



(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)



1-0035473

(51)⁷ C12N 1/20; A61K 39/102; A61K 47/26 (13) B

(21) 1-2015-00325

(22) 02/07/2013

(86) PCT/FR2013/051549 02/07/2013

(87) WO 2014/006318 09/01/2014

(30) 12/56,329 02/07/2012 FR

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/05/2015 326A

(73) Sanofi Pasteur (FR)

2, Avenue Pont Pasteur, 69367 Lyon Cedex 07, France

(72) LE HIR, Jérôme (FR); BARBIRATO, Fabien (FR); LOUBIERE, Pascal (FR);
LINDLEY, Nicholas (FR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYSACARIT VỎ CỦA VI KHUẨN
HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYP B VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ
PHẨM VACXIN CHỨA POLYSACARIT VỎ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b (PRP) trên quy mô công nghiệp để dùng cho vacxin, theo đó chủng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được thu hoạch và xử lý để chiết polysacarit vỏ từ đó, môi trường nuôi cấy này chứa ít nhất là:

- một nguồn cacbon,
- protoporphyrin,
- muối,
- axit amin,
- NAD hoặc NADH,
- vitamin,
- chất điều chỉnh độ pH,

khác biệt ở chỗ, môi trường nuôi cấy này được xác định về mặt hóa học.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) trên quy mô công nghiệp, theo đó chủng Hib được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy cụ thể, thành phần của chúng được xác định về mặt hóa học và do đó môi trường này không chứa nguồn phức chất của nitơ hoặc của cacbon.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giải pháp đã biết và cụ thể là Công bố đơn số W02009/007641, mô tả môi trường nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b cải tiến không chứa thành phần bất kỳ có nguồn gốc động vật như được khuyến cáo khi mục đích nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b là để tạo ra polysacarit vỏ, sau đó polysacarit này sẽ được đưa dưới dạng kháng nguyên vào thành phần của vaccin. Trong môi trường được mô tả trong giải pháp đã biết này, nguồn nitơ thường bao gồm pepton có nguồn gốc động vật được thay bằng pepton có nguồn gốc thực vật.

Các môi trường này là sự tiến bộ lớn xét về độ an toàn của dược phẩm, cụ thể là liên quan đến việc loại bỏ nguy cơ lây truyền các bệnh như bệnh viêm não thể xốp ở bò; do đó, chúng làm cho dược phẩm có thể phù hợp với khuyến cáo của Cơ quan y tế.

Tuy nhiên, thành phần của pepton có thể thay đổi theo mẻ cung cấp, điều này có thể dẫn tới sự thay đổi lượng vi khuẩn tạo ra và còn thay đổi cả sản lượng kháng nguyên cần quan tâm, các nhà sản xuất vaccin cố gắng hạn chế hoặc khắc phục điều này bằng cách thay đổi các thông số nhất định trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, khi sản xuất dược phẩm trên quy mô công nghiệp, cần có quy trình hiệu quả thay đổi càng ít càng tốt ở mỗi lần sản xuất, và kết quả ở mỗi bước có thể lặp lại từ mẻ này sang mẻ khác.

Các quy trình này cũng cần phải cho phép thu được sản lượng phù hợp với lợi nhuận công nghiệp, trong trường hợp sản xuất kháng nguyên từ vi khuẩn, tiêu chí cần đạt được không chỉ là thu được lượng vi khuẩn lớn nhất có thể mà còn thu được tỷ lệ tốt nhất giữa độ chuẩn kháng nguyên và lượng vi khuẩn tạo ra; do đó, vi khuẩn cần được nuôi cấy trong điều kiện để hướng quá trình chuyển hóa của nó về phía tổng hợp ra polysacarit vỏ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b trên quy mô công nghiệp (PRP) để dùng cho vacxin, theo đó chủng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được thu hoạch và xử lý để chiết polysacarit vỏ từ đó, môi trường nuôi cấy này chứa ít nhất là:

- một nguồn cacbon,
- protoporphyrin,
- muối,
- axit amin,
- NAD hoặc NADH,
- vitamin,
- chất điều chỉnh độ pH,

khác biệt ở chỗ, môi trường nuôi cấy này được xác định về mặt hóa học.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả mật độ quang ở bước sóng 694 nm khi nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b trong các môi trường nuôi cấy khác nhau được đo mỗi h trong thời gian 12 giờ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đối tượng của sáng chế là phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae* typ b (PRP) trên quy mô công nghiệp để dùng cho vacxin, theo đó chủng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, và dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được thu hoạch và xử lý để chiết polysacarit vỏ từ đó, môi trường nuôi cấy này chứa ít nhất:

- một nguồn cacbon,
- protoporphyrin,
- các muối,
- các axit amin,
- NAD hoặc NADH,

- các vitamin,
- chất điều chỉnh độ pH,

khác biệt ở chỗ, môi trường nuôi cấy này được xác định về mặt hóa học.

Nhờ sáng chế, có thể vừa có được quy trình sản xuất công nghiệp hiệu quả lẫn tăng lượng polysacarit vỏ tạo ra mà không cần tăng sinh khối tương ứng, nhờ đó có thể giảm lượng lipopolysacarit (LPS) đi kèm với lượng PRP tạo ra.

Ngoài ra, sự không có mặt protein trong thành phần của môi trường nuôi cấy làm giảm nhu cầu cần thiết về chất chống tạo bọt và đơn giản hóa bước tinh chế, làm cho có thể thu được kháng nguyên bao gồm polysacarit vỏ từ dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy chứa chất điều chỉnh độ pH. Các chất điều chỉnh độ pH này có thể bao gồm muối đệm và/ hoặc chất đo độ pH kết hợp với chất bổ sung axit hoặc bazơ vào môi trường. Sản lượng có thể được tối ưu hóa nhờ điều chỉnh độ pH.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước liên hợp PRP tạo ra với protein mang như protein của vi khuẩn uốn ván.

Đối tượng của sáng chế còn là phương pháp bào chế vaccin phối hợp, theo đó:

- Kháng nguyên *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), bao gồm polysacarit vỏ (PRP), được điều chế trên quy mô công nghiệp bằng cách nuôi cấy chủng Hib trong môi trường được xác định về mặt hóa học mà tính chất và lượng của mỗi thành phần của nó được xác định một cách hoàn hảo và môi trường này chứa ít nhất:

- một nguồn cacbon,
- protoporphyrin,
- các muối,
- các axit amin,
- NAD hoặc NADH,
- các vitamin,
- và chất điều chỉnh độ pH,
- dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được thu hoạch và xử lý để chiết

polysacarit vỏ đã tinh chế từ đó,

- polysacarit vỏ được liên hợp với protein mang.

Theo một phương án, thể liên hợp thu được còn được kết hợp với ít nhất một hoặc

nhiều kháng nguyên để tiêm chủng chống lại một hoặc nhiều bệnh sau: bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, bệnh viêm gan B, bệnh thủy đậu, bệnh quai bị, bệnh sởi Đức, các bệnh nhiễm vi khuẩn *Neisseria meningitidis* hoặc *Streptococcus pneumoniae*, các bệnh nhiễm rotavirus để thu được vaccin phối hợp cho phép tạo miễn dịch đồng thời chống lại một số bệnh.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy được xác định về mặt hóa học, tức là cấu trúc hóa học và lượng của mỗi thành phần là đã biết. Môi trường này không chứa nguồn phức chất của nitơ hoặc của cacbon, như pepton, casein, huyết thanh hoặc chất tương tự, và do đó nếu cần, có thể bảo đảm không chứa nguyên tố có nguồn gốc trực tiếp từ động vật.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae* typ b trên quy mô công nghiệp. Phương pháp này làm cho có thể thu được lượng sinh khối và polysacarit vỏ hoặc polyribosyl ribitol phosphat (PRP) phù hợp với các điều kiện ràng buộc công nghiệp. Cụ thể, phương pháp này làm cho có thể thu được sinh khối tương ứng với mật độ quang ở 694nm ít nhất là 2,4 sau 12 giờ nuôi cấy, và lượng PRP đi kèm ít nhất là 240 mg/lít môi trường nuôi cấy, từ chủng *Haemophilus influenzae* typ b mà trong mã di truyền của nó có ít nhất 2 bản sao locut *cap* mã hóa các chức năng cho phép tổng hợp vỏ, mà không cần điều chỉnh đặc biệt môi trường (như độ pH hoặc pO₂). Việc xác định lượng PRP tạo ra được thực hiện bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion tính năng cao kết hợp với kỹ thuật phát hiện chuẩn độ ampe theo xung (high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection: HPAEC-PAD) (Dionex), hoặc phương pháp cho kết quả tương đương. Có lợi nếu phương pháp theo sáng chế cho phép có thể thu được lượng PRP ít nhất là 270 mg/lít môi trường, và thậm chí có lợi hơn là lượng ít nhất 300 mg/lít.

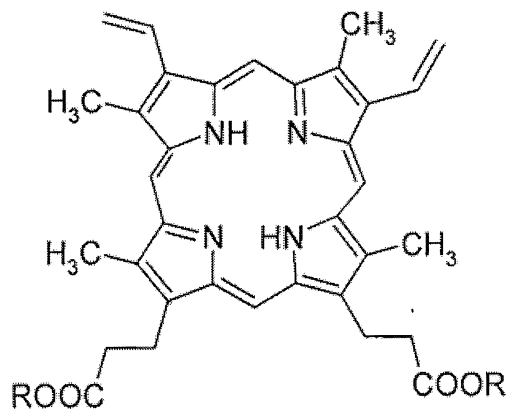
Trong số các nguồn cacbon có thể được sử dụng có thể kể đến tất cả các nguồn cacbon có thể được chuyển hóa bởi chủng *Haemophilus influenzae* typ b, và cụ thể là glucoza, fructoza, galactoza, glyxerol, xyloza, riboza, fucoza, axit sialic và lactat. Cũng có thể sử dụng hai hoặc nhiều nguồn khác nhau, cụ thể là lactat và glucoza.

Theo sáng chế, lượng glucoza có mặt trong môi trường ban đầu nằm trong khoảng từ 5 đến 25 g/l, cụ thể hơn là từ 10 đến 20 g/l, và cụ thể hơn nữa là từ 12 đến 16 g/l.

Lượng lactat có mặt trong môi trường ban đầu có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 15 g/l, và cụ thể hơn nữa là từ 0,5 đến 10 g/l.

Theo một phương án của sáng chế, protoporphyrin của môi trường là

protoporphyrin tổng hợp, ví dụ sản phẩm của công ty Sigma-Aldrich có mã sản phẩm 258385 (muối dinatri của protoporphyrin). Do đó, có thể sử dụng môi trường có thể đảm bảo hoàn toàn không chứa chất có nguồn gốc động vật. Theo cách khác, protoporphyrin tổng hợp IX được sử dụng, công thức của nó là như sau:



trong đó R là H, hoặc ion đối, tốt hơn là ion đối của kim loại kiềm, cụ thể là natri.

Protoporphyrin IX này và phương pháp điều chế chúng đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Pháp số FR 2 914 302.

Theo sáng chế, có lợi nếu lượng protoporphyrin có mặt trong môi trường ban đầu nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/l, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 2 mg/l.

Môi trường nuôi cấy theo sáng chế chứa các muối tạo ra các chất khoáng cần thiết cho quá trình sinh trưởng tế bào, làm cho có thể đảm bảo áp suất thẩm thấu có lợi cho vi khuẩn, và còn có khả năng đệm độ pH.

Tốt hơn nếu sử dụng hỗn hợp của các cation hóa trị một như Na^+ và/ hoặc K^+ , cation hóa trị hai như Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , anion phosphat ở dạng HPO_4^- , H_2PO_4^- và/ hoặc PO_4^{---} và anion SO_4^- và Cl^- ở dạng dung dịch muối, nồng độ phân tử gam thể tích của mỗi ion này có thể thay đổi trong khoảng từ 10^{-4} mM đến 1000 mM.

Cụ thể, các muối có mặt trong môi trường nuôi cấy được chọn từ: K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Nồng độ muối được chọn để có nồng độ mol nằm trong khoảng từ 200 đến 700 miliosmol/l, cụ thể là nằm trong khoảng từ 300 đến 400 miliosmol/l, đặc biệt là 350 miliosmol/l, và độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Cụ thể, nhằm mục đích này, môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thể chứa:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 150 đến 1500 mg/l,
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 6,5 đến 52 mg/l,
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,25 đến 10 mg/l,
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,5 đến 80 mg/l,
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2 mg/l,
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,5 đến 10 mg/l,
- Natri ở dạng natri lactat 60% với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 4 ml/l,
- K_2HPO_4 và KH_2PO_4 , mỗi chất này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 1200 mg/lít nếu tác dụng đệm được tạo bởi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 15 đến 120 g/l,
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ thấp hơn từ 10 đến 30 lần so với $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Theo cách khác, tác dụng đệm có thể được tạo ra bởi cặp muối $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; trong trường hợp này, nồng độ K_2HPO_4 nằm trong khoảng từ 15 đến 120 g/l, và nồng độ KH_2PO_4 thấp hơn từ 10 đến 30 lần so với K_2HPO_4 ; do đó, nồng độ của $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ và $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ có thể nằm trong khoảng từ 100 đến 1200 mg/lít.

Trong số các muối nêu trên, có thể cần lưu ý rằng sự có mặt của kẽm là đặc biệt có lợi đối với quá trình tạo sinh khối và PRP, cụ thể là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,5 đến 80 mg/l, hoặc cụ thể hơn nữa là từ 5 đến 20 mg/l. Kết quả rất tốt đã thu được ở nồng độ 20 mg/l.

Trong trường hợp độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh trong giai đoạn nuôi cấy, cụ thể là bằng cách bổ sung bazơ có độ đậm đặc cao như NaOH hoặc KOH, có thể giảm lượng muối có mặt trong môi trường này, và cụ thể là lượng cặp muối đệm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, hoặc $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ có mặt, tuy nhiên, nồng độ mol được duy trì ở giá trị thích hợp, tức là nằm trong khoảng từ 200 đến 700 mOsm/l, nhờ tùy ý bổ sung NaCl.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy còn chứa NAD hoặc nguồn NAD, hoặc nguồn coenzym tương đương bất kỳ khác. NAD (hoặc β -nicotinamid adenin dinucleotit), còn được gọi là coenzym I hoặc yếu tố V, là yếu tố sinh trưởng cần thiết để nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b. Có lợi nếu nó có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 và 50 mg/l, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 10 mg/l, cụ thể là 5 mg/l môi trường nuôi cấy. Nó có thể được đưa vào môi trường ở dạng được khử NADH của nó. Theo một phương án khác của NAD, môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thể chứa

thành phần tiền chất NAD mà vi khuẩn sẽ có thể sử dụng, như NADP/NADPH (β -nicotinamit adenin dinucleotit phosphat) hoặc NMN (β -nicotinamit adenin mononucleotit) hoặc NR (nicotinamit ribosit), 3-axetylpyridin adenin dinucleotit (APAD) hoặc 3-axetylpyridin mononucleotit (APMN).

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy chứa axit amin, có lợi nếu axit amin này được chọn từ arginin, alanin, lysin, histidin, tryptophan, valin, isoleuxin, leuxin, tyrosin, phenylalanin, xystin (hoặc axit tương đương), asparagin, glutamin, axit aspartic và axit glutamic.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy theo sáng chế chỉ chứa arginin, alanin, histidin, tryptophan, tyrosin, phenylalanin, xystin, axit aspartic và axit glutamic. Theo cách khác, tất cả các axit amin nêu trên đều có mặt trong môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, xystin được thay bằng glutathion hoặc xystein.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp theo sáng chế sử dụng môi trường nuôi cấy không chứa các axit amin sau: L-metionin, L-glyxin, L-prolin, L-serin và L-threonin. Điều này là do sự có mặt của các axit amin này dẫn tới sự tăng sinh khối, nhưng không tăng tương ứng mức PRP tạo ra.

Axit amin được cung cấp ở dạng bột rất tinh khiết là sản phẩm của Sigma. Đặc biệt có lợi nếu các axit amin này có nguồn gốc tổng hợp hoặc được điều chế bằng các quy trình đảm bảo rằng chúng không chứa nguyên tố có nguồn gốc trực tiếp từ động vật, để loại trừ nguy cơ nhiễm bệnh truyền nhiễm bất kỳ, và cụ thể là nhiễm bệnh viêm não thể xốp ở bò (Bovine Spongiform Encephalitis: BSE).

Lượng của mỗi axit amin được chọn để tối ưu hóa quá trình sinh trưởng tế bào và quá trình tạo ra PRP. Lượng axit aspartic, asparagin và glutamin được chọn để gây ra tình trạng thiếu dinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy tế bào, nhờ đó làm cho có thể hướng sự chuyển hóa tế bào về phía sản sinh ra polysacarit vỏ, trong khi lượng các axit amin còn lại được chọn sao cho không có tình trạng thiếu dinh dưỡng trong giai đoạn nuôi cấy.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy còn chứa các vitamin được chọn từ: thiamin, pantothenat, uraxil, hypoxantin, biotin, riboflavin và pyridoxin. Nhằm mục đích của sáng chế, thuật ngữ "vitamin" còn bao gồm uraxil và hypoxantin là các bazơ nitơ.

Đặc biệt có lợi nếu vitamin có mặt trong môi trường nuôi cấy theo sáng chế không có nguồn gốc động vật, cụ thể là có nguồn gốc tổng hợp, nhờ đó có thể loại trừ nguy cơ

nhiễm bệnh truyền nhiễm bất kỳ, và cụ thể là bệnh viêm não thể xốp ở bò (BSE). Cụ thể, vitamin là sản phẩm của Sigma được sử dụng, độ tinh khiết của nó là đã biết chính xác, nhờ đó cho phép sử dụng liều rất chính xác trong quá trình điều chế môi trường nuôi cấy.

Lượng vitamin có mặt trong môi trường được chọn để tối ưu hóa quá trình sản xuất sinh khối và PRP.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, môi trường nuôi cấy chứa xitruilin, axit amin này có thể thay thế cho arginin và uraxil.

Trong trường hợp này, có lợi nếu lượng xitruilin đưa vào môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 150 đến 500 mg/l.

Nhờ môi trường nuôi cấy theo sáng chế, có thể tạo ra Polyribosyl Ribitol Phosphat với lượng lớn hơn so với khi sử dụng môi trường theo giải pháp đã biết trong khi đồng thời không tiêu thụ nhiều hydratcacbon, và không tạo ra nhiều chất gây ô nhiễm, cụ thể là LPS.

Theo một phương án của sáng chế, chủng *Haemophilus influenzae* typ b được nuôi cấy là chủng có vỏ bọc có ít nhất 2 bản sao locut gen *cap* trong mã di truyền của nó. Locut *cap* có kích thước từ 17 đến 18kb này tạo thành nhóm với các gen mà sự biểu hiện của chúng liên quan đến sự tổng hợp và biểu hiện vỏ.

Sự biểu hiện vỏ này làm cho vi khuẩn có màu trắng khi nó được nuôi cấy trên aga đặc hiệu; vì vậy, các khuẩn lạc vi khuẩn có locut *cap* này được gọi là "khuẩn lạc trắng", trong khi vi khuẩn không biểu hiện polysacarit vỏ ra bề mặt vỏ được gọi là "khuẩn lạc xám". Sự biểu hiện vỏ có thể là không ổn định di truyền, điều này có thể dẫn tới sự xuất hiện các thể đột biến không có vỏ, do đó sẽ dẫn tới làm giảm lượng PRP tạo ra. Các nghiên cứu đã có thể chứng minh được rằng môi trường được xác định về mặt hóa học sử dụng trong phương pháp theo sáng chế làm cho có thể đảm bảo tính ổn định di truyền cao của chủng được sử dụng trong khoảng 20 thế hệ tế bào.

Theo sáng chế, có thể thực hiện quá trình nuôi cấy vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b theo một số bước liên tiếp để tăng dần sinh khối.

Trong trường hợp này, vi khuẩn có nguồn gốc từ mẫu đông khô hoặc từ mẫu đông lạnh được cấy vào môi trường có thể tích thường không quá 1 lít. Sau khi nuôi cấy qua đêm hoặc khi mật độ quang của môi trường đủ lớn, dịch nuôi cấy thứ nhất này được chuyển vào môi trường nuôi cấy thứ hai giống với môi trường thứ nhất, nhưng thể tích của nó có thể lớn hơn 10 đến 20 lần. Lượng vi khuẩn cấy vào môi trường thứ hai được

điều chỉnh sao cho mật độ quang (O.D.) ban đầu của môi trường nuôi cấy thứ hai ở 694nm nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,4 để thúc đẩy quá trình sinh trưởng nhanh của quần thể vi khuẩn. Quá trình nuôi cấy thứ hai này thường được thực hiện trong thiết bị lên men, nhưng các loại đồ chứa khác có thể được sử dụng (bình, bình quay, v.v.). Nếu quá trình nuôi cấy được thực hiện trong thiết bị lên men, nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, khuấy liên tục, áp suất 0,1ba, pO_2 bằng 30% và tốc độ dòng không khí là 0,25 thể tích khí/thể tích môi trường/phút thường được sử dụng trong quá trình nuôi cấy. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể chọn các thông số khác cho cách nuôi cấy này. Vào cuối giai đoạn sinh trưởng theo hàm mũ của vi khuẩn, sinh khối có thể được tăng tiếp bằng cách chuyển nó vào thiết bị lên men khác có dung tích lớn hơn bằng cách sử dụng quy trình tương tự v.v.. Thể tích nuôi cấy thu được có thể đạt tới, hoặc thậm chí cao hơn 1000 lít. Nói chung, (các) quá trình nuôi cấy này được thực hiện theo cách "gián đoạn".

Cuối cùng, dịch nổi bề mặt của lần nuôi cấy cuối cùng được thu hoạch sau khi bất hoạt vi khuẩn. Việc bất hoạt này thường được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch formol ở nồng độ cuối 0,35%-0,37% (theo thể tích). Dịch nổi bề mặt này thường được tách ra khỏi vi khuẩn bằng bước ly tâm. Sau đó, PRP có trong dịch nổi bề mặt được chiết và tinh chế theo các phương pháp thông thường mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết rõ.

Sau đó, có lợi nếu PRP đã được thu hoạch và tinh chế được liên hợp với protein mang như protein của vi khuẩn uốn ván, để làm cho nó có tính phụ thuộc vào tế bào T và cụ thể là có thể tạo miễn dịch cho trẻ em. Kháng nguyên PRP-T thu được có thể được sử dụng một mình trong vaccin đơn giá, hoặc được kết hợp với các kháng nguyên khác để có thể tiêm chủng đồng thời chống lại một số bệnh.

Đặc biệt có lợi là sáng chế đề xuất phương pháp bào chế vaccin phối hợp, theo đó thể liên hợp thu được được kết hợp với ít nhất một hoặc nhiều kháng nguyên thường có mặt trong vaccin dùng cho trẻ em, và cụ thể là kháng nguyên chống lại bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, bệnh viêm gan B, các bệnh nhiễm vi khuẩn *Neisseria meningitidis* hoặc *Streptococcus pneumoniae*, bệnh thủy đậu, bệnh quai bị, bệnh sởi Đức, các bệnh nhiễm rotavirus, v.v..

Theo một phương án, thể liên hợp PRP-T có mặt ở dạng bột, trong khi các kháng nguyên khác ở dạng lỏng, tất cả các kháng nguyên này được trộn ngay trước khi sử dụng; theo một phương án khác, vaccin phối hợp hoàn toàn là chất lỏng.

Do đó, phương pháp bào chế theo sáng chế cho phép có thể bào chế vaccin phối hợp bốn giá, ngoài thể liên hợp PRP-T, vaccin này chứa kháng nguyên bạch hầu, uốn ván và viêm gan B. Theo cách khác, phương pháp theo sáng chế làm cho có thể bào chế vaccin phối hợp bốn giá, ngoài thể liên hợp PRP-T, vaccin này chứa giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, và 2 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào (giải độc tố và ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi) hoặc 3 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào (2 kháng nguyên nêu trên + pertactin) hoặc 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào (ba kháng nguyên nêu trên + ngưng kết nguyên).

Phương pháp theo sáng chế cũng làm cho có thể bào chế vaccin phối hợp năm giá, ngoài thể liên hợp PRP-T, vaccin này chứa giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, 2, 3 hoặc 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào và cả virus bại liệt typ 1, 2 và 3 được bất hoạt.

Phương pháp theo sáng chế cũng làm cho có thể bào chế vaccin phối hợp sáu giá, ngoài thể liên hợp PRP-T, vaccin này chứa giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, 2, 3 hoặc 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào, kháng nguyên của virus viêm gan B và cả virus bại liệt typ 1, 2 và 3 được bất hoạt. Cụ thể, vaccin phối hợp sáu giá này có thể là chất lỏng và có thể chứa các thành phần sau cho liều 0,5ml:

- giải độc tố bạch hầu với lượng 20 IU,
- giải độc tố uốn ván với lượng 40 IU,
- kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B với lượng 10µg,
- giải độc tố ho gà với lượng 25 µg,
- ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi của vi khuẩn ho gà với lượng 25 µg,
- PRP-T với lượng 12µg PRP,
- virus bại liệt bất hoạt typ 1, 2 và 3 với lượng tương ứng là 40, 8 và 32 DU,
- nhôm hydroxit với lượng 0,6mg Al³⁺.

Theo cách khác, phương pháp theo sáng chế làm cho có thể bào chế vaccin phối hợp trong đó kháng nguyên ho gà bao gồm vi khuẩn *Bordetella pertussis* toàn bào.

Nhờ phương pháp nuôi cấy theo sáng chế, có thể tăng lượng Polyribosyl Ribitol Phosphat tạo ra mà không tăng lượng sinh khối, nhờ đó có thể giảm lượng LPS gây nhiễm bẩn; ưu điểm này của phương pháp theo sáng chế là rất quan trọng đối với ngành công nghiệp vaccin, trong đó các sản phẩm này được đưa vào vaccin hỗn hợp dưới dạng kháng nguyên và trong đó lượng LPS cần được giảm đến mức tối thiểu. Nhờ có phương pháp

có thể cho phép không tăng lượng LPS tạo ra đối với lượng PRP lớn hơn, có thể đơn giản hóa quá trình tinh chế sau đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Điều chế môi trường nuôi cấy theo sáng chế

Môi trường nuôi cấy theo sáng chế được điều chế từ môi trường cơ bản mà các dung dịch làm giàu được bổ sung vào đó ngay khi sử dụng.

Thành phần của môi trường cơ bản được đưa ra trong bảng I dưới đây:

Bảng I

Hợp chất	Lượng tính bằng g trong 1 lít	Nhà cung cấp	Mã sản phẩm
Natri lactat 60%	1,5ml	Prolabo	27925.292
K ₂ HPO ₄	300	VWR Prolabo	26931.263
KH ₂ PO ₄	300	VWR Prolabo	26923.298
MgSO ₄ .7H ₂ O	368	VWR Prolabo	25165.260
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28620	VWR Prolabo	28028.298
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	1870	VWR Prolabo	28015.294
L-Arginin	87	Sigma	A5006 hoặc A8094
L-Alanin	134	Sigma	A7627 hoặc A7469 hoặc A4349
L-Asparagin	198	Sigma	A0884 hoặc A7094
L-Lysin	140	Sigma	L5626 hoặc L8662 hoặc L7039
L-Glutamin	220	Sigma	G3126 hoặc G8540 hoặc G5792
L- histidin	78	Sigma	h8000 hoặc h6034 hoặc h3911
L-Tryptophan	200	Sigma	T0254 hoặc T8941 hoặc T4196
L-Valin	115	Sigma	V0500 hoặc V0513 hoặc V4638

L-Isoleuxin	130	Sigma	12752 hoặc 17403 hoặc 15281
L-Leuxin	130	Sigma	L8000 hoặc L6914 hoặc L8912
L-Tyrosin	180	Sigma	T3754 hoặc T8566 hoặc T4321
L-Phenylalanin	165	Sigma	P5482
L-Xystin	61	Sigma	C8755 hoặc C7602 hoặc C5735
L-axit aspartic	1065	Sigma	A9256 hoặc A5474
L-axit glutamic	1471	Sigma	GI 251 hoặc G8415
Pyridoxin HCl	4	Sigma	P5669
Riboflavin	0,2	Sigma	R4500
Thiamin HCl	4	Sigma	T4625
Biotin	4	Sigma	B4501
Ca Pantothenat	4,5	Sigma	P5710
Uraxil	70	Sigma	U0750
Hypoxantin	20	Sigma	H9377
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5	Aldrich	450278
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	Sigma	Z4750
CoCl ₂ .6H ₂ O	1	Flulca	60818
MnSO ₄ .H ₂ O	5	Sigma	M7634
CaCl ₂ .2H ₂ O	13	Panreac	131232.1211

Để điều chế 1 lít môi trường, các hợp chất khác nhau được bổ sung theo thứ tự nêu trong bảng nêu trên vào khoảng 100ml nước mềm, kết hợp với khuấy bằng cách sử dụng thanh khuấy từ. Trước khi bổ sung, tất cả các chất dạng bột được hòa tan trước trong một thể tích nhỏ nước mềm cùng với bổ sung axit hoặc bazơ trong một số trường hợp.

Do vậy, đối với valin, isoleuxin và leuxin, cần bổ sung 140μl dung dịch KOH 10N vào các lượng nêu trong bảng nêu trên; đối với tyrosin, cần bổ sung 280μl dung dịch KOH 10N; đối với phenylalanin, cần bổ sung 210μl dung dịch HCl 37%, và đối với xystin, cần bổ sung 70μl dung dịch HCl 37%.

Cuối cùng, độ pH được điều chỉnh tới $7,2 \pm 0,1$ bằng dung dịch KOH 10N (trong trường hợp độ pH quá cao, dung dịch HCl 37% sẽ được sử dụng), tiếp đó nước mềm được sử dụng để tăng thể tích tới mức mong muốn.

Sau đó, môi trường được tiệt trùng bằng cách lọc trên bộ lọc có ngưỡng lọc là

0,22 μ m.

Theo cách này có thể bảo quản môi trường trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 5°C.

Trước khi cấy vi khuẩn vào môi trường, các chất sau được bổ sung:

- 27,3ml glucoza ở nồng độ 512,8 g/l được điều chế từ D(+) glucoza khan là sản phẩm của VWR với mã sản phẩm 24379.294,
- 5ml dung dịch NAD ở nồng độ 1 g/l, là sản phẩm của Sigma có tên sản phẩm là P-Nicotinamit Adenin Dinucleotit hydrat (mã sản phẩm 43410),
- 4ml dung dịch gốc chứa protoporphyrin ở nồng độ 0,25 g/l và amoni hydroxit ở nồng độ 5m/l; protoporphyrin này là sản phẩm có tên là muối dinatri Protoporphyrin IX của Sigma Aldrich (mã sản phẩm 258385) và amoni hydroxit là sản phẩm có tên là dung dịch amoniac 28% của VWR (mã sản phẩm 21190.292), để thu được 1 lít môi trường sẵn sàng để cấy vi khuẩn, và ngoài các thành phần được mô tả trong bảng I trên đây, môi trường này chứa các thành phần bổ sung sau đây với nồng độ như nêu trong bảng II dưới đây:

Bảng II

Hợp chất	Nồng độ trước khi cấy vào môi trường
Protoporphyrin	1 mg/l
Dung dịch amoniac trong nước	17,7 μ g/l
Glucoza khan	14 g/l
NAD	5 mg/l

Ví dụ 2: Điều chế môi trường nuôi cấy theo giải pháp đã biết

Môi trường nuôi cấy theo giải pháp đã biết được điều chế bằng cách bổ sung các dung dịch làm giàu cụ thể vào môi trường cơ bản.

Thành phần của môi trường cơ bản được đưa ra trong bảng III dưới đây:

Bảng III:

Hợp chất	Nồng độ trong môi trường cơ bản
Pepton đậu Hà Lan	7,42 g/l
Natri lactat 60%	1,5 ml/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	31,14 g/l
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,03 g/l
Xystin (L)	0,07 g/l

HCl (10N)	0,07 ml/l
Tryptophan (L)	0,02 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g/l

Để điều chế môi trường cơ bản này, mỗi thành phần được bổ sung theo thứ tự mà trong đó chúng được nêu trong bảng nêu trên vào 100ml nước mềm được khuấy liên tục bằng cách sử dụng thanh khuấy từ. Mỗi thành phần được cung cấp ở dạng bột được hòa tan trước trong một thể tích nhỏ nước mềm.

Pepton đậu hà lan là sản phẩm của Kerry và được bán với mã sản phẩm Hy-pea 7404. (NH₄)₂SO₄ là sản phẩm của VWR với mã sản phẩm 21333,296. Các thành phần khác đều là sản phẩm của các nhà sản xuất này và được cung cấp với mã sản phẩm giống như được mô tả trong ví dụ 1 để điều chế môi trường theo sáng chế.

Độ pH cuối được điều chỉnh tới $7,2 \pm 0,1$ bằng dung dịch KOH 10N (trong trường hợp độ pH quá cao, dung dịch HCl 37% sẽ được sử dụng).

Sau đó, nước mềm được bổ sung để thu được thể tích mong muốn, và môi trường thu được tiệt trùng bằng cách hấp trong nồi hấp, theo chu trình 30 phút ở nhiệt độ 120°C.

Sau khi được tiệt trùng, môi trường có thể được bảo quản trong 15 ngày ở nhiệt độ 4°C.

Các dung dịch làm giàu A, B, C và D được bổ sung vào môi trường cơ bản này.

Dung dịch A là dung dịch chứa glucoza khan ở nồng độ 512,8 g/l, là sản phẩm có tên D(+) glucoza khan của VWR (mã sản phẩm 24379,294).

Dung dịch B là dung dịch gốc chứa NAD ở nồng độ 1 g/l, là sản phẩm β -Nicotinamid Adenin Dinucleotit hydrat của Sigma (mã sản phẩm 43410).

Dung dịch C là dung dịch gốc chứa protoporphyrin ở nồng độ 0,25 g/l và amoni hydroxit ở nồng độ 5 ml/l; protoporphyrin là sản phẩm muối dinatri Protoporphyrin IX của Sigma Aldrich (mã sản phẩm 258385) và amoni hydroxit là sản phẩm có tên là dung dịch amoniac 28% của VWR (mã sản phẩm 21190.292).

Dung dịch D là dung dịch đậm đặc chứa dịch chiết nấm men siêu lọc tự phân giải (Ufel) ở nồng độ 125 g/l; đây là sản phẩm Ultrafiltrat d'extrait autolytique de levure (Ufel) của Biospringer (mã sản phẩm Springer 0701).

Mỗi dung dịch này được tiệt trùng bằng cách lọc bằng bộ lọc có ngưỡng lọc là

0,22 μ m.

Các chất sau được bổ sung vào 1 lít môi trường cơ bản:

- 35,1 ml dung dịch A
- 5 ml dung dịch B
- 4 ml dung dịch C
- 40 ml dung dịch D.

Việc bổ sung mỗi dung dịch vào môi trường cơ bản được thực hiện trong tủ hút dòng chảy thành lớp và tạo ra môi trường nuôi cấy có các thành phần bổ sung với nồng độ nêu trong bảng IV dưới đây, trước khi cấy vi khuẩn, ngoài các thành phần nêu trong bảng III trên đây:

Bảng IV:

Hợp chất	Nồng độ trước khi cấy vào môi trường
Dịch chiết nấm men siêu lọc tự phân giải (Ufel)	4,9 g/l
Protoporphyrin	1 mg/l
Dung dịch amoniac trong nước	17,7 μ g/l
Glucosa khan	18 g/l
NAD	5 mg/l

Ví dụ 3: So sánh mức độ tạo ra PRP giữa môi trường theo sáng chế như mô tả trong ví dụ 1 và môi trường theo giải pháp đã biết như mô tả trong ví dụ 2

Các ví dụ so sánh này được thực hiện theo quy trình nuôi cấy hai bước:

- bước nuôi cấy sơ bộ trong bình Erlenmeyer thủy tinh dung tích 1 lít không có vách ngăn ở nhiệt độ 36°C kết hợp với khuấy ở tốc độ 130 vòng/phút trong thời gian 8 giờ, khi hết thời gian này, chủng vi khuẩn ở vào cuối giai đoạn sinh trưởng tuyến tính; quá trình nuôi cấy sơ bộ được khơi mào bằng cách cấy vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b chứa ít nhất 2 bản sao locut *cap* ở nồng độ 0,5% (theo thể tích) vào 280ml môi trường nuôi cấy;

- tiếp đó, chuyển 90ml dịch nuôi cấy sơ bộ để có thể cấy cho thiết bị lên men Biostat B cộng với dung tích 2 lít chứa 1,8 lít môi trường nuôi cấy. Thiết bị lên men này được duy trì ở nhiệt độ 37°C, kết hợp với khuấy ở tốc độ 400 vòng/phút và sục khí với lượng 0,45 lít/phút trong 12 giờ.

Sau 12 giờ nuôi cấy, mật độ quang ở 694nm được đo để có thể xác định lượng sinh khối. Điều này là do trong các thử nghiệm đã biết, có thể xác định được rằng một

đơn vị mật độ quang đo được ở 694nm tương ứng với 0,64g sinh khối (khối lượng khô)/lít.

Tổng lượng PRP trong dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion tính năng cao với kỹ thuật phát hiện chuẩn độ ampe theo xung (HPAEC-PAD), theo phương pháp rất giống với phương pháp được mô tả trong tài liệu công bố của Sturgess và các đồng tác giả (Vaccine 17 (1999) 1169-1178). Dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được lọc bằng cách cho nó đi qua bộ lọc có ngưỡng lọc 0,22µm, và tiếp đó 500µl dịch nổi bề mặt được siêu lọc bằng cách sử dụng cột siêu lọc Amicon có ngưỡng lọc 10kDa (mã sản phẩm của Milipore là UFC5010BK) và sau đó thủy phân cơ bản bằng cách bổ sung NaOH.

Quá trình thủy phân được thực hiện ở nhiệt độ môi trường trong thời gian tối thiểu là 4 giờ.

Hiệu lực của thử nghiệm này được kiểm tra bằng cách sử dụng chất chuẩn nội là glucosamin-1-phosphat (GlcN1P) có mặt trong dung dịch thủy phân và đều đặn cho chạy mẫu đối chứng nội có nồng độ PRP đã biết. Theo các chỉ dẫn của Sturgess và các đồng tác giả, pha động gồm 35mM NaOH và 114mM CH₃COONa, giai đoạn tái sinh được thực hiện trong 10 phút bằng 100mM NaOH và 400mM CH₃COONa.

Các kết quả thu được được đưa ra trong bảng V dưới đây:

Bảng V

	Môi trường theo sáng chế (4 thử nghiệm)	Môi trường theo giải pháp đã biết (1 thử nghiệm)
Mật độ quang ở 694nm	2,52 ± 0,14	3,9
Lượng sinh khối tính bằng số g chất khô/lít môi trường nuôi cấy	1,74 ± 0,09	2,6
Nồng độ PRP tính bằng số mg/lít môi trường nuôi	349 ± 22	169
Năng suất riêng tính bằng số mg PRP/g sinh khối	199 ± 3	66

Các kết quả này cho thấy ưu điểm của phương pháp theo sáng chế về năng suất PRP, thực tế đã thấy rằng đối với cùng một thể tích môi trường nuôi cấy, khi sử dụng môi trường nuôi cấy theo giải pháp đã biết, trong khi lượng sinh khối thu được là lớn hơn thì lượng PRP lại nhỏ hơn.

Ví dụ 4: So sánh lượng PRP và LPS có mặt trong dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy theo phương pháp của sáng chế, và trong dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy theo phương pháp đã biết

Quá trình nuôi cấy *Haemophilus influenzae*-typ b được thực hiện để so sánh môi trường theo sáng chế và môi trường theo giải pháp đã biết theo cách được mô tả trong ví dụ 3, tuy nhiên, chỉ khác là môi trường cơ bản của phương pháp đã biết bao gồm 10 g/l dịch thủy phân casein bằng axit, là sản phẩm của Solabia (mã sản phẩm AI434) thay cho pepton đậu hà lan có mặt trong môi trường theo ví dụ 3.

Thời gian nuôi cấy sơ bộ là 8 giờ như trong ví dụ 3, và thời gian nuôi cấy là 12 giờ.

Các thử nghiệm xác định lượng PRP và thử nghiệm xác định lượng LPS đều được thực hiện bằng phương pháp HPAEC-PAD; nhưng thử nghiệm xác định lượng LPS được thực hiện bằng cách định lượng monosacarit cụ thể là heptosa, bằng cách sử dụng khoảng kết quả chuẩn của LPS tinh khiết được thử nghiệm bằng chính quy trình này, đối chứng nội của thử nghiệm này là ramnoza.

Các kết quả thu được được đưa ra trong bảng VI dưới đây:

Bảng VI

	Môi trường theo sáng chế (4 thử nghiệm)	Môi trường theo giải pháp đã biết (3 thử nghiệm)
Mật độ quang ở 694nm	2,5 ± 0,1	3,9 ± 0,3
Lượng sinh khối tính bằng số g chất khô/1 môi trường	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,2
Nồng độ LPS tính bằng số mg/l môi trường	5 ± 1	4,6 ± 1
Nồng độ PRP tính bằng số mg/l môi trường	349 ± 22	17 ± 5
Tỷ lệ PRP/LPS	74 ± 15	38 ± 6

Các kết quả thu được cho thấy ưu điểm của phương pháp theo sáng chế, phương pháp này cho phép có thể giảm lượng LPS tạo ra so với lượng PRP.

Đây là ưu điểm quan trọng của phương pháp theo sáng chế, do phương pháp này giúp đơn giản hóa các thao tác tinh chế rất nhiều trong khi đồng thời duy trì độ an toàn thích hợp.

Ví dụ 5: Thử nghiệm đánh giá tầm quan trọng của kẽm

Tầm quan trọng của sự có mặt của kẽm trong môi trường nuôi cấy được nghiên cứu.

Để thực hiện điều này, ba môi trường được so sánh:

- môi trường như được mô tả trong ví dụ 1, được gọi là môi trường MS,
- môi trường có thành phần giống với môi trường của ví dụ 1, nhưng không chứa ZnSO₄, được gọi là môi trường MSZn⁻,

- môi trường như được mô tả trong ví dụ 1, nhưng có nồng độ ZnSO_4 cao hơn bốn lần, tức là nồng độ 20 mg/l, môi trường này được gọi là môi trường MS Zn^{++} .

Sau đó, các môi trường này được tiệt trùng bằng cách lọc trên bộ lọc có ngưỡng lọc là 0,22 μm .

Trước hết, bước nuôi cấy sơ bộ bình thủy tinh Erlenmeyer dung tích 1 lít không có vách ngăn được thực hiện trong 16 giờ ở nhiệt độ 36°C kết hợp với khuấy ở tốc độ 130 vòng/phút bằng cách cấy mẫu vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b đông lạnh có ít nhất 2 bản sao locut *cap* trong mã di truyền của nó vào 280ml môi trường như mô tả trong ví dụ 4.

Tiếp đó, 9,5ml dịch nuôi cấy sơ bộ được rửa trong mỗi môi trường nuôi cấy cần thử nghiệm trước mỗi lần cấy vi khuẩn để nuôi cấy trong bình Erlenmeyer bằng polycarbonat dung tích 500ml có vách ngăn chứa 170ml môi trường nuôi cấy cần thử nghiệm; quá trình nuôi cấy được thực hiện trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 37°C và khuấy ở tốc độ 150 vòng/phút.

Đối với mỗi môi trường, lượng sinh khối, nồng độ PRP và cả lượng LPS vào cuối quá trình nuôi cấy được xác định, theo cách giống như được mô tả trong các ví dụ 3 và 4, và tỷ lệ PRP/sinh khối và LPS/sinh khối và PRP/LPS được tính.

Các kết quả thu được được đưa ra trong bảng VII dưới đây:

Bảng VII:

	MS	MS Zn^-	MS Zn^{++}
Lượng sinh khối tính bằng số g chất khô/lít môi trường nuôi cấy	1,98	1,23	2,22
Nồng độ PRP tính bằng số mg/lít môi trường nuôi cấy	319	203	372
Năng suất riêng tính bằng số mg PRP/g sinh khối	160	165	167
Nồng độ LPS tính bằng số mg/lít môi trường nuôi cấy	11,5	8,8	12,1
Tỷ lệ LPS/sinh khối tính bằng mg/g sinh khối	6,1	7,2	5,5
Tỷ lệ PRP/LPS tính bằng mg/mg	30	23	31

Các kết quả này cho thấy rằng sự có mặt của kẽm trong môi trường nuôi cấy làm cho có thể tăng đáng kể lượng sinh khối tạo ra và cả lượng PRP tạo ra, tuy nhiên, không làm tăng tương ứng lượng LPS.

Ví dụ 6: Các thử nghiệm thực hiện trong thiết bị lên men dung tích 5 lít

Quá trình nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b được thực hiện trong môi trường nuôi cấy được mô tả trong ví dụ 1 theo sáng chế, bằng cách chỉ sử dụng các sản phẩm

được bảo đảm bởi nhà cung cấp là không chứa thành phần có nguồn gốc động vật và sử dụng protoporphyrin tổng hợp như mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Pháp số FR 2 914 302, và là sản phẩm của Solvias AG với tên là muối dinatri Protoporphyrin IX (mã sản phẩm SOL20402). Sau đó, các thử nghiệm được thực hiện theo cách được mô tả trong ví dụ 3, chỉ khác là thiết bị lên men được sử dụng là thiết bị lên men có dung tích 5 lít được điều chỉnh ở nhiệt độ 37°C, kết hợp với khuấy ở tốc độ 550 vòng/phút và sục khí ở tốc độ 0,5 lít/phút. Thể tích cấy là 280ml, tức là cả bình Erlenmeyer để nuôi cấy sơ bộ.

Nồng độ PRP và LPS được xác định theo quy trình được mô tả trong các ví dụ 3 và 4.

Các kết quả thu được được đưa ra trong bảng VIII dưới đây:

Bảng VIII:

	Môi trường không chứa các thành phần có nguồn gốc động vật theo sáng chế
Mật độ quang ở 694nm	3,58
Lượng sinh khối tính bằng số g chất khô/lít môi trường	2,29
Nồng độ PRP tính bằng số mg/lít môi trường	567
Năng suất riêng tính bằng số mg PRP/g sinh khối	247

Các kết quả này khẳng định kết quả đã biết, và cho thấy ưu điểm của phương pháp điều chế PRP với lượng lớn theo sáng chế.

Ví dụ 7: So sánh lượng sinh khối và lượng PRP được tạo ra bằng môi trường theo sáng chế như mô tả trong ví dụ 1 và bằng môi trường được xác định về mặt hóa học được mô tả trong giải pháp đã biết

Quá trình nuôi cấy *Haemophilus influenzae* typ b được thực hiện trong môi trường nuôi cấy được mô tả trong ví dụ 1 theo sáng chế và cả trong tám môi trường được mô tả trong các tài liệu công bố liên quan đến việc nuôi cấy *Haemophilus influenzae*, và được xác định về mặt hóa học.

Tám môi trường này được điều chế theo khuyến cáo của các tác giả. Theo thứ tự thời gian, các môi trường này là môi trường nêu trong các tài liệu sau:

- Talmadge and Herriott: Biochemical and Biophysical Research Communications, (March 1960), Vol. N°3, p 203-206),
- Butler: J. gen. Microbiol. (1962), 27, 51-60,

- Wolin: J. Bacteriol. Vol.85, (1963) Notes, p 253-254,
- Herriott et al. : Journal of Bacteriology, (Feb. 1970), Vol. 101, N°2, 513-516,
- Klein and Luginbuhl: Journal of General Microbiology (1979), 113, 409-411
- Coleman *et al.* : Journal of Clinical Microbiology, (Sept 2003), Vol.41, N°9 p. 4408-4410,

Mã của các sản phẩm sử dụng để điều chế tám môi trường này được nêu trong bảng IX dưới đây:

Bảng IX:

Sản phẩm	Nhà cung cấp	Mã sản phẩm
Uridin	Sigma	U3003
Inosin	Sigma	14125
Adenosin	Sigma	A4036
Guanin	Sigma	G6779
Guanosin	Sigma	G6264
Vitamin B12	Sigma	V2876
Xitrulin	Sigma	C7629
Cholin clorua	Fluka	26978
Thimidin	Sigma	T9250
Inositol	Sigma	15125
Putrescin dihydroclorua	Sigma	P5780
Nicotinamit	Sigma	N0636
Hematin của lợn	Sigma	h3281
hemin	Fluka	51280
Natri oleat	Sigma	07501
Natri axetat	Fluka	71185
Axit folic	Sigma	F7876
Rượu polyvinyllic	Sigma	341584
Trietanolamin	Sigma	90278
Dung dịch đệm glyxylglyxin	Libios	B-GLYGLY250
Tween 40	Sigma	P1504
Tween 80	Sigma	P1754
Dung dịch đệm Tris	VWR	33621.260
Etylendiamintetraaxetat	VWR	20302.180
HEPES	Sigma	h3375
Glutathion	Sigma	G6013
Adenin	Sigma	A8626
Prolin	Sigma	P0380
Threonin	Sigma	T8625
Glyxin	Sigma	G7126

Metionin	Sigma	M9625
Serin	Sigma	S4500
Glyxerol	VWR	24387.292
K ₂ SO ₄	VWR	26994.293
KCl	VWR	26764.298
MgCl ₂ . 6H ₂ O	Panreac	131396.1211
NaCl	VWR	27810.295
NaHCO ₃	VWR	27778.260
NH ₄ Cl	VWR	21236.291
RPMI 1640 chứa L-glutamin và 25mM HEPES	Invitrogen	Mã cũ nêu trong tài liệu công bố của Coleman (2003) là 61870036 => mã mới
Natri pyruvat MEM 100mM	Invitrogen	Mã cũ nêu trong tài liệu công bố của Coleman (2003) là. 11360070 => mã mới

Sau đó, các môi trường này được tiệt trùng bằng cách lọc trên bộ lọc có ngưỡng lọc là 0,22 μ m.

Trước hết, bước nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong bình thủy tinh Erlenmeyer dung tích 1 lít không có vách ngăn trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 36°C kết hợp với khuấy ở tốc độ 130 vòng/phút, bằng cách cấy mẫu vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b đông lạnh có ít nhất 2 bản sao locut *cap* trong mã di truyền của nó cho 280ml môi trường như mô tả trong ví dụ 4.

9,5ml dịch nuôi cấy sơ bộ được rửa trong mỗi môi trường nuôi cấy cần thử nghiệm, trước khi cấy vi khuẩn để nuôi cấy, mỗi lần nuôi cấy này được thực hiện trong bình Erlenmeyer làm bằng polycarbonat dung tích 500ml có vách ngăn chứa 170ml môi trường nuôi cấy cần thử nghiệm; quá trình nuôi cấy được thực hiện trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 37°C và khuấy ở tốc độ 150 vòng/phút.

Mỗi thử nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần.

Đối với mỗi môi trường, mật độ quang ở 694nm được đo mỗi giờ và nồng độ PRP được xác định ở cuối quá trình nuôi cấy theo cách giống như được mô tả trong ví dụ 3.

Kết quả mật độ quang được thể hiện trên Hình 1.

Kết quả xác định PRP được thể hiện trong bảng X dưới đây:

Bảng X:

Vào thời điểm 12 giờ	Mật độ quang ở 694nm	PRP
Môi trường theo sáng chế	$2,86 \pm 0,12$	320 ± 15
Talmadge	$0,28 \pm 0,10$	20 ± 1
Butler	$0,04 \pm 0,00$	2 ± 0
Wolin	$0,04 \pm 0,00$	6 ± 0
Herriot Mic-cit	$1,26 \pm 0,15$	138 ± 7
Flerriot Mic	$0,98 \pm 0,13$	101 ± 5
Klein MMA (cit)	$0,38 \pm 0,01$	40 ± 2
Klein MMB	$0,20 \pm 0,03$	27 ± 1
Coleman	$1,43 \pm 0,04$	204 ± 10

Ví dụ 8: Sản xuất PRP trên quy mô công nghiệp (1000 lít)

Môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thành phần nêu trong ví dụ 1, chỉ khác là kẽm có nồng độ 20 mg/l thay cho 5 mg/l được điều chế. Điều này là do ví dụ 5 cho thấy rằng nồng độ này cho phép có thể tạo ra lượng PRP lớn hơn mà không làm tăng lượng LPS.

Môi trường là giống với quá trình nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy cuối, chỉ khác về độ pH (độ pH ban đầu $= 7,2 \pm 0,1$, tiếp đó là độ pH tùy ý đối với các quá trình nuôi cấy sơ bộ và độ pH được điều chỉnh ở $6,7 \pm 0,1$ đối với quá trình nuôi cấy để sản xuất).

Môi trường được điều chế như trong ví dụ 1. Sau khi trộn hợp chất đã hòa tan trước trong một thể tích nhỏ nước tinh khiết, có bổ sung axit hoặc bazơ trong một số trường hợp (xem ví dụ 1), và trước khi bổ sung lượng đủ nước tinh khiết, độ pH được điều chỉnh tới $7,2 \pm 0,1$ đối với quá trình dịch nuôi cấy sơ bộ và $6,7 \pm 0,1$ đối với quá trình nuôi cấy cuối (bằng dung dịch kali hydroxit hoặc natri hydroxit 10N hoặc dung dịch HCl 37%).

Sau đó, môi trường được tiệt trùng bằng cách lọc trên bộ lọc có ngưỡng lọc bằng $0,22\mu\text{m}$.

Theo đó, có thể bảo quản môi trường này trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 5°C.

Trước khi cấy vi khuẩn cho môi trường, các chất sau được bổ sung:

- glucoza ở nồng độ 512,8 g/l được điều chế từ D (+) glucoza khan là sản phẩm của VWR với mã sản phẩm 24379.294,
- dung dịch NAD ở nồng độ 1g/l, là sản phẩm của Sigma có tên β -Nicotinamid Adenin Dinucleotit hydrat (mã sản phẩm 43410),
- dung dịch gốc chứa protoporphyrin ở nồng độ 0,25 g/l và amoni hydroxit ở nồng độ 5 ml/l; protoporphyrin là sản phẩm của Solvias AG có tên là muối dinatri Protoporphyrin IX (mã sản phẩm SOL20402) và amoni hydroxit là sản phẩm của VWR có tên là dung dịch amoniac 28% (mã sản phẩm 21190.292),

để thu được môi trường sẵn sàng để cấy vi khuẩn và ngoài các thành phần được mô tả trong bảng I của ví dụ 1, môi trường này còn chứa các thành phần bổ sung với nồng độ như nêu trong bảng II của ví dụ 1 (trừ glucoza ở nồng độ cuối 14,87 g/l thay vì 14 g/l).

Quy trình nuôi cấy trên quy mô 1000 lít bao gồm ba quá trình nuôi cấy sơ bộ:

- các quá trình nuôi cấy sơ bộ thứ nhất được thực hiện trong bình Erlenmeyer dung tích 1 lít không có vách ngăn chứa 290ml môi trường nuôi cấy đầy đủ, ở nhiệt độ 37°C kết hợp với khuấy ở tốc độ 130 vòng/phút, trong thời gian 17-18 giờ. Các quá trình nuôi cấy sơ bộ này được khơi mào bằng cách cấy vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b chứa ít nhất 2 bản sao locut *cap* vào môi trường nuôi cấy, với lượng cấy tương ứng với OD_{694nm} ban đầu là 0,014;

- loạt nuôi cấy sơ bộ thứ hai được thực hiện trong thiết bị lên men dung tích 6,8 lít. hai thiết bị lên men chứa 5,2 lít môi trường nuôi cấy đầy đủ được cấy 260ml dịch nuôi cấy sơ bộ thu được từ loạt nuôi cấy sơ bộ 1 cho mỗi thiết bị. Các thiết bị lên men này được duy trì trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C $\pm$ 1, với độ pH ban đầu là 7,2 $\pm$ 0,2, pO₂ được duy trì ở 30% với sự tăng tốc độ khuấy (500 lên 800 vòng/phút), tiếp đó tăng tốc độ sục

khí (0,5 lên 2,5 lít/phút) và sau đó tốc độ dòng O₂ tinh khiết nằm trong khoảng từ 0 và đến 6 lít/phút;

- loạt nuôi cấy sơ bộ thứ ba được thực hiện trong thiết bị lên men có dung tích 120 lít chứa 57 lít môi trường đầy đủ, môi trường này được cấy 5,8 lít dịch nuôi cấy sơ bộ thu được từ loạt nuôi cấy sơ bộ 2. Thiết bị lên men này được duy trì trong 3 giờ 10 ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, với độ pH ban đầu bằng $7,2 \pm 0,2$, pO₂ được duy trì ở 30% với sự tăng tốc độ khuấy (300 lên 425 vòng/phút), tiếp đó tăng tốc độ sục khí (6 lên 28 lít/phút) và tiếp đó tốc độ dòng O₂ tinh khiết nằm trong khoảng từ 0 đến 50 lít/phút.

Quá trình nuôi cấy trên quy mô công nghiệp được thực hiện trong thiết bị lên men có dung tích 1000 lít chứa 778 lít môi trường đầy đủ, môi trường này được cấy 39 lít dịch nuôi cấy sơ bộ của loạt nuôi cấy sơ bộ 3. Thiết bị lên men này được duy trì ở nhiệt độ $32^{\circ}\text{C} \pm 1$, với độ pH được điều chỉnh bằng $6,7 \pm 0,2$ (bằng dung dịch natri hydroxit 2,5N), pO₂ được duy trì ở 70% nhờ sự tăng tốc độ khuấy (100 lên 230 vòng/phút), tiếp đó tăng tốc độ sục khí (70 lên 150 lít/phút) và tiếp đó tốc độ dòng O₂ tinh khiết nằm trong khoảng từ 0 đến 500 lít/phút. Ngoài ra, chất chống tạo bọt (Biospumex với lượng 4%) được bổ sung, nếu cần, tùy thuộc vào mức độ bọt.

Sau 12 giờ nuôi cấy, mật độ quang ở 694nm được đo để có thể xác định lượng sinh khối (một đơn vị OD tương ứng với 0,64g sinh khối khô). Nồng độ PRP và LPS được xác định theo quy trình được mô tả trong các ví dụ 3 và 4.

Các kết quả thu được được đưa ra trong bảng XI dưới đây:

Bảng XI:

	Môi trường theo sáng chế
Mật độ quang ở 694nm	3,45
Lượng sinh khối tính bằng số g chất khô/lít môi trường nuôi cấy	2,21
Nồng độ PRP tính bằng số mg/lít môi trường nuôi cấy	865

Năng suất riêng tính bằng số mg PRP/g sinh khối	392
Nồng độ LPS tính bằng số mg/lít môi trường nuôi cấy	35,6
Tỷ lệ LPS/sinh khối tính bằng mg/g sinh khối	16,1
Tỷ lệ PRP/LPS tính bằng mg/mg	24,3

Các kết quả này cho thấy ưu điểm của phương pháp theo sáng chế về năng suất PRP và tỷ lệ PRP/LPS, các kết quả này đã được chứng minh trên quy mô công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất polysacarit vỏ của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* typ b (PRP) trên quy mô công nghiệp để dùng cho vaccin, theo đó chủng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, và dịch nổi bề mặt của quá trình nuôi cấy được thu hoạch và xử lý để chiết polysacarit vỏ từ đó, môi trường nuôi cấy này chứa ít nhất:

- một nguồn cacbon,
- protoporphyrin,
- các muối,
- các axit amin,
- NAD hoặc NADH,
- các vitamin,
- các chất điều chỉnh độ pH,

khác biệt ở chỗ, môi trường nuôi cấy này được xác định về mặt hóa học, và ít nhất là chứa kẽm, với lượng tương ứng với lượng từ 2,5 đến 80mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, và ở chỗ, tỷ lệ trọng lượng PRP/LPS lớn hơn tỷ lệ khi thu được trong cùng môi trường nhưng không chứa kẽm.

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chất điều chỉnh độ pH bao gồm các muối đệm.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, có thể có nhiều nguồn cacbon, và nguồn này được chọn từ glucoza, fructoza, galactoza, glyxerol, xyloza, riboza, fucoza, axit sialic và lactat.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, protoporphyrin nêu trên là protoporphyrin tổng hợp IX.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ, các muối nêu trên được chọn từ muối kali, magie, natri, canxi, sắt, kẽm, coban và mangan.

6. Phương pháp theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, các muối nêu trên được chọn từ: K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $MgSO_4.7H_2O$; $Na_2HPO_4.12H_2O$; $NaH_2PO_4.2H_2O$; $CaCl_2.2H_2O$; $FeSO_4.7H_2O$; $ZnSO_4.7H_2O$; $CoCl_2.6H_2O$; $MnSO_4.H_2O$.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, khác biệt ở chỗ, các axit amin được chọn từ:

- arginin,
- alanin,
- ít nhất một axit amin trong số: asparasin, glutamin, axit aspartic, axit glutamic,
- lysin,
- histidin,
- tryptophan,
- valin,
- isoleuxin,
- leuxin,
- tyrosin,
- phenylalanin,
- xystin hoặc axit amin tương đương.

8. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, môi trường nuôi cấy ít nhất là chứa arginin, alanin, histidin, tryptophan, tyrosin, phenylalanin, xystin, axit aspartic và axit glutamic.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, khác biệt ở chỗ, xystin được thay bằng glutathion hoặc xystein.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, khác biệt ở chỗ, vitamin được chọn từ: thiamin, pantothenat, uraxil, hypoxantin, biotin, riboflavin và pyridoxin.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, khác biệt ở chỗ, arginin và uraxil được thay bằng xitrulin.

12. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin, theo đó:

- a) kháng nguyên kháng *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) bao gồm polysacarit

vỏ (PRP) được điều chế trên quy mô công nghiệp bằng phương pháp theo điểm 1,
(b) polysacarit vỏ thu được trong bước a) được liên hợp với protein mang.

13. Phương pháp theo điểm 12, khác biệt ở chỗ, protein mang là giải độc tố uốn ván.

14. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được ở bước (b) được kết hợp với ít nhất một hoặc nhiều kháng nguyên mà thường có mặt trong vaccin dành cho trẻ em.

15. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với kháng nguyên bạch hầu, uốn ván và viêm gan B.

16. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, và 2 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào mà là giải độc tố và ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi.

17. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, và 3 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào mà là giải độc tố, pertactin và ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi.

18. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, và 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào mà là giải độc tố, pertactin, ngưng kết nguyên và ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi.

19. Phương pháp bào chế chế phẩm vaccin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, 2, 3 hoặc 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào và cả virus bại liệt typ 1, 2 và 3 được bất hoạt.

20. Phương pháp bào chế chế phẩm vacxin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván, các kháng nguyên viêm gan B, 2, 3 hoặc 5 kháng nguyên *Bordetella pertussis* vô bào và cả virut bại liệt typ 1, 2 và 3 được bất hoạt.

21. Phương pháp bào chế chế phẩm vacxin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với vi khuẩn *Bordetella pertussis* toàn bào.

22. Phương pháp bào chế chế phẩm vacxin theo điểm 12 hoặc 13, khác biệt ở chỗ, thể liên hợp thu được trong bước b) được kết hợp với ít nhất là một trong số các kháng nguyên kháng bạch hầu, uốn ván, bại liệt, viêm gan B, các nhiễm khuẩn do *Neisseria meningitidis* hoặc *Streptococcus pneumoniae* gây ra.

Fig. 1

