



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036186

(51)^{2006.01} A61K 39/00; A61K 39/02; C12N 7/00; (13) B
A61K 39/12; A61K 39/13; A61K 39/15;
A01N 1/02; A61K 39/085

(21) 1-2019-01205

(22) 24/08/2017

(86) PCT/IB2017/055100 24/08/2017

(87) WO2018/037365 01/03/2018

(30) 201621029037 26/08/2016 IN

(45) 25/07/2023 424

(43) 27/05/2019 374A

(73) 1. SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED (IN)

212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune Maharashtra, 411 028, India

2. THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (US)

The government of the United States of America, as Represented by the Secretary, Department of Health and Human Services, of National Institutes of Health Office of Technology Transfer, Bethesda, Maryland, 20892-7660, USA

(72) DHERE, Rajeev Mhalasakant (IN); PISAL, Sambhaji Shankar (IN); ZADE, Jagdish Kamalaji (IN); SABALE, Rajendra Narayan (IN); KADAM, Ravindra Bapurao (IN); KAMBLE, Abhijeet Sanjeev (IN); JIANG, Baoming (US); GLASS, Roger (US).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) VACCIN KẾT HỢP VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VACCIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định, gây miễn dịch bao gồm hỗn hợp kháng nguyên dùng để phòng và điều trị dự phòng các bệnh truyền nhiễm do virus Rota, virus bại liệt, *Haemophilus influenzae*, vi khuẩn bạch hầu, vi khuẩn uốn ván, vi khuẩn ho gà và virus viêm gan B. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp đa giá ổn định bao gồm i) các kháng nguyên của vaccin bại liệt dạng tiêm (IPV) Salk hoặc Sabin giảm liều đáng kể bằng cách sử dụng phương pháp bất hoạt bằng formaldehyt cải tiến và hấp phụ bằng nhôm hydroxit dẫn đến hiệu suất thu hồi tối đa kháng nguyên D và ii) kháng nguyên virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được thu được từ chủng virus Rota (CDC-9) tạo ra khả năng miễn dịch bảo vệ chéo giữa các chủng virus Rota ở người, iii) liên hợp PRP Hib-protein mang có độ ổn định và khả năng gây miễn dịch được cải thiện, trong đó liên hợp PRP Hib-protein mang được sản xuất khởi đầu bằng cách sử dụng quy trình gán và sau đó trộn ở nhiệt độ thấp với sự có mặt của chất ổn định để giảm thiểu sự giải phóng PRP tự do iv) kháng nguyên ho gà toàn tế bào với khả năng gây miễn dịch và độ ổn định được cải thiện thu được bằng cách bổ sung kháng nguyên ho gà toàn tế bào vào giai đoạn sau trong quá trình trộn, nhờ đó giảm thiểu sự phân hủy do thủy phân v) các phân đoạn đồng nhất của biến độc tố bạch hầu và biến độc tố uốn ván thu được bằng cách loại bỏ các phần không mong muốn nhờ sắc ký thẩm thấu gel. Quy trình sản xuất chế phẩm vaccin ổn định và gây miễn dịch bằng i) hấp phụ riêng rẽ kháng nguyên IPV, IRV liều thấp trên nhôm hydroxit và giữ các kháng nguyên khác không hấp phụ hoặc hấp phụ trên nhôm phosphat, nhôm hydroxit, vào hỗn hợp nhôm hydroxit và nhôm phosphat và ii) sử dụng thứ tự cụ thể để bổ sung kháng nguyên trong quá trình trộn cũng được đề cập.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định bao gồm hỗn hợp nhiều kháng nguyên dùng để phòng và điều trị dự phòng các bệnh truyền nhiễm do virus tiêu chảy (Rota), virus bại liệt (Poliomyelitis), *Haemophilus influenzae*, vi khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*), vi khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*), vi khuẩn ho gà (*Bordetella pertussis*) (toàn tế bào) và virus viêm gan B (Hepatitis B). Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp đa giá ổn định bao gồm các kháng nguyên của vaccin bại liệt dạng tiêm (IPV) Salk hoặc Sabin giảm liều đáng kể và kháng nguyên virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được thu được từ chủng virus Rota (CDC-9).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus bại liệt xâm chiếm hệ thần kinh và có thể gây tê liệt không hồi phục trong vài giờ. Ba loại virus bại liệt tồn tại trên toàn cầu, cụ thể là tuýp 1, tuýp 2 và tuýp 3.

Tỷ lệ nhiễm virus bại liệt đã giảm phần lớn do sử dụng vaccin bại liệt dạng uống (OPV), dựa trên các chủng bại liệt Sabin sống giảm độc lực. Tuy nhiên, OPV có những hạn chế đối với thời kỳ hậu thanh toán bệnh. OPV bao gồm virus bại liệt có nguồn gốc từ vaccin (cVDPV) có thể lây truyền và có thể trở thành tác nhân gây độc thần kinh (tương tự như virus bại liệt hoang dại) dẫn đến bệnh bại liệt liên quan đến vaccin. Những chủng như vậy có khả năng thay đổi thế giới bằng loại virus bại liệt và xóa nhòa những thành tựu thanh toán bệnh. Để ngăn chặn sự xuất hiện của virus bại liệt có nguồn gốc từ vaccin, nhóm chuyên gia tư vấn chiến lược của WHO (SAGE) đã khuyến nghị ít nhất một liều IPV được sử dụng cùng với OPV ở các nước hiện đang sử dụng OPV. (Tham khảo: Tổ chức Y tế Thế giới. Cuộc họp của nhóm chuyên gia tư vấn chiến lược về tiêm chủng phòng bệnh, Tháng 11 năm 2012 - kết luận và khuyến nghị. Wkly Epidemiol Rec 2013; 88: 1-16; PMID: 23311010).

Hiện nay, IPV được tạo ra bằng cách sử dụng chủng bại liệt hoang dã, tức là chủng Salk và các chủng Sabin mới hơn được tạo ra từ các chủng Sabin giảm độc lực giống như các chủng được sử dụng trong OPV sống giảm độc lực. Liều vaccin bại liệt tiêu chuẩn được phê chuẩn được đưa vào cơ thể bằng cách tiêm bắp (IM) hoặc tiêm dưới da (SC) sâu chứa

kháng nguyên D là 40 đơn vị virus bại liệt tuýp 1 bất hoạt (Mahoney), 8 đơn vị virus bại liệt bất hoạt tuýp 2 (MEF-I) và 32 đơn vị virus bại liệt bất hoạt tuýp 3 (Saukett) (cụ thể là Infanrix-IPV™). Nhưng IPV có chi phí sản xuất cao so với OPV, chủ yếu là do yêu cầu mỗi liều cần có nhiều virus hơn; xử lý hậu bổ sung (cụ thể là nồng độ, tinh chế và bất hoạt) và kiểm tra QC liên quan; mất kháng nguyên hoặc phục hồi kém trong hậu xử lý; và vỏ chứa.

Chi phí sản xuất IPV hiện được ước tính đắt hơn khoảng 20 lần so với OPV. Nhu cầu IPV toàn cầu trong tương lai sau khi thanh toán virus bại liệt có thể tăng từ mức 80 triệu liều hiện nay lên 450 triệu liều mỗi năm. Do đó, để giảm chi phí cuối cùng của IPV, các nỗ lực đang được thực hiện để giảm số lượng các thành phần kháng nguyên, tức là để sản xuất các chế phẩm IPV liều thấp.

Trên toàn cầu, virus Rota là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy cấp nặng và vaccin được xem là giải pháp đầy hứa hẹn để giảm gánh nặng bệnh tật. Người ta ước tính rằng số ca tử vong do virus Rota trên thế giới đã giảm từ 528000 xuống còn 215000 trong suốt mười ba năm từ 2000 đến 2013, do vaccin virus Rota đã được giới thiệu ở trên 60 quốc gia. Trong số đó, ước tính có khoảng 47100 (22%) trường hợp tử vong do virus Rota ở Ấn Độ vào năm 2013. Ấn Độ, Nigeria, Pakistan và Cộng hòa Dân chủ Congo, bốn quốc gia này chiếm khoảng một nửa (49%) tổng số ca tử vong do virus Rota ước tính trong năm 2013.

Theo các nghiên cứu gần đây được thực hiện trên toàn thế giới, người ta đã thấy rằng 4 tuýp huyết thanh của virus Rota, tức là G1, G2, G3 và G4 đại diện cho hơn 88% các chủng được phân tích trên toàn cầu. Tuýp huyết thanh G1 của virus Rota A là một trong những dạng phổ biến nhất của virus gây bệnh trên toàn thế giới, trong khi virus liên quan đến tuýp huyết thanh G9 đã xuất hiện từ cuối những năm 1990 và hiện chiếm khoảng 4% các chủng phân lập toàn cầu. Tiêm vaccin chống lại bệnh liên quan đến virus Rota là chiến lược để giải quyết vấn đề sức khỏe quan trọng này. Hai loại vaccin virus Rota dạng uống đã được cấp phép hiện nay là RotaTeq và Rotarix, vốn rất hiệu quả trong việc giảm các ca tiêu chảy nặng ở trẻ em ở các nước thu nhập trung bình và phát triển, có hiệu quả thấp hơn nhiều (~ 50%) ở các nước thu nhập thấp ở Châu Phi và Châu Á. [Tham khảo Tate JE và cộng sự, “Sự giảm thiểu bền vững trong việc phát hiện virus Rota tại Hoa Kỳ sau khi giới thiệu vaccin virus Rota vào năm 2006”. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: S30-4; và Yên C và cộng sự “Sự giảm thiểu các ca nhập viện và các chuyến thăm khám sức khỏe do virus Rota đối với bệnh tiêu chảy ở trẻ em sau khi tiêm vaccin virus Rota ở El Salvador”. *Pediatr Infect*

Dis J 2011; 30: S6-10]. Ngoài ra, hai loại vaccin virus Rota hiện nay có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh ở trẻ sơ sinh được tiêm chủng. [Tham khảo Patel MM và cộng sự, “Nguy cơ xâm nhập và lợi ích sức khỏe của vaccin virus Rota ở Mexico và Brazil. N Engl J Med 2011; 364: 2283-92 và Buttery JP và cộng sự, “Nhóm nghiên cứu PAEDS/APSU. Xâm nhập sau khi tiêm vaccin virus Rota: giám sát sau tiếp thị trong Chương trình Tiêm chủng Quốc gia tại Úc”. Vaccin 2011; 29: 3061-6].

Một trong những vaccin virus Rota ứng viên của Bharat Biotech International dựa trên chủng virus Rota 116E, G9P[11] là dạng tái tổ hợp tự nhiên có chứa một gen virus Rota P[11] ở bò và mười gen virus Rota ở người. Vaccin này giúp phòng bệnh trong 2 năm đầu đời là chống lại các kiểu gen lưu hành bao gồm G1P[8], G2P[4], G12P[6], G12P[8] và G9P[4]. Nó không thể bảo vệ chéo đối với các chủng khác như G3, G4, G5, G6, G8, G10, G11, G13 và G14. Ngoài ra, hiệu quả của vaccin dựa trên 116E trong 2 năm đầu đời còn khiêm tốn (48-55%) như đối với các loại vaccin được cấp phép khác. [Tham khảo Nita Bhandari và cộng sự, “Hiệu quả của loại vaccin virus Rota ở bò-người (116E) đơn giá đối với trẻ em Ấn Độ ở tuổi thứ hai”, Vaccine 2014; 32 Suppl 1: A110-6]. Ngoài ra, thử nghiệm tiền lâm sàng của một số ứng viên vaccin virus Rota bất hoạt (IRV) tiêm bắp khác dựa trên G1, G3 hoặc G6 chỉ cho thấy sự bảo vệ một phần.

Ngoài ra, bất hoạt Virus Rota bằng β -propiolactone (BPL), tác nhân thường được sử dụng để bất hoạt nhiều loại virus, đã được chứng minh là gây phá hủy nghiêm trọng đến tính toàn vẹn và thành phần sinh hóa của các hạt virus Rota. Ngoài ra, virus Rota được xử lý bằng BPL cho thấy giảm hoạt tính ngưng kết hồng cầu do virus và tiêm bắp với vật liệu này ở chuột gây sản sinh kháng thể trung hòa ít hơn so với tiêm chủng bằng virus sống [Tham khảo Offit PA và cộng sự “Virus Rota không nhiễm trùng (chủng RRV) gây ra phản ứng miễn dịch ở chuột giúp bảo vệ chống lại virus Rota”. J Micro Microbiol 1989; 27: 885-8].

Ở nhiều nơi trên thế giới, tiêm chủng bằng IPV đã thay thế OPV để trong một vài năm, vaccin virus Rota sẽ là vaccin duy nhất được sử dụng qua đường uống. Do đó, các cân nhắc về vận hành và phụ trợ ủng hộ IRV để sử dụng ở cả các nước đang phát triển và công nghiệp hóa.

Sự xuất hiện của các dime trong D/T, dường như là hậu quả của quá trình khử độc bằng formalin. Sự tồn tại của các dime có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình kết hợp - có lẽ thông qua sự cản trở không gian ở bề mặt protein - dẫn đến mất hoạt tính, và mức độ monome theo ý muốn không giảm xuống dưới 80%. Trước đây, đã có báo cáo rằng T với ít nhất 60% monome có thể thu được bằng cách sử dụng HIC rồi sau đó sử dụng trao đổi ion; T với hàm lượng monome 73% có thể thu được bằng cách chỉ sử dụng HIC Phenyl sepharosa, T với hàm lượng monome 55% có thể thu được bằng cách chỉ sử dụng Amoni sulfat. Do đó, phương pháp đơn bước thay thế là cần thiết để thu được D/T có ít nhất 80% monome.

Vaccin kết hợp bao gồm hai hoặc nhiều vaccin có thể được sản xuất riêng lẻ và đưa chúng vào một chế phẩm. Người sử dụng vaccin được bảo vệ giống như khi các loại vaccin riêng lẻ được tiêm chủng riêng, nhưng với ít mũi tiêm hơn. Do đó, một loại vaccin kết hợp tạo ra khả năng miễn dịch chống lại nhiều bệnh và luôn có lợi thế so với các loại vaccin đơn giá vì sự tuân thủ sử dụng vaccin được tăng lên bằng cách giảm số lượng vaccin riêng biệt.

Loại vaccin kết hợp bảy giá đang được Bharat Biotech International phát triển bao gồm vaccin phòng bệnh ho gà phi tế bào D, T, Sabin IPV (tuýp 1: 40 DU, tuýp 2: 8 DU, tuýp 3: 32DU), chủng virut Rota đơn bất hoạt (chủng G9, cụ thể là chủng 116E), polyribosyl-ribitol-phosphat (PRP) *Haemophilus influenza* tuýp b kết hợp với biến độc tố uốn ván (TT) và vaccin viêm gan B tái tổ hợp. Như đã thảo luận trên đây, vaccin kết hợp bảy giá bao gồm vaccin dựa trên 116E sẽ không bảo vệ chéo đối với các chủng khác như G3, G4, G5, G6, G8, G10, G11, G13 và G14. Hơn nữa, hiệu quả của thành phần IRV của vaccin kết hợp trong 2 năm đầu đời sẽ còn khiêm tốn (48 đến 55%) như đối với các loại vaccin được cấp phép khác.

Một loại vaccin kết hợp khác, Hexyon® (còn được gọi là Hexacima® và Hexaxim®) từ Sanofi Pasteur, có chứa aP. Vaccin này có khả năng được định hướng dành cho thị trường tư nhân ở châu Âu và trên toàn thế giới. Một loại vaccin kết hợp sáu giá khác với kháng nguyên aP hiện đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn III, được phát triển bởi Merck và Sanofi Pasteur.

Hiện nay, Infanrix Hexa® của là loại vaccin kết hợp nhi khoa sáu giá duy nhất trên thị trường toàn cầu có chứa IPV. Vaccin này có chứa thành phần kháng nguyên ho gà vô

bào (aP) và được đóng gói dưới dạng ống tiêm cộng với chế phẩm đông khô do sự không ổn định của thành phần *Haemophilus influenza* tuýp b (Hib). Rào cản chính đối với việc sử dụng Infanrix Hexa® (GSK) ở nước gia đang phát triển là giá của sản phẩm vaccin, yêu cầu nguyên dạng đông khô, và sự lo ngại về hiệu quả của vaccin aP ở các nước phát triển. Từ góc độ chi phí, các kháng nguyên aP trong lịch sử đã vượt quá chi phí của các kháng nguyên wP theo hệ số từ mười đến hơn 30 do sự khác biệt trong sản xuất và chi phí bản quyền. Do đó, việc sử dụng kháng nguyên bệnh ho gà toàn tế bào (wP) trong vaccin kết hợp đa giá dành cho các nước đang phát triển đã trở nên quan trọng cả về chi phí và những lo ngại về hiệu quả lâu dài của vaccin aP, nhất là ở các nước phát triển.

Một số vaccin kết hợp đa giá với wP và IPV đang được phát triển. Tuy nhiên, kháng nguyên IPV không tương thích với thimerosal (hợp chất chứa thủy ngân có hoạt tính kháng khuẩn) bảo quản vaccin thông thường khiến cho vỏ capsid của virus bại liệt bị mất tính kháng nguyên. Thimerosal được sử dụng bởi nhiều nhà sản xuất vaccin trong việc bất hoạt vi khuẩn ho gà sống để tạo ra bán thành phẩm vaccin wP, được đưa vào sản phẩm cuối cùng, nhưng cũng gây mất tính kháng nguyên của IPV, và do đó IPV có thể cần phải được đóng gói trong lọ riêng biệt với wP chứa thiomersal để duy trì hiệu lực theo thời gian.

Vaccin kết hợp toàn tế bào GSK (DTwP-IPV-HBV//Hib) được báo cáo trong một số thử nghiệm lâm sàng sớm. Tuy nhiên, khả năng miễn dịch bại liệt của sản phẩm này không tốt bằng vaccin so sánh và người ta thấy rằng liều IPV sẽ cần tối thiểu giống như vaccin liều IPV tiêu chuẩn hiện nay hoặc có thể cần phải tăng lên.

Các chế phẩm vaccin hiệu quả liều thấp gây tác dụng bảo vệ chống nhiễm trùng bằng cách sử dụng kháng nguyên IPV liều thấp hơn là điều mong muốn trong trường hợp việc cung cấp vaccin thông thường không đủ để đáp ứng nhu cầu toàn cầu hoặc khi chi phí sản xuất vaccin thông thường ngăn vaccin được bán ở mức giá phải chăng cho các nước đang phát triển. Ngoài ra, việc phơi nhiễm với liều IPV thấp hơn so với các chế phẩm được bán trên thị trường hiện nay có thể an toàn hơn. Vaccin kết hợp đa giá có thể đơn giản hóa lịch tiêm chủng thông thường cho trẻ em vốn có lộ trình phức tạp, cải thiện sự tuân thủ sử dụng vaccin và giảm chi phí vận chuyển. Tuy nhiên, vaccin đa giá có chứa IPV là một thách thức kỹ thuật đối với các nhà sản xuất vaccin kể từ khi bắt đầu kết hợp vaccin cho trẻ em vào đầu những năm 1990.

Sự bất ổn của kháng nguyên Hib với sự có mặt của tá dược nhôm, cụ thể hơn là nhôm hydroxit là vấn đề kỹ thuật chính. Do đó, thách thức kỹ thuật mà nhà sản xuất cần giải quyết sẽ là tránh sử dụng các tá dược nhôm khác nhau, nếu bán thành phẩm vaccin đưa vào tổ hợp dựa trên các hóa chất nhôm khác nhau. Do đó, trình tự bổ sung kháng nguyên trở thành một yếu tố quan trọng, vì việc trộn lẫn các kháng nguyên hoặc tá dược không tương thích có thể dẫn đến sự xuất hiện các thành phần vật lý không mong muốn cho sản phẩm cuối cùng (như kết tủa và khó tái tạo huyền phù) cũng dẫn đến việc không chấp nhận sản phẩm vaccin kết hợp cuối cùng [Tham khảo Malecker và cộng sự 1996, “Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng của vaccin thử nghiệm để bảo vệ chuột lang chống lại thách thức gây chết với độc tố bạch cầu”; được báo cáo tại hội nghị quốc tế của WHO/IABS/NIBSC về kiểm soát và tiêu chuẩn hóa vaccin ho gà vô bào, Vương quốc Anh, ngày 26-27 tháng 9 năm 1996].

Các vaccin kết hợp phổ biến và có sẵn hiện nay có thể không chứa các công thức thích hợp của các kháng nguyên tương thích ở các dạng miễn dịch tương thích để đạt được mức độ hiệu quả và khả năng miễn dịch mong muốn trong cộng đồng dân cư dễ mắc bệnh đối với trong một số bệnh. Điều quan trọng nhất là, không có chế phẩm kết hợp đa giá nào với IPV liều thấp, IRV bảo vệ chéo và vaccin bệnh ho gà toàn tế bào có sẵn trên thị trường. Với thực trạng đã thảo luận ở trên liên quan đến vaccin kết hợp, vẫn có nhu cầu riêng biệt đối với tất cả các loại vaccin kết hợp đa giá dạng lỏng phù hợp với các nước đang phát triển khi cung cấp lượng tương đương hoặc cải thiện bảo vệ huyết thanh đối với các kháng nguyên riêng lẻ tránh sự cản trở kháng nguyên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vaccin kết hợp miễn dịch ổn định, bao gồm hỗn hợp các kháng nguyên để phòng và điều trị dự phòng nhiễm trùng do virus Rota, virus bại liệt, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* và virus viêm gan B. Cụ thể là, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp đa giá bao gồm: i) kháng nguyên IPV Salk hoặc Sabin giảm liều đáng kể bằng cách sử dụng các phương pháp cải tiến để bất hoạt bằng formaldehyt và hấp phụ bằng nhôm hydroxit dẫn đến thu hồi tối đa kháng nguyên D; và ii) các kháng nguyên virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm thu được từ chủng virus Rota (CDC-9) cung cấp khả năng miễn dịch bảo vệ chéo rộng rãi giữa các chủng virus Rota ở người; iii) liên hợp PRP Hib-protein mang có độ ổn định

và khả năng miễn dịch được cải thiện, trong đó liên hợp PRP Hib-protein mang ban đầu được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình liên hợp mới và sau đó được pha trộn ở nhiệt độ thấp với chất ổn định để giảm thiểu sự giải phóng PRP tự do; iv) kháng nguyên ho gà toàn tế bào với khả năng miễn dịch và độ ổn định được cải thiện thu được bằng cách bổ sung kháng nguyên ho gà toàn tế bào ở giai đoạn sau trong quá trình pha trộn, nhờ đó giảm thiểu sự phân hủy do thủy phân; v) các phân đồng nhất của biến độc tố bạch hầu (DT) và biến độc tố ho gà thu được bằng cách loại bỏ các cốt liệu không mong muốn thông qua sắc ký thẩm thấu gel. Quy trình sản xuất chế phẩm vaccin ổn định và miễn dịch như vậy bằng cách i) hấp phụ riêng lẻ các kháng nguyên IPV, IRV liều thấp lên nhôm hydroxit và giữ các kháng nguyên khác, hoặc không hấp phụ hoặc hấp thụ lên nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit, hoặc kết hợp cả hai và ii) sử dụng thứ tự cụ thể khi bổ sung các kháng nguyên trong quá trình trộn cũng được đề xuất. Hơn nữa, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp giá cả phải chăng phù hợp với các nước đang phát triển khi cung cấp lượng tương đương hoặc cải thiện bảo vệ huyết thanh đối với các kháng nguyên riêng lẻ tránh sự cản trở kháng nguyên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Tinh chế biến độc tố bạch hầu - Sắc ký đồ của sắc ký lọc gel sephacryl S-300 HR, cột XK 26/70.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất vaccin kết hợp đa giá bao gồm (i) vaccin bại liệt bất hoạt liều thấp được chọn từ các chủng Sabin hoặc Salk; (ii) các chủng virus Rota CDC-9 bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được; và (iii) có thể có một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ liên hợp D, T, wP HBsAg, PRP Hib-protein mang, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* A (vi khuẩn gây bệnh viêm màng não mô cầu), kháng nguyên *Neisseria meningitidis* C, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* W-135, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* Y, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* X, kháng nguyên phế cầu khuẩn (*Streptococcus Pneumoniae*); kháng nguyên *Neisseria meningitidis* B dạng bleb hoặc tinh khiết, kháng nguyên *Staphylococcus aureus*, kháng nguyên bệnh than, kháng nguyên bệnh lao BCG, kháng nguyên Hepatitis A, kháng nguyên Hepatitis B, virus papilloma ở người (HPV), kháng nguyên *Salmonella Typhi*, kháng nguyên ho gà vô bào, xyclaza adenylat biến tính,

kháng nguyên bệnh sốt rét (RTS, S), Sởi, Quai bị, Rubella, Dengue, Zika, Ebola, Chikungun, viêm não Nhật Bản, kháng nguyên tiêu chảy, v.v...

Thành phần của chế phẩm Vacxin kết hợp:

Virut bại liệt bất hoạt

Virut bại liệt (Poliomyelitis) là loại virut có khả năng lây nhiễm cao. Virut bại liệt xâm chiếm hệ thần kinh và có thể gây tê liệt không hồi phục trong vài giờ. Ba loại virut bại liệt tồn tại trên toàn cầu, cụ thể là tuýp 1, tuýp 2 và tuýp 3.

Phương án thực hiện thứ nhất của sáng chế bao gồm phương pháp bất hoạt virut bại liệt (chủng Salk hoặc Sabin) cải tiến bằng formaldehyt khi có đệm dẫn đến sự thu hồi tối đa kháng nguyên D sau khi hấp phụ IPV lên nhôm hydroxit tạo ra chế phẩm IPV được giảm liều đáng kể. Sáng chế đề xuất quy trình cải tiến bất hoạt bằng formalin và hấp phụ bằng nhôm hydroxit, trong đó hiệu suất thu hồi kháng nguyên D sau bất hoạt vào khoảng 50-80% và tỷ lệ hấp phụ của nhôm hydroxit vào khoảng 70-99%.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thực hiện thứ nhất, tế bào CCL81-VERO (thận khỉ) đã được sử dụng làm tế bào chủ cho sự sinh trưởng của virut bại liệt, cụ thể là chủng Sabin và Salk. Sau khi gây nhiễm các tế bào chủ bằng chủng virut bại liệt mong muốn và ủ trong 72 giờ, môi trường chứa virut và mảnh vụn tế bào được gộp lại và thu thập trong dụng cụ chứa.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ nhất, sản phẩm thu được phải được đưa qua nhiều quá trình lọc (bộ lọc 6 μm và 0,45 μm); và dịch lọc được thu gom vào bình chứa thủy tinh. Dịch lọc tiếp tục được lọc tiếp tuyến (TFF) với băng lọc 100 kDa; lọc màng sử dụng đệm phosphat và tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ nhất, sản phẩm virut đã tinh chế tiếp tục được trao đổi đệm từ đệm phosphat sang đệm Tris (30-50 mM, pH: 7-7,5) với hệ thống TFF (100 kDa, 0,1 m^2) sau đó thêm M-199 và 0,1-1,0% glyxin.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thực hiện thứ nhất, bán thành phẩm virut đã tinh chế trong đệm Tris được bất hoạt bởi formalin 0,01-1,0% với việc khuấy liên tục khối

virut và ủ ở nhiệt độ môi trường trong 13 ngày, với quá trình lọc bán thành phẩm vào ngày thứ 7. Tiếp đó, khối bất hoạt được lọc lần cuối và sau đó được bảo quản ở 2-8°C.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thực hiện thứ nhất, bán thành phẩm tinh chế cuối cùng được hấp phụ trên $\text{Al}(\text{OH})_3$, trong đó nồng độ nhôm (Al^{3+}) cuối cùng nằm trong khoảng 0,1-1,5 mg/liều, M-199 + 0,5% glyxin được sử dụng để tăng thể tích và pH được điều chỉnh về 6-7 bằng cách sử dụng HCl/NaOH 1N, tiếp tục được khuấy qua đêm ở 2-8°C.

Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng, sự mất mát kháng nguyên D sau bất hoạt bằng formaldehyt là do sự có mặt của đệm phosphat, đây là kết quả bất ngờ do sự kết tụ không mong muốn của virut bại liệt. Sáng chế đề xuất quy trình bất hoạt bằng formaldehyt được cải tiến với sự có mặt của đệm Tris, do đó bảo đảm sự thay đổi tối thiểu biểu mô và sau đó giảm thiểu sự mất mát kháng nguyên D.

Virut Rota bất hoạt

Virut Rota là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra bệnh tiêu chảy nặng ở trẻ nhỏ trên toàn thế giới. Vacxin virut Rota sống, giảm độc lực dạng uống có sẵn trên toàn thế giới; và được coi là an toàn và hiệu quả trong phòng bệnh đường tiêu hóa.

Phương án thực hiện thứ hai của sáng chế bao gồm sản xuất, tinh chế và phối trộn virut Rota. Quy trình này dùng để sản xuất kháng nguyên virut Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được bao gồm chủng mới, cụ thể là CDC-9 sử dụng bất hoạt bằng nhiệt và hấp phụ trên tá dược nhôm hydroxit.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ hai, virut Rota được nuôi cấy bằng cách sử dụng các tế bào Vero (CCL-81) làm tế bào chủ và sản phẩm nuôi cấy được tinh sạch bằng cách sử dụng màng lọc 30 μm và 2 μm để loại bỏ các mảnh vụn của tế bào.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ hai, sản phẩm đã tinh sạch được xử lý bằng benzonaza (2000-10000 đơn vị/lít) bằng cách ủ ở 37°C trong 4 giờ và khuấy liên tục. Cụ thể hơn là, nồng độ benzonaza được sử dụng là 5000 đơn vị/lít.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ hai, bán thành phẩm đã xử lý bằng benzonaza tiếp tiếp đó được cô đặc 10X và được lọc qua màng 4X bằng cách sử dụng “HBSS (Dung dịch muối cân bằng Hanks) + 10% sorbitol” với băng lọc 100 kDa.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thực hiện thứ hai, bán thành phẩm đã lọc màng có thể được thẩm tách tùy ý bằng cách sử dụng đệm pha loãng và tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký ái lực, tốt nhất là, nhựa sắc ký cột là xenlufin sulfat.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thực hiện thứ hai, phương pháp bất hoạt virus Rota bằng nhiệt cải tiến được sử dụng. Phương pháp này nhanh chóng, đơn giản và có thể duy trì tính toàn vẹn và do đó bảo tồn tính kháng nguyên của các hạt virus Rota. Nhiệt độ được sử dụng để bất hoạt nằm trong khoảng 60-70°C; và thời gian ủ trong khoảng 10 phút - 24 giờ. Tốt hơn là thời gian ủ nằm trong khoảng 30 phút-10 giờ. Tốt hơn nữa là, việc bất hoạt CDC-9 đã được tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng nhiệt ở 60°C trong 5 giờ với một lần thay đổi bình chứa sau hai giờ. Bán thành phẩm CDC-9 bất hoạt được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thực hiện thứ hai, kháng nguyên virus Rota bất hoạt được hấp phụ lên nhôm hydroxit, trong đó nồng độ nhôm (Al^{3+}) cuối cùng là 0,2-0,8 mg/liều.

Liên hợp PRP *Haemophilus influenzae* b – Protein

Haemophilus influenzae tuýp b là vi khuẩn gram âm gây viêm màng não và nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính, chủ yếu ở trẻ em. Cấu trúc ngoài cùng của *H. influenzae* tuýp b bao gồm PRP, một loại polysaccharit chịu trách nhiệm về độc lực và miễn dịch. PRP là bán kháng nguyên (hapten) được coi gây miễn dịch kém trong tự nhiên do đó PRP được liên kết cộng hóa trị với protein mang để tạo ra kháng nguyên Hib miễn dịch cao. Quá trình này thay đổi polysaccharit không phụ thuộc T thành kháng nguyên phụ thuộc T và cải thiện đáng kể khả năng miễn dịch, đặc biệt là ở trẻ nhỏ.

Phương án thực hiện thứ ba của sáng chế bao gồm quá trình sản xuất liên hợp PRP Hib-protein. Cần lưu ý rằng các protein mang được sử dụng để liên hợp với kháng nguyên Hib có thể được chọn từ nhóm bao gồm CRM₁₉₇ (Vật liệu phản ứng chéo 197, một dạng giải độc tố di truyền của biến độc tố bạch hầu), biến độc tố bạch hầu, phức hợp màng ngoài

Neisseria meningitidis, mảnh C của biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà, protein D của *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST và ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*, phức hợp màng ngoài c (OMPC), protein lỗ xuyên màng (porin), protein liên kết transferrin, pneumolysin, protein bề mặt phế cầu khuẩn (A) (PspA), yếu tố bám dính bề mặt phế cầu khuẩn A (PsaA), PhtD phế cầu khuẩn, protein bề mặt phế cầu khuẩn BVH-3 và BVH-11, kháng nguyên bảo vệ (PA) của *Bacillus anthracis*, và yếu tố phù (EF) giải độc và yếu tố gây chết (LF) của *Bacillus anthracis*, ovalbumin, hemoxyanin ốc đá lỗ khóa (KLH), albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò (BSA) và dẫn xuất protein tinh khiết của tuberculin (PPD), peptit tổng hợp, protein sốc nhiệt, protein ho gà, xytokin, lymphokin, hormon, các yếu tố tăng trưởng, protein nhân tạo bao gồm nhiều tế bào T CD4+ của người từ các kháng nguyên có nguồn gốc mầm bệnh khác nhau như N 19, protein hấp thu sắt, độc tố A hoặc B từ protein *C. difficile* và *S. agalactiae* hoặc loại tương tương bất kỳ. Tốt hơn là protein mang trong liên hợp được chọn từ TT hoặc CRM197.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ ba, kháng nguyên Hib có nguồn gốc từ polysaccharit bao nhầy của chủng *H. influenzae* tuýp b. Để sản xuất polysaccharit PRP, vi khuẩn *H. Influenzae* tuýp b được nuôi cấy trong môi trường bán tổng hợp trong điều kiện nhiệt độ nhất định, khuấy trộn và mật độ quang học nhất định. PRP là một polysaccharit gắn màng ngoài, được giải phóng vào môi trường trong quá trình lên men trong điều kiện khuấy. Dịch lên men tách sinh khối lên men có chứa PRP thô tiếp tục được tinh chế bằng cách kết tủa sử dụng chất tẩy rửa N, N, N-trimetyl-1-hexadecanamin bromua, sau đó kết tủa bằng gradient ethanol và lọc. Polysaccharit PRP tinh khiết cuối cùng được kiểm tra để đáp ứng các thông số kỹ thuật như nội độc tố, axit nucleic và protein theo WHO, BP, EP, IP, v.v...

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ ba, liên hợp polysaccharit - liên hợp được sản xuất bằng cách gắn polysaccharit (PRP) với protein mang. PRP Hib được gắn với protein mang bằng cách sử dụng quá trình gắn bao gồm các bước: khử polyme hóa PRP bằng cách sử dụng đệm kiềm để thu được PRP giảm kích thước; xử lý với tác nhân xyanua hóa như CDAP (1-xyano-4-dimetylamin pyridin tetrafloroborat) để tạo thành este xyanat; gắn polysaccharit đã xyanua hóa hoạt hóa với nhóm amin của protein mang; tinh chế liên hợp cuối cùng bằng siêu lọc.

Tốt hơn là, tỷ lệ đầu vào tối ưu của các chất phản ứng, cụ thể là PRP, CDAP và CRM₁₉₇ được chọn ở tỷ lệ 1: 1,5: 1 cho phản ứng gắn. Trong quá trình gắn, polysacarit PRP tinh khiết đã được khử polyme bằng cách sử dụng dung dịch đệm kiềm (dung dịch đệm Cacbonat-bicacbonat 0,4M, pH 10,5 ± 0,1) để thu được PRP giảm kích thước. PRP giảm kích thước đã được xử lý xyanua hóa bằng cách sử dụng CDAP (1-xyano-4-dimetylamin pyridin tetraflorat) để tạo thành este xyanat. Polysacarit đã xyanua hóa hoạt hóa được gắn trực tiếp với nhóm amin trên protein mang CRM₁₉₇. Mức độ chuyển đổi liên hợp Hib được xác nhận bằng kiểm tra ngoại tuyến sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phản ứng gắn được dừng lại nhờ đạt được mức độ chuyển đổi liên hợp mong muốn với thông số chuyển đổi không dưới 65% liên hợp Hib, rồi tiếp đó phản ứng liên hợp được trung hòa bằng cách bổ sung glyxin (2M). Liên hợp PRP Hib-CRM₁₉₇ tiếp tục được tinh chế bằng bộ lọc màng siêu lọc (300 kDa và 100 kDa) để loại bỏ các chất phản ứng không phản ứng và sản phẩm phụ. Bán thành phẩm liên hợp cuối cùng được lọc 0,22 µm và được lưu trữ ở 2-8°C.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ ba, PRP Hib được gắn với protein mang trong đó tỷ lệ sacarit: protein (w/w) nằm trong khoảng 0,4-1 và hàm lượng PRP tự do trong bán thành phẩm liên hợp PRP Hib-protein cuối cùng không quá 5 %, tốt hơn là dưới 2%.

Biến độc tố bạch hầu (D)

Bạch hầu là bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *Corynebacterium diphtheria* gây ra, chủ yếu lây nhiễm vào họng và đường hô hấp trên, và tạo ra độc tố ảnh hưởng đến các cơ quan khác. Độc tố bạch hầu là ngoại độc tố được tiết ra bởi *Corynebacterium diphtheria*, sở hữu đặc tính kháng nguyên và có độc tính trong tự nhiên. Để giảm độc tính, chất độc được chuyển thành biến độc tố chưa hoạt hóa bằng cách bất hoạt. Quá trình bất hoạt có thể được chọn từ nhóm gồm phương pháp xử lý bằng nhiệt, UV, formalin/formaldehyt, axetyetylenimin, v.v... Để tăng khả năng gây miễn dịch, biến độc tố được hấp phụ vào tá dược. Do đó, biến độc tố được tạo thành có thể gây cảm ứng tạo ra các kháng thể chống độc tố chống lại *C. diphtheria*. Sự tồn tại của dime có thể dẫn đến các phản ứng bất lợi.

Theo phương án thực hiện thứ tư của sáng chế, biến độc tố bạch hầu đã được sản xuất.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ tư, độc tố bạch hầu (ngoại độc tố) được lấy từ *Corynebacterium diphtheria* và được giải độc bằng cách sử dụng chất bất hoạt thích hợp. Ví dụ về chất bất hoạt thích hợp bao gồm formaldehyt.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ tư, biến độc tố bạch hầu thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lọc Gel với nhựa Sephacryl S-300 HR và tốc độ dòng chảy tuyến tính 2-5 ml/phút. Do đó, D tinh khiết thu được không có các mảnh vụn và kết tập không đồng nhất không mong muốn (tham khảo Fig.1) với ít nhất 80-90% biến độc tố bạch hầu đơn thể (monome) được sử dụng để phối trộn vacxin đa giá. Hơn nữa, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (polyacrylamit liên kết chéo), gel agaroza và/hoặc Styragel cũng có thể được sử dụng cho mục đích tinh chế bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu Gel.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ tư, biến độc tố bạch hầu được hấp phụ trên một hoặc nhiều muối nhôm bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, tốt nhất là trên nhôm phosphat.

Biến độc tố uốn ván

Uốn ván là bệnh truyền nhiễm cấp tính gây ra bởi các chủng vi khuẩn *Clostridium tetani*, một loại vi khuẩn gram dương, hình thành bào tử, kỵ khí nghiêm ngặt. Độc tố uốn ván là một ngoại độc tố do *Clostridium tetani* tiết ra, sở hữu đặc tính kháng nguyên và có độc tính trong tự nhiên. Để giảm độc tính, độc tố được chuyển thành biến độc tố bất hoạt bằng cách bất hoạt. Quá trình bất hoạt có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm phương pháp xử lý bằng nhiệt, UV, UV, formalin/formaldehyt, axetyletylenimin, v.v... Để tăng khả năng gây miễn dịch, biến độc tố được hấp phụ vào tá dược. Do đó, biến độc tố được tạo thành có thể gây cảm ứng tạo ra các kháng thể chống độc tố chống lại *C. tetani*. Sự tồn tại của dime có thể dẫn đến các phản ứng bất lợi.

Theo phương án thực hiện thứ năm của sáng chế, biến độc tố uốn ván đã được sản xuất.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ năm, độc tố uốn ván được lấy từ *Clostridium tetani* và được giải độc bằng cách sử dụng chất bất hoạt thích hợp. Ví dụ về chất bất hoạt thích hợp bao gồm formaldehyt.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ năm, biến độc tố uốn ván thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lọc Gel với nhựa Sephacryl S-300 HR và tốc độ dòng chảy tuyến tính 2 - 5 ml/phút. Do đó, D tinh khiết thu được không có các mảnh vụn và kết tập không đồng nhất không mong muốn với ít nhất 80-90% biến độc tố uốn ván đơn thể được sử dụng để phối trộn vacxin đa giá. Hơn nữa, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (polyacrylamit liên kết chéo), gel agaroza và Styragel cũng có thể được sử dụng cho mục đích tinh chế bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu Gel.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ năm, biến độc tố uốn ván được hấp phụ trên một hoặc nhiều muối nhôm bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, tốt nhất là trên nhôm phosphat.

Kháng nguyên ho gà

Ho gà là bệnh gây ra bởi *Bordetella pertussis*, một loại cầu trực khuẩn gram âm nhỏ gây nhiễm trùng các lớp niêm mạc đường hô hấp của con người. Hai dạng vacxin đang được sử dụng là vacxin ho gà toàn tế bào (wP) và vacxin ho gà vô bào (aP). Vacxin ho gà toàn tế bào là dịch huyền phù của toàn bộ tế bào vi khuẩn *B. pertussis* đã được bất hoạt, thường là bằng formalin. Tiêm chủng bằng vacxin wP tương đối rẻ tiền và hiệu quả cao. Ngoài ra, sự có mặt của wP trong vacxin kết hợp đóng vai trò như một chất bổ trợ cho nhiều thành phần kháng nguyên khác.

Vacxin ho gà vô bào (aP) có chứa các thành phần tinh khiết của *B. pertussis* như độc tố ho gà bất hoạt hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với các thành phần *B. pertussis* khác như ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi, kháng nguyên tua viền (fimbria), pertactin, và adenylat xyclaza biến tính. Vacxin ho gà vô bào có phản ứng bất lợi ít hơn so với vacxin wP.

Theo phương án thực hiện thứ sáu của sáng chế, vacxin ho gà là kháng nguyên ho gà được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên ho gà toàn tế bào hoặc kháng nguyên ho gà vô bào.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ sáu, vacxin ho gà là kháng nguyên ho gà được chọn lọc từ nhóm bao gồm ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi, kháng nguyên tua viền, pertactin, và adenylat xyclaza biến tính. Kháng nguyên ho gà vô bào có thể được biểu hiện ở vật chủ thích hợp bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ sáu, vacxin ho gà là kháng nguyên ho gà toàn tế bào bao gồm các chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229 theo tỷ lệ cụ thể và sau đó được bất hoạt bằng cách sử dụng các phương pháp bất hoạt cải tiến không có thimerosal; do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và tăng hiệu lực. Tốt hơn là, kháng nguyên wP được tạo ra từ các chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229 được trộn theo tỷ lệ 1:1:0,25:0,25.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ sáu, quá trình bất hoạt wP bao gồm bất hoạt bằng nhiệt ở $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 10-15 phút với sự có mặt của formaldehyt; trong đó bán thành phẩm wP vẫn không bị vón cục và dễ bị đồng nhất hóa, do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và làm cho hiệu lực wP tốt hơn trong thời gian dài hơn.

Kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg)

Viêm gan B là bệnh nhiễm trùng gan có khả năng đe dọa tính mạng do virus viêm gan B (HBV) gây ra. Kháng nguyên bề mặt viêm gan B là protein bề mặt cũng đóng vai trò là chất kháng nguyên trong vacxin có hiệu quả cao để ngăn ngừa nhiễm HBV. Protein HBsAg có thể được biểu hiện tái tổ hợp trong vi sinh vật chủ thích hợp; hoặc có thể được phân lập từ huyết tương của bệnh nhân/người mang mầm bệnh viêm gan B mạn tính.

Theo phương án thực hiện thứ bảy của sáng chế, HBsAg đã được sản xuất.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thực hiện thứ bảy, HBsAg đã được biểu hiện trong các tế bào nấm men *Hansenula polymorpha* sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp. Các loại nấm men khác như *Saccharomyces cerevisiae* cũng có thể được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện tái tổ hợp HBsAg.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thực hiện thứ bảy, HbsAg đã được hấp phụ trên một hoặc nhiều muối nhôm được chọn từ nhóm bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, tốt nhất là trên nhôm phosphat.

Thành phần vacxin kết hợp hai giá và quy trình sản xuất

Theo phương án thực hiện thứ tám của sáng chế, vaccin đa giá là loại vaccin kết hợp hai giá dạng lỏng. Vaccin kết hợp hai giá bao gồm virus bại liệt tuýp I, II và III bất hoạt; và virus Rota bất hoạt.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ tám, virus bại liệt bất hoạt được chọn từ nhóm bao gồm chủng Salk và chủng Sabin; và nồng độ tuýp I, tuýp II, và tuýp III riêng lẻ của chủng Salk hoặc Sabin dựa vào IPV không quá 20 đơn vị kháng nguyên D.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ tám, virus bại liệt bất hoạt là chủng Salk và nồng độ tuýp I, tuýp II, và tuýp III riêng lẻ của chủng Salk dựa vào IPV được chọn từ nhóm bao gồm 7,5-16-10, 8-2-5, 10-2-5, 10-2-10, 10-2-12, 10-2-16, 7,5-16-10, 5-2-5 đơn vị kháng nguyên D; cụ thể hơn là nồng độ tuýp I, tuýp II, và tuýp III riêng lẻ của chủng Salk dựa vào IPV được chọn từ nhóm bao gồm 8-2-5 và 10-2-10 đơn vị kháng nguyên D.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ tám, virus bại liệt bất hoạt là chủng Sabin và nồng độ tuýp I, tuýp II, và tuýp III riêng lẻ của chủng Sabin dựa vào IPV được chọn từ nhóm bao gồm 5-16-10, 2,5-8-5, 5-8-10 đơn vị kháng nguyên D; cụ thể hơn là nồng độ tuýp I, tuýp II, và tuýp III riêng lẻ của chủng Sabin dựa vào IPV là 5-16-10 đơn vị kháng nguyên D.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thực hiện thứ tám, virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được là chủng virus Rota CDC-9 hoặc CDC-66 và nồng độ IRV nằm trong khoảng 5-50 µg/liều, cụ thể hơn là nồng độ IRV bằng 10 µg/liều.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thực hiện thứ tám, chế phẩm hai giá được sản xuất bằng cách hấp phụ bán thành phẩm IPV (Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV riêng lẻ trên một hay nhiều muối nhôm được chọn từ nhóm bao gồm nhôm hydroxit và nhôm photphat, tốt nhất là trên nhôm hydroxit. Các bán thành phẩm hấp phụ đơn giá riêng lẻ IPV và IRV được trộn lẫn với nhau và giữ trên máy lắc ở 2-8°C trong 1-4 giờ.

Chế phẩm vaccin kết hợp sáu giá và quá trình sản xuất

Theo phương án thực hiện thứ chín của sáng chế, tất cả các chế phẩm vaccin sáu giá (DTwP-IPV-IRV-Hib) được sản xuất như sau:

a) Bán thành phẩm IPV (Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6.

b) D được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5, thêm T và trộn bằng cách khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ.

c) Các dung dịch thu được ở bước a và b được trộn lẫn, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.

d) kháng nguyên wP và histidin đã được thêm vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C.

e) Liên hợp PRP Hib và 2-Phenoxyetanol (2-PE) được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước d ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6.

f) NaCl và nước tiêm (WFI) (lượng vừa đủ) đã được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước e, sau đó khuấy trong 2 giờ.

Theo phương án thực hiện thứ mười của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá dạng lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin sáu giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu (D); biến độc tố uốn ván (T); kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào (wP) bất hoạt; các chủng Salk virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt (IRV); và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm

lượng nhôm (Al^{3+}) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười một của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin sáu giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Salk virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười một, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười một, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae*

tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười hai của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin sáu giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Sabin virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxietanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười hai, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al³⁺) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười hai, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười ba của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin sáu giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Sabin virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxietanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười ba, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al³⁺) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười ba, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin sáu giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg và WFI.

Chế phẩm vaccin kết hợp bảy giá và quy trình sản xuất

Theo phương án thực hiện thứ mười bốn của sáng chế, chế phẩm vaccin bảy giá (DTwP-HbsAg-IPV-IRV-Hib) được sản xuất như sau:

- a) Bán thành phẩm IPV (chủng Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6.
- b) HbsAg được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 6,0-6,5.
- c) D được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5 và bổ sung T.
- d) Dung dịch thu được ở bước b và c được trộn lẫn, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5 và được khuấy trộn ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ.
- e) Các hỗn hợp trên (thu được ở bước a và d) được bổ sung, sau đó được điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.

f) Kháng nguyên wP và histidin được thêm vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C.

g) Liên hợp protein PRP Hib và 2-PE được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước f ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6.

h) NaCl và WFI (lượng vừa đủ) được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước g, sau đó khuấy trong 2 giờ.

Theo phương án thực hiện thứ mười lăm của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá dạng lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin bảy giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Salk virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT; kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười lăm, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 5-30 µg; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười lăm, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười sáu của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá dạng lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin bảy giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Salk virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇; kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười sáu, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 5-30 µg; hàm lượng nhôm (Al³⁺) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười sáu, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười bảy của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá dạng lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin bảy giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Sabin virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT; kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười bảy, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 5-30 µg; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười bảy, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười tám của sáng chế, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá dạng lỏng. Tất cả các chế phẩm vaccin bảy giá lỏng bao gồm biến độc tố bạch hầu; biến độc tố uốn ván; kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt; các chủng Sabin virus bại liệt bất hoạt tuýp I, II và III; virus Rota bất hoạt; và liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇; kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và các tá dược khác như tá dược gốc nhôm (nhôm phosphat, nhôm hydroxit), 2-phenoxyetanol, L-Histidin và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ mười tám, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có số lượng trong khoảng 2-20 µg

thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 5-30 µg; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg và WFI.

Theo khía cạnh ưu tiên nhất của phương án thực hiện thứ mười tám, chế phẩm vaccin đa giá là chế phẩm vaccin bảy giá, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg và WFI.

Theo phương án thực hiện thứ mười chín của sáng chế, chế phẩm vaccin kết hợp bao gồm một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm bao gồm Benzethonium clorua (Phemerol), thiomersal, phenol và 2- phenoxyetanol (2-PE). Tốt hơn là, chế phẩm vaccin kết hợp bao gồm 2- phenoxyetanol (2-PE) dưới dạng chất bảo quản.

Theo phương án thực hiện thứ hai mươi của sáng chế, chế phẩm vaccin kết hợp có chứa một hoặc nhiều tá dược được phẩm được lựa chọn từ nhóm bao gồm đường và polyol, chất hoạt động bề mặt, polyme, muối, axit amin, chất điều chỉnh pH, v.v...

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thực hiện thứ hai mươi, đường và polyol bao gồm sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, galactoza, mannitol, sorbitol, glyxerol, v.v... Theo khía cạnh thứ hai của phương án thực hiện thứ hai mươi, chất hoạt động bề mặt bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbat 20, polysorbat 80, v.v... Theo khía cạnh thứ ba của phương án thực hiện thứ hai mươi, polyme bao gồm dextran, cacboxymetylxenluloza, axit hyaluronic, xyclodextrin, v.v. Ví dụ về các muối có thể bao gồm NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂, v.v... Theo khía cạnh thứ tư của phương án thực hiện thứ hai mươi, axit amin bao gồm Arginin, Glyxin, Histidin, v.v ... Theo khía cạnh thứ năm của phương án thực hiện thứ hai mươi, chất điều chỉnh pH bao gồm natri hydroxit, axit clohydric, v.v...

Theo phương án thực hiện thứ hai mươi một của sáng chế, độ pH của chế phẩm vaccin kết hợp cuối cùng nằm trong khoảng từ 6,0 đến pH 7,5; tốt hơn nữa là trong khoảng pH 6,2 đến pH 7,2; và tốt nhất là trong khoảng pH 6,4 đến pH 6,6.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất kháng nguyên virus bại liệt (Salk/Sabin) bất hoạt liều thấp

Viện huyết thanh Ấn Độ đã phát triển phương pháp bất hoạt và hấp phụ kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt theo quy trình sau:

- Tế bào CCL81-VERO (thận khỉ) được sử dụng làm tế bào chủ cho sự sinh trưởng của virus bại liệt, cụ thể là các chủng Sabin và Salk.

- Tinh chế IPV

Sản phẩm nuôi cấy đã lọc được cô đặc 10X bằng hệ thống lọc tiếp tuyến với băng lọc 100 Kda (0,5 m²) rồi tiếp đó lọc màng 3 lần sản phẩm lọc với đệm phosphat (40 mM, pH: 7,0).

Sản phẩm cô đặc được tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion (IEC). Sản phẩm TFF cô đặc 10X được cho chảy nhanh qua DEAE sepharosa (chất trao đổi ion yếu) được đóng gói trong cột xk-26 sử dụng Akta explorer (GE Health). Các tạp chất tích điện âm được liên kết với cột trong khi virus bại liệt được thu thập trong dòng chảy qua với dung dịch đệm phosphat 40 mM.

Để giảm thiểu hiện tượng mất kháng nguyên trong quy trình bất hoạt khá phức tạp và kéo dài (13 ngày), virus tinh khiết đã được trao đổi đệm từ đệm phosphat sang đệm Tris (40 mM, pH: 7) với hệ thống TFF [100 KDa, 0,1 m²]. Virus tinh khiết được trao đổi với thể tích đệm Tris gấp ba lần.

- Bất hoạt IPV

Sản phẩm cô đặc 10X M-199 được bổ sung glyxin 0,5% để đạt được nồng độ cuối cùng 1X. Chất bất hoạt formalin (0,025%) đã được thêm vào bán thành phẩm virus tinh khiết trong khi trộn liên tục. Quá trình bất hoạt được thực hiện ở 37°C trong khi khuấy liên

tục trong 13 ngày, bao gồm công đoạn lọc qua màng 0,22 µm lọc vào ngày thứ 7 và ngày thứ 13.

Kết quả và kết luận

Khi các phương pháp bất hoạt bằng fomaldehyt được thực hiện với sự có mặt của đệm phosphat, kết quả cho thấy rằng kháng nguyên D bị mất mát đáng kể đối với chủng Sabin và chủng Salk, trong khi đó, khi thực hiện bất hoạt bằng formaldehyt với sự có mặt của đệm Tris, sự mất mát kháng nguyên D được giảm thiểu.

	D – hàm lượng kháng nguyên (40 mM đệm phosphat trong quá trình bất hoạt)	D – hàm lượng kháng nguyên (40 mM đệm Tris trong quá trình bất hoạt)
Tuýp I	52,70 DU/ml	408,19 DU/ml
Tuýp II	22,63 DU/ml	180,20 DU/ml
Tuýp III	4,21 DU/ml	21,50 DU/ml

Ví dụ 2: Sản xuất kháng nguyên virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được

Chủng virus Rota (CDC-9) được đề cập trong đơn sáng chế số PCT/US2010/034537 có tên là “chủng virus Rota ở người và vacxin” nộp ngày 12 tháng 5 năm 2010; đơn sáng chế số PCT/US2008/075239 có tên là “Bất hoạt virus Rota bằng nhiệt”, nộp ngày 4 tháng 9 năm 2008, đã được sử dụng.

Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh (CDC) đã phát triển phương pháp dùng để bất hoạt virus Rota. CDC cũng đã phát triển xét nghiệm để kiểm tra IgG đặc hiệu của virus Rota và kháng thể trung hòa.

- Virus Rota (chủng CDC-9) được nuôi cấy bằng cách sử dụng tế bào Vero (CCL-81) làm tế bào chủ và sản phẩm nuôi cấy được làm sạch bằng cách sử dụng màng lọc 30+2 µm để loại bỏ các mảnh vụn của tế bào.

- Sản phẩm làm sạch được xử lý bằng Benzoinaza (5000 đơn vị/lít) bằng cách ủ ở 37°C trong 4 giờ và khuấy liên tục.

- Bán thành phẩm đã xử lý Benzonaza tiếp tục được cô đặc 10X và được lọc 4X bằng cách sử dụng “HBSS (Dung dịch muối cân bằng Hanks) + 10% sorbitol” với băng 100 KDa.

- Bán thành phẩm đã lọc được thẩm tách bằng cách sử dụng dung dịch đệm pha loãng và được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký ái lực (nhựa xenlufin sulfat).

- Bất hoạt CDC-9 tinh khiết được thực hiện bằng cách sử dụng nhiệt ở 60°C trong 5 giờ với một lần thay đổi bình chứa sau hai giờ. Bán thành phẩm CDC-9 bất hoạt được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng tiếp. [Huyết thanh 1]

Ví dụ 3 : Tinh chế biến độc tố bạch hầu

Biến độc tố bạch hầu được tinh chế bằng sắc ký lọc gel với thông số quy trình được đặt như dưới đây:

Bảng 1: Thông số quy trình

STT	Thông số	Chi tiết
1	Bán thành phẩm tự nhiên D được sử dụng	--
2	Hàm lượng (Bán thành phẩm tự nhiên D) bằng xét nghiệm Lowry	11 mg/ml
3	LF/ml	3000
4	Phương pháp tinh chế	Sắc ký lọc gel (GFC)
5	Nhựa	Sephacryl S-300 HR
6	Cột được sử dụng	XK 26/70 cm
7	Chiều cao cột tạo thành đệm	~50 cm
8	Tốc độ dòng chảy tuyến tính	1 – 3 ml/phút
9	Nạp mẫu (D)	4% tổng thể tích cột
10	Thu phân đoạn	Từng 5 ml (2 phút)

11	Phân tích	Phân tích Lowry, ước tính LF, % monome
----	-----------	--

Các phân đoạn số 6 -11 được gộp lại và phân tích hàm lượng monome (tham khảo Fig.1)

Kết quả và thuyết minh

Sắc ký được chạy nhiều lần bằng cách sử dụng các tham số trên. Sản phẩm cô đặc bán thành phẩm CRM₁₉₇ được sử dụng làm chỉ thị để so sánh hàm lượng monome. CMR₁₉₇ monome có thể được xem là dạng tinh khiết nhất của DT. Hàm lượng phần trăm monome nằm trong khoảng 80-90%.

Bảng 2: % thu hồi và hàm lượng monome của DT đã tinh chế thu được

STT	Mẫu	Nồng độ protein (mg/ml)	% monome	% thu hồi
1	DT tự nhiên	---	67,19	--
2	CRM tự nhiên	---	86,96	--
3	GFC DT FR 8	2,03	83,21	Lượng DT đã tiêm 120 mg
4	GFC DT FR 9	3,38	87,15	
5	GFC DT FR 10	4,08	87,24	
6	GFC DT FR 11	3,52	86,60	Lượng thu được 75,1 mg
7	GFC DT FR 12	2,01	89,97	
8	GFC DT FR 10-11	3,83	86,03	31,6%
9	GFC DT FR 9-12	2,96	87,42	48,9%
10	GFC DT FR 7-13	2,19	86,24	63,3%

Ví dụ 4 : Tinh chế biến độc tố uốn ván

Biến độc tố uốn ván đã được tinh chế bằng sắc ký lọc gel/HIC (phenyl sepharosa) với thông số quy trình được đặt như sau:

Bảng 3: Thông số quy trình

STT	Thông số	Chi tiết
1	Bán thành phẩm tự nhiên T được sử dụng	--
2	Hàm lượng (bán thành phẩm tự nhiên T) bằng xét nghiệm Lowry	11 mg/ml
3	LF/ml	3000
4	Phương pháp tinh chế	Sắc ký lọc gel (GFC)
5	Nhựa	Sephacryl S-300 HR
6	Cột được sử dụng	XK 26/70cm
7	Chiều cao cột tạo thành đệm	~50cm
8	Tốc độ dòng chảy tuyến tính	1 – 3 ml/phút
9	Nạp mẫu (T)	4% thể tích cột
10	Thu phân đoạn	từng 5 ml (2 phút)
11	Phân tích	Phân tích Lowry, ước tính LF, % monome

Kết quả

Sắc ký được chạy nhiều lần bằng cách sử dụng các tham số trên. Hàm lượng phần trăm monome nằm trong khoảng 80-90%.

Ví dụ 5: Sản xuất liên hợp PRP Hib- Protein

PRP polysacarit được sản xuất như sau:

Vi khuẩn *H. Influenzae* tuýp b được nuôi cấy trong môi trường bán tổng hợp trong điều kiện nhiệt độ nhất định, khuấy trộn và mật độ quang học nhất định. PRP là một polysacarit gắn màng ngoài, được giải phóng vào môi trường trong quá trình lên men trong

điều kiện khuấy. Dịch lên men tách sinh khối lên men có chứa PRP thô tiếp tục được tinh chế bằng cách kết tủa sử dụng chất tẩy rửa N, N, N-trimetyl-1-hexadecanamin bromua, sau đó kết tủa bằng gradient etanol và lọc. Polysacarit PRP tinh khiết cuối cùng được kiểm tra để đáp ứng các thông số kỹ thuật như nội độc tố, axit nucleic và protein theo WHO, BP, EP, IP, v.v...

Liên hợp PRP Hib-protein được sản xuất như sau:

Liên hợp polysacarit được sản xuất bằng cách gắn polysacarit PRP với protein mang CRM₁₉₇. Tỷ lệ đầu vào của các chất phản ứng, cụ thể là PRP, CDAP và CRM₁₉₇ được chọn ở tỷ lệ 1: 1,5: 1 cho phản ứng gắn. Trong quá trình gắn, polysacarit PRP tinh khiết đã được khử polyme bằng cách sử dụng dung dịch đệm kiềm (dung dịch đệm Cacbonat-bicacbonat 0,4M, pH 10,5 ± 0,1) để thu được PRP giảm kích thước. PRP giảm kích thước được xử lý xyanua hóa bằng cách sử dụng CDAP (1-xyano-4-dimetylamin pyridin tetrafloroborat) để tạo thành este xyanat. Polysacarit đã xyanua hóa hoạt hóa được gắn trực tiếp với nhóm amin trên protein mang CRM₁₉₇. Mức độ chuyển đổi liên hợp Hib được xác nhận bằng HPLC. Phản ứng gắn được dừng lại nhờ đạt được mức độ chuyển đổi liên hợp mong muốn với thông số chuyển đổi không dưới 65% liên hợp Hib, rồi tiếp đó phản ứng liên hợp được trung hòa bằng cách bổ sung glyxin (2M). Liên hợp PRP Hib-CRM₁₉₇ tiếp tục được tinh chế bằng bộ lọc màng siêu lọc (300 kDa và 100 kDa) để loại bỏ các chất phản ứng không phản ứng và sản phẩm phụ. Bán thành phẩm liên hợp cuối cùng được lọc 0,22 µm và được lưu trữ ở 2-8°C.

Các đặc trưng chất lượng của kháng nguyên liên hợp PRP Hib-CRM₁₉₇ thu được như sau:

Hàm lượng PRP (mg/ml) : 1,49

Hàm lượng protein (mg/ml): 2,98

Tỷ lệ (Ps: Protein) : 0,52

PRP tự do (%) : 1,77

Trọng lượng phân tử protein (kD) : 983

Trọng lượng phân tử trung bình (kD): 752

Ví dụ 6: Chế phẩm hai giá (vacxin IPV-IRV)

Viện huyết thanh Ấn Độ đã phát triển chế phẩm hai giá bao gồm virus bại liệt bất hoạt liều thấp và virus Rota bất hoạt theo quy trình sau đây:

Chế phẩm vacxin hai giá như sau

Bảng 4: Chế phẩm vacxin hai giá

Thành phần	Chế phẩm vacxin hai giá I (Salk IPV + IRV)	Chế phẩm vacxin hai giá II (Salk IPV + IRV)	Chế phẩm vacxin hai giá III (Salk IPV + IRV)	Chế phẩm vacxin hai giá IV (Sabin IPV + IRV)
Hàm lượng kháng nguyên – IPV	Tuýp 1: ≥ 8 DU/liều Tuýp 2: ≥ 2 DU/liều Tuýp 3: ≥ 5 DU/liều	Tuýp 1: ≥ 10 DU/liều Tuýp 2: ≥ 2 DU/liều Tuýp 3: ≥ 10 DU/liều	Tuýp 1: ≥ 10 DU/liều Tuýp 2: ≥ 2 DU/liều Tuýp 3: ≥ 16 DU/liều	Tuýp 1: ≥ 5 DU/liều Tuýp 2: ≥ 16 DU/liều Tuýp 3: ≥ 10 DU/liều
Hàm lượng kháng nguyên – IRV	Protein tổng số ≥ 10 µg /liều	Protein tổng số ≥ 10 µg/liều	Protein tổng số ≥ 10 µg/liều	Protein tổng số ≥ 10 µg/ liều
Nhôm	0,8 mg/liều	0,8 mg/liều	0,8 mg/liều	0,8 mg/liều

Ví dụ 7: Sản xuất vacxin hai giá (IPV-IRV)

Vacxin hai giá (IPV-IRV) được sản xuất theo quy trình dưới đây:

- Hấp phụ IPV

Cho lượng $\text{Al}(\text{OH})_3$ mong muốn vào bình.

Thêm lượng mong muốn của bán thành phẩm Salk/Sabin IPV đơn giá và tạo thể tích cuối cùng với chất pha loãng.

Điều chỉnh pH chế phẩm cuối cùng về 6,5 bằng NaOH 1N/HCl 1N.

Giữ các bán thành phẩm đơn giá trên máy khuấy từ/máy lắc qua đêm ở 2-8°C.

- Hấp phụ IRV

Cho lượng $\text{Al}(\text{OH})_3$ mong muốn vào bình.

Thêm lượng mong muốn của bán thành phẩm IRV và tạo thể tích cuối cùng với chất pha loãng.

Điều chỉnh pH chế phẩm cuối cùng về 6,5 bằng NaOH 1N/HCl 1N.

Giữ các bán thành phẩm đơn giá trên máy khuấy từ/máy lắc qua đêm ở 2-8°C.

- Phối trộn vaccin hai giá (IPV-IRV)

Trộn lẫn các bán thành phẩm IPV và IRV đơn giá.

Giữ ở 2-8°C trên máy lắc trong 2 giờ.

Lưu trữ chế phẩm cuối cùng (thành phẩm) ở 2-8°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Ví dụ 8: Kiểm tra hiệu quả của vaccin hai giá

Hiệu lực của vaccin hai giá đã được đánh giá bằng cách kiểm tra các mẫu huyết thanh trung hòa kháng thể chống lại virus bại liệt Sabin tuýp 1, 2 và 3, cũng như chủng virus Rota Wa sử dụng các xét nghiệm trung hòa vi lượng. Các độ chuẩn trung hòa chống lại virus bại liệt được báo cáo ở định dạng log₂. Độ chuẩn trung hòa 2,5 được coi là âm tính. Đối với virus Rota, độ chuẩn trung hòa <20 được coi là âm tính.

Bảng 5

	Định danh mẫu	Sabin 1		Sabin 2		Sabin 3		IRV (Wa)	
		D0	D42	D0	D42	D0	D42	D0	D42
Salk 8-2-5 + IRV 10 µg	7A	2,5	6,17	2,5	10,5	2,5	7,83	<20	320
	7B	2,5	4,5	2,5	7,17	2,5	2,5	<20	1280

	Định danh mẫu	Sabin 1		Sabin 2		Sabin 3		IRV (Wa)	
		D0	D42	D0	D42	D0	D42	D0	D42
	8A	2,5	7,83	2,5	9,5	2,5	8,83	<20	320
	8B	2,5	8,5	2,5	10,5	2,5	6,5	<20	160
Salk 5-2-5 + IRV 10 µg	9A	2,5	5,5	2,5	10,5	2,5	3,5	<20	640
	9B	2,5	2,5	2,5	8,83	2,5	5,83	<20	640
Sabin 5-16-10 + IRV 10 µg	10A	2,5	7,5	2,5	9,5	2,5	6,5	<20	640
	10B	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	10,5	<20	320
	11A	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	10,5	<20	640
	11B	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	9,17	<20	640
Sabin 2,5-8-5 + IRV 10 µg	12A	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	8,83	<20	320
	12B	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	8,17	<20	80
Rota sống (Log 5,5 FFU)	15A	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	<20	320
	15B	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	<20	640
Âm tính	17A	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	<20	<20
	17B	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	<20	<20
	Đối chứng	6,5		4,83		4,17		<20 (đối chứng âm)	
		6,5		5,17		4,5		160 (đối chứng dương 1)	
		6,17		5,5		4,5		1280 (Đối chứng dương 2)	
		5,83		4,5		5,5			

	Định danh mẫu	Sabin 1		Sabin 2		Sabin 3		IRV (Wa)	
		D0	D42	D0	D42	D0	D42	D0	D42
Các chữ số (cụ thể 8-2-5) trong cột A biểu thị các đơn vị kháng nguyên D của virus bại liệt tuýp 1-2-3 tương ứng. Mỗi chuột lang (từ 7 đến 12 B) tiếp nhận ba liều vaccin kết hợp bao gồm IPV và 10μg kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) vào ngày 1, ngày 14 và ngày 28 và mẫu huyết thanh được lấy vào ngày 42, chuột lang số 15A và 15B nhận ba liều virus Rota sống (log 5,5 FFU hoặc 10 μg) được sử dụng làm đối chứng dương. Ở nhóm đối chứng âm (17A và 17B), chỉ chế phẩm chứa nhôm mà không có kháng nguyên bất kỳ được sử dụng để gây miễn dịch.									

Bảng 6

Kiểm tra trung hòa huyết thanh đối với vaccin ba giá Salk+Rota 1 liều và 2 liều											
Nhóm 7: Salk+Rota 8-2-5				Nhóm 8: Salk+Rota 8-2-5				Nhóm 9: Salk+Rota 5-2-5			
(1 Liều)				(2 Liều)				(2 Liều)			
Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3
1	2	7	7	1	10	8	11	1	3	9	12
2	3	7	9	2	7	8	10	2	7	6	12
3	4	7	8	3	7	7	7	3	7	8	10
4	4	6	10	4	10	7	10	4	11	9	8
5	0	7	8	5	9	7	12	5	5	6	10
6	0	9	10	6	5	8	9	6	10	9	12

7	5	7	10		7	5	6	10		7	6	6	12
8	8	9	6		8	10	8	11		8	2	10	12
9	4	8	5		9	6	9	11		9	9	9	10
10	6	8	10		10	7	9	10		10	5	NS	NS

Bảng 7

Kiểm tra trung hòa huyết thanh đối với vacxin ba giá Sabin+Rota 1 liều và 2 liều											
Nhóm 10: Sabin+Rota 5-16-10				Nhóm 11: Sabin+Rota 5-16-10				Nhóm 12: Sabin+Rota 2,5-8-5			
(1 Liều)				(2 Liều)				(2 Liều)			
Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3
1	7	4	11	1	8	7	12	1	5	4	11
2	10	5	11	2	5	7	NS	2	7	2	12
3	7	3	10	3	8	4	12	3	6	6	9
4	8	5	11	4	6	7	12	4	6	8	9
5	7	4	11	5	8	7	12	5	7	5	8
6	8	4	11	6	8	7	12	6	5	6	12
7	6	3	12	7	8	4	10	7	8	6	10
8	11	5	12	8	7	4	11	8	8	6	11
9	7	7	10	9	8	4	12	9	10	7	12
10	9	4	12	10	6	3	10	10	NS	NS	NS

Nhóm 13: Salk thương mại (1 Liều)				Nhóm 14: Salk thương mại (2 Liều)				Số nhóm 16			
								Đối chứng âm			
Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3	Chuột số	Tuýp 1	Tuýp 2	Tuýp 3
1	4	7	2	1	6	7	NS	1	0	0	0
2	0	4	6	2	3	8	11	2	0	0	0
3	0	6	5	3	1	7	8	3	0	0	0
4	4	8	9	4	7	8	9	4	0	0	0
5	0	7	3	5	2	5	7	5	0	0	0
6	3	6	3	6	7	8	10	6	0	0	0
7	3	6	6	7	7	6	9	7	0	0	0
8	0	4	6	8	12	7	9	8	0	0	0
9	5	8	5	9	10	9	11	9	0	0	0
10	0	4	5	10	5	8	7	10	0	0	0

Kết quả và giải thích:

1. Vaccin hai giá (IPV + IRV) gây ra sự chuyển dạng huyết thanh cao hơn đáng kể vào ngày 42 so với ngày 0.
2. Liều đơn Sabin IPV ba giá được phát triển tại SIIL có 5:16:10 DU với nhôm gây chuyển dạng huyết thanh tốt hơn so với IPV thương mại.
3. Liều kép Sabin IPV ba giá được phát triển tại SIIL có 2,5: 8: 5 DU với nhôm gây chuyển dạng huyết thanh tốt hơn nhiều so với IPV thương mại.
4. Liều đơn Salk IPV ba giá được tạo ra tại SIIL có 8: 2: 5 DU với nhôm gây chuyển dạng huyết thanh tốt hơn so với IPV thương mại.
5. Liều kép Sabin IPV ba giá được tạo ra tại SIIL có 5: 2: 5 DU với nhôm gây chuyển dạng huyết thanh tốt hơn nhiều so với IPV thương mại.

Ví dụ 9: Các chế phẩm vaccin kết hợp sáu giá bao gồm IPV liều thấp, virus Rota bất hoạt, D, T, wP và liên hợp PRP Hib-protein được trình bày dưới đây:

Bảng 8: Chế phẩm sáu giá-1 có Salk IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 1A	Chế phẩm 1B	Chế phẩm 1C	Chế phẩm 1D	Chế phẩm 1E	Chế phẩm 1F	Chế phẩm 1G	Chế phẩm 1H
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf							
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf							
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU							
4	Virut bại liệt chủng Salk bất hoạt								
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg							
6	Liên hợp PRP Hib - CRM ₁₉₇	10 µg theo hàm lượng PRP							
7	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺							
8	2-Phenoxyetanol	3,25 mg							
9	L-Histidin	1,55 mg							
10	WFI	lượng vừa đủ							

Bảng 9: Chế phẩm sáu giá-2 có Salk IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 2A	Chế phẩm 2B	Chế phẩm 2C	Chế phẩm 2D	Chế phẩm 2E	Chế phẩm 2F	Chế phẩm 2G	Chế phẩm 2H
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf							
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf							
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào	15 IOU							
4	Virus bại liệt chủng Salk bất hoạt								
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Virus Rota bất hoạt (IRV)	10 µg							
6	Liên hợp PRP Hib -TT	5 µg theo hàm lượng PRP							
7	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺							
8	2-Phenoxyetanol	3,25 mg							
9	L-Histidin	1,55 mg							
10	WFI	lượng vừa đủ							

Bảng 10: Chế phẩm sáu giá-3 có Sabin IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 3A	Chế phẩm 3B	Chế phẩm 3C
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf		
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf		
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU		
4	Virut bại liệt chủng Sabin bất hoạt			
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	5	2,5	5
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	16	8	8
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	5	10
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg		
6	Liên hợp PRP Hib- CRM ₁₉₇	10 µg theo hàm lượng PRP		
7	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺		
8	2-Phenoxyetanol	3,25 mg		
9	L-Histidin	1,55 mg		
10	WFI	lượng vừa đủ		

Bảng 11: Chế phẩm sáu giá-4 có Sabin IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 4A	Chế phẩm 4B	Chế phẩm 4C
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf		
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf		
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU		
4	Virut bại liệt chủng Sabin bất hoạt			
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	5	2,5	5
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	16	8	8
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	5	10
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg		
6	Liên hợp PRP Hib-TT	5 µg theo hàm lượng PRP		
7	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺		
8	2-Phenoxyetanol	3,25 mg		
9	L-Histidin	1,55 mg		
10	WFI	lượng vừa đủ		

Ví dụ 10: Quy trình sản xuất các chế phẩm vaccin kết hợp sáu giá bao gồm IPV liều thấp, virut Rota bất hoạt, D, T, wP và liên hợp PRP Hib-protein được trình bày dưới đây:

a) Bán thành phẩm IPV (Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6.

b) D được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5, thêm T và trộn bằng cách khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ.

c) Các dung dịch thu được ở bước a và b được trộn lẫn, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.

d) kháng nguyên wP và histidin được thêm vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C.

e) Liên hợp PRP Hib và 2-PE được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước d ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6.

f) NaCl và nước tiêm (lượng vừa đủ) được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước e, sau đó khuấy trong 2 giờ.

Liên hợp PRP Hib-protein mang được sản xuất theo quy trình gắn và sau đó được pha trộn ở nhiệt độ thấp với chất ổn định cho thấy sự ổn định cao hơn với PRP tự do tối thiểu và cải thiện khả năng gây miễn dịch. Ngoài ra, việc bổ sung kháng nguyên ho gà toàn tế bào ở giai đoạn sau trong hỗn hợp sẽ giảm thiểu sự phân hủy do thủy phân và tạo ra kháng nguyên wP ổn định và gây miễn dịch.

Ví dụ 11: Các chế phẩm vaccin kết hợp bảy giá bao gồm IPV liều thấp, virus Rota bất hoạt, D, T, wP, HBsAg và liên hợp PRP Hib-protein được trình bày dưới đây:

Bảng 12: Chế phẩm 7 giá-5 có Salk IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 5A	Chế phẩm 5B	Chế phẩm 5C	Chế phẩm 5D	Chế phẩm 5E	Chế phẩm 5F	Chế phẩm 5G	Chế phẩm 5H
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf							
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf							
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU							
4	Virut bại liệt chủng Salk bất hoạt								
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg							
6	Liên hợp PRP Hib- CRM ₁₉₇	10 µg theo hàm lượng PRP							
7	HbsAg	12,5 µg							

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 5A	Chế phẩm 5B	Chế phẩm 5C	Chế phẩm 5D	Chế phẩm 5E	Chế phẩm 5F	Chế phẩm 5G	Chế phẩm 5H
8	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺							
9	2-Phenoxyetanol	3,25 mg							
10	L-Histidin	1,55 mg							
11	WFI	lượng vừa đủ							

Bảng 13: Chế phẩm 7 giá-6 có Salk IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 6A	Chế phẩm 6B	Chế phẩm 6C	Chế phẩm 6D	Chế phẩm 6E	Chế phẩm 6F	Chế phẩm 6G	Chế phẩm 6H
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf							
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf							
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU							
4	Virus bại liệt chủng Salk bất hoạt Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 6A	Chế phẩm 6B	Chế phẩm 6C	Chế phẩm 6D	Chế phẩm 6E	Chế phẩm 6F	Chế phẩm 6G	Chế phẩm 6H
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Virus Rota bất hoạt (IRV)	10 µg							
6	Liên hợp PRP Hib-TT	5 µg theo hàm lượng PRP							
7	HbsAg	12,5 µg							
8	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺							
9	2-Phenoxyetanol	3,25 mg							
10	L-Histidin	1,55 mg							
11	WFI	lượng vừa đủ							

Bảng 14: Chế phẩm 7 giá-7 có Sabin IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 7A	Chế phẩm 7B	Chế phẩm 7C
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf		
2	Biến độc tố uốn ván (TT)	7,5 Lf		
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU		
4	Virut bại liệt chủng Sabin bất hoạt			
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	5	2,5	5
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	16	8	8
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	5	10
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg		
6	Liên hợp PRP Hib- CRM ₁₉₇	10 µg theo hàm lượng PRP		
7	HbsAg	12,5 µg		
8	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺		
9	2-Phenoxyetanol	3,25 mg		
10	L-Histidin	1,55 mg		
11	WFI	lượng vừa đủ		

Bảng 15: Chế phẩm 7 giá-8 có Sabin IPV liều thấp

STT	Thành phần chế phẩm	Chế phẩm 8A	Chế phẩm 8B	Chế phẩm 8C
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	22,5 Lf		
2	Biến độc tố uốn ván (T)	7,5 Lf		
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> toàn tế bào (wP)	15 IOU		
4	Virut bại liệt chủng Sabin bất hoạt			
	Tuýp I (Đơn vị kháng nguyên D)	5	2,5	5
	Tuýp II (Đơn vị kháng nguyên D)	16	8	8
	Tuýp III (Đơn vị kháng nguyên D)	10	5	10
5	Virut Rota bất hoạt (IRV)	10 µg		
6	Liên hợp PRP Hib-TT	5 µg theo hàm lượng PRP		
7	HbsAg	12,5 µg		
8	Hàm lượng nhôm	Không quá 0,9 mg Al ³⁺		
9	2-Phenoxyetanol	3,25 mg		
10	L-Histidin	1,55 mg		
11	WFI	lượng vừa đủ		

Ví dụ 12: Quy trình sản xuất chế phẩm vacxin kết hợp bảy giá bao gồm IPV liều thấp, virut Rota bất hoạt, D, T, wP, HBsAg và liên hợp PRP Hib-protein được trình bày dưới đây:

a) Bán thành phẩm IPV (chủng Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6.

- b) HbsAg được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 6,0-6,5.
- c) D được hấp phụ trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5 và bổ sung T.
- d) Trộn lẫn dung dịch thu được ở bước b và c, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5 và được khuấy trộn ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ.
- e) Các hỗn hợp trên (thu được ở bước a và d) được bổ sung, sau đó được điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.
- f) Kháng nguyên wP và histidin được thêm vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C.
- g) Liên hợp protein PRP Hib và 2-PE được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước f ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6.
- h) NaCl và WFI (lượng vừa đủ) được thêm vào hỗn hợp thu được ở bước g, sau đó khuấy trong 2 giờ.

Liên hợp PRP Hib-protein mang được sản xuất theo quy trình gắn và sau đó được pha trộn ở nhiệt độ thấp với chất ổn định cho thấy sự ổn định cao hơn với PRP tự do tối thiểu và cải thiện khả năng gây miễn dịch. Ngoài ra, việc bổ sung kháng nguyên ho gà toàn tế bào ở giai đoạn sau trong hỗn hợp sẽ giảm thiểu sự phân hủy do thủy phân và tạo ra kháng nguyên wP ổn định và gây miễn dịch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vaccin kết hợp bao gồm:

i) kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt được chọn từ chủng Salk hoặc Sabin;

ii) kháng nguyên virus Rota bất hoạt (Inactivated Rota virus, IRV);

iii) tùy chọn một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm: biến độc tố bạch hầu, biến độc tố uốn ván, kháng nguyên ho gà toàn tế bào, kháng nguyên virus viêm gan B (HbsAg), liên hợp PRP Hib-protein mang, kháng nguyên vi khuẩn viêm màng não mô cầu (*Neisseria meningitidis*) A, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* C, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* W-135, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* Y, kháng nguyên *Neisseria meningitidis* X, kháng nguyên phế cầu khuẩn (*Streptococcus Pneumoniae*), kháng nguyên *Neisseria meningitidis* B dạng bleb hoặc tinh khiết, kháng nguyên *Staphylococcus aureus*, kháng nguyên bệnh than, kháng nguyên bệnh lao BCG, kháng nguyên viêm gan A, kháng nguyên viêm gan B, virus papilloma ở người (HPV), kháng nguyên *Salmonella typhi*, kháng nguyên ho gà vô bào, xyclaza adenylat biến tính, kháng nguyên bệnh sốt rét (RTS, S), Sởi, Quai bị, Rubella, Dengue, Zika, Ebola, Chikungun, viêm não Nhật Bản, kháng nguyên tiêu chảy; và

iv) một hoặc nhiều tá dược là muối nhôm được chọn từ nhóm gồm nhôm hydroxit và nhôm photphat;

trong đó, kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt là chế phẩm liều thấp chủng virus bại liệt bất hoạt, kháng nguyên được chọn nhóm bao gồm:

i.a) thành phần liều bao gồm tổ hợp Sabin tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 5-16-10 đơn vị kháng nguyên D;

i.b) thành phần liều bao gồm tổ hợp Sabin tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 2,5-8-5 đơn vị kháng nguyên D;

i.c) thành phần liều bao gồm tổ hợp Sabin tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 5-8-10 đơn vị kháng nguyên D;

i.d) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 7,5-16-10 đơn vị kháng nguyên D;

i.e) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 8-2-5 đơn vị kháng nguyên D;

i.f) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 10-2-5 đơn vị kháng nguyên D;

i.g) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 10-2-10 đơn vị kháng nguyên D;

i.h) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 10-2-12 đơn vị kháng nguyên D;

i.i) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 10-2-16 đơn vị kháng nguyên D;

i.j) thành phần liều bao gồm tổ hợp Salk tuýp 1, tuýp 2, tuýp 3 với lượng tương ứng 5-2-5 đơn vị kháng nguyên D;

trong đó kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt được hấp phụ trên tá dược nhôm hydroxit.

2. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên virus bại liệt liều thấp được hấp phụ trên tá dược nhôm hydroxit có nồng độ Al^{3+} trong khoảng 0,1-2,5 mg/liều và tỷ lệ hấp phụ ít nhất 70%.

3. Vacxin theo điểm 2, trong đó kháng nguyên virus bại liệt liều thấp được hấp phụ trên tá dược nhôm hydroxit có nồng độ Al^{3+} trong khoảng 0,1-0,7 mg/liều và tỷ lệ hấp phụ ít nhất 90%.

4. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) là virus Rota bất hoạt bằng nhiệt có thể tiêm được được chọn từ nhóm bao gồm các chủng CDC-9, CDC-66 hoặc chủng virus Rota bất hoạt bất kỳ khác và được hấp phụ

trên tá được nhôm hydroxit có nồng độ Al^{3+} trong khoảng 0,1-2,5 mg/liều và tỷ lệ hấp phụ ít nhất 70%.

5. Vacxin theo điểm 4, trong đó kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) là chủng virus Rota CDC-9 bất hoạt bằng nhiệt được hấp phụ trên tá được nhôm hydroxit có nồng độ Al^{3+} trong khoảng 0,1-0,5 mg/liều và tỷ lệ hấp phụ ít nhất 90%.

6. Vacxin theo điểm 1, trong đó các kháng nguyên D và T được hấp phụ lên tá được nhôm phosphat.

7. Vacxin theo điểm 1, trong đó D và T được tinh chế bằng sắc ký thẩm thấu gel với nhựa được chọn từ nhóm bao gồm: Sephacryl S-300 HR, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (polyacrylamit liên kết chéo), gel agarozavà Styragel.

8. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên ho gà là kháng nguyên vô bào bao gồm một hay nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm adenylat xyclaza biến tính, biến độc tố ho gà (PT), ngưng kết tố hồng cầu dạng sợi (FHA), Pertactin (P69 hoặc PRN), và protein tua viền (FIM 1, 2 và 3).

9. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên ho gà là kháng nguyên ho gà toàn tế bào bất hoạt bao gồm một hay nhiều chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229.

10. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hib là polysaccharit PRP Hib được gắn với protein mang sử dụng hóa chất gắn xyanua hóa, trong đó chất phản ứng xyanua hóa được chọn từ nhóm bao gồm 1-xyano-4-dimetylaminpyridin tetraflorat (CDAP), 1-xyano-4-pyrrolidinpyridin tetraflorat (CPPT), 1-xyanoimidazol (1-CI), 1-xyanobenzotriazol (1-CBT) hoặc 2-xyanopyridazin-3(2H)one (2-CPO); và protein mang được chọn từ nhóm bao gồm CRM₁₉₇, biến độc tố bạch hầu, phức hợp màng ngoài của *Neisseria meningitidis*, mảnh C của biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà, protein D của *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*, phức hợp màng ngoài c (OMPC), protein lỗ xuyên màng (porin), protein liên kết transferrin, pneumolysin, protein bề mặt phế cầu khuẩn (A) (PspA), yếu tố bám dính bề mặt phế cầu khuẩn A (PsaA), PhtD phế cầu khuẩn, protein bề mặt phế

cầu khuẩn BVH-3 và BVH-11, kháng nguyên bảo vệ (PA) của *Bacillus anthracis*, và yếu tố phù (EF) giải độc và yếu tố gây chết (LF) của *Bacillus anthracis*, ovalbumin, hemoxyanin ốc đá lỗ khóa (KLH), albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò (BSA) và dẫn xuất protein tinh khiết của tuberculin (PPD), peptit tổng hợp, protein sốc nhiệt, protein ho gà, xytokin, lymphokin, hormon, các yếu tố tăng trưởng, protein nhân tạo bao gồm nhiều quyết định kháng nguyên tế bào T CD4+ của người từ các kháng nguyên có nguồn gốc mầm bệnh khác nhau như N 19, protein hấp thu sắt, độc tố A hoặc B từ protein *C. difficile* và *S. Agalactiae*.

11. Vacxin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên HbsAg là kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm phosphat.

12. Vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin bao gồm ít nhất một chất bảo quản được chọn từ nhóm bao gồm benzethonium clorua, 2-phenoxyetanol, phenol, thiomersal, và formaldehyt.

13. Vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin kết hợp là chế phẩm vacxin hai giá bao gồm IPV liều thấp và IRV bất hoạt.

14. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng liều của tuýp 1, tuýp 2, và tuýp 3 của chủng Salk theo IPV được chọn từ nhóm bao gồm i) 8 đơn vị kháng nguyên D, 2 đơn vị kháng nguyên D, 5 đơn vị kháng nguyên D; ii) 10 đơn vị kháng nguyên D, 2 đơn vị kháng nguyên D, 10 đơn vị kháng nguyên D; và iii) 10 đơn vị kháng nguyên D, 2 đơn vị kháng nguyên D, 16 đơn vị kháng nguyên D.

15. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng của tuýp 1, tuýp 2, và tuýp 3 của chủng Sabin theo IPV là 5-16-10 đơn vị kháng nguyên.

16. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng của kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) là 1-30 µg/liều.

17. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng của kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) là 2,5 µg/liều.

18. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng của kháng nguyên virus Rota bất hoạt (IRV) là 5 µg/liều.

19. Vacxin theo điểm 13, trong đó hàm lượng của kháng nguyên virus Rota bất hoạt là 10 µg/liều.

20. Vacxin theo điểm 13, trong đó tổng lượng nhôm (Al^{3+}) ở hàm lượng không quá 1 mg/liều.

21. Vacxin theo điểm 1, trong đó i) biến độc tố bạch hầu và biến độc tố uốn ván tinh khiết thu được bằng cách sử dụng sắc ký thẩm thấu gel có hàm lượng monome ít nhất 80%; ii) liên hợp PRP Hib-protein mang được sản xuất bằng quy trình gắn xyanua hóa và sau đó trộn ở nhiệt độ thấp với sự có mặt của tá dược cho thấy độ ổn định lớn hơn, giảm thiểu sự giải phóng PRP tự do và cải thiện khả năng gây miễn dịch; và iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào được bổ sung vào giai đoạn sau trong quá trình trộn sẽ giảm thiểu sự phân hủy do thủy phân và tạo ra kháng nguyên wP ổn định và gây miễn dịch.

22. Vacxin theo điểm 1, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của kháng nguyên virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-protein có mặt với số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; và L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg.

23. Vacxin theo điểm 22, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng

10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg.

24. Vacxin theo điểm 22, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với số lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg.

25. Vacxin theo điểm 1, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-protein có mặt với số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; và L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg.

26. Vacxin theo điểm 25, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg.

27. Vacxin theo điểm 25, bao gồm D, T, wP, Hib, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg thành phần PRP; hàm lượng nhôm (Al³⁺) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với số lượng 1,55 mg.

28. Vacxin theo điểm 1, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của kháng nguyên virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-protein có mặt với số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 5-30 µg; hàm lượng nhôm (Al³⁺) tổng số có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với số lượng khoảng 2-6 mg; và L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg.

29. Vacxin theo điểm 28, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của kháng nguyên virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm (Al³⁺) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg.

30. Vacxin theo điểm 28, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Salk bất hoạt liều thấp của kháng nguyên virus bại

liệt tuýp 1 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 2 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 hoặc 16 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với số lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm (Al³⁺) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg.

31. Vaccin theo điểm 1, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với số lượng trong khoảng 1-50 Lf; T có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 Lf; wP có mặt với số lượng trong khoảng 10-50 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với số lượng trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 trong khoảng 1-20 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với số lượng trong khoảng 1-30 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-protein có số lượng trong khoảng 2-20 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng trong khoảng 5-30 µg; hàm lượng nhôm có mặt với lượng khoảng 0,4-1,5 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng khoảng 2-6 mg; và L-Histidin có mặt với lượng khoảng 0,5-5 mg.

32. Vaccin theo điểm 31, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị kháng nguyên D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị kháng nguyên D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-TT có mặt với lượng 5 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg; hàm lượng nhôm (Al³⁺) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg.

33. Vaccin theo điểm 31, bao gồm D, T, wP, Hib, HbsAg, kháng nguyên IPV và IRV, trong đó D có mặt với lượng 22,5 Lf; T có mặt với số lượng 7,5 Lf; wP có mặt với số lượng 15 IOU; chủng Sabin bất hoạt liều thấp của virus bại liệt tuýp 1 có mặt với lượng 5 đơn vị D, tuýp 2 có mặt với lượng 16 đơn vị D, tuýp 3 có mặt với lượng 10 đơn vị D; IRV có mặt với lượng 10 µg; liên hợp PRP *H. influenzae* tuýp b-CRM₁₉₇ có mặt với lượng 10 µg thành phần PRP; HbsAg có mặt với lượng 12,5 µg;

hàm lượng nhôm (Al^{3+}) tổng số không quá 0,9 mg; 2-Phenoxyetanol có mặt với lượng 3,25 mg; và L-Histidin có mặt với lượng 1,55 mg.

34. Vaccin theo điểm 1, trong đó các kháng nguyên IPV và IRV được hấp phụ riêng rẽ trên nhôm hydroxit; và các kháng nguyên khác hoặc không được hấp phụ hoặc được hấp phụ trên muối nhôm được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm hydroxit, hoặc hỗn hợp của chúng.

35. Vaccin theo điểm 1, trong đó vaccin bao gồm tá dược bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm histidin, sucroza, glyxin, và natri clorua; tốt hơn nữa là histidin có nồng độ trong khoảng 5-40 mM.

36. Quy trình sản xuất vaccin kết hợp theo điểm 1, quy trình bao gồm các bước:

a) hấp phụ riêng rẽ bán thành phẩm IPV (chủng Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV trên nhôm hydroxit; và

b) trộn các bán thành phẩm IPV và IRV đơn giá và giữ hỗn hợp ở 2-8°C trên máy lắc trong 2 giờ.

37. Quy trình sản xuất vaccin kết hợp (sáu giá) theo điểm 1, quy trình bao gồm các bước:

a) hấp phụ riêng rẽ bán thành phẩm IPV (Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6;

b) hấp phụ D trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5, thêm T và trộn bằng cách khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ;

c) bổ sung các hỗn hợp trên (dung dịch thu được ở bước a và b), sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút;

d) thêm kháng nguyên wP và chất ổn định vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C;

e) thêm liên hợp PRP Hib và 2-Phenoxyetanol (2-PE) vào hỗn hợp thu được ở bước d ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6; và

f) bổ sung NaCl và nước tiêm (lượng vừa đủ) vào hỗn hợp thu được ở bước e, sau đó khuấy trong 2 giờ.

38. Quy trình sản xuất vacxin kết hợp (bảy giá) theo điểm 1, quy trình bao gồm các bước:

a) hấp phụ riêng rẽ bán thành phẩm IPV (chủng Sabin/Salk) và bán thành phẩm IRV trên nhôm hydroxit, sau đó điều chỉnh pH về 6,2-6,6;

b) hấp phụ HbsAg trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 6,0-6,5;

c) hấp phụ D trên nhôm phosphat, sau đó điều chỉnh pH về 5,5-6,5 và bổ sung T;

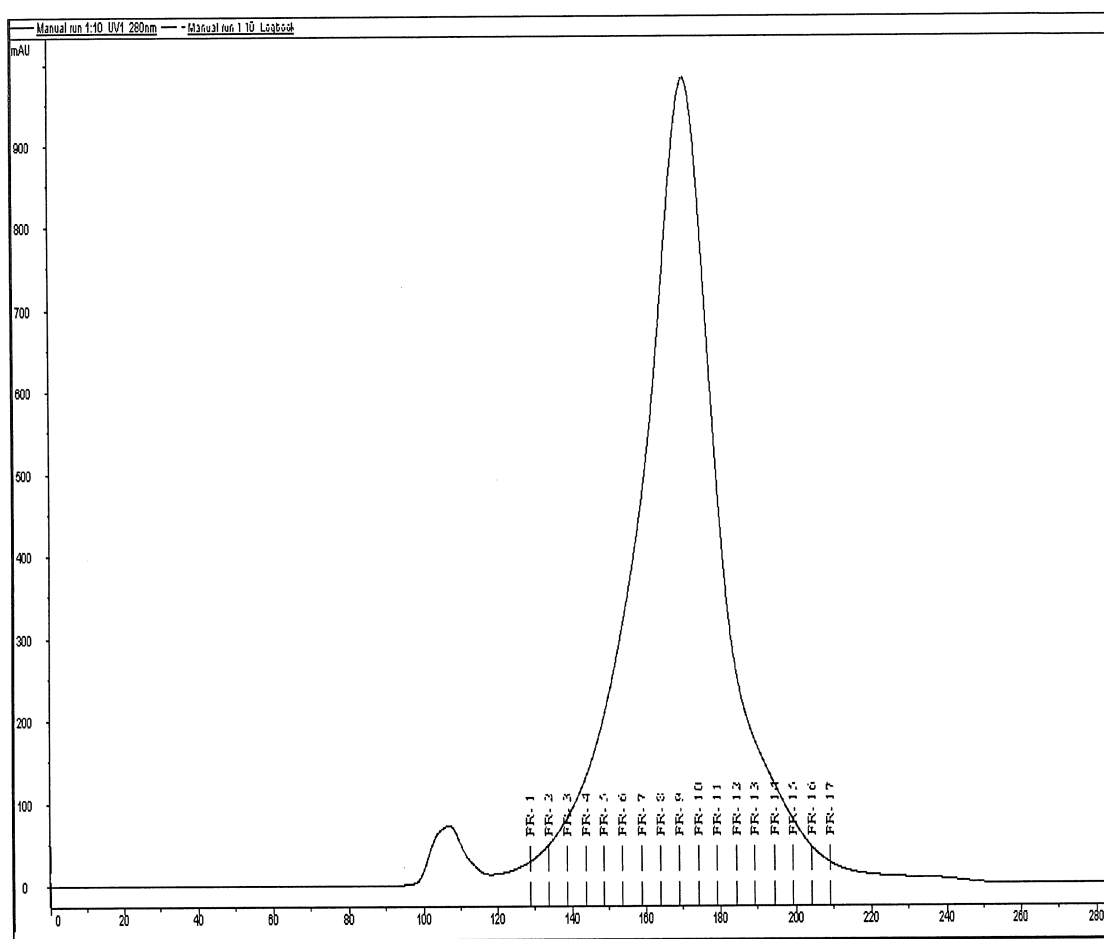
d) trộn các hỗn hợp thu được ở bước b và c, bằng cách khuấy trộn ở nhiệt độ phòng trong 18-24 giờ;

e) bổ sung các hỗn hợp trên (thu được ở bước a và d), sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6 và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút;

f) bổ sung kháng nguyên wP và chất ổn định vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trong 60 phút và để trong điều kiện tĩnh qua đêm ở 2-8°C;

g) thêm liên hợp PRP Hib và 2-PE vào hỗn hợp thu được ở bước d ở 2-8°C, sau đó điều chỉnh pH về 6,4-6,6; và

h) thêm NaCl và WFI (lượng vừa đủ) vào hỗn hợp thu được ở bước e, sau đó khuấy trong 2 giờ.



Trục X: Thể tích (ml)

Trục Y: UV @ 280 nm (mAU)

Fig. 1