phần lipit chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion. Theo một số phương án, thành phần lipit trong các chế phẩm này bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG).

Theo một khía cạnh khác, thành phần lipit chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion và một hoặc nhiều steroid. Theo một số phương án, thành phần lipit trong các chế phẩm này gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG) và steroid đơn (ví dụ, cholesterol).

Theo một khía cạnh khác, thành phần lipit bao gồm một hoặc nhiều lipit kết hợp để tạo ra nang (tức là, "chế phẩm nang"). Theo một số phương án, lipit được kết hợp để tạo ra các nang khi không có mặt chất trị liệu và tiếp đó được trộn lẫn với chất trị liệu (tức là, chế phẩm bao gồm "nang được tạo hình trước"). Theo một số phương án trong số các phương án này, lipit bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, steroid và amphiphil dạng ion. Các chế phẩm nang được điều chế phù hợp với các phương án này có thể bao gồm chất lưỡng phần dạng ion bất kỳ bao gồm chất lưỡng phần bất kỳ trong số các chất lưỡng phần dạng ion được nêu làm ví dụ được mô tả ở đây. Theo một số phương án, lipit được kết hợp để tạo ra nang với sự có mặt của chất trị liệu. Các chế phẩm nang được điều chế phù hợp với các phương án này có thể bao gồm phosphoglyxerit bất kỳ trong số các phosphoglyxerit được nêu làm ví dụ được mô tả ở đây có dạng chất lưỡng phần dạng ion. Theo một số phương án, thành phần lipit trong các chế phẩm nang này bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG), steroid đơn (ví dụ, cholesterol) và chất lưỡng phần dạng ion đơn (ví dụ, DCP hoặc DPPG). Theo một số phương án, thành phần lipit trong các chế phẩm nang này bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG), steroid đơn (ví dụ, cholesterol) và chất lưỡng phần dạng ion đơn (ví dụ, DCP) và nang được tạo hình trước. Theo một số phương án, thành phần lipit trong chế phẩm nang này bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion (ví dụ, MPG), steroid (ví dụ, cholesterol) và phosphoglyxerit dưới

dạng chất lưỡng phần dạng ion (ví dụ, DPPG) và vi nang được tạo hình trước hoặc được tạo ra với sự có mặt của chất trị liệu.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm, bao gồm chế phẩm được đề cập ở trên (ví dụ, phương pháp nấu chảy và phương pháp phun bụi và các phương pháp khác).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các kết quả được nêu làm ví dụ từ thử nghiệm hiệu lực đối với bệnh sởi (TCID₅₀) được tiến hành bằng cách sử dụng các vaccin M-M-R-II® được bào chế trước khác nhau (được bào chế bằng 25mg/ml lipid) được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C và khoảng 37°C trong thời gian 1, 2 và lên đến 12 tuần.

Fig.2 thể hiện các kết quả được nêu làm ví dụ từ thử nghiệm hiệu lực đối với bệnh sởi (TCID₅₀) được tiến hành bằng cách sử dụng các vaccin M-M-R-II® được bào chế trước khác nhau (được bào chế bằng 12,5mg/ml lipid) được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C và khoảng 37°C trong thời gian 1, 2 và lên đến 12 tuần.

Fig.3 thể hiện các kết quả về độ tinh khiết theo phần trăm từ phương pháp sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện bằng cách sử dụng trastuzumab được bào chế trước dưới dạng protein trị liệu được nêu làm ví dụ (được bào chế bằng 12,5mg/ml lipid) được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C và khoảng 40°C trong thời gian 4 và lên đến 8 tuần.

Fig.4 thể hiện các kết quả về hiệu lực từ thử nghiệm về hiệu lực sinh học chống tăng sinh BT-474 được thực hiện bằng cách sử dụng trastuzumab được bào chế trước dưới dạng protein trị liệu được nêu làm ví dụ (được bào chế bằng 12,5mg/ml lipid) được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C và khoảng 40°C trong thời gian 4 và lên đến 8 tuần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trong toàn bộ bản mô tả, một số thuật ngữ đã sử dụng được định nghĩa trong các đoạn dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng nguyên" hoặc "kháng nguyên virus" dùng để chỉ chất chứa một hoặc nhiều epitop có thể được nhận diện bởi kháng thể. Theo một số phương án, kháng nguyên có thể là virus. Thuật ngữ "kháng nguyên" không kể những nghĩa khác bao gồm virus giảm độc lực và bị bất hoạt. Theo một số phương án, kháng nguyên có thể là "chất gây miễn dịch".

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ đáp ứng được gây ra ở động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể đề cập đến miễn dịch qua trung gian tế bào, miễn dịch thể dịch hoặc có thể bao gồm cả hai. Đáp ứng miễn dịch cũng có thể được giới hạn ở một phần của hệ miễn dịch. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch có thể gây ra đáp ứng IFN γ tăng cường. Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch có thể gây ra đáp ứng IgA ở niêm mạc (ví dụ, được đo trong nước rửa mũi và/hoặc nước rửa trực tràng). Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch có thể gây ra đáp ứng IgG toàn thân (ví dụ, như được đo trong huyết thanh).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gây miễn dịch" có nghĩa là khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật chủ kháng lại thực thể không phải vật chủ (ví dụ, kháng nguyên virus). Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch này tạo ra nền tảng của tính miễn dịch bảo vệ bởi vaccin phòng ngừa sinh vật lây nhiễm đặc trưng (ví dụ, virus).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng hữu hiệu trị liệu" dùng để chỉ lượng đủ để cho thấy lợi ích đáng kể ở đối tượng được điều trị. Lượng hữu hiệu trị liệu của chế phẩm có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như điểm cuối sinh học mong muốn, bản chất của chế phẩm, đường dùng, sức khỏe, kích thước và/hoặc tuổi của đối tượng được điều trị, v.v..

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị" (hoặc "sự điều trị", "được điều trị", "việc điều trị", v.v.) dùng để chỉ việc dùng chế phẩm cho đối tượng bị bệnh, triệu chứng bệnh hoặc tổ bệnh của bệnh, với mục đích để làm giảm bớt, làm dịu đi, biến đổi, cải thiện hoặc tác động đến bệnh, triệu chứng hoặc các triệu chứng của bệnh, hoặc tổ bệnh của bệnh. Theo một số phương án, thuật ngữ "sự điều trị" dùng để chỉ sự chủng ngừa cho đối tượng.

Mô tả chi tiết các phương án

I. Chế phẩm

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất trị liệu và thành phần lipid. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thành phần lipid" bao gồm tất cả các lipid có trong chế phẩm. Thành phần lipid có thể bao gồm hoặc gồm các loại lipid hoặc lipid khác nhau như được mô tả ở đây.

Thành phần lipid

Theo một khía cạnh, thành phần lipid chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion. Theo một số phương án, thành phần lipid chứa chất hoạt động bề mặt không ion đơn. Không giới hạn theo sáng chế, ví dụ về các chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp bao gồm chất hoạt động bề mặt được liên kết este trên cơ sở glyxerol. Este glyxerol này có thể bao gồm một nhóm trong số hai nhóm axyl béo cao hơn, ví dụ, chứa ít nhất mười nguyên tử cacbon trong mỗi gốc axyl. Chất hoạt động bề mặt không ion trên cơ sở este glyxerol này có thể bao gồm nhiều hơn một đơn vị glyxerol, ví dụ, lên đến 5 đơn vị glyxerol. Monoeste glyxerol có thể được sử dụng, ví dụ, monoeste glyxerol chứa gốc C_{12} - C_{20} alkanoyl hoặc alkenoyl, ví dụ caproyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, oleyl hoặc stearyl. Chất hoạt động bề mặt không ion được nêu làm ví dụ là 1-monopalmitoyl glyxerol (MPG). Chất hoạt động bề mặt được liên kết ete cũng có thể được sử dụng dưới dạng chất hoạt động bề mặt không ion. Ví dụ, chất hoạt động bề mặt được liên kết ete trên cơ sở glyxerol hoặc glycol có glycol béo thấp hơn có lên đến 4 nguyên tử cacbon, như etylen glycol, là thích hợp. Chất hoạt động bề mặt không ion trên cơ sở glycol này có thể bao gồm nhiều hơn một đơn vị glycol, ví dụ, lên đến 5 đơn vị glycol (ví dụ, diglycolxetyl ete và/hoặc polyoxyetylen-3-lauryl ete). Glycol hoặc glyxerol monoete có thể được sử dụng, bao gồm các glycol hoặc glyxerol monoete chứa gốc C_{12} - C_{20} alkanyl hoặc alkenyl, ví dụ capryl, lauryl, myristyl, xetyl, oleyl hoặc stearyl. Các sản phẩm ngưng tụ etylen oxit có thể được sử dụng bao gồm các sản phẩm được bộc lộ trong Công bố PCT Số WO88/06882 (ví dụ, chất hoạt động bề mặt ete và amin béo cao hơn polyoxyetylen). Chất hoạt động bề mặt được liên kết ete được nêu làm ví dụ bao gồm 1-monoxetyl glyxerol ete và diglycolxetyl ete.

Theo một khía cạnh khác, thành phần lipit chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt không ion và một hoặc nhiều steroid (ví dụ, sterol như cholesterol). Theo một số phương án, thành phần lipit chứa chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG) và steroid đơn (ví dụ, cholesterol). Theo một số phương án, (các) chất hoạt động bề mặt không ion và (các) steroid có trong chế phẩm với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 6:4 đến khoảng 4:4, ví dụ, khoảng 5:4.

Theo một khía cạnh khác, thành phần lipit chứa một hoặc nhiều lipit, mà các lipit này kết hợp để tạo thành nang (tức là, "chế phẩm nang").

Theo một số phương án, lipit được kết hợp để tạo thành các nang với sự có mặt của chất trị liệu và tiếp đó được trộn với chất trị liệu (tức là, chế phẩm bao gồm "nang được tạo hình trước"). Theo một số phương án này, lipit bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, steroid (ví dụ, sterol như cholesterol) và chất lưỡng phần dạng ion. Chế phẩm nang được điều chế phù hợp với các phương án này có thể bao gồm chất lưỡng phần dạng ion bất kỳ bao gồm chất lưỡng phần bất kỳ trong số các chất lưỡng phần dạng ion được nêu làm ví dụ được mô tả dưới đây.

Theo một số phương án, lipit được kết hợp để tạo ra nang với sự có mặt của chất trị liệu. Chế phẩm nang được điều chế phù hợp với các phương án này có thể bao gồm phosphoglyxerit bất kỳ trong số các phosphoglyxerit được nêu làm ví dụ được mô tả dưới đây có dạng chất lưỡng phần dạng ion.

Chất lưỡng phần dạng ion được nêu làm ví dụ có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vật liệu có tính axit như axit alkanoic và alkenoic cao hơn (ví dụ, axit palmitic, axit oleic) hoặc các hợp chất khác chứa nhóm axit bao gồm các phosphat như dialkyl phosphat (ví dụ, dixetylphosphat hoặc DCP, hoặc axit phosphatidic hoặc phosphatidyl serin) và monoeste sulphat như alkyl sulphat cao hơn (ví dụ, xetylsulphat), tất cả có thể được sử dụng cho mục đích này.

Như được lưu ý ở trên, theo một số phương án, phosphoglyxerit (cũng được biết đến dưới dạng glyxerophospholipit) có thể được sử dụng làm chất lưỡng phần dạng ion. Phosphoglyxerit có thể là plasmalogen, phosphatidat (như phosphatidyletanoamin, phosphatidylcholin), phosphatidylcholin, hoặc chất tương tự. Phosphoglyxerit được nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

diphosphatidyl glyxerol (DPPG); 1,2-dipalmitoyl-sn-glyxero-3-phospho-L-serin (DPPS); 1,2-distearoyl-sn-glyxero-3-phosphatidylcholin (DSPC); 1,2-distearoyl-sn-glyxero-3-phosphoetanolamin (DSPE); phosphatidylcholin dipalmitoyl (DPPC) và dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, thành phần lipid trong các chế phẩm nang này gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG), steroid đơn (ví dụ, cholesterol) và chất lưỡng phần dạng ion đơn (ví dụ, DCP hoặc DPPG). Theo một số phương án, thành phần lipid trong các chế phẩm nang này gồm chất hoạt động bề mặt không ion đơn (ví dụ, MPG), steroid đơn (ví dụ, cholesterol) và chất lưỡng phần dạng ion đơn (ví dụ, DCP) và nang được tạo hình trước. Theo một số phương án, thành phần lipid trong các chế phẩm nang này gồm chất hoạt động bề mặt không ion (ví dụ, MPG), steroid (ví dụ, cholesterol) và phosphoglyxerit có dạng chất lưỡng phần dạng ion (ví dụ, DPPG) và nang được tạo hình trước hoặc được tạo ra với sự có mặt của chất trị liệu.

Theo một số phương án, (các) chất hoạt động bề mặt không ion và steroid có mặt trong các chế phẩm nang này có tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 6:4 đến khoảng 4:4, ví dụ, khoảng 5:4. Theo một số phương án, (các) chất hoạt động bề mặt không ion và chất lưỡng phần dạng ion có mặt trong các chế phẩm nang này với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 6:1 đến khoảng 4:1, ví dụ, khoảng 5:1. Theo một số phương án, steroid và chất lưỡng phần dạng ion có mặt trong các chế phẩm nang này với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 5:1 đến khoảng 3:1, ví dụ, khoảng 4:1.

Theo các phương án đã biết, hàm lượng lipid thu được ít nhất bằng khoảng 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 hoặc 95mg/ml. Theo các phương án đã biết, hàm lượng lipid nằm trong khoảng từ 5mg/ml đến khoảng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc 25mg/ml. Theo các phương án đã biết, nồng độ lipid nằm trong khoảng 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15mg/ml đến khoảng 30mg/ml. Theo các phương án đã biết, nồng độ lipid nằm trong khoảng từ 5mg/ml đến khoảng 50mg/ml, từ khoảng 5mg/ml đến khoảng 25mg/ml, từ khoảng 10mg/ml đến khoảng 50mg/ml, từ

khoảng 10mg/ml đến khoảng 30mg/ml, hoặc từ khoảng 10mg/ml đến khoảng 50mg/ml.

Theo một số phương án, các chế phẩm được mô tả ở đây không bao gồm phân tử làm tăng sự vận chuyển tạo thuận lợi cho việc vận chuyển các phân tử giống lipit qua niêm mạc. Theo một số phương án, các chế phẩm không bao gồm "axit mật" như axit cholic và axit chenodeoxycholic, sản phẩm liên hợp của chúng với glyxin hoặc taurin như axit glycocholic và taurocholic, các dẫn xuất bao gồm axit deoxycholic và ursodeoxycholic, và muối của từng axit trong số các axit này. Theo một số phương án, chế phẩm không bao gồm axit amin được axyloxyl hóa, như axylcarnitin và muối của nó, và palmitoylcarnitin.

Chất trị liệu

Sáng chế bao gồm việc sử dụng các loại chất trị liệu khác nhau. Theo một số phương án, các chất này không bền nhiệt. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất không bền nhiệt" dùng để chỉ các chất bị mất hiệu lực khi được phơi nhiễm (tiếp xúc) ở nhiệt độ cao định trước. Theo một số phương án, sự phơi nhiễm của chất không bền nhiệt ở nhiệt độ cao làm mất 20% hiệu lực của kháng nguyên (ví dụ, trên 30%, trên 40%, trên 50% hoặc lớn hơn) như được đo trong thử nghiệm về hiệu lực (ví dụ, trên cơ sở trị số IC_{50} hoặc EC_{50}) so với chất không được xử lý. Theo một số phương án, kháng nguyên không bền nhiệt mất hiệu lực ở nhiệt độ cao hơn 30°C (ví dụ, cao hơn 35°C, cao hơn 40°C, cao hơn 45°C, hoặc cao hơn 50°C). Theo một số phương án, thời gian bảo quản chất không bền nhiệt ở nhiệt độ cao này lớn hơn 3 phút (ví dụ, 5 phút, 10 phút, 15 phút hoặc lớn hơn) làm mất trên 20% hiệu lực (ví dụ, trên 30%, trên 40%, trên 50% hoặc lớn hơn) như được đo trong thử nghiệm về hiệu lực (ví dụ, trên cơ sở trị số IC_{50} hoặc EC_{50}) so với chất không được xử lý. Tuy nhiên nên hiểu rằng các phương pháp và chế phẩm trong bản mô tả không giới hạn ở các chất không bền nhiệt và, theo một số phương án, các phương pháp hoặc chế phẩm cũng có thể bao gồm các chất ổn định hơn bao gồm các chất trị liệu phân tử nhỏ truyền thống.

Kháng nguyên virus - Kháng nguyên virus gây bệnh sởi, bệnh quai bị, bệnh rubella và bệnh thủy đậu

Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella là ba bệnh phổ biến ở trẻ nhỏ gây ra bởi sự lây nhiễm virus (lần lượt bởi virus gây bệnh sởi (paramyxovirus), virus gây bệnh quai bị (paramyxovirus), và virus gây bệnh rubella (togavirus)). Việc nhiễm bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella có thể gây ra các biến chứng y học nghiêm trọng, có thể làm chết người. Bệnh sởi là bệnh nhiễm trùng hệ hô hấp và gây ra các triệu chứng bao gồm sốt, ho, sổ mũi, và phát ban toàn thân, và thường dẫn đến các biến chứng như bệnh viêm phổi và bệnh viêm não. Bệnh quai bị là bệnh nhiễm trùng gây ra các triệu chứng bao gồm viêm, sốt, đau đầu và viêm tinh hoàn, và có thể dẫn đến các biến chứng như bệnh viêm màng não vô trùng và tật điếc. Bệnh rubella, thường được biết đến là bệnh sởi Đức, thường gây ra các triệu chứng nhẹ, mặc dù sự nhiễm trùng từ mẹ trong giai đoạn mang thai có thể khá nghiêm trọng.

Vaccine phòng bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella được sản xuất từ virus giảm độc lực sống được nhân giống trong cơ chất tế bào. Mỗi thành phần của vaccine MMR ban đầu được điều chế dưới dạng hóa trị một, mỗi thành phần của vaccine tiếp đó được trộn cùng nhau để tạo ra dạng hóa trị ba trong đó chủng virus thành phần có mặt với lượng được xác định đủ để gây ra đáp ứng miễn dịch hữu hiệu cho người nhận vaccine. Vaccine MMR trên thị trường được chứa trong lọ nhỏ được làm khô lạnh, chúng phải được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong thời gian không quá 3 năm theo các chỉ dẫn được cấp phép. Tuy nhiên, một số yếu tố bao gồm chế phẩm chất ổn định, điều kiện bảo quản và độ ẩm dư có thể ảnh hưởng đến độ ổn định nhiệt của vaccine được làm khô lạnh. Tổ chức y tế thế giới (World Health Organization - WHO) khuyến cáo thử nghiệm về liều gây nhiễm tế bào canh trường mô (Tissue culture infective doses - TCID₅₀) sử dụng các tế bào Vero để đánh giá hiệu lực của virus gây bệnh sởi sống trong vaccine. Tuy nhiên, các số đo hiệu lực có thể thay đổi phụ thuộc vào phương pháp xác định, phòng thí nghiệm, và điều kiện tại thời điểm thử nghiệm.

WHO đã thiết lập các yêu cầu tối thiểu về độ ổn định của vaccine dưới dạng được làm khô ở nhiệt độ thấp cũng như khi được tái tạo dưới dạng dung dịch lỏng trước khi dùng. Trong trạng thái được làm khô ở nhiệt độ thấp, vaccine phòng bệnh sởi này phải giữ lại được hiệu lực tối thiểu ít nhất 3,0 log₁₀ hạt virus trên mỗi liều

dùng ở người sau khi phơi nhiễm ở nhiệt độ bằng 37°C trong thời gian ít nhất một tuần và liều dùng chuẩn độ của virus không giảm bằng lớn hơn 1,0 log₁₀ trong khi ủ. Tuy nhiên, vaccin phòng bệnh sởi đã hoàn nguyên nhanh chóng bị giảm hiệu lực khi phơi nhiễm ở nhiệt độ trong phòng. Ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 25°C, vaccin mất khoảng 50% hiệu lực trong một giờ. Ở nhiệt độ lớn hơn 37°C, vaccin bị bất hoạt trong thời gian một giờ (The Immunological Basis for Immunization Series, Module 7: Measles (WHO/EPI/GEN/93.17)).

Một số vaccin phòng bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella (MMR) giảm độc lực hiện nay đã được cấp phép và làm giảm thành công tỷ lệ mắc phải bệnh nhiễm virus, và có thể được sử dụng theo sáng chế.

Theo một số phương án, các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng với một hoặc nhiều kháng nguyên chứa trong vaccin được cấp phép hoặc đang phát triển. Bảng 1 là danh mục không giới hạn các vaccin được cấp phép hoặc đang phát triển đối với các bệnh nhiễm trùng do bệnh sởi, bệnh quai bị, bệnh rubella và bệnh thủy đậu.

Bảng 1

Vaccin	Bệnh
Attenuvax [®]	Bệnh sởi
Diplovax HDC 4.0 [®]	Bệnh sởi
Morbilvax [®]	Bệnh sởi
Rimevax [®]	Bệnh sởi
M-R-Vax, M-R-Vax II [®]	Bệnh sởi và bệnh rubella
Moru-Viraten [®]	Bệnh sởi và bệnh rubella
M-M-R Vax [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
M-M-R-II [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
M-M-RvaxPRO [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
Priorix [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
Trimovax [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
Triviraten Berna [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella
ProQuad [®]	Bệnh sởi, bệnh quai bị, bệnh rubella và bệnh thủy đậu
Mumpsivax [®]	Bệnh quai bị
Rubilin [®]	Bệnh quai bị và bệnh rubella
Meruvax II [®]	Bệnh rubella
Ervevax [®]	Bệnh rubella
R-Vac [®]	Bệnh rubella
Varivax [®]	Bệnh thủy đậu

Trong phần dưới đây chúng tôi sẽ bàn luận về các kháng nguyên virus được nêu làm ví dụ này và các kháng nguyên virus được nêu làm ví dụ khác có thể được sử dụng trong chế phẩm hoặc phương pháp theo sáng chế.

Ở Mỹ, vaccin phòng bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella (MMR) đầu tiên được cấp phép vào năm 1971, với liều vaccin thứ hai được giới thiệu vào năm 1989. Nói chung, trong một số nước tại đó việc tiêm chủng MMR lúc nhỏ được thực hiện hằng ngày, tỷ lệ mắc phải bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella đã giảm đáng kể (ví dụ, nhiều hơn 99% vào năm 1995 so với số ca vào năm 1941).

Vaccin phòng bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella (MMR) giảm độc lực khác nhau hiện nay đã được cấp phép. Ví dụ, M-M-R-II[®] được phát triển và được sản xuất bởi Merck & Co., Inc. M-M-R-II[®] chứa chế phẩm được làm khô lạnh vô trùng chứa (1) dòng virus gây bệnh sởi Attenuvax[®] (Vaccin virus gây bệnh sởi sống) giảm độc lực, (2) chủng virus gây bệnh quai bị được nhân giống trong canh trường tế bào phôi gà Mumpsvac[®] (vaccin virus gây bệnh quai bị sống), và (3) chủng giảm độc lực của virus gây bệnh rubella Meruvax II[®] (Vaccin virus gây bệnh rubella sống). Mỗi liều 0,5mL không chứa ít hơn 1000 TCID₅₀ (liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy) của virus gây bệnh sởi, không ít hơn 5000 TCID₅₀ virus gây bệnh quai bị, và không ít hơn 1000 TCID₅₀ virus gây bệnh rubella. Sau khi hoàn nguyên, M-M-R-II[®] (như với các vaccin MMR được cấp phép khác) thường được dùng qua đường dưới da. Mặc dù một liều M-M-R-II[®] ở trẻ em trên 12 tháng tuổi thường cảm ứng sản xuất các kháng thể trung hòa, một số người bệnh không chuyển đổi huyết thanh sau liều thứ nhất. Do đó, liều nhắc lại thứ hai được chỉ định, đặc biệt là trước khi vào trường tiểu học, để chuyển đổi huyết thanh của người mà không đáp ứng với liều thứ nhất. Để đảm bảo không làm mất hiệu lực của vaccin M-M-R-II[®], nó phải được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 10°C hoặc lạnh hơn trong khi vận chuyển, được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong khi bảo quản ở trạng thái được làm khô lạnh, và được sử dụng trong thời gian 8 giờ sau khi hoàn nguyên.

Một ví dụ khác về vaccin MMR, PROQUAD® cũng chứa thành phần virus gây bệnh thủy đậu đã được cấp phép và được bán tại Mỹ bởi Merck, mặc dù việc sản xuất hiện nay đã bị đình chỉ. PROQUAD® được dùng một lần cho trẻ trên 12 tháng tuổi, với liều nhắc lại tùy ý được dùng ít nhất ba tháng sau đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm virus bị bất hoạt hoặc giảm độc lực. Nên hiểu rằng các chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất bởi sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thành phần của vaccin MMR (ví dụ, virus gây bệnh sởi, bệnh quai bị, hoặc bệnh rubella, hoặc hỗn hợp của chúng). Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch chứa thành phần virus gây bệnh thủy đậu (ví dụ, một mình, như với VARIVAX®, hoặc kết hợp với các thành phần virus khác, như với PROQUAD®).

Như được đề cập ở trên, tất cả các vaccin MMR được cấp phép đã biết bao gồm virus giảm độc lực. Nên hiểu rằng vaccin bất kỳ trong số các vaccin được cấp phép này có thể được sử dụng như được mô tả ở đây để tạo ra chế phẩm gây miễn dịch. Ví dụ, M-M-R-II® thương mại có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm gây miễn dịch. Theo một số phương án, vaccin đã được cấp phép được tinh chế lần thứ nhất (ví dụ, để loại bỏ tá dược phenol hoặc chất phản ứng khác trong vaccin). Theo một số phương án, vaccin đã được cấp phép không được tinh chế trước khi bào chế như được mô tả ở đây.

Như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ưu điểm của virus giảm độc lực là khả năng gây miễn dịch cao hơn do nó có khả năng tái bản *in vivo* mà không gây ra bệnh nhiễm trùng toàn bộ. Một phương pháp được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật để điều chế virus giảm độc lực là phương pháp làm thích nghi virus bao gồm bước cấy chuyển lần lượt chủng virus qua nhiều canh trường tế bào. Theo thời gian chủng đột biến và chủng giảm độc lực tiếp đó có thể được nhận biết. Ví dụ, để điều chế M-M-R-II®, chủng giảm độc lực của virus gây bệnh sởi được nhân giống trong canh trường tế bào phôi gà, chủng gây bệnh quai bị mức độ B được nhân giống trong canh trường tế bào phôi gà, và chủng gây bệnh rubella giảm độc lực được nhân giống trong nguyên bào sợi phổi lưỡng bội người. Theo một số phương án, virus có thể được cấy chuyển qua các canh trường tế bào khác nhau.

Cần phải nhận biết rằng chủng virus gây bệnh sởi, bệnh quai bị, và/hoặc bệnh rubella bất kỳ có thể được sử dụng, ví dụ, mà không giới hạn ở chủng bất kỳ trong số các chủng dưới đây, các chủng này đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này:

- Chủng Edmonston giảm độc lực Enders của virus gây bệnh sởi (AttA)
- Chủng AIK-C giảm độc lực của virus gây bệnh sởi
- Chủng Jeryl Lynn (mức độ B) của virus gây bệnh quai bị
- Chủng Leningrad Zagreb của virus gây bệnh quai bị
- Chủng Urabe Am 9 của virus gây bệnh quai bị
- Chủng Wistar RA 27/3 của virus gây bệnh rubella
- Virus gây bệnh rubella Giguere; 1964 ở Mỹ
- Virus gây bệnh rubella HPV-77; 1961 ở Mỹ
- Virus gây bệnh rubella Judith; 1963 Liverpool U.K.
- Virus gây bệnh rubella KO-1; 1967 Kochi, Nhật

Trong khi tất cả các vắc xin MMR được cấp phép hiện nay chứa virus giảm độc lực, vắc xin thay thế chứa virus bị bất hoạt có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch có thể chứa virus bị bất hoạt. Cần phải nhận biết rằng phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng để điều chế virus bị bất hoạt. Nói chung, các phương pháp này sẽ bao gồm bước nhân giống virus trong tế bào chủ, bước làm tiêu (ly giải) tế bào chủ để giải phóng virus, bước phân lập và tiếp đó là bất hoạt virus. Virus thường được thu từ canh trường tế bào và được sàng lọc theo liều gây nhiễm cũng như về sự không có mặt của các chất ngẫu nhiên (ngoại lai). Việc xử lý virus bằng hóa chất (ví dụ, formalin, formaldehyt, trong số các hóa chất khác) thường được sử dụng để bất hoạt virus. Tuy nhiên, nên hiểu rằng các kỹ thuật khác có thể được sử dụng, ví dụ, phương pháp xử lý bằng clo, phương pháp tiếp xúc với nhiệt độ cao, v.v..

Kháng nguyên virus - các chất khác

Bảng 2 là danh sách không hạn chế các vắc xin giảm độc lực sống khác được cấp phép hoặc đang phát triển. Điều này được hiểu là các chế phẩm được tạo ra bởi sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thành phần của vắc xin này.

Bảng 2

Vaccin	Bệnh
DA2PPC	Bệnh Care ở chó, Adenovirut tuýp 2, virus gây bệnh khó thở ở trẻ em (Parainfluenza), bệnh nhiễm Parvovirut ở chó, và bệnh nhiễm Coronavirut ở chó
RotaTeq [®]	Rotavirut
Rotarix [®]	Rotavirut
Zostavax [®]	Bệnh zona
Dryvax [®]	Bệnh đậu mùa và bệnh đậu mùa khi
YF-Vax [®]	Bệnh sốt vàng
Vaccin virus PRRS	Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn
Vaccin virus PR	Virus gây bệnh giả dại

Bệnh Care ở chó là bệnh gây ra bởi sự nhiễm virus gây bệnh Care ở chó, là một paramyxovirus có liên quan mật thiết với virus gây bệnh sởi. Virus gây bệnh Care ở chó có thể gây ra các bệnh lý y khoa nghiêm trọng ảnh hưởng đến các loài động vật có vú khác nhau bao gồm chó, chồn (*Mustela*), chồn hôi, linh cẩu, gấu trúc Bắc Mỹ, và mèo hoang dã. Bệnh nhiễm trùng Care ở chó có thể gây ra các triệu chứng bao gồm sốt, biếng ăn, chảy nước mũi, và chảy mủ mắt, và nói chung thường dẫn đến các biến chứng như chứng viêm phổi và chứng viêm não. Vaccin phòng bệnh Care ở chó giảm độc lực đã được cấp phép, bao gồm vaccin DA2PPC đa trị, bảo vệ chống lại bệnh Care ở chó (D), adenovirus tuýp 2 (A2), virus gây bệnh khó thở ở trẻ em (P), Parvovirus ở chó (P) và coronavirus ở chó (C). Nên hiểu rằng các chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra bởi sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thành phần DA2PPC (ví dụ, kháng nguyên virus gây bệnh Care ở chó).

Bệnh nhiễm rotavirus dẫn đến bệnh viêm dạ dày ruột do rotavirus, có thể đặc biệt nghiêm trọng đối với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Vaccin giảm độc lực sống được cấp phép để điều trị bệnh nhiễm rotavirus bao gồm RotaTeq[®] và Rotarix[®]. RotaTeq[®] được chỉ định để ngăn ngừa bệnh viêm dạ dày ruột do rotavirus gây ra bởi các kiểu huyết thanh G1, G2, G3, và G4 của virus. RotaTeq[®] được dùng qua đường miệng theo đợt ba liều cho trẻ sơ sinh ở độ tuổi nằm trong khoảng từ 6 đến 32 tuần. Mỗi 2ml liều RotaTeq[®] chứa virus tái tổ hợp trao đổi sống, chứa G1, G2, G3, G4, và P1A và chứa lượng tối thiểu từ 2,0 đến 2,8 x 10⁶ đơn vị gây nhiễm (infectious unit - IU). Rotarix[®] được chỉ định để ngăn ngừa bệnh viêm dạ dày ruột

do rotavirus gây ra bởi kiểu huyết thanh G1, G3, G4, và G9 của virus. Rotarix® được dùng qua đường miệng theo đợt hai liều cho trẻ sơ sinh trong độ tuổi từ 6 tuần và 24 tuần tuổi. Mỗi 1ml liều Rotarix® chứa một lượng tối thiểu 10^6 CCID₅₀ rotavirus G1P ở người giảm độc lực, sống.

Bệnh zona là bệnh nhiễm virus rễ thần kinh, thường gây ra chứng đau và chứng phát ban trên một phía cơ thể. Bệnh zona là bệnh phổ biến nhất ở người lớn tuổi và người có hệ miễn dịch yếu. Virus được cấp phép để điều trị bệnh zona gây ra bởi virus gây bệnh zona là Zostavax®, là chế phẩm được làm khô lạnh chứa chủng Oka/Merck của virus gây bệnh thủy đậu-écpet giảm độc lực, sống. Zostavax® được chỉ định dùng dưới da và được chỉ định cho các cá nhân 60 tuổi và già hơn. Mỗi 0,65ml liều Zostavax® chứa ít nhất 19400pfu virus giảm độc lực, sống.

Một ví dụ khác về vaccin giảm độc lực sống được cấp phép là DRYVAX®, là chế phẩm virus sống chứa virus gây bệnh đậu mùa để điều trị bệnh nhiễm virus gây bệnh đậu mùa. DRYVAX® được điều chế từ bạch huyết bê được tinh chế, cô đặc, và được làm khô bằng cách làm khô lạnh. Vaccin được hoàn nguyên được chỉ ra chứa không nhiều hơn 200 sinh vật vi khuẩn có thể sống được trên mỗi ml. DRYVAX® được chỉ định sử dụng để tiêm nhiều lần, tức là, sử dụng vaccin vào các lớp bề mặt da sử dụng kim rỗng. Thông thường, việc tiêm chủng bằng DRYVAX® dẫn đến sự nhân virus, sự miễn dịch, và sự quá mẫn cảm của tế bào. Đối với lần tiêm chủng đầu tiên, nốt sần xuất hiện tại vị trí tiêm chủng trong thời gian từ ngày thứ hai đến ngày thứ năm. Nốt sần này trở thành bóng trong khoảng ngày thứ 5 hoặc ngày thứ 6, bóng này trở thành mụn mủ, có lõm, và ban đỏ xung quanh và trở nên cứng. Vùng ban đỏ rộng nhất xuất hiện trong thời gian từ ngày thứ 8 đến ngày thứ 12 sau khi tiêm chủng (thường là ngày thứ 10). Chứng ban đỏ và sưng tấy sau đó giảm bớt đi, và vảy cứng tạo ra, vảy cứng này sẽ tróc ra trong thời gian từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 21. Tại điểm cao nhất của phản ứng ban đầu được biết đến là đáp ứng Jennerian, thường có bệnh hạch bạch huyết vùng và có thể có biểu hiện toàn thân như chứng sốt và khó chịu. Lần tiêm chủng đầu tiên bằng DRYVAX® có hiệu lực 100 triệu đơn vị tạo nốt đậu mùa (pfu)/ml được thể

hiện tạo ra tỷ lệ đáp ứng 97% bởi cả phản ứng chính và đáp ứng kháng thể trung hòa ở trẻ nhỏ.

Ví dụ khác của vaccin giảm độc lực sống được cấp phép là YF-VAX® để điều trị bệnh nhiễm virus sốt vàng. YF-VAX® được điều chế bằng cách nuôi cấy chủng virus sốt vàng 17D trong phôi gà không chứa virus gây bệnh bạch cầu chim sống. YF-VAX® được làm khô lạnh và được bịt kín bằng nitơ để bảo quản và được hoàn nguyên ngay trước khi sử dụng. YF-VAX® được bào chế chứa không ít hơn 5,04 Log₁₀ pfu trên mỗi 0,5ml liều dùng. Thông thường, tính miễn dịch đối với bệnh sốt vàng tiến triển vào ngày thứ mười sau lần tiêm chủng đầu tiên bằng YF-VAX®. Mặc dù đã chứng minh được rằng khả năng miễn dịch của vaccin phòng bệnh sốt vàng có thể duy trì trong thời gian ít nhất từ 30 đến 35 năm, và một vài trường hợp, các lần tiêm chủng vaccin sống, liều nhắc lại cần trong khoảng thời gian khoảng 10 năm để tăng hiệu giá kháng thể.

Virus gây ra hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), cũng được biết đến là bệnh tai xanh ở lợn là virus gây bệnh ở lợn, được gọi là hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS). Bệnh dịch lớn, quan trọng trong kinh tế làm mất khả năng sinh sản ở gia súc giống và chứng bệnh đường hô hấp ở lợn con. Vaccin sống giảm độc lực được phát triển để ngăn ngừa PRRS.

Bệnh giả dại là bệnh do virus ở lợn là bệnh địa phương ở hầu hết các vùng trên thế giới. Bệnh này gây ra bởi virus Suid herpes 1 (SuHV-1), cũng được gọi là virus giả dại (PRV) và cũng được biết đến là bệnh Aujeszky, và ở gia súc là bệnh ngứa điên. Động vật có vú hoang dã và vật nuôi khác, như bò, cừu, dê, mèo, chó, và gấu trúc Bắc Mỹ, cũng dễ bị ảnh hưởng do bệnh này thường không tránh được. Nghiên cứu trên PRV ở lợn khởi đầu cho việc kiểm soát bệnh ở động vật bằng vaccin giảm độc lực sống. Mặc dù từ "bệnh giả dại" có nghĩa là "bệnh dại giả," hoặc "giống bệnh dại," nhưng nó là thuật ngữ sai. Bệnh giả dại dùng để chỉ virus ecpet, chứ không phải là virus dại.

Protein trị liệu

Nhiều protein trị liệu (bao gồm nhiều protein trị liệu không bền nhiệt) hiện nay đã được cấp phép hoặc đang phát triển và có thể được sử dụng theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein" dùng để chỉ polyme của axit amin. Theo một số phương án, protein có thể bao gồm các gốc khác axit amin (ví dụ, có thể là glycoprotein, proteoglycan, lipoprotein, v.v.) và/hoặc theo cách khác có thể được xử lý hoặc cải biến. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng "protein" có thể là chuỗi polypeptit hoàn chỉnh được tạo ra bởi tế bào (có hoặc không có trình tự tín hiệu), hoặc có thể là một phần của nó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng protein đôi khi có thể chứa nhiều hơn một chuỗi polypeptit, ví dụ, được liên kết bằng một hoặc nhiều liên kết disulfua hoặc được kết hợp bằng các cách khác. Polypeptit có thể chứa L-axit amin, D-axit amin, hoặc cả hai và có thể chứa các cải biến axit amin khác nhau hoặc các gốc tương tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Protein trị liệu là các protein được chiết từ tế bào người hoặc được thao tác di truyền trong phòng thí nghiệm để sử dụng trong y học. Phần lớn các protein trị liệu là protein tái tổ hợp ở người được sản xuất bằng cách sử dụng dòng tế bào động vật có vú không phải người được thao tác di truyền để biểu hiện các trình tự di truyền đã biết ở người để tạo ra protein đặc hiệu. Protein tái tổ hợp là một nhóm quan trọng trong các phép trị liệu được sử dụng, ví dụ, để thay thế các thiếu hụt yếu tố sinh trưởng quan trọng được mang bởi máu và để tăng cường hệ miễn dịch chống lại bệnh ung thư và bệnh nhiễm trùng. Protein trị liệu cũng được sử dụng để làm giảm bớt nhiều bệnh lý của người bệnh, bao gồm các bệnh ung thư khác nhau (được điều trị bằng kháng thể đơn dòng và interferon), cơn đau tim, chứng đột quỵ, chứng xơ nang và bệnh Gaucher (được điều trị bằng enzym và yếu tố nhóm máu), bệnh đái tháo đường (được điều trị bằng insulin), bệnh thiếu máu (được điều trị bằng erythropoietin), và bệnh ưa chảy máu (được điều trị bằng các yếu tố đông máu).

FDA có 75 protein trị liệu được chấp nhận, cũng được biết đến dưới dạng dược phẩm sinh học, và có nhiều hơn 500 protein bổ sung đang được phát triển. Các sản phẩm sinh học trị liệu hiện nay đang được xem xét điều chỉnh bao gồm:

kháng thể đơn dòng, xytokin, yếu tố sinh trưởng, enzym, chất điều biến miễn dịch; và chất làm tan huyết khối và protein được dùng để trị liệu được chiết từ động vật hoặc vi sinh vật, bao gồm các dạng tái tổ hợp của các sản phẩm này và các liệu pháp miễn dịch trị liệu không phải vaccin khác.

Theo một số phương án, protein trị liệu là kháng thể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" được dùng để bao gồm globulin miễn dịch và đoạn (mảnh) của chúng phản ứng đặc hiệu với protein hoặc peptit được chỉ định, hoặc đoạn của nó. Các kháng thể thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể người, kháng thể được linh trưởng hóa, kháng thể thể khảm, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể được nhân hóa, kháng thể liên hợp (tức là, kháng thể được liên hợp hoặc được dung hợp với protein khác, nhãn (chất đánh dấu) phóng xạ, độc tố tế bào), được phẩm miễn dịch modul nhỏ (Small Modular ImmunoPharmaceuticals - SMIPs™), kháng thể chuỗi đơn, kháng thể lạc đà, phân tử giống kháng thể, và đoạn kháng thể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" cũng bao gồm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, kháng thể đa dòng, kháng thể vùng đơn (ví dụ, kháng thể vùng đơn ở cá mập (ví dụ, IgNAR hoặc đoạn của nó)), kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể nguyên vẹn, và đoạn kháng thể với điều kiện là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Kháng thể có thể thuộc loại bất kỳ (ví dụ, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

Theo một số phương án, protein trị liệu là đoạn kháng thể. Như được sử dụng ở đây, "đoạn kháng thể" (hoặc mảnh kháng thể) bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn, như, ví dụ, vùng biến đổi hoặc vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Các ví dụ về đoạn kháng thể bao gồm các đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, Fc và Fv; kháng thể đặc hiệu ba tái tổ hợp; kháng thể đặc hiệu bốn tái tổ hợp; kháng thể tuyến tính; phân tử kháng thể chuỗi đơn; và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ đoạn kháng nguyên. Thuật ngữ "đoạn kháng thể" cũng bao gồm protein được thiết kế di truyền hoặc protein tổng hợp có chức năng giống kháng thể bằng cách liên kết với kháng nguyên đặc hiệu để tạo ra phức hợp. Ví dụ, đoạn kháng thể bao gồm các đoạn được phân lập, đoạn "Fv", gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, phân tử polypeptit chuỗi đơn tái tổ hợp trong đó vùng biến đổi chuỗi

nặng và chuỗi nhẹ được nối bằng mối liên kết peptit ("protein ScFv"), và bộ phận nhận diện tối thiểu gồm các gốc axit amin bắt chước vùng siêu biến.

Một số protein trị liệu được nêu làm ví dụ có thể được sử dụng theo sáng chế được liệt kê trong Bảng 3 dưới đây. Một protein trị liệu được nêu làm ví dụ là Herceptin® (trastuzumab), kháng thể đơn dòng được nhân hóa liên kết với thành phần ngoại bào của thụ thể Her2/neu, protein gây ung thư xuyên màng 185kDa được biểu hiện quá mức trong khoảng từ 20 đến 25% người bệnh bị bệnh ung thư vú. Kháng thể và các dược phẩm sinh học tương tự khác được thiết kế để biểu hiện isotyp Fc-Gama-1 ở người để làm tăng cả chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (Complement Dependent Cytotoxicity - CDC) và chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity - ADCC) của kháng thể. Chức năng có liên quan đến Fab của trastuzumab có khả năng liên kết với ái lực cao với vùng ngoại bào của thụ thể Her2/neu ức chế sự tăng sinh tế bào và ngăn ngừa sự hình thành mạch.

Polynucleotit

Polynucleotit cũng có thể được sử dụng phù hợp với sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ polyme của nucleotit. Polyme có thể bao gồm nucleosit tự nhiên (tức là, adenosin, thymidin, guanosin, xytidin, uridin, deoxyadenosin, deoxythymidin, deoxyguanosin, và deoxy xytidin), chất tương tự nucleosit (ví dụ, 2-aminoadenosin, 2-thiothymidin, inosin, pyrolopyrimidin, 3-metyl adenosin, 5-metylxytidin, C5-bromouridin, C5-flouridin, C5-ioturidin, C5-propynyl-uridin, C5-propynyl-xytidin, C5-metylxytidin, 7-deazaadenosin, 7-deazaguanosin, 8-oxoadenosin, 8-oxoguanosin, 0(6)-metylguanin, 4-axetylxytidin, 5-(carboxyhydroxymetyl)uridin, dihydrouridin, metylpseudouridin, 1 -metyl adenosin, 1-metyl guanosin, N6-metyl adenosin, và 2-thioxytidin), bazơ được cải biến hóa học, bazơ được cải biến sinh học (ví dụ, bazơ metyl hóa), bazơ xen kẽ, đường được cải biến (ví dụ, 2'-floriboza, riboza, 2'-deoxyriboza, 2'-0-metylxytidin, arabinoza, và hexoza), hoặc nhóm phosphat được cải biến (ví dụ, mối liên kết phosphothioat và 5' -N-phosphoamidit).

Theo một số phương án, polynucleotit được sử dụng phù hợp với sáng chế là ADN, ARN, aptame, shARN, siARN, miARN, và/hoặc ARN đối nghĩa, ARN antagomir.

Polysacarit

Polysacarit cũng có thể được sử dụng phù hợp với sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polysacarit" dùng để chỉ polyme của đường. Polyme có thể bao gồm đường tự nhiên (ví dụ, arabinoza, lyxoza, riboza, xyloza, ribuloza, xyluloza, aloza, altroza, galactoza, glucoza, guloza, idoza, manoz, taloza, fructoza, psicoza, sorboza, tagatoza, manoheptuloza, sedoheptuloza, octuloza, và sialoza) và/hoặc đường được cải biến (ví dụ, 2'-floriboza, 2'-deoxyriboza, và hexoza).

Phân tử nhỏ

Như được lưu ý ở phần trước, trong khi các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế được cho là đặc biệt hữu ích đối với các chất không bền nhiệt, các chất này theo một số phương án được hiểu là có thể được sử dụng với các chất ổn định hơn bao gồm các chất trị liệu phân tử nhỏ truyền thống. Nhiều phân tử nhỏ trị liệu được phát triển và có thể được sử dụng phù hợp với sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất trị liệu phân tử nhỏ" dùng để chỉ phân tử trị liệu không phải polyme có thể chứa một số liên kết cacbon-cacbon và có trọng lượng phân tử nhỏ hơn khoảng 1500Da (ví dụ, nhỏ hơn khoảng 1000Da, nhỏ hơn khoảng 500Da hoặc nhỏ hơn khoảng 200Da). Chất trị liệu phân tử nhỏ có thể được tổng hợp trong phòng thí nghiệm (ví dụ, bằng sự tổng hợp kết hợp, sử dụng vi sinh vật được thao tác di truyền, v.v.) hoặc có thể được tìm thấy trong tự nhiên (ví dụ, sản phẩm tự nhiên). Nói chung, chất trị liệu phân tử nhỏ có thể thay đổi, ức chế, hoạt hóa, hoặc nói cách khác ảnh hưởng đến sự kiện sinh học. Ví dụ, chất trị liệu phân tử nhỏ có thể gồm, nhưng không giới hạn ở, chất trị bệnh AIDS, chất trị bệnh ung thư, thuốc kháng sinh, chất trị bệnh đái tháo đường, chất ức chế miễn dịch, chất kháng virus, chất ức chế enzym, độc tố thần kinh, opioit, thuốc ngủ, thuốc kháng histamin, chất bôi trơn, thuốc an thần, thuốc chống co giật, thuốc giãn cơ và chất trị bệnh Parkinson, thuốc chống co thắt và chất co cơ bao gồm chất phong bế (chẹn) kênh,

thuốc thu hẹp đồng tử và thuốc chống tiết cholin, hợp chất trị bệnh tăng nhãn áp, hợp chất kháng động vật ký sinh và/hoặc kháng động vật nguyên sinh, chất điều biến các tương tác chất nền ngoại bào-tế bào bao gồm chất ức chế sự sinh trưởng tế bào và phân tử chống dính bám, chất giãn mạch, chất ức chế ADN, ARN hoặc sự tổng hợp protein, thuốc chống tăng huyết áp, thuốc giảm đau, thuốc sốt, chất chống viêm steroid và không steroid, yếu tố chống tạo mạch, chất chống bài tiết, thuốc chống đông tụ và/hoặc chất chống huyết khối, thuốc gây mê cục bộ, thuốc chữa mắt, prostaglandin, thuốc chống trầm cảm, chất chống loạn thần kinh, thuốc chống nôn, và chất tạo ảnh. Danh mục đầy đủ hơn của các phân tử nhỏ được nêu làm ví dụ thích hợp để sử dụng trong các phương pháp trong sáng chế có thể được tìm thấy trong *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications*, biên tập bởi Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, biên tập bởi Susan Budavari et al., CRC Press, 1996, và the *United States Pharmacopeia-25 /National formulary-20*, được công bố bởi United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2001. Tốt hơn nếu, mặc dù không nhất thiết, phân tử nhỏ là một phân tử được cho rằng an toàn và hiệu quả để sử dụng bởi hội đồng hoặc cơ quan chính phủ. Ví dụ, thuốc sử dụng cho người được liệt kê bởi FDA theo 21 C.F.R. §§ 330,5, 331 đến 361, và 440 đến 460 và thuốc sử dụng trong thú y được liệt kê bởi FDA theo 21 C.F.R. §§ 500 đến 589, tất cả được chấp nhận để sử dụng phù hợp với các phương pháp của sáng chế.

Chất trị liệu được nêu làm ví dụ

Bảng 3 đề xuất danh mục không giới hạn các chất được nêu làm ví dụ bổ sung có thể được sử dụng phù hợp với sáng chế.

Bảng 3

Chất	Thuốc tham khảo
Urokinaza	Abbokinase [®]
interferon gama-1b	Actimmune [®]
alteplaza	Activase [®] /Cathflo [®]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	Advate
albumin người	Albutein [®]
laronidaza	Aldurazyme [®]

Chất	Thuốc tham khảo
interferon alfa-n3	Alferon N [®]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu ở người	Alphanate [®]
yếu tố đông tụ IX ở người được lọc virut	AlphaNine [®] SD
alefacept	Amevive [®]
bivalirudin	Angiomax [®]
darbepoetin alfa	Aranesp [™]
bevacizumab	Avastin [™]
interferon beta-1a	Avonex [®]
yếu tố đông tụ IX	BeneFix [™]
interferon beta-1b	Betaseron [®]
tositumomab	Bexxar [®]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	Bioclate [™]
hoóc môn sinh trưởng người	BioTropin [™]
độc tố botulin tuýp A	Botox [®]
alemtuzumab	Campath [®]
acritumomab; được đánh dấu techneti-99	CEA-Scan [®]
algluxeraza	Ceredase [®]
imigluxeraza	Cerezyme [®]
Peginterferon alfa2a	Copasys Copegus [®]
Fab miễn dịch đa hóa trị kháng nọc rắn	CroFab [™]
Fab miễn dịch digoxin	DigiFab [™]
rasburicaza	Elitek [®]
Asparaginaza	Elspar [®]
etanercept	Enbrel [®]
epoietin alfa	Epogen [®]
cetuximab	Erbix [™]
algasidaza beta	Fabrazyme [®]
urofolitropin	Fertinex [™]
folitropin beta	Follistim [™]
teriparatit	Forteo [®]
Somatropin người	GenoTropin [®]
glucagon	GlucaGen [®]
folitropin alfa	Gonal-F [®]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	Helixate [®]
yếu tố XIII	Hemofil [®]
Trastuzumab	Herceptin [®]
insulin	Humalog [®]
phức hợp yếu tố trị bệnh ưa chảy máu/yếu tố von Willebrand - người	Humate-P [®]
somatotropin	Humatrope [®]
adalimumab	Humira [™]
Insulin người	Humulin [®]
Hyaluronidaza tái tổ hợp ở người	Hylenex [™]

Chất	Thuốc tham khảo
interferon alfacon-1	Infergen [®]
eptifibatit	Integrilin [™]
alpha-interferon	Intron A [®]
palifermin	Kepivance
anakinra	Kineret [™]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	Kogenate [®] FS
insulin glargin	Lantus [®]
yếu tố kích thích cụm đại thực bào bạch cầu hạt	Leukine [®]
lutropin alfa, để tiêm	Luveris
ranibizumab	Lucentis [®]
Độc tố botulin tuýp B	Myobloc [®]
gemtuzumab ozogamixin	Mylotarg [™]
galsulfaza	Naglazyme [™]
nesiritit	Natrecor [®]
pegfilgrastim	Neulasta [™]
oprelvekin	Neumega [®]
filgrastim	Neupogen [®]
fanolesomab	NeutroSpec [™]
somatropin	Norditropin [®] /Norditropin Nordiflex [®]
insulin; huyền phù kẽm	Novolin L [®]
insulin; huyền phù isophan	Novolin N [®]
insulin, thông thường	Novolin R [®]
insulin	Novolin [®]
yếu tố đông tụ VIIa	NovoSeven [®]
somatropin	Nutropin [®]
globulin miễn dịch trong tĩnh mạch	Octagam [®]
L-asparaginaza pegyl hóa	Oncaspar [®]
Denileukin diftitox	Ontak [®]
abatacept	Orencia [™]
muromomab-CD3	Orthoclone OKT3 [®]
Gonadotropin màng đệm người	Ovidrel [®]
interferon alfa-2a pegyl hóa	Pegasys [®]
interferon alfa-2b pegyl hóa	PEG-Intron [™]
abarelix	Plenaxis [™]
epoietin alfa	Procrit [®]
aldesleukin	Proleukin, IL-2 [®]
somatrem	Protropin [®]
Capromab Pendetit	ProstaScint [®]
dornaza alfa	Pulmozyme [®]
efalizumab	Raptiva [™]

Chất	Thuốc tham khảo
interferon beta-1a	Rebif [®]
yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	Recombinate [®]
rAHF/yếu tố trị bệnh ưa chảy máu	ReFacto [®]
lepirudin	Refludan [®]
Becaplermin	Regranex [®]
infliximab	Remicade [®]
abxiximab	ReoPro [™]
reteplaza	Retavase [™]
rituximab	Rituxan [™]
interferon alfa-2a	Roferon-A [®]
somatropin	Saizen [®]
Colagenaza	Santyl [®]
Hoóc môn tiết (Secretin) tổng hợp ở lợn	SecreFlo [™]
basiliximab	Simulect [®]
eculizumab	Soliris [®]
pegvisomant	Somavert [®]
palivizumab	Synagis [™]
Streptokinaza	Streptase [®]
thyrotropin alfa	Thyrogen [®]
tenecteplaza	TNKase [™]
natalizumab	Tysabri [®]
Nofetumomab	Verluma [®]
interferon alfa-n1	Wellferon [®]
drotrecogin alfa	Xigris [™]
omalizumab	Xolair [®]
daclizumab	Zenapax [®]
ibritumomab tiuxetan	Zevalin [™]
somatotropin	Zorbtive [™] (Serostim [®])

II. Phương pháp điều chế chế phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm chứa chế phẩm được đề cập ở trên. Phương pháp đặc trưng được sử dụng có thể phụ thuộc vào bản chất của chất trị liệu, bản chất của thành phần lipid, nang có được tạo ra hay không và các nang này có được tạo ra với sự có mặt hoặc không có mặt chất trị liệu hay không.

Chế phẩm với nang được tạo hình trước

Trong trường hợp chế phẩm chứa nang được tạo hình trước, nang có thể được điều chế phù hợp với phương pháp đã biết bất kỳ và tiếp đó được kết hợp với chất

trị liệu để tạo ra chế phẩm. Ví dụ, kỹ thuật được nêu làm ví dụ là phương pháp bay hơi màng kiểu quay, trong đó màng của lipit tạo thành nang được điều chế bằng phương pháp bay hơi kiểu quay từ dung môi hữu cơ, ví dụ, hydrocacbon hoặc dung môi hydrocacbon được clo hóa như clorofom, ví dụ, xem Russell and Alexander, *J. Immunol.* 140: 1274, 1988. Màng mỏng tạo thành tiếp đó được hydrat hóa lại trong dung dịch đệm bicarbonat để tạo ra nang.

Phương pháp khác bao gồm sự hydrat hóa với sự có mặt của lực cắt. Thiết bị có thể được sử dụng để gây ra lực cắt này đã được biết, thiết bị thích hợp (xem, ví dụ, Công bố PCT Số WO88/06882). Phương pháp dùng sóng âm và sóng siêu âm cũng là các phương pháp hiệu quả để tạo ra nang hoặc để thay đổi kích thước hạt của chúng.

Một phương pháp khác để sản xuất nang được bộc lộ bởi Collins et al, *J. Pharm. Pharmacol.* 42:53, 1990. Phương pháp này bao gồm bước nấu chảy hỗn hợp chứa lipit tạo nang và hydrat hóa bằng cách trộn mạnh với sự có mặt của dung dịch đệm chứa nước.

Nên hiểu rằng các phương pháp khác, bao gồm các phương pháp nấu chảy và phương pháp phun bụi khác được mô tả dưới đây cũng được sử dụng để điều chế nang được tạo hình trước.

Các chế phẩm khác

Khi các nang được tạo hình với sự có mặt của chất trị liệu này tốt hơn nếu (nhưng không nhất thiết) được điều chế bằng một trong các phương pháp phun bụi hoặc phương pháp nấu chảy dưới đây. Các chế phẩm không nhất thiết phải chứa nang (ví dụ, chế phẩm được điều chế bằng cách sử dụng các thành phần lipit chứa chất hoạt động bề mặt không ion như MPG hoặc chất hoạt động bề mặt không ion và steroid như MPG/cholesterol) cũng có thể được điều chế theo cách này dù là chúng không cần thiết phải tạo thành các nang. Như được bàn luận trong các tài liệu khác, các phương pháp này tránh được sự phơi nhiễm của chất trị liệu với dung môi hữu cơ và nhiệt độ cao. Mà không bị giới hạn bởi lý thuyết, các phương pháp này do đó được cho là để giảm thiểu sự hư hại của chất trị liệu (và do đó bị mất hiệu lực) có thể tạo ra từ các phương pháp bào chế khác.

Phương pháp nấu chảy - Tiêu chuẩn

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước nấu chảy (các) lipid của thành phần lipid và tiếp đó trộn chúng với chất trị liệu. Theo một số phương án, các phương pháp này bao gồm các bước tạo ra hỗn hợp nấu chảy chứa một hoặc nhiều lipid và tiếp đó bổ sung dung dịch nước chứa chất trị liệu vào hỗn hợp nấu chảy (phương pháp nấu chảy tiêu chuẩn). Theo một số phương án lipid tạo thành nang khi được bổ sung vào dung dịch nước.

Nên hiểu rằng hỗn hợp nấu chảy chứa một hoặc nhiều lipid có thể thu được theo cách bất kỳ, ví dụ, (các) lipid được nấu chảy để tạo thành hỗn hợp nấu chảy. Theo một số phương án, (các) lipid được nấu chảy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 150°C (ví dụ, nằm trong khoảng từ 120°C đến 125°C, nằm trong khoảng từ 120°C đến 130°C, nằm trong khoảng từ 120°C đến 140°C, nằm trong khoảng từ 130°C đến 140°C, nằm trong khoảng từ 135°C đến 145°C, hoặc nằm trong khoảng từ 140°C đến 145°C).

Theo một số phương án, hỗn hợp được tạo ra bằng cách bổ sung dung dịch kháng nguyên vào hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid được đặt dưới các điều kiện được kiểm soát nhiệt độ nhỏ hơn 60°C, ví dụ, nhỏ hơn 55°C, nhỏ hơn 50°C, nhỏ hơn 45°C, nhỏ hơn 40°C, nhỏ hơn 35°C, nhỏ hơn 30°C, nhỏ hơn 25°C hoặc thậm trí nhỏ hơn 20°C. Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid có thể được đặt dưới các điều kiện được kiểm soát nhiệt độ (ví dụ, sử dụng bồn nước) ngay trước khi bổ sung dung dịch kháng nguyên. Mặt khác, dung dịch kháng nguyên có thể được bổ sung vào hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid và hỗn hợp tạo thành tiếp đó thể được đặt dưới các điều kiện được kiểm soát nhiệt độ. Theo một số phương án, hỗn hợp được tạo ra bằng cách bổ sung dung dịch kháng nguyên vào hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid được đặt dưới các điều kiện được kiểm soát nhiệt độ nằm trong khoảng nhiệt độ từ 20 đến 60°C, ví dụ, từ 20 đến 50°C, từ 20 đến 40°C, từ 20 đến 30°C, từ 30 đến 60°C, từ 30 đến 50°C, từ 30 đến 40°C, từ 40 đến 60°C, từ 40 đến 50°C, hoặc từ 50 đến 60°C. Nên hiểu rằng thuật ngữ "điều kiện được kiểm soát nhiệt độ" không cần đến nhiệt độ được cố định ở nhiệt độ cụ

thể nhưng đơn giản là nhiệt độ giữ trong khoảng (ví dụ, $\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\pm 2^{\circ}\text{C}$, $\pm 5^{\circ}\text{C}$, $\pm 10^{\circ}\text{C}$, v.v., từ một vài trị số) hoặc nhiệt độ giữ ở dưới hoặc trên nhiệt độ cụ thể.

Theo một số phương án, dung dịch nước chứa kháng nguyên ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C khi được bổ sung vào hỗn hợp chứa (các) lipit được nấu chảy, ví dụ, nhỏ hơn 45°C , nhỏ hơn 40°C , nhỏ hơn 35°C , nhỏ hơn 30°C , nhỏ hơn 25°C hoặc thậm trí nhỏ hơn 20°C . Theo một số phương án, dung dịch nước chứa kháng nguyên ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 60°C , ví dụ, từ 20 đến 50°C , từ 20 đến 40°C , từ 20 đến 30°C , từ 30 đến 60°C , từ 30 đến 50°C , từ 30 đến 40°C , từ 40 đến 60°C , từ 40 đến 50°C , hoặc từ 50 đến 60°C khi được bổ sung vào hỗn hợp chứa (các) lipit được nấu chảy. Theo một số phương án, dung dịch nước chứa kháng nguyên được đặt dưới sự kiểm soát nhiệt độ trước khi được bổ sung vào hỗn hợp chứa (các) lipit được nấu chảy.

Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipit ở nhiệt độ không lớn hơn 50°C cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi dung dịch kháng nguyên được bổ sung vào. Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipit ở nhiệt độ không lớn hơn 45°C , 40°C , 35°C , 30°C , 25°C , 20°C , 10°C , hoặc 5°C cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi dung dịch kháng nguyên được bổ sung vào. Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipit ở nhiệt độ không lớn hơn từ 5 đến 50°C , ví dụ, từ 5 đến 40°C , từ 5 đến 30°C , từ 5 đến 20°C , từ 5 đến 10°C , từ 10 đến 50°C , từ 10 đến 40°C , từ 10 đến 30°C , hoặc từ 10 đến 20°C cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi dung dịch kháng nguyên được bổ sung vào. Ví dụ, theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipit ở nhiệt độ nhỏ hơn 110°C , nhỏ hơn 100°C , nhỏ hơn 90°C , hoặc nhỏ hơn 80°C khi dung dịch kháng nguyên được bổ sung vào.

Phương pháp nấu chảy - Được nghịch chuyển

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước nấu chảy (các) lipit của thành phần lipit và tiếp đó bổ sung hỗn hợp chứa (các) lipit được nấu chảy vào dung dịch nước chứa chất trị liệu (phương pháp nấu chảy được nghịch chuyển). Theo một số phương án, lipit tạo thành nang khi được bổ sung vào dung dịch nước.

Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C khi bổ sung hỗn hợp chứa lipid được nấu chảy vào, ví dụ, nhỏ hơn 45°C, nhỏ hơn 40°C, nhỏ hơn 35°C, nhỏ hơn 30°C, nhỏ hơn 25°C hoặc thậm chí nhỏ hơn 20°C. Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu và/hoặc chất phòng bệnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 60°C, ví dụ, từ 20 đến 50°C, từ 20 đến 40°C, từ 20 đến 30°C, từ 30 đến 60°C, từ 30 đến 50°C, từ 30 đến 40°C, từ 40 đến 60°C, từ 40 đến 50°C, hoặc từ 50 đến 60°C khi hỗn hợp chứa (các) lipid được nấu chảy được bổ sung vào. Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu dưới sự kiểm soát nhiệt độ.

Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 150°C (ví dụ, nằm trong khoảng từ 120°C đến 125°C, nằm trong khoảng từ 120°C đến 130°C, nằm trong khoảng từ 120°C đến 140°C, nằm trong khoảng từ 130°C đến 140°C, nằm trong khoảng từ 135°C đến 145°C, hoặc nằm trong khoảng từ 140°C đến 145°C) khi được bổ sung vào dung dịch nước.

Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid ở nhiệt độ không lớn hơn 50°C, nhưng cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi được bổ sung vào dung dịch nước. Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid ở nhiệt độ không lớn hơn 45°C, 40°C, 35°C, 30°C, 25°C, 20°C, 10°C, hoặc 5°C cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi được bổ sung vào dung dịch nước. Theo một số phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid ở nhiệt độ không lớn hơn từ 5 đến 50°C, ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 40°C, từ 5 đến 30°C, từ 5 đến 20°C, từ 5 đến 10°C, từ 10 đến 50°C, từ 10 đến 40°C, từ 10 đến 30°C, hoặc từ 10 đến 20°C cao hơn nhiệt độ nóng chảy của nó khi được bổ sung vào dung dịch nước. Ví dụ, theo một vài phương án, hỗn hợp nấu chảy chứa (các) lipid ở nhiệt độ nhỏ hơn 120°C, nhỏ hơn 110°C, nhỏ hơn 100°C, hoặc nhỏ hơn 90°C, khi được bổ sung vào dung dịch nước.

Phương pháp phun dung môi

Theo một số phương án, chế phẩm có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp phun dung môi. Ví dụ, theo một số phương án, các phương pháp có

thể bao gồm bước cung cấp dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit và bước bổ sung dung dịch chứa lipit vào dung dịch nước bao gồm chất trị liệu bằng cách phun.

Phương pháp phun dung môi có thể tạo ra một số ưu điểm so với các phương pháp điều chế khác, ví dụ, các phương pháp này bao gồm phương pháp nhiệt độ hoặc áp suất cao, do (các) lipit có thể được hòa tan trong dung môi hữu cơ dưới các điều kiện kiểm soát nhiệt độ. Hơn nữa, phương pháp đồng nhất hóa ở áp suất cao có thể tránh được bằng cách sử dụng phương pháp phun dung môi.

Theo một số phương án, hỗn hợp được tạo ra bằng cách phun dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit vào dung dịch nước chứa chất trị liệu được đặt dưới các điều kiện được kiểm soát nhiệt độ nhỏ hơn 55°C, ví dụ, nhỏ hơn 50°C, nhỏ hơn 45°C, nhỏ hơn 40°C, nhỏ hơn 35°C, nhỏ hơn 30°C, nhỏ hơn 25°C hoặc thậm chí nhỏ hơn 20°C. Theo một số phương án, hỗn hợp được tạo ra bằng cách phun dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit vào dung dịch nước chứa chất trị liệu được đặt dưới điều kiện được kiểm soát áp suất nằm trong khoảng nhiệt độ từ 20 đến 55°C, ví dụ, từ 20 đến 50°C, từ 20 đến 40°C, từ 20 đến 30°C, từ 30 đến 55°C, từ 30 đến 50°C, từ 30 đến 40°C, từ 40 đến 55°C, từ 40 đến 50°C, hoặc từ 50 đến 55°C.

Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu phòng bệnh ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C trước khi phun dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit, ví dụ, nhỏ hơn 45°C, nhỏ hơn 40°C, nhỏ hơn 35°C, nhỏ hơn 30°C, nhỏ hơn 25°C hoặc thậm chí nhỏ hơn 20°C. Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 60°C, ví dụ, từ 20 đến 50°C, từ 20 đến 40°C, từ 20 đến 30°C, từ 30 đến 60°C, từ 30 đến 50°C, từ 30 đến 40°C, từ 30 đến 35°C, từ 40 đến 60°C, hoặc từ 40 đến 50°C trước khi phun vào dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit. Theo một số phương án, dung dịch nước chứa chất trị liệu được đặt dưới sự kiểm soát nhiệt độ trước khi phun vào dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit.

Theo một số phương án, dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit ở nhiệt độ nhỏ hơn 90°C khi nó được phun vào dung dịch nước chứa chất trị liệu, ví dụ, nhỏ hơn 80°C, nhỏ hơn 70°C, nhỏ hơn 65°C, nhỏ hơn 60°C, hoặc nhỏ hơn 55°C. Theo một số phương án, dung dịch chứa một hoặc nhiều lipit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ

50 đến 90°C khi nó được phun vào dung dịch nước chứa chất trị liệu, ví dụ, từ 50 đến 80°C, từ 50 đến 70°C, từ 50 đến 65°C, từ 50 đến 60°C, từ 50 đến 55°C, từ 55 đến 80°C, từ 55 đến 70°C, từ 55 đến 65°C, hoặc từ 55 đến 60°C.

Các phương pháp phun dung môi khác nhau đã được bộc lộ và được làm phù hợp với sáng chế. Ví dụ, phương pháp phun dung môi trong đó lipid được hòa tan trong diethyl ete được bàn luận trong Syan et al. (Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery, J. Chemical and Pharmaceutical Research 2(2):496, 2010). Trong một ví dụ khác, phương pháp phun dung môi trong đó lipid được hòa tan trong etanol được bàn luận trong Wagner et al. (Liposome Technology for Industrial Purposes, J. Drug Delivery; Volume 2011, Article ID 591325). Trong một ví dụ khác, rượu tert-butylic được sử dụng để hòa tan lipid như được mô tả bởi Wang et al. (Colloids and Surfaces V: Biointerfaces 79:254, 2010). Tham khảo các phương pháp trong Schubert M.A. et al. (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 55:125-131, 2003).

Theo một số phương án, (các) lipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ. Theo một số phương án, dung môi là dung môi ete, ví dụ, diethyl ete. Theo một số phương án, dung môi là dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực. Dung môi proton hóa là dung môi chứa các proton có thể phân ly (ví dụ, nguyên tử hydro được liên kết với oxy như trong nhóm hydroxyl hoặc nitơ như trong nhóm amin). Theo một số phương án, dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực là rượu béo có 2 đến 5 nguyên tử cacbon (ví dụ, 2 nguyên tử cacbon, 3 nguyên tử cacbon, 4 nguyên tử cacbon, hoặc 5 nguyên tử cacbon). Theo một số phương án, dung môi là tert-butanol. Theo một số phương án, dung môi là etanol.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực mà không có đồng dung môi. Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực khi có mặt một hoặc nhiều đồng dung môi. Theo một số phương án, một hoặc nhiều đồng dung môi cũng là dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực. Theo một số phương án,

dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước proton hóa phân cực tạo ra ít nhất 70% thể tích/thể tích của hệ dung môi, ví dụ, ít nhất 75%, 80%, 90%, 95% hoặc 99%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipit được hòa tan trong hệ dung môi không chứa nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipit được hòa tan trong hệ dung môi chứa một lượng nước sao cho không tạo ra nang. Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipit được hòa tan trong hệ dung môi, hệ dung môi này chứa ít hơn 5% thể tích/thể tích nước, ví dụ, nhỏ hơn 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1%.

Phương pháp làm khô lạnh (đông khô nhanh)

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể được làm khô lạnh để sử dụng trong các bước tiếp theo và sau đó được hydrat hóa trước khi sử dụng.

Phương pháp làm khô lạnh bao gồm bước kết đông chế phẩm và tiếp đó làm giảm áp suất của môi trường xung quanh (và tùy ý gia nhiệt chế phẩm) để (các) dung môi đã đóng băng được thăng hoa trực tiếp từ pha rắn thành khí (tức là, pha sấy khô). Theo một số phương án, pha sấy khô được chia thành pha sấy khô thứ cấp và sơ cấp.

Pha đông đặc (kết đông) có thể được tiến hành bằng cách đặt chế phẩm vào vật chứa (ví dụ, bình thót cổ, ống eppendorf, v.v.) và tùy ý quay vật chứa trong bồn được làm mát bằng sự làm lạnh cơ học (ví dụ, sử dụng đá khô và methanol, nitơ lỏng, v.v.). Theo một số phương án, bước kết đông bao gồm bước làm mát chế phẩm đến nhiệt độ thấp hơn điểm eutectic của chế phẩm. Do điểm eutectic xuất hiện ở nhiệt độ thấp nhất tại đó pha rắn và pha lỏng của chế phẩm có thể cùng tồn tại, duy trì vật liệu ở nhiệt độ thấp hơn điểm này để đảm bảo vật liệu sẽ thăng hoa chứ không bay hơi trong bước tiếp theo.

Pha sấy khô (hoặc pha sấy khô sơ cấp khi sử dụng hai pha sấy khô) bao gồm bước làm giảm áp suất và tùy ý gia nhiệt chế phẩm đến điểm mà tại đó (các) dung môi có thể thăng hoa. Pha sấy khô này thường loại bỏ phần lớn (các) dung môi khỏi chế phẩm. Cần phải nhận biết rằng pha đông đặc và pha sấy khô không nhất thiết là các pha riêng biệt mà có thể được kết hợp theo cách bất kỳ. Ví dụ, theo một số phương án, pha đông đặc và pha sấy khô có thể chồng lấp.

Pha sấy khô thứ cấp có thể tùy ý được sử dụng để loại bỏ (các) dung môi dư được hấp phụ trong pha đông đặc. Không tách rời khỏi lý thuyết, pha này bao gồm bước làm tăng nhiệt độ để phá vỡ các tương tác vật lý - hóa học bất kỳ được tạo ra giữa các phân tử dung môi và chế phẩm được làm lạnh. Khi pha sấy khô hoàn thành, chân không có thể được phá vỡ bằng khí trơ (ví dụ, nitơ hoặc heli) trước khi sản phẩm được làm khô lạnh tùy ý được bịt kín.

Theo một số phương án, sản phẩm được làm khô lạnh gần như không chứa (các) dung môi hữu cơ.

Các tá dược như sucroza, axit amin hoặc protein như gelatin hoặc albumin huyết thanh có thể được sử dụng để bảo vệ thêm chất trị liệu trong quy trình sấy khô và bảo quản. Theo một số phương án, chất bảo vệ lạnh có thể được sử dụng để bảo vệ chất trị liệu trong khi làm khô lạnh. Chất bảo vệ lạnh được nêu làm ví dụ bao gồm sucroza, trehaloza, polyetylen glycol (PEG), dung dịch đậm dimethyl-succinat (DMS), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA), manitol, sorbitol, và dextran. Lượng và/hoặc hỗn hợp thích hợp bất kỳ của (các) chất bảo vệ lạnh có thể được sử dụng để bảo vệ kháng nguyên. Ví dụ, như được chứng minh trong Patent Mỹ số 6290967, sự có mặt đồng thời của disacarit (ví dụ, sucroza) và rượu 6-cacbon polyhydric (ví dụ, sorbitol) tăng cường độ ổn định của chế phẩm vaccin so với chế phẩm đối chứng. Sucroza được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 70 gam trên mỗi lít vaccin, và sorbitol được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 15 đến 90 gam trên mỗi lít vaccin.

Phản ứng hydrat hóa lại

Khi chế phẩm được làm khô lạnh (và tùy ý được bảo quản), thì các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước hydrat hóa lại sản phẩm được làm khô lạnh. Theo một số phương án, sản phẩm này đạt được bằng cách trộn sản phẩm được làm khô lạnh với dung dịch nước.

Theo một số phương án, dung dịch nước bao gồm dung dịch đậm. Dung dịch đậm được sử dụng sẽ tùy ý phụ thuộc vào bản chất của chất trị liệu. Ví dụ, mà không giới hạn, dung dịch đậm PCB, dung dịch đậm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, dung dịch đậm PBS, dung dịch đậm bixin, dung dịch đậm Tris, dung dịch đậm HEPES,

dung dịch đệm MOPS, v.v., có thể được sử dụng. Dung dịch đệm PCB được tạo ra bằng cách trộn natri propionat, natri cacodylat, và bis-Tris propan với tỷ lệ mol là 2:1:2. Việc thay đổi lượng HCl bổ sung vào có khả năng đệm ở pH nằm trong khoảng từ 4 đến 9. Theo một số phương án, có thể sử dụng dung dịch đệm cacbonat.

Theo một số phương án, chế phẩm có thể được làm khô lạnh để sử dụng trong tương lai và sau đó được hydrat hóa (ví dụ, với nước vô trùng hoặc dung dịch đệm chứa nước) trước khi sử dụng. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được bảo quản ở nhiệt độ -80°C trước khi làm khô lạnh.

Theo một số phương án, chế phẩm được hydrat hóa lại thể hiện hiệu lực gần như tương tự với chế phẩm trước khi làm khô lạnh.

Theo một số phương án, chế phẩm được hydrat hóa lại thể hiện ít nhất khoảng 50% hiệu lực của chế phẩm trước khi làm khô lạnh (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99%). Theo một số phương án, mức hiệu lực trên cơ sở các số đo IC₅₀ hoặc EC₅₀ (hoặc số đo hiệu lực khác, ví dụ, TCID₅₀ trên cơ sở thử nghiệm vi chuẩn độ *in vitro* trong trường hợp chế phẩm trên cơ sở vacxin MMR). Theo một số phương án, mức hiệu lực là trên cơ sở phép đo thử nghiệm tạo vết tan.

Theo một số phương án, chế phẩm được hydrat hóa lại thể hiện hiệu lực lớn hơn ít nhất 1,5 lần so với chế phẩm tương đương khác được bào chế khi không có thành phần lipid (ví dụ, ít nhất khoảng 2 lần, 2,5 lần, 3 lần, 3,5 lần, 4 lần hoặc 5 lần). Theo một số phương án, mức hiệu lực trên cơ sở các số đo IC₅₀ hoặc EC₅₀ (hoặc số đo hiệu lực khác, ví dụ, TCID₅₀ trên cơ sở thử nghiệm vi chuẩn độ *in vitro* trong trường hợp chế phẩm trên cơ sở vacxin MMR). Theo một số phương án, mức hiệu lực là trên cơ sở phép đo thử nghiệm tạo vết tan.

Phương pháp bảo quản

Theo một số phương án, chế phẩm được làm khô lạnh có thể được bảo quản trong một khoảng thời gian (ví dụ, ngày, tuần hoặc tháng) trước khi hydrat hóa lại và dùng cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, chế phẩm được làm khô lạnh được phơi nhiễm ở nhiệt độ vượt quá 8°C trong khi bảo quản (ví dụ, nhiệt

độ vượt quá 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, hoặc 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 30°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C, nhiệt độ trong phòng, v.v.). Theo một số phương án, chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản dưới các điều kiện không được kiểm soát nhiệt độ.

Theo một số phương án, chế phẩm được làm khô lạnh có thể ổn định nhiệt trong đó hiệu lực của chế phẩm còn lại gần như không thay đổi trong khi bảo quản mặc dù được phơi nhiễm ở nhiệt độ cao vượt quá 8°C (ví dụ, nhiệt độ vượt quá 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, hoặc 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 30°C, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C, 37°C, nhiệt độ trong phòng, v.v.) trong thời gian từ 1 đến 6 tháng (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 tháng, 12 tuần, v.v.).

Theo một số phương án, phương pháp bảo quản chế phẩm được làm khô lạnh ở nhiệt độ tăng cao này làm mất ít hơn 20% hiệu lực của chế phẩm (ví dụ, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 1%) như được đo trong thử nghiệm hiệu lực và được so sánh với chế phẩm được làm khô lạnh tương đương được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong khoảng thời gian tương tự.

Theo một số phương án, hiệu lực của chế phẩm sau bảo quản ít nhất lớn hơn gấp 1,5 lần so với chế phẩm được làm khô lạnh tương đương khác được bảo quản dưới nhiệt độ tăng cao tương tự nhưng chế phẩm này được bào chế mà không có thành phần lipid (ví dụ, ít nhất khoảng 2 lần, 2,5 lần, 3 lần, 3,5 lần, 4 lần hoặc 5 lần). Theo một số phương án, mức hiệu lực trên cơ sở các số đo IC₅₀ hoặc EC₅₀ (hoặc các số đo hiệu lực khác, ví dụ, TCID₅₀ trên cơ sở thử nghiệm vi chuẩn độ *in vitro* trong trường hợp chế phẩm trên cơ sở vacxin MMR). Theo một số phương án, mức hiệu lực là trên cơ sở phép đo thử nghiệm tạo vết tan.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều kết quả về hiệu lực này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 tháng. Theo một số phương án, các kết quả này thu được khi chế

phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 1 tháng. Theo một số phương án, các kết quả này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 2 tháng. Theo một số phương án, các kết quả này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 3 tháng (hoặc 12 tuần). Theo một số phương án, các kết quả này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 4 tháng. Theo một số phương án, các kết quả này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 5 tháng. Theo một vài phương án, các kết quả này thu được khi chế phẩm được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 30°C, 35°C, 37°C hoặc 40°C trong thời gian 6 tháng. Theo một số phương án, nhiệt độ này có thể được phép thay đổi trong khoảng cho phép, ví dụ, $\pm 2^\circ\text{C}$.

III. Liều dùng và cách dùng

Các chế phẩm và phương pháp của sáng chế hữu ích để điều trị cho người bao gồm người lớn và trẻ con. Tuy nhiên, nói chung các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật bất kỳ. Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp ở đây có thể được sử dụng trong thú y, ví dụ, chó và mèo. Nếu mong muốn, các chế phẩm và phương pháp ở đây cũng có thể được sử dụng cho vật nuôi, như giống cừu, chim, bò, lợn và ngựa.

Chế phẩm được mô tả ở đây thường sẽ được dùng với lượng và trong thời gian cần thiết hoặc đủ để gây ra đáp ứng trị liệu (ví dụ, lượng hữu hiệu trị liệu). Chế độ liều gồm liều đơn hoặc đa liều trong một khoảng thời gian. Lượng chế phẩm chính xác được dùng có thể thay đổi từ đối tượng này sang đối tượng khác và có thể phụ thuộc vào một vài yếu tố. Do đó, cần phải nhận biết rằng, nói chung, liều chính xác được dùng sẽ được xác định bởi bác sỹ kê đơn và không chỉ phụ thuộc vào cân nặng của đối tượng và đường dùng, mà còn phụ thuộc vào tuổi của đối tượng và tính nghiêm trọng của các triệu chứng và/hoặc sự nguy hiểm của bệnh nhiễm trùng.

Theo một số phương án, liều dùng của kháng nguyên virus trong chế phẩm gây miễn dịch đủ để tạo ra các trị số TCID₅₀ tương đương với các trị số TCID₅₀ của vaccin được cấp phép. Ví dụ, vaccin M-M-R-II® được cấp phép chứa ít nhất 1000 TCID₅₀ virus gây bệnh sởi, ít nhất 5000 TCID₅₀ virus gây bệnh quai bị và ít nhất 1000 TCID₅₀ virus gây bệnh rubella. TCID₅₀ (liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy) định lượng lượng virus cần để lây nhiễm 50% tế bào trong canh trường mô được cấy. Thông thường, các trị số TCID₅₀ được đo bằng cách dàn mỏng trên đĩa các tế bào chủ (ví dụ, tế bào Vero) và bổ sung thêm các dung dịch pha loãng theo bậc của các kháng nguyên virus. Sau khi ủ, phần trăm các tế bào bị lây nhiễm được quan sát và ghi chép thủ công mỗi độ pha loãng virus, và các kết quả được sử dụng để tính bằng toán học trị số TCID₅₀, ví dụ, theo phương pháp Behrens-Karber (Karber, Arch Exp Pathol Pharmacol 162:480-483, 1931).

Theo một số phương án, chất trị liệu được lấy ra từ sản phẩm được cấp phép ở người (ví dụ, sản phẩm thuốc hoặc vaccin) và chế phẩm được dùng cho người ở liều nhỏ hơn liều dùng tiêu chuẩn ở người (ví dụ, nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, từ 10 đến 80%, từ 10 đến 70%, từ 10 đến 60%, từ 10 đến 50%, từ 10 đến 40%, từ 10 đến 30%, từ 10 đến 20%, từ 20 đến 90%, từ 20 đến 80%, từ 20 đến 70%, từ 20 đến 60%, từ 20 đến 50%, từ 20 đến 40%, từ 20 đến 30%, từ 30 đến 90%, từ 30 đến 80%, từ 30 đến 70%, từ 30 đến 60%, từ 30 đến 50%, từ 30 đến 40%, từ 40 đến 90%, từ 40 đến 80%, từ 40 đến 70%, từ 40 đến 60%, từ 40 đến 50%, từ 50 đến 90%, từ 50 đến 80%, từ 50 đến 70%, từ 50 đến 60%, từ 60 đến 90%, từ 60 đến 80%, từ 60 đến 70%, từ 70 đến 90%, từ 70 đến 80%), hoặc từ 80 đến 90% liều dùng tiêu chuẩn ở người).

Theo một số phương án, chế phẩm được dùng dưới dạng liều đơn. Theo một số phương án chế phẩm được dùng nhiều hơn một liều (ví dụ, từ 1 đến 3 liều cách nhau từ 1 đến 12 tháng).

Theo một số phương án, chế phẩm có thể được bào chế để phân phối ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm. Theo các phương án này, việc dùng có thể là, ví dụ, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, hoặc dưới da, hoặc bằng các kỹ thuật tiêm không cần kim hoặc truyền. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được

bào chế để phân phối trong cơ. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được bào chế để phân phối dưới da. Để phân phối ngoài đường tiêu hóa, chế phẩm có thể được điều chế hoặc được giữ trong các chế phẩm được làm khô lạnh thông thường và được hoàn nguyên trước khi dùng với dung dịch nước muối được dụng, như dung dịch nước muối 0,9%. pH của chế phẩm có thể tiêm được điều chỉnh, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, với axit được dụng, như axit metansulfonic. Các chất mang và dung môi chấp nhận được khác có thể được sử dụng bao gồm dung dịch Ringer và U.S. P. Ngoài ra, dầu không bay hơi, vô trùng thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Để sử dụng cho mục đích này, dầu không bay hơi nhớt bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm mono hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, axit béo như axit oleic được sử dụng trong chế phẩm có thể tiêm được. Chế phẩm có thể tiêm có thể được khử trùng, ví dụ, bằng cách lọc qua bộ lọc giữ lại vi khuẩn, hoặc bằng cách kết hợp các chất khử trùng dưới dạng chế phẩm rắn vô trùng có thể được hòa tan hoặc được phân tán trong nước vô trùng hoặc môi trường có thể tiêm vô trùng khác trước khi sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây mô tả một số phương thức được nêu làm ví dụ để tạo thành và thực hiện các chế phẩm đã biết được mô tả ở đây. Nên hiểu rằng các ví dụ này chỉ dùng với mục đích minh họa và không dùng để giới hạn phạm vi của các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây.

Ví dụ 1: Phương pháp nấu chảy nghịch đảo hai bước

Ví dụ này mô tả phương pháp nấu chảy nghịch đảo hai bước được sử dụng để điều chế các chế phẩm đã biết (bao gồm chế phẩm trong đó nang được tạo ra với sự có mặt của kháng nguyên virus).

Trong bước 1, tỷ lệ mol 5:4:1 của lipid:1-monopalmitoyl glyxerol (MPG), cholesterol (CHO) và dixetyl phosphat (DCP) dưới đây được đưa vào cốc mỏ thủy tinh 50ml đáy phẳng, đảm bảo không có bụi bị mắc vào phía thành của cốc mỏ thủy tinh. Lipid được nấu chảy trong bồn dầu được gia nhiệt ở nhiệt độ khoảng

120°C trong thời gian 10 phút, bằng cách tạo xoáy ngắt quãng trong cốc mở thủy tinh được phủ bằng lá nhôm.

Ở giai đoạn này, dung dịch gốc chứa vacxin M-M-R-II® (vacxin virus gây bệnh sởi, bệnh quai bị và bệnh rubella, virus giảm độc lực sống, Merck Frosst Std.) được nuôi trước trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ khoảng 30°C trong bồn nước được gia nhiệt. Trong bước 2, dung dịch gốc vacxin M-M-R-II® tạo thành được đồng nhất hóa ở tốc độ thích hợp (ví dụ, ở tốc độ 8000 vòng/phút), hỗn hợp lipid đã nấu chảy được bổ sung vào dung dịch vacxin M-M-R-II® đồng nhất hóa, và sự đồng nhất hóa liên tục trong thời gian 30 giây nữa ở nhiệt độ khoảng 30°C. Chế phẩm đồng nhất tạo thành được lắc trong thời gian 30 phút ở tốc độ 220 vòng/phút và ở nhiệt độ khoảng 30°C. Thể tích đương lượng của dung dịch sucroza 400mM trong 25mM dung dịch đệm natri bicacbonat (pH=9,7) được bổ sung vào chế phẩm đồng nhất được lắc và chế phẩm đồng nhất được lắc thêm trong thời gian 5 phút nữa ở tốc độ 220 vòng/phút ở nhiệt độ khoảng 30°C. Hỗn hợp này được chia thành các phần mẫu và được làm lạnh ở nhiệt độ -80°C, tiếp đó được làm khô lạnh và được hoàn nguyên với 0,5ml nước vô trùng để tiêm (water for injection - WFI) trước khi sử dụng.

Ví dụ 2: Thử nghiệm hiệu lực đối với bệnh sởi (TCID₅₀ và vết tan)

Phương pháp thử nghiệm phổ biến được sử dụng để định lượng số lượng các hạt lây nhiễm trong vacxin virus sống là thử nghiệm Liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy (Tissue Culture Infective Dose - TCID₅₀). Thử nghiệm pha loãng điểm cuối này định lượng lượng virus cần để diệt 50% vật chủ bị nhiễm bệnh hoặc tạo ra hiệu quả gây bệnh tế bào trong 50% tế bào canh trường mô được cấy. Thử nghiệm này có thể phổ biến hơn trong các ứng dụng nghiên cứu lâm sàng trong đó liều gây chết người phải được xác định hoặc nếu virus không tạo ra vết tan (xem phần bàn luận của thử nghiệm vết tan thay thế dưới đây). Trong ngữ cảnh nuôi cấy mô, tế bào chủ được ria cấy (dàn mỏng) và các dung dịch pha loãng theo bậc của virus được bổ sung vào. Sau khi ủ, phần trăm tế bào chết (tức là, tế bào bị nhiễm bệnh) được quan sát và ghi chép thủ công đối với mỗi độ pha loãng virus, và các kết quả được sử dụng để tính toán bằng toán học kết quả TCID₅₀. Do các chênh lệch rõ rệt

trong phương pháp và nguyên tắc thử nghiệm, TCID₅₀ và pfu/ml (kết quả thử nghiệm tạo vết tan) hoặc các kết quả thử nghiệm tính lây nhiễm khác là không tương đương. Phương pháp này có thể mất khoảng một tuần do thời gian để lây nhiễm tế bào.

Tế bào Vero được sử dụng trong các thử nghiệm này để đánh giá hiệu lực của virus gây bệnh sởi trong các vaccine M-M-R-II® được bào chế trước. Vaccine M-M-R-II® được bào chế trước được điều chế phù hợp với Ví dụ 1 được hoàn nguyên sau khoảng thời gian bảo quản (được bàn luận dưới đây) trong nước để tiêm. Các tế bào Vero được phát triển đến độ bao phủ (hợp dòng) 80% trong các đĩa 96 lỗ. 100µl dung dịch vaccine được bào chế trước đã pha loãng 10 lần được bổ sung vào các lỗ bắt đầu với độ pha loãng 1/10 và bầy dung dịch pha loãng theo bậc 10 lần vaccine M-M-R-II® được bào chế trước trong môi trường nuôi cấy. Độ chuẩn virus định lượng lượng virus cần để tạo ra hiệu quả gây bệnh tế bào trong 50% tế bào canh trường mô được cấy. Độ chuẩn của virus gây bệnh sởi (TCID₅₀) được xác định sau khi hoàn nguyên như được bàn luận ở trên.

Như được đề cập ở trên, phương pháp thử nghiệm phổ biến khác được sử dụng để định lượng số lượng các hạt lây nhiễm trong vaccine virus sống trong thử nghiệm tạo vết tan. Phương pháp thử nghiệm này trên cơ sở hiệu quả gây bệnh tế bào của virus trong vaccine trên dòng tế bào dễ bị lây nhiễm và phép đo *in vitro* hiệu lực của chế phẩm vaccine (Schalk et al, *Journal of Virological Methods* 117: 179-187, 2004).

Vaccine M-M-R-II® được bào chế trước được điều chế phù hợp với Ví dụ 1 được hoàn nguyên sau khoảng thời gian bảo quản (ví dụ, như được bàn luận ở trên) trong nước để tiêm. Do vaccine M-M-R-II® là vaccine hóa tam trị, nên virus gây bệnh quai bị và bệnh rubella trong vaccine ban đầu được trung hòa bằng cách bổ sung huyết thanh miễn dịch trị bệnh quai bị và trị bệnh rubella sau đó nuôi ở nhiệt độ 4°C trong thời gian một giờ (huyết thanh miễn dịch được bất hoạt nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút trước khi bổ sung). Pha loãng theo bậc 100, 500, 1000, 2500 và 5000 lần vaccine M-M-R-II® được bào chế trước trong môi trường nuôi cấy tiếp đó được điều chế. Tế bào Vero được phát triển đến độ bao phủ 90%

trong các đĩa 6 lỗ. Một ngày trước khi lây nhiễm, môi trường nuôi cấy được làm mới lại. Tế bào bị lây nhiễm bằng 200µl mỗi lần pha loãng (12 lỗ mỗi lần pha loãng). Sau khi hấp thụ virus trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ trong phòng, các tế bào tiếp nhận được 4ml thạch bao phủ chứa môi trường M199 (BioWhittaker Europe) với 4,7% huyết thanh bào thai bò bị bất hoạt (Invitrogen), 0,11% NaHCO_3 và 0,33% thạch. Các đĩa được lật ngược và được nuôi ở nhiệt độ 36°C và 2,5% CO_2 . Sau thời gian 9 ngày, thạch bao phủ được loại bỏ và tế bào được cố định trong 96% etanol trong thời gian 2 phút. Sau đó, tế bào được nhuộm trong chất nhuộm màu đỏ và được làm khô. Các vết tan thường được đếm thủ công và kết quả thu được cùng với các kết quả pha loãng được sử dụng để chuẩn bị đĩa, và tính số lượng các đơn vị tạo vết tan trên mỗi thể tích đơn vị mẫu (pfu/ml). Kết quả pfu/ml thể hiện số lượng các hạt lây nhiễm trong mẫu và trên cơ sở giả thuyết rằng mỗi vết tan được tạo ra đại diện cho một hạt virus lây nhiễm.

Ví dụ 3: So sánh các nang chứa kháng nguyên virus và nang được tạo hình trước được trộn lẫn với kháng nguyên virus: hiệu quả của hàm lượng lipid đối với độ ổn định nhiệt và độ ổn định lipid

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá độ ổn định các nang của chất hoạt động bề mặt không ion (non-ionic surfactant vesicles - NISVs) chứa M-M-R-II® giảm độc lực sống được bào chế có nồng độ lipid khác nhau, dung dịch đệm và sucroza sử dụng quy trình nấu chảy nghịch chuyển như được mô tả trong Ví dụ 1. Nghiên cứu cũng so sánh sự bào chế M-M-R-II® thành nang so với sự bào chế M-M-R-II® bằng nang được tạo hình trước. Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Vacxin M-M-R-II® thương mại được sử dụng làm đối chứng dương để so sánh. TCID_{50} được sử dụng là thử nghiệm *in vitro* (như được mô tả trong Ví dụ 2) để xác định hiệu lực của vacxin sau thời gian 1, 2 và 12 tuần bảo quản. Các kết quả được so sánh với hiệu suất của vacxin thương mại để đánh giá lợi ích ổn định nhiệt của các mẫu được bào chế trước.

Tỷ lệ mol 5:4:1 của lipid:monopalmitoyl glycerol (MPG), cholesterol (CHO) và dixetyl phosphat (DCP) được đặt dưới đáy của cốc mô thủy tinh đáy phẳng. Lipid được nấu chảy trong bồn dầu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến

122°C bằng cách trộn ngất quăng. Vacxin M-M-R-II® (được hoàn nguyên bằng chất pha loãng được cấp vào) được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C trong thời gian 5 phút. Dung dịch vacxin M-M-R-II® được đồng nhất hóa ở 8000 vòng/phút và lipit đã nấu chảy được chuyển ngay vào dung dịch vacxin, và được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C. Sau khi đồng nhất hóa (10 phút đối với TA 8 và 9; 30 giây đối với TA 1-7 và 10-12), và hỗn hợp tạo thành được trộn trong thời gian 30 phút ở 220 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C. Đối với các mẫu nhất định, thể tích tương đương của 400mM dung dịch sucroza, tùy ý được điều chế bằng 25mM dung dịch đệm bicacbonat hoặc nước vô trùng, tiếp đó được bổ sung vào. Mẫu điều chế được trộn trong thời gian 5 phút nữa ở 220 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C. Đối với TA 4, dung dịch đệm phosphat đậm đặc được bổ sung vào dung dịch vacxin M-M-R-II® trước khi bổ sung lipit được nấu chảy. Dung dịch được chia thành các phần mẫu 1,0mL /lọ nhỏ (TA 1-4, 8, 9, 10, 11) và 0,5mL (TA 5-7 và 12) sau đó bằng cách làm khô lạnh. Lọ nhỏ được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ đến $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Mỗi lọ nhỏ chứa mẫu làm khô lạnh được hoàn nguyên với 1,0mL nước vô trùng trước khi phân tích liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy (Tissue Culture Infectious Dose₅₀ - TCID₅₀). Các mẫu để thử nghiệm độ ổn định này được mô tả trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

TA#	Kháng nguyên	Lipit (mg/mL)	Tá dược			Thể tích đồ đầy/cỡ lọ
			Sucroza (mM)	Dung dịch đệm phosphat đậm đặc (mM)	Dung dịch đệm Bicacbonat ** (mM)	
1	M-R-II®	25	400	--	25	1mL/6cc
2	M-R-II®	12,5	400	--	25	1mL/6cc
3	M-R-II®	3,125	400	--	25	1mL/6cc
4	M-R-II®	12,5	400	50*	--	1mL/6cc
5	M-R-II® *	25	--	--	--	0,5mL/2cc
6	M-R-II®	12,5	--	--	--	0,5mL/2cc
7	M-R-II®	3,125	--	--	--	0,5mL/2cc
8	M-R-II®	25	400	NISV + 25* được tạo hình	--	1mL/6cc

				trước		
9	M-R-II®	12,5	400	NISV + 25* được tạo hình trước	--	1mL/6cc
10	M-R-II®	Không có NISV	400	--	25	1mL/6cc
11	M-R-II®	Không có NISV	400	50*	--	1mL/6cc
12	M-R-II®	Không có NISV	--	--	--	0,5mL/2cc
13	M-R-II®	--	--	--	--	0,5mL/2cc

*Dung dịch đệm phosphat được sử dụng để đệm vacxin M-R-II® trước khi bổ sung lipid.

**25mM Natri Bicacbonat pH=9,7 được sử dụng để hòa tan 400mM Sucroza và được bổ sung vào các mẫu trước khi làm khô lạnh.

Các mẫu làm khô lạnh được thu từ buồng nhiệt. Tất cả các mẫu được mã hóa và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trước khi thử nghiệm. Hiệu lực của thành phần bệnh sởi được xác định bằng thử nghiệm vi chuẩn độ *in vitro*. Thử nghiệm TCID₅₀ đánh giá virus có thể sống sót sử dụng thử nghiệm pha loãng điểm cuối được sắp xếp hợp lý được phân tích bằng thống kê. Tóm lại, các lần pha loãng bậc các mẫu này và các chế phẩm tiêu chuẩn tham chiếu được cấy theo hàng 10 lỗ của đĩa vi chuẩn độ, cùng với các tế bào Vero (tế bào biểu mô thận khỉ xanh châu Phi; ATCC - CCL 81) được sử dụng cho mẫu 1, 2 và 12 tuần. Dòng tế bào Vero có nguồn gốc từ thận của khỉ xanh châu Phi trưởng thành bình thường. Các đĩa vi chuẩn độ được cấy 50µl tế bào Vero để thu được độ chuẩn 4,0 x 10⁵ tế bào/mL trong thời gian 24 giờ ở 5% CO₂/37°C (từ 75 đến 80% nhập dòng tế bào được mong đợi trong các điều kiện này). Mỗi mẫu được hoàn nguyên với 1000µl nước chung cất vô trùng, được trộn trong thời gian 15 giây bằng tay sau đó khuấy bằng máy khuấy trong thời gian 45 giây ở tốc độ trung bình (đặt ở mức 5). Mẫu được hoàn nguyên (4 lọ nhỏ trên mỗi thời điểm) được chuyển vào các đĩa vi chuẩn độ trong thời gian 45 phút dưới dạng được pha loãng và không được pha loãng (từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷) trên đĩa 96 lỗ bốn bản (100/lỗ). Các lần pha loãng từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷ được điều chế trong các đĩa 24 lỗ được hoàn thành với 5% môi trường IMDM được bổ sung FBS và

100 μ l được bổ sung vào mỗi lỗ riêng lẻ bốn bản. Các đối chứng dương và âm cũng bao gồm (vacxin thương mại/vacxin thương mại được xử lý nội bộ và tế bào, lần lượt). Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 35°C/5% CO₂ trong thời gian 5 ngày. Kết thúc giai đoạn nuôi, số lượng hiệu quả gây bệnh tế bào virus đặc hiệu (CPE) được tính và được ghi lại. TCID₅₀ đối với mỗi liều dùng ở người được tính theo các tiêu chuẩn này. Trị số TCID₅₀ được sử dụng thu được từ độ chuẩn trung bình nhân trong phân tích thống kê.

Đối với phân tích thống kê của tất cả các mẫu, các biến đã biến đổi được đề cập đến bằng cách sử dụng Prism 5 cho phần mềm Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) để tiến hành hai thử nghiệm t không bắt cặp hai đuôi và phát hiện trị số p giữa các nhóm. Ý nghĩa thống kê được chỉ ra bởi trị số p trong khoảng từ 0,05 đến 0,01 và ý nghĩa thống kê cao được chỉ ra bởi trị số p nhỏ hơn 0,01. Trị số TCID₅₀ được tính nếu độ chuẩn là giống nhau đối với tất cả các thử nghiệm trong một nhóm, sao cho độ chuẩn được làm tròn đến điểm thập phân thứ tư để tránh giới hạn phần mềm trong phân tích thống kê phi tham số.

Fig.1 mô tả các kết quả thử nghiệm TCID₅₀ của các mẫu (TA 1, 5 và 8) được lập công thức (bào chế) với 25mg/mL lipit, các đối chứng xử lý TA 10 và TA12 (vacxin thương mại trải qua tất cả các bước xử lý không có lipit, có và không có sucroza và dung dịch đệm) và vacxin thương mại (M-M-R-II®, TA 13) ở cả nhiệt độ 5 $\pm$ 3°C và 37 $\pm$ 2°C. Hệ thống đóng kín bình chứa và thể tích lấp đầy đối với TA 1 (1mL mẫu đã đề xuất được bào chế trước trong lọ nhỏ 6cc) là khác với TA 5 (0,5mL được đổ đầy vào lọ nhỏ 2cc) nhưng kết quả thu được với TCID₅₀ và các mô tả hóa lý (dữ liệu không được chỉ ra) là tương đương. Hiệu lực của TA 1, 5 và 8 được bảo quản trong thời gian 1, 2 và 12 tuần ở nhiệt độ 5 $\pm$ 3°C và 37 $\pm$ 2°C cao hơn so với giới hạn được khuyến dùng của WHO (3,0 log₁₀) (Fig.1). Các mẫu được bào chế trước với 25mg/mL lipit không thể hiện sự giảm hiệu lực trong thời gian 12 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ cao hơn (37 $\pm$ 2°C) trong khi hiệu lực của vacxin thương mại bị giảm đáng kể (p<0,0001). Vacxin M-M-R-II® được bổ sung vào NISV được tạo hình trước và được bào chế bằng phương pháp nấu chảy nghịch chuyển thể hiện các kết quả TCID₅₀ tương đương. Cũng quan sát thấy rằng

đối chứng xử lý không chứa lipit TA 10 và TA 12 không ổn định trong thời gian nhiều hơn một tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ cao hơn ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) (Fig.1, TA 10). TA 12 không thể hiện độ ổn định ở nhiệt độ cao hơn sau thời gian một tuần so với vacxin thương mại ổn định trong thời gian lớn hơn hai tuần ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ nhưng thể hiện sự giảm sau thời gian 12 tuần. Các kết quả này chứng minh rằng vacxin M-M-R-II® ổn định nhiệt có nồng độ lipit bằng 25mg/mL (có hoặc không có sucroza và dung dịch đệm) ở nhiệt độ tăng cao. Ở nhiệt độ $5 \pm 3^\circ\text{C}$, TA 1, 5 và 8, các đối chứng xử lý (TA 10 và 12) và M-M-R-II® thương mại (TA 13) thể hiện không mất hiệu lực trong thời gian 12 tuần bảo quản. TA 1, 5 và 8 được bảo quản ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$, giữ được hiệu lực cao hơn so với vacxin thương mại.

Fig.2 thể hiện các kết quả thử nghiệm TCID₅₀ của các mẫu (TA 2, 4, 6 và 9) được bào chế với 12,5mg/mL lipit, đối chứng xử lý (vacxin thương mại trải qua tất cả các bước xử lý mà không có lipit, có và không có sucroza và dung dịch đệm) và vacxin thương mại (M-M-R-II®) ở nhiệt độ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Hệ thống bịt kín bình chứa và thể tích lấp đầy của TA 2 (1ml Vật phẩm thử nghiệm được đề xuất được bào chế trước trong lọ nhỏ 6cc) là khác với TA 6 (0,5ml được đổ đầy vào lọ nhỏ 2cc). Hình thái bên ngoài của TA 6 ổn định hơn trong suốt thời gian bảo quản ở nhiệt độ cao hơn. Hiệu lực của TA 2, 4, 6 và 9 được bảo quản trong thời gian 1, 2 và 12 tuần ở nhiệt độ $5 \pm 3^\circ\text{C}$ và $37 \pm 2^\circ\text{C}$ cao hơn so với giới hạn được khuyến cáo bởi WHO ($3,0 \log_{10}$) (Fig.2). Các mẫu được bào chế trước với 12,5mg/mL lipit cho thấy không có sự mất hiệu lực trong thời gian 12 tuần bảo quản ở nhiệt độ cao hơn ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) trong khi hiệu lực của vacxin thương mại bị giảm đáng kể ($p < 0,0001$). NISV được tạo hình trước (TA 9) và chế phẩm trong phương pháp nấu chảy nghịch chuyển (TA 2, 4 và 6) thể hiện các kết quả TCID tương đương. Cũng quan sát thấy rằng các mẫu đối chứng xử lý được bào chế trước không ổn định trong thời gian lớn hơn một tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ cao hơn ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) (Fig.2 đối với TA 10 và TA 11). TA 12 không thể hiện sự mất hiệu lực ở nhiệt độ cao hơn sau thời gian một tuần so với vacxin thương mại ổn định trong thời gian lên đến hai tuần ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Các kết quả này chứng minh rằng vacxin M-

M-R-II® ổn định nhiệt có hàm lượng lipid bằng 12,5mg/ml. Ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, các mẫu (TA 2, 4, 6 và 9), đối chứng xử lý (không có lipid) và vacxin thương mại thể hiện độ ổn định trong thời gian lên đến 12 tuần. Các mẫu được bào chế với NISV (TA 2, 4, 6 và 9) được bảo quản ở cả hai nhiệt độ ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ và $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$) giữ được hiệu lực cao hơn so với vacxin thương mại 2 và 12 tuần tuổi.

Tóm lại, các mẫu được làm khô lạnh chứa vacxin M-M-R-II® trong NISV (12,5 hoặc 25,0mg/mL lipid) được điều chế bằng quy trình nấu chảy nghịch chuyển không thay đổi hiệu lực trong thời gian 12 tuần bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ và $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hàm lượng lipid cao nhất được thử nghiệm là 25mg/mL dường như không tạo ra lợi ích bổ sung bất kỳ trong việc duy trì hiệu lực so với các mẫu chứa hàm lượng lipid thấp hơn (12,5mg/mL). Mẫu được làm khô lạnh chứa vacxin M-M-R-II® được bổ sung vào NISV được tạo hình trước không có sự mất hiệu lực trong thời gian 12 tuần bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ và $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Ví dụ 4: Mô tả vật lý các chế phẩm được điều chế bằng các thành phần lipid khác nhau

Mục đích chính của nghiên cứu này là để nghiên cứu việc sử dụng 1, 2 dipalmitoylphosphatidyl glycerol (DPPG) làm chất hoạt động bề mặt anion thay thế cho DCP trong các chế phẩm lipid-M-M-R-II® được điều chế bằng phương pháp nấu chảy nghịch chuyển (như được mô tả trong Ví dụ 1). Mục đích thứ hai là để nghiên cứu loại trừ DCP hoặc DPPG (và cả CHO) trong các chế phẩm M-M-R-II®.

Tỷ lệ mol 5:4:1 của lipid: MPG, CHO và DCP hoặc DPPG được đặt dưới đáy của cốc mỏ thủy tinh đáy phẳng. Lipid được nấu chảy trong bồn dầu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 122°C (140°C đối với các mẫu có DPPG) bằng cách trộn ngắt quãng. Vacxin M-M-R-II® (được hoàn nguyên bằng các chất pha loãng được cung cấp) được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C trong thời gian 5 phút. Dung dịch vacxin M-M-R-II® được đồng nhất hóa ở 8000 vòng/phút và lipid được nấu chảy được chuyển ngay vào dung dịch vacxin, được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C . Sau thời gian từ 30 đến 40 giây đồng nhất hóa, hỗn hợp được trộn trong thời gian 30 phút ở 220 vòng/phút ở

hiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C. Dung dịch được phân thành các phần mẫu 0,5mL/lọ nhỏ (lọ nhỏ làm khô lạnh 2cc) sau đó làm khô lạnh. Lọ nhỏ được làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C sau khi làm khô lạnh. Mỗi lọ nhỏ chứa mẫu đông khô lạnh được hoàn nguyên với 0,5mL nước cất (GIBCO) trước khi phân tích. TA 5, đối chứng xử lý M-M-R-II®, được điều chế bằng cách cho vacxin thương mại M-M-R-II® được hydrat hóa trải qua quy trình nấu chảy nghịch chuyển với sự có mặt của lipit. TA 6, đối chứng vacxin thương mại được giữ lại dưới dạng bột đông khô lạnh cho đến khi phân tích. Các mẫu dùng cho nghiên cứu này được mô tả trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Vật phẩm thử nghiệm	Kháng nguyên	Phương pháp	Lipit (mg/mL)	Tá được
1	M-M-R-II®	Nấu chảy nghịch chuyển	12,5	MPG/CHOL/DCP : 5/4/1
2	M-M-R-II®	Nấu chảy nghịch chuyển	12,5	MPG/CHOL/DPPG : 5/4/1
3	M-M-R-II®	Nấu chảy nghịch chuyển	12,5	chỉ có MPG/CHOL : 5/4
4	M-M-R-II®	Nấu chảy nghịch chuyển	12,5	chỉ có MPG
5	M-M-R-II®	--	--	Đối chứng xử lý
6	M-M-R-II®	--	--	Đối chứng thương mại

Nhiều đặc điểm lý sinh được tiến hành trên các mẫu khác nhau như được mô tả trong đoạn dưới đây. pH của các mẫu được đo bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Điện thế zeta của các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng tán xạ ánh sáng điện di. Sự phân bố kích thước của mỗi mẫu được phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động sử dụng Zetasizer Nano ZS (Mẫu số ZEN3600). Nói vắn tắt, tất cả các mẫu chứa lipit được pha loãng đến 50µg/mL lipit trong 0,2µm WFI được lọc. Các mẫu được pha loãng được lắc mạnh trước khi nạp vào thiết bị. Chỉ số khúc xạ mẫu được đặt đến 1,45 và ba số đo liên tiếp được tiến hành trên

mỗi mẫu. TA 1-6 được nghiên cứu ở $t=0$, sử dụng kính hiển vi quang học với vật kính 40X. Các mẫu được phân tích hàm lượng nước dư sử dụng phương pháp làm khô lạnh chuẩn độ Karl Fischer sau đây. Các kết quả về đặc điểm lý sinh của các mẫu được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6

Thử nghiệm	TA 1	TA 2	TA 3	TA 4	TA 5	TA 6
Hình thái (sau khi làm khô lạnh)	Bánh màu vàng nhạt	Bánh màu vàng nhạt	Bánh màu vàng nhạt	Bánh màu vàng nhạt	Bánh màu vàng nhạt	Bánh màu vàng nhạt
pH (sau khi hoàn nguyên)	6,47	6,49	6,47	6,50	6,52	6,53
Hàm lượng nước (%)*	3,30	4,74	6,29	5,06	6,11	5,69
Điện thế Zeta trung bình (mV)**	-48,5	-38,8	-16,7	-13,7	-6,40	-5,68
Số trung bình Z trung bình (d.nm)***	298,3	442,6	803,1	707,0	685,6	879,3
Hệ số đa phân tán trung bình (Polydispersity Index - PI)	0,357	0,522	0,741	0,777	0,604	0,710

* Được tính trên cơ sở Phương pháp chuẩn độ Karl Fischer các vật phẩm thử nghiệm sau khi làm khô lạnh

** Đường kính thủy động lực học được tính bằng DLS sử dụng Malvern Zetasizer Nano ZS

*** Được tính bằng phương pháp tán xạ ánh sáng điện di sử dụng Malvern Zetasizer Nano ZS

Trị số pH của tất cả các mẫu là tương đương với đối chứng vacxin thương mại (TA 6). Hàm lượng ẩm dư của tất cả các mẫu nằm trong khoảng từ 3,30 đến 6,29%. Hàm lượng ẩm dư thấp nhất là TA 1 có tỷ lệ mol lipid 5:4:1 của MPG: CHO: DCP. Hàm lượng ẩm dư cao nhất được quan sát trong TA 3 (MPG: CHO; tỷ lệ mol lipid 5:4). Hệ số đa phân tán (polydispersity index - PI) và hệ số trung bình Z của TA 2 (chứa MPG:CHO:DPPG) cao hơn không đáng kể khi được so sánh với TA 1 (MPG: CHO: DCP) đề xuất hệ đa phân tán của các hạt trong TA 2 (xem Bảng 6). Đường kính thủy động lực học và PI của TA 3 (803,1nm; PI = 0,741) và

TA 4 (707,0nm; PI=0,777) lớn hơn đường kính thủy động lực học và PI được điều chế bởi chất hoạt động bề mặt ion (TA 1 và TA 2). Trị số điện thế Zeta với TA 1 (-48,5mV) và 2 (-38,8mV) chứa chất hoạt động bề mặt anion có trị số âm lớn hơn so với các trị số điện thế Zeta không có chất hoạt động bề mặt anion và đối chứng không có lipit (từ -5,68 đến -16,7mV). Nhìn trên kính hiển vi, hạt nang lipit (lipit vesicle particle - LPV) được quan sát với các mẫu chứa chất hoạt động bề mặt (TA 1 và 2, dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, dạng kết khối nhìn thấy được của các hạt lipit được quan sát trong các mẫu không chứa chất hoạt động bề mặt (TA 3 và 4). Các hạt lipit không nhìn thấy được được quan sát trong các đối chứng không chứa lipit (TA 5 và 6). Các bánh được làm khô lạnh màu vàng nhạt được quan sát đối với tất cả các mẫu (xem bảng 6).

Ví dụ 5: Sử dụng chất hoạt động bề mặt anion trong các nang và nang được tạo hình trước với protein trị liệu được nêu làm ví dụ

Mục đích chính của nghiên cứu này là để nghiên cứu cách sử dụng 1, 2 dipalmitoylphosphatidyl glycerol (DPPG) dưới dạng chất hoạt động bề mặt anion thay thế cho DCP trong các chế phẩm NISV được điều chế bằng phương pháp nấu chảy nghịch chuyển (như được mô tả trong ví dụ 1) với protein trị liệu được nêu làm ví dụ (trastuzumab, kháng thể đơn dòng phong bế thụ thể HER2/neu). Mục đích thứ hai là để nghiên cứu xem liệu việc trộn lẫn protein trị liệu với các nang của chất hoạt động bề mặt anion được tạo hình trước có thể có được độ bền nhiệt không.

Tỷ lệ mol 5:4:1 của lipit: MPG, CHO và DPPG được đặt dưới đáy của cốc mô thủy tinh đáy phẳng. Lipit được nấu chảy trong bồn dầu ở nhiệt độ 140°C bằng cách trộn ngất quãng. Dung dịch trastuzumab được thẩm tách (dung dịch đệm được trao đổi bằng 5% sucroza trong 25mM Tris và 25mM dung dịch đệm Natri-Xitrat, pH=6,5) được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 32°C đến 35°C trong thời gian từ 5 đến 10 phút. Dung dịch trastuzumab được đồng nhất hóa ở 8000 vòng/phút và lipit đã nấu chảy được chuyển ngay vào dung dịch protein trị liệu, được làm ấm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 32°C. Sau thời gian 2 phút đồng nhất hóa, hỗn hợp liposom được trộn trong thời gian nằm trong khoảng từ 15

đến 30 phút ở 220 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 300°C đến 350°C trong máy ủ lắc. Dung dịch được chia thành các phần mẫu 0,5mL/lọ nhỏ (lọ nhỏ đông khô lạnh 2cc) sau đó bằng cách làm khô lạnh. Lọ nhỏ đã làm khô lạnh được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C sau khi làm khô lạnh. Mỗi lọ nhỏ chứa vật phẩm thử nghiệm làm khô lạnh được hoàn nguyên với 0,5mL nước WFI. Các nang được tạo hình trước được tạo ra bằng cách tương tự ngoại trừ bước đồng nhất hóa chỉ với dung dịch đệm và trastuzumab được trộn lẫn với các nang được tạo hình trước sau khi bào chế hơn là trong khi bào chế. Vật phẩm thử nghiệm trong thử nghiệm về độ ổn định như được mô tả trong Bảng 7 dưới đây. Đối với đối chứng No-LPV ("Đối chứng 4", trastuzumab chưa được bào chế), dung dịch trastuzumab không được thẩm tách và giữ lại trong dung dịch đệm chứa 20mM Histidin, 7% Sucroza, 0,01% PS20, pH=6,0.

Bảng 7

Vật phẩm thử nghiệm	Kháng nguyên	Phương pháp	Lipit (mg/mL)	Tá được
LPV-1	Trastuzumab	Phương pháp nấu chảy nghịch chuyển	12,5	MPG/CHOL/DPPG: (5/4/1) 5% sucroza trong 25mM Tris và 25mM dung dịch đệm natri-xitrat, pH=6,5
LPV-2	Trastuzumab	LPV được tạo hình trước	12,5	MPG/CHOL/DPPG: (5/4/1)
LPV-3	Trastuzumab	LPV được tạo hình trước	25,0	MPG/CHOL/DPPG: (5/4/1) 5% sucroza trong 25mM Tris và 25mM dung dịch đệm natri-xitrat, pH=6,5
Đối chứng-4	Trastuzumab	Đối chứng không có LPV	--	Đối chứng thương mại 7% sucroza trong 20mM histidin và 0,01% dung dịch đệm PS20, pH=6,0

Ví dụ 6: So sánh độ bền nhiệt của Protein trị liệu được nêu làm ví dụ trong các nang của chất hoạt động bề mặt anion hoặc được trộn lẫn với các nang được tạo hình trước

Độ tinh khiết và hiệu lực của trastuzumab được bào chế trong NISV được đánh giá sau khi bảo quản 8 tuần ở hai nhiệt độ ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ và $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) sử dụng phương pháp sắc ký loại trừ kích thước (Size Exclusion Chromatography - SEC) để xác định phần trăm độ tinh khiết và thử nghiệm hiệu lực sinh học chống tăng sinh BT-474. Thử nghiệm hiệu lực được xác nhận đối với trastuzumab là sự ức chế BT-474 của thử nghiệm sinh học tăng sinh. Thử nghiệm này đo hoạt tính của ái lực liên kết Fab. Nguyên lý của sự ức chế trastuzumab của thử nghiệm sinh học tăng sinh là dòng tế bào đích có liên quan, thường là các tế bào BT-474, được điều chế trong các đĩa tế bào sử dụng quy trình được thiết kế để tối ưu hóa sự biểu hiện của thụ thể. Một loạt các lần pha loãng (dung dịch pha loãng theo bậc) trastuzumab tiếp đó được điều chế, được bổ sung vào đĩa và được liên kết với các tế bào BT-474 trong một khoảng thời gian. Các kết quả mẫu được báo cáo dưới dạng phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào hoặc dưới dạng phép đo hiệu lực tương đối dựa theo tiêu chuẩn tham chiếu. Các kết quả được so sánh với hiệu suất của protein trị liệu không được bào chế để đánh giá lợi ích bền nhiệt của các dạng bào chế trước.

Fig.3 thể hiện các kết quả về phần trăm độ tinh khiết của SEC của vật phẩm thử nghiệm LPV-1 (trastuzumab được bào chế bằng nang chứa DPPG) so với vật phẩm thử nghiệm đối chứng không có LPV (trastuzumab không được bào chế) để đánh giá hiệu quả về độ ổn định nhiệt trong thời gian 8 tuần bảo quản ở nhiệt độ 40°C so với 4°C . Đối chứng tham chiếu không có LPV thể hiện sự giảm theo % độ tinh khiết (được đo dưới dạng pic chính đơn trên SEC) khi được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 40°C so với khi được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 4°C . Ngược với đối chứng không có LPV, không có chênh lệch về % độ tinh khiết được quan sát trong vật phẩm thử nghiệm (LPV-1) chứa lipit được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 4°C hoặc 40°C .

Fig.4 thể hiện các kết quả thử nghiệm hiệu lực sinh học chống tăng sinh BT-474 của vật phẩm thử nghiệm LPV-1 (trastuzumab được bào chế với các nang chứa DPPG) so với vật phẩm thử nghiệm đối chứng không có LPV (trastuzumab không được bào chế) để đánh giá hiệu quả về độ ổn định nhiệt trong thời gian 8

tuần bảo quản ở nhiệt độ 40°C so với 4°C. Đối chứng tham chiếu không có LPV thể hiện sự giảm hiệu lực (như được đo bằng phương pháp phát hiện UV) khi được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 40°C so với khi được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 4°C. Ngược với đối chứng không có LPV, không có sự chênh lệch về % độ tinh khiết được quan sát trong vật phẩm thử nghiệm (LPV-1) chứa lipid được bảo quản trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 4°C hoặc 40°C. Các kết quả tương đương được quan sát thấy dù protein trị liệu trastuzumab có được bào chế với các nang chứa DPPG hay được trộn lẫn với các nang của chất hoạt động bề mặt anion được tạo hình trước.

Các phương án khác

Các phương án khác của sáng chế sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này liên quan đến phần mô tả hoặc thực tiễn của sáng chế được bộc lộ ở đây. Phần mô tả và các ví dụ chỉ được xem là được nêu làm ví dụ, với phạm vi chính xác của phần mô tả được chỉ ra bởi các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây. Nội dung của tài liệu tham khảo bất kỳ được đề cập đến ở đây được kết hợp theo cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế chế phẩm được làm khô lạnh ổn định nhiệt, phương pháp này bao gồm các bước:

điều chế nang được tạo hình trước bằng cách nấu chảy lipid bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, steroid và chất lưỡng phân dạng ion ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 140°C và sau đó đồng nhất hóa lipid đã nấu chảy trong dung dịch đệm để tạo ra nang được tạo hình trước;

trộn lẫn các nang được tạo hình trước với dung dịch nước chứa chất trị liệu không bền nhiệt bao gồm virus giảm độc lực hoặc protein trị liệu, để tạo thành hỗn hợp;

đồng nhất hóa hỗn hợp này để tạo ra chế phẩm đồng nhất; và

làm khô lạnh chế phẩm đồng nhất này,

trong đó chất lưỡng phân dạng ion là dioxetylphosphat (DCP) hoặc diphosphatidyl glycerol (DPPG), chất hoạt động bề mặt không ion là 1-monopalmitoyl glycerol (MPG) và steroid là cholesterol (CHO).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất lưỡng phân dạng ion là DPPG.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất lưỡng phân dạng ion là DCP.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bước điều chế nang được tạo hình trước bao gồm các bước:

(a) nấu chảy thành phần lipid, và bổ sung thành phần lipid đã nấu chảy vào dung dịch nước mà không có chất trị liệu không bền nhiệt; hoặc

(b) nấu chảy thành phần lipid, và bổ sung dung dịch nước mà không có chất trị liệu không bền nhiệt vào thành phần lipid đã nấu chảy.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó virus giảm độc lực được chọn từ nhóm bao gồm virus gây bệnh sởi giảm độc lực, virus gây bệnh quai bị giảm độc lực, virus gây bệnh rubella giảm độc lực, virus gây bệnh thủy đậu giảm độc lực, và kết hợp của chúng.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó virus giảm độc lực được chọn từ nhóm bao gồm rotavirus giảm độc lực, virus gây bệnh zona

giảm độc lực, virus gây bệnh đậu mùa giảm độc lực, virus gây bệnh sốt vàng giảm độc lực, và kết hợp của chúng.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chất trị liệu không bền nhiệt bao gồm protein trị liệu, như kháng thể.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó protein trị liệu là kháng thể.

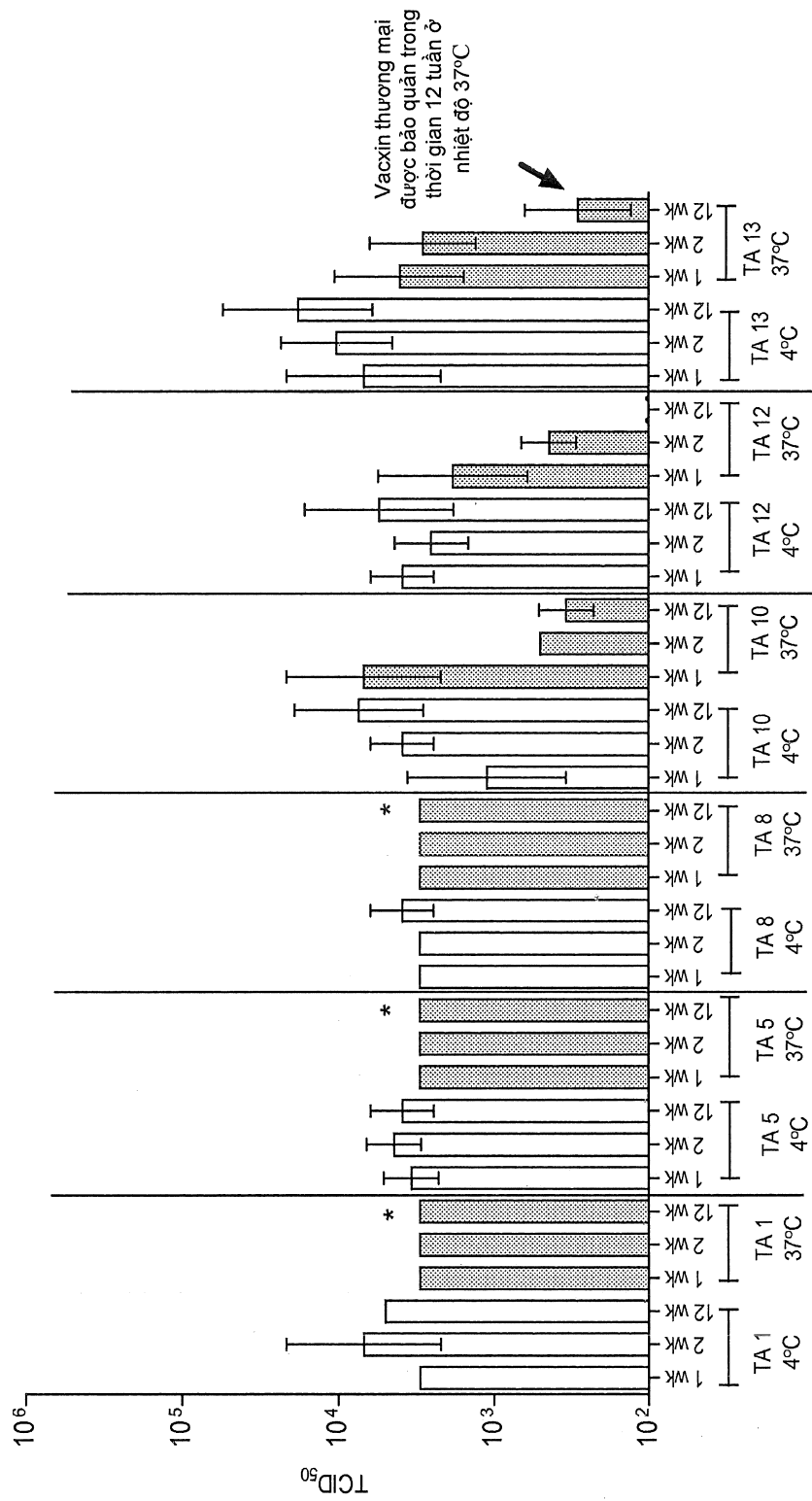


Fig. 1

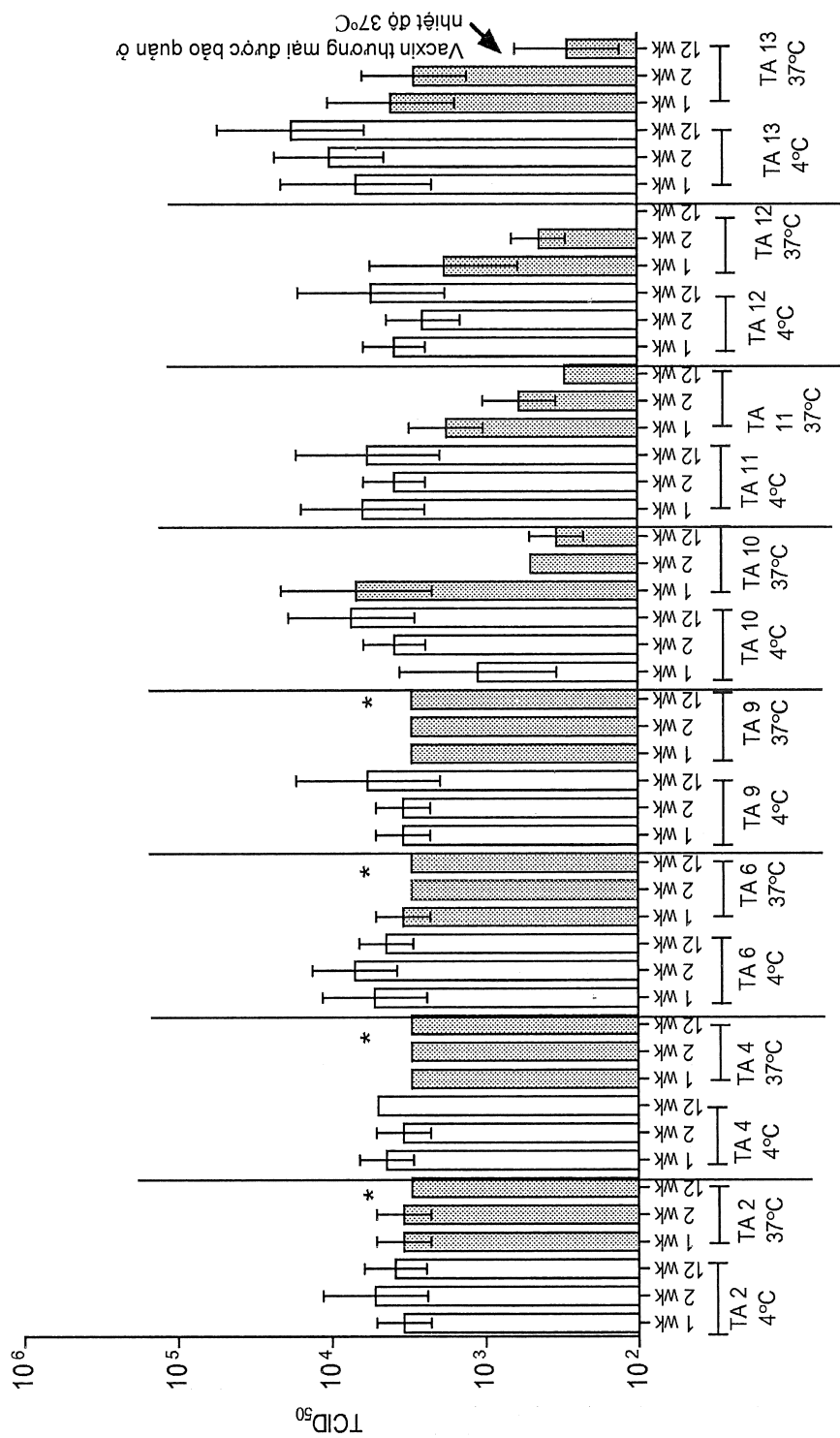


Fig. 2

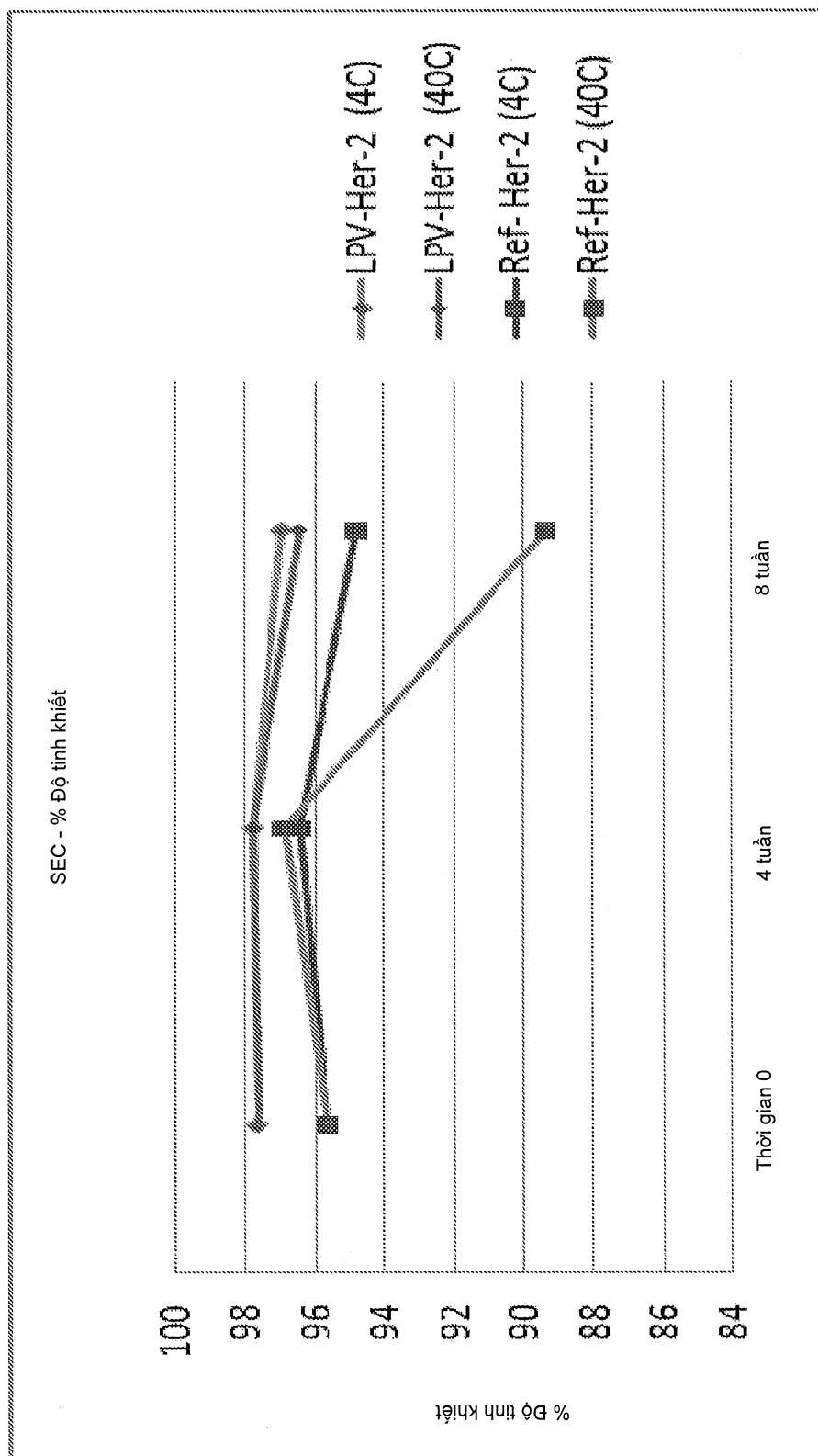


Fig. 3

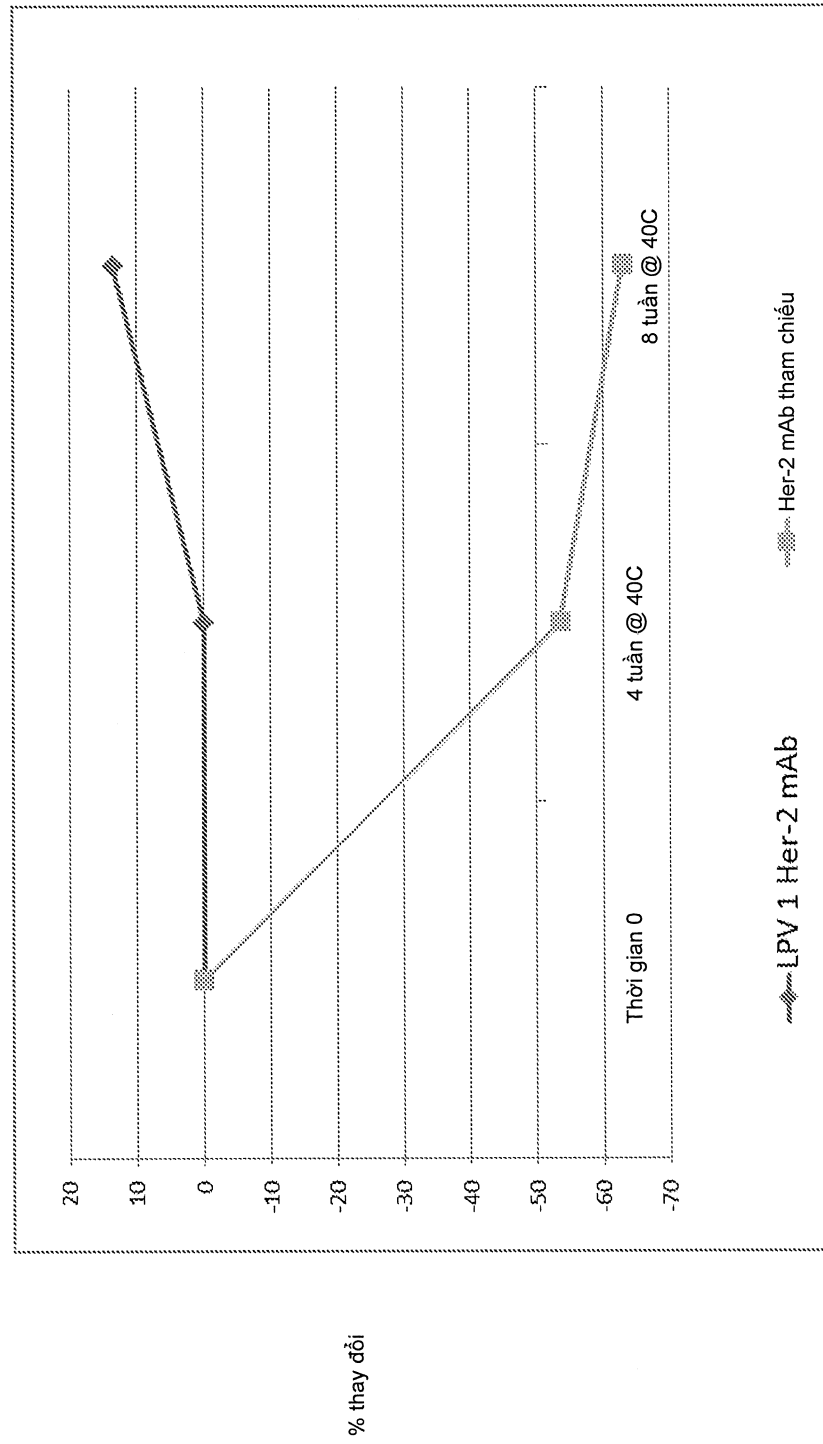


Fig. 4