



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038325

(51)⁷ A61K 39/15; A61P 31/14; A61K 39/00; (13) B
A61K 39/12

(21) 1-2019-00255

(22) 13/06/2017

(86) PCT/IN2017/050237 13/06/2017

(87) WO 2017/216808 21/12/2017

(30) 201641020675 16/06/2016 IN

(45) 25/01/2024 430

(43) 26/08/2019 377A

(73) BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED (IN)

Genome Valley, Turkapally, Shameerpet, Hyderabad 500078, India

(72) Krishna Mohan VADREVVU (IN); Sai Devarajulu PRASAD (IN); Krishna Murthy
ELLA (IN).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CHẾ PHẨM VACCIN ROTAVIRUT LÔNG

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin rotavirus lỏng có thể tích liều lượng thấp ổn định trong axit không chứa chất đệm. Vaccin này có thể dùng được với thể tích liều lượng ít hơn 1ml cho mỗi liều lượng dùng qua đường miệng và không chứa chất đệm bất kỳ. Vaccin này không cần dùng chất chống axit trước hoặc sau khi dùng vaccin qua đường miệng cho đối tượng để trung hòa axit dạ dày. Vaccin này minh họa sự sụt giảm không đáng kể về chuẩn độ vaccin ở độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4 trong khoảng thời gian 30 phút. Vaccin này là ổn định ở nhiệt độ -20°C trong thời gian ít nhất là 60 tháng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin rotavirus. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vaccin rotavirus mà không chứa dung dịch đệm hoặc không cần chất kháng axit bất kỳ trước khi, trong khi hoặc sau khi dùng vaccin rotavirus này. Sáng chế còn đề cập đến lĩnh vực lượng thể tích liều lượng cho mỗi đơn vị vaccin, đặc biệt là vaccin rotavirus.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rõ rằng rotavirus là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh viêm dạ dày-ruột nghiêm trọng ở trẻ sơ sinh và ở trẻ nhỏ trên toàn thế giới. Ngay cả sự cải thiện về vệ sinh, chất lượng và vệ sinh nước mà thường có thể kiểm soát nhiều loại vi khuẩn và các vật ký sinh mà chịu trách nhiệm cho sự gây ra các dạng bệnh tiêu chảy khác cũng vẫn là không đủ để phòng ngừa sự lây lan của rotavirus. Do đó, dùng vaccin là cách thức duy nhất có khả năng làm giảm ở mức độ đáng kể gánh nặng do bệnh này gây ra do nhiễm rotavirus ở các nước chậm phát triển và các nước đang phát triển trên toàn cầu. Dùng vaccin là đáng kể hơn đối với các quốc gia mà thiếu hỗ trợ kinh tế cần thiết và cơ sở hạ tầng để đối phó hiện tượng nhiễm rotavirus ở các bệnh nhân đã bị nhiễm. Cho đến nay, có ít nhất bốn loại vaccin rotavirus đã được thương mại hóa trên thế giới, loại đầu tiên trong số này là Rotashield® do Wyeth Holdings cung cấp, vào năm 1999. Đây là vaccin rotavirus sống, hóa trị bốn, dùng qua đường miệng tạo ra được bằng cách sử dụng 1 rotavirus của khi nâu, 3 vaccin kết hợp các virus của khi nâu và của người đã được cấp phép lưu hành ở Mỹ. Tuy nhiên, sản phẩm này bị rút khỏi thị trường sau 14 tháng do các tác dụng phụ đi kèm liên quan đến bệnh lồng ruột.

Rotashield® bao gồm hỗn hợp chứa, sucroza, mononatri glutamat, kali monophosphat, kali diphosphat, huyết thanh bào thai bò và neomycin sulphat trong môi trường amphotericin. Công bố patent tương ứng về các chế phẩm vaccin rotavirus WO2000006196A2 bộc lộ rằng các chế phẩm vaccin này có thể chứa các chất phụ trợ được dùng nếu cần để gần giống các điều kiện sinh lý, như các chất điều chỉnh độ pH và các chất đệm và các chất tương tự, ví dụ, natri axetat, natri lactat, natri clorua, kali

clorua, canxi clorua, sorbitan monolaurat, tri-etanolamin oleat, xitrat-bicacbonat, hoặc các chất tương tự. Nếu chế phẩm này được dùng qua đường miệng, thì cũng có thể cần cung cấp cho cá thể dung dịch đệm để trung hòa một phần axit của dạ dày và bảo vệ rotavirus kết hợp trên đường đi đến ruột. Dung dịch đệm thích hợp cho ứng dụng này bao gồm natri bicacbonat, xitrat bicacbonat, hoặc dung dịch đệm tương tự.

RotaTeq®, là vaccin kết hợp hóa trị năm của người và của bò (WC3) sống giảm độc lực dùng qua đường miệng do Merck & Co. sản xuất, chứa chủng rotavirus của bò WC3, P7[5]G6 bao gồm 5 dạng kết hợp; trong số đó 4 dạng kết hợp với gen VP7 từ G1, G2, G3, hoặc G4 và 1 dạng kết hợp với gen VP4 P1A[8] từ chủng gốc rotavirus của người với phần còn lại của gen từ rotavirus gốc của bò WC3. Chế phẩm vaccin (các công bố đơn sáng chế tương ứng của Merck viz. WO1998/13065, WO2001/08495 và WO2002/011540) chứa một số chất làm ổn định trong môi trường nuôi cấy mô cùng với sự có mặt của các dung dịch đệm trong chính hỗn hợp này, dung dịch đệm này là natri xitrat và natri phosphat. Carboxylat theo các điểm yêu cầu bảo hộ đã được cấp bằng sáng chế được sử dụng và hoạt động như dung dịch đệm để tạo ra kháng nguyên rotavirus chịu đựng tính axit của dạ dày khi kháng nguyên của virus được dùng vào dạ dày của trẻ sơ sinh.

Tiếp theo, Rotarix® là vaccin hóa trị một, chứa chủng rotavirus RIX4414 của người đã được cấy truyền thu được từ chủng 89-12. Rotarix® (do GlaxoSmithKline Biologicals sản xuất), là vaccin sống mà chứa chủng rotavirus của người P[8] hóa trị một G1 đã được làm giảm độc lực. Vaccin này sẵn có ở dạng khô lạnh đã được trộn với các chất làm ổn định, cần được hoàn nguyên bằng dung dịch đệm pha loãng trên cơ sở canxi cacbonat trước khi dùng vaccin cho đối tượng.

Rotarix được bào chế bằng cách hoàn nguyên thành phần hoạt tính đã được đông khô lạnh (chủng RIX4414 + các tá dược) với 1,0ml dung dịch đệm CaCO_3 của GSK chứa trong bơm tiêm đã nạp. Sau khi tiêm dung dịch đệm vào lọ chứa vaccin đã được làm đông khô lạnh này, lọ này được lắc kỹ để tái tạo huyền phù vaccin. Sau đó, toàn bộ thể tích của sản phẩm đã được tái tạo huyền phù được rút vào cùng một bơm tiêm, kim tiêm (hoặc thiết bị chuyển) của bơm tiêm này được loại bỏ, và sản phẩm được dùng ngay ở dạng một liều đơn dùng qua đường miệng. Theo cách khác, việc hoàn nguyên của vaccin thương phẩm đã được làm đông khô lạnh sẽ theo cùng các

quy trình, bằng cách sử dụng dụng cụ để dùng qua đường miệng đã được nạp dung dịch đệm và thiết bị tiếp hợp chuyển thay cho bơm tiêm và kim tiêm. Vaccin hoàn nguyên về hình thức sẽ có màu trắng sữa. Nó cần được kiểm tra bằng mắt thường về vật chất dạng hạt và/hoặc sự mất màu, và không được dùng nếu xảy ra một trong số các tình trạng này. Rotarix sẽ được dùng qua đường miệng. Trẻ sơ sinh nên được đặt ở vị trí ngòai dựa, và toàn bộ dung lượng của dụng cụ cho dùng qua đường miệng chứa vaccin hoàn nguyên nên được dùng ở phần giữa má. Rotarix không nên được dùng bằng cách tiêm. Do vậy, dường như rằng, việc hoàn nguyên dung dịch đệm pha loãng gồm quá nhiều bước, từ việc đảm bảo rằng việc hoàn nguyên được thực hiện một cách đúng đến việc dùng vaccin. Tất cả các yếu tố này vốn làm giảm sự tuân thủ vaccin, góp phần bảo vệ một phần khỏi nhiễm rotavirus hơn là đạt được mức bảo vệ hoàn toàn.

Các đơn đăng ký sáng chế tương ứng của GSK về các chế phẩm vaccin rotavirus có số công bố quốc tế WO2001/012797, WO2005/02133, WO2006/087205, mà bao gồm chủng rotavirus sống đã bị giảm độc lực P43 đã được cấy truyền từng kỳ với các đột biến cụ thể còn được bổ sung dung dịch đệm kháng axit để hoàn nguyên. Protein G của chủng rotavirus này (VP4 và VP7) có khả năng gây đáp ứng miễn dịch đối với ít nhất là 4 chủng rotavirus khác đối với G1 và ít nhất là một trong số các typ huyết thanh G2 đến G14.

Các chế phẩm vaccin rotavirus đã được cấp bằng sáng chế khác với các chất làm ổn định và các dung dịch đệm do Bharat Biotech International Limited cung cấp với chủng không có triệu chứng của Ấn độ 116E phân lập được từ trẻ nhỏ cũng đã được bộc lộ. Các chủng này đòi hỏi dùng riêng dung dịch đệm kháng axit cho người nhận vaccin trước khi nhận vaccin này để tăng độ pH của dạ dày, trong đó dung dịch đệm kháng axit này là dung dịch đệm xitrat-phosphat, để trung hòa độ axit của dạ dày tại thời điểm dùng kháng nguyên vaccin rotavirus này. Công bố đơn sáng chế WO2013160913 đề cập đến các chế phẩm vaccin rotavirus chứa các kháng nguyên của rotavirus, các chất làm ổn định và một số tổ hợp dung dịch đệm mới. Các dung dịch đệm theo sáng chế được trộn sơ bộ trong các chế phẩm vaccin rotavirus để trung hòa độ pH rất axit của dạ dày mà không cần dùng riêng chất kháng axit trước khi dùng vaccin.

Do vậy, rõ ràng rằng các vaccin rotavirus khác nhau đã được phát triển bằng cách sử dụng các chủng khác nhau, cả hai loại kết hợp của người và của động vật. Có một vài khác biệt quan trọng về đặc tính của các chủng này, các khác biệt điển hình được liệt kê dưới đây.

Vaccin rotavirus với các chủng của người	Vaccin rotavirus kết hợp của động vật
Nhiễm tự nhiên đem lại tác dụng bảo vệ đối với lần nhiễm rotavirus tiếp theo.	Rotavirus của động vật thường là các chủng đã được giảm độc lực, mà làm giảm mức độ sao chép ở người.
Các virus của người có khả năng sao chép cao ở vật chủ, và do đó bị giảm độc lực bằng nhiều lần cấy truyền giống cây mô ở nhiều vật chủ. Vì có các chủng của người, chuẩn độ vaccin bằng 10^4 FFU/0,5ml là đủ để gây ra tính tạo miễn dịch cần thiết chống nhiễm rotavirus ở người.	Các vaccin rotavirus với các chủng kết hợp của động vật đòi hỏi chuẩn độ vaccin rất cao để có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch cần thiết.
Phổ sinh miễn dịch rộng có được thông qua các cơ chế tác động miễn dịch khác nhau.	Mong đợi rằng cần trung hòa kháng thể trong khoang ruột. Tính miễn dịch đạt được không cao như các vaccin với các chủng của người.
Đạt được tác dụng bảo vệ khác chủng thông qua phổ đáp ứng miễn dịch rộng. Điều này có nghĩa là, nó đem lại tác dụng bảo vệ chéo đối với các chủng khác nhau.	Các cấu trúc vaccin kết hợp bao gồm các kháng nguyên thông thường của rotavirus của người.

Bảng 1: Các khác biệt giữa các vaccin kết hợp hóa trị một của người và của động vật

Nguyên lý của sáng chế

Do vậy, đã biết rằng rotavirut là rất nhạy với các môi trường có tính axit (Estes, M., Graham, D., Smith, E. and Gerba, C. (1979). *Rotavirus Stability and Inactivation. Journal of General Virology*, 43(2), pp,403-409). Cũng đã có thông báo rằng bệnh viêm dạ dày ruột virut ở trẻ sơ sinh trở nên không ổn định và có hiện tượng sụp tan lớp vỏ ngoài của chúng và các capsome khi được đưa đến môi trường có độ pH thấp hơn 3.0 (Palmer, E., Martin, M. and Murphy, F. (1977). *Morphology and Stability of Infantile Gastroenteritis Virus: Comparison with Reovirus and Bluetongue virus. Journal of General Virology*, 35(3), pp. 403-414). Cũng đã có thông báo rằng nhiều chủng rotavirut bị bất hoạt trong vòng một phút khi được cho tiếp xúc với môi trường có độ pH=2, và các kết quả tương tự thu được với dịch vị dạ dày của người có độ pH=1,8 (Weiss, C. and Clark, H. (1985). *Rapid Inactivation of Rotaviruses by Exposure to Acidic Gastric Juice. Journal of General Virology*, 66(12), pp. 2725-2730). Cũng đã có thông báo rằng rotavirut typ huyết thanh 1 của người bị bất hoạt hoàn toàn khi được đưa đến môi trường có độ pH=2,5 (Meng, Z., Birch, C., Heath, R. and Gust, I. (1987). *Physicochemical Stability and Inactivation of Human and Simian Rotaviruses. Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), pp. 727-730). Nói chung, đã biết rằng rotavirut là rất không ổn định khi được đưa đến các môi trường có tính axit và nhanh chóng bị bất hoạt. Tỷ lệ bất hoạt của ba rotavirut của bò và vài rotavirut có nguồn gốc từ động vật linh trưởng được xác định khi tiếp xúc với các dung dịch đệm axit ở độ pH=2,0, độ pH=3,0 hoặc độ pH=4,0. Mỗi rotavirut bị bất hoạt rất nhanh chóng ở độ pH=2,0 (độ axit gần giống như dạ dày bình thường ở trạng thái đói), trong đó thời gian bán tồn đối với tính gây nhiễm được xác định là 1 phút hoặc ngắn hơn. Mỗi rotavirut bị bất hoạt với tốc độ chậm hơn nhiều ở độ pH=3,0; mức bất hoạt ở độ pH=4,0 là tối thiểu. Một số khác biệt về tính kháng axit giữa các chủng rotavirut khác nhau được phát hiện. Mặc dù các bước xác định này được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng (23°C), các thử nghiệm ở các nhiệt độ khác nhau biểu thị tốc độ bất hoạt virut thậm chí nhanh hơn nhiều nhờ axit ở nhiệt độ bình thường của thân thể (37°C). Các nghiên cứu đối với rotavirut tiếp xúc với dịch vị dạ dày bình thường của người ở độ pH=1,8 hoặc độ pH=2,1, cho thấy tốc độ bất hoạt virut tương tự như quan sát được ở dung dịch đệm glyxin của độ pH đồng nhất. (Tham khảo: Geigy Scientific Tables, volume 1,1981, page 126).

Sự bất hoạt rotavirus xảy ra ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 3,0 nhưng ở độ pH=4,0 sự bất hoạt không xảy ra hoặc chỉ xảy ra ở mức độ tối thiểu. Do dạ dày là môi trường rất axit, buộc phải bổ sung các dung dịch đệm vào các chế phẩm vaccin rotavirus cho đến nay. Các dung dịch đệm trong các chế phẩm rotavirus hỗ trợ việc duy trì độ pH của các chế phẩm vaccin rotavirus không đổi, nhờ đó đem lại cho các chế phẩm vaccin này khả năng kháng axit hoặc đệm. Khả năng kháng axit (còn gọi là khả năng trung hòa axit) của các vaccin rotavirus được đo theo các thử nghiệm Baby Rossett Rice được bộc lộ trong các patent của GSK. Khả năng trung hòa axit có chế phẩm nhất định được xác định là thời gian đo được để duy trì độ pH trên 4,0 và được đánh giá theo thử nghiệm Baby Rossette Rice. Theo thông báo, thử nghiệm Baby Rosset được cho là tái tạo môi trường dịch vị ở dạ dày của người. Patent gần đây nhất của GSK US8821891B2 ủng hộ nồng độ thấp của phosphat, và với nồng độ tăng của carboxylat, tốt hơn là adipat, trong khoảng từ 100mM đến 1M, tốt hơn là 400mM đến 700mM ở thể tích liều lượng thấp đến 1,5ml cho mỗi liều vaccin rotavirus để dùng cho người. Adipat hoạt động như dung dịch đệm có khả năng chịu được mức độ axit cao của dạ dày (độ pH =1 đến 2). Khả năng chịu đựng được tính axit của dạ dày của người được đo theo thử nghiệm Baby Rosset Rice, có trị số nằm trong khoảng 8 phút đến 23 phút mà được cho là có khả năng và đủ tốt để tránh làm bất hoạt kháng nguyên rotavirus trong chế phẩm vaccin sau khi dùng vaccin rotavirus này ở trẻ sơ sinh.

Do đó, để dùng một cách có hiệu quả vaccin rotavirus mà có khả năng gây ra đáp ứng sinh miễn dịch đủ để đem lại tác dụng bảo vệ đối với nhiễm rotavirus, cần ít nhất là 1,5ml đến 2ml vaccin rotavirus hoặc chế phẩm vaccin hoàn nguyên cho mỗi liều cho người để dùng qua đường miệng để cho phép một cách có hiệu quả kháng nguyên rotavirus đi qua môi trường có tính axit cao ở dạ dày. Do đó, nhờ phần mô tả trên đây về tình trạng của bản chất tự nhiên của các vaccin rotavirus hiện có cho đến nay, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng hiểu và xác nhận rằng kháng nguyên rotavirus là kháng nguyên rất không ổn định trong điều kiện axit, và việc dùng vaccin rotavirus luôn cần thành phần kháng axit hoặc thành phần đệm, bằng cách đó làm tăng lượng vaccin cần dùng (xét về liều lượng theo thể tích cho mỗi đơn vị vaccin).

Cũng rõ ràng là kháng nguyên rotavirus là virus rất không ổn định và xem xét đến tình huống khi kháng nguyên của vaccine rotavirus sống bị giảm độc lực sẽ còn kém ổn định hơn; do đó kháng nguyên rotavirus được bổ sung chất ổn định vaccine thích hợp tương ứng để làm ổn định các chế phẩm vaccine này, mà bổ sung đến lượng liều vaccine tính theo thể tích cho mỗi đơn vị vaccine. Hơn thế nữa, việc đưa các dung dịch đệm hoặc các chất kháng axit vào hoặc đòi hỏi hoàn nguyên vaccine bằng chất pha loãng vaccine trên cơ sở dung dịch đệm làm gia tăng lượng liều vaccine tính theo thể tích cho mỗi đơn vị vaccine. Do vậy, việc cung cấp vaccine rotavirus không kèm dung dịch đệm/chất kháng axit hẳn sẽ làm giảm thể tích liều lượng cho mỗi đơn vị vaccine. Tuy nhiên, rõ ràng là vaccine rotavirus không kèm dung dịch đệm này không bị ảnh hưởng về hiệu quả cũng như mức độ ổn định của vaccine rotavirus.

Vì đối tượng nhận vaccine rotavirus luôn là trẻ sơ sinh trong nhóm tuổi từ 6 tuần đến 6 tháng tuổi, rất có khả năng là lượng đáng kể chế phẩm vaccine rotavirus được phân phối vào miệng của trẻ sơ sinh bị tràn ra. Điều này dẫn đến cơ hội dùng một phần vaccine, do đó làm giảm mức độ tuân thủ vaccine và không bảo vệ được gánh nặng về bệnh tật dù tiếp nhận vaccine này. Do đó, luôn mong muốn rằng lượng liều tính theo thể tích cho mỗi đơn vị vaccine rotavirus giảm càng nhiều càng tốt mà không ảnh hưởng đến hiệu quả của chế phẩm vaccine. Thể tích liều lượng thấp nhất hiện nay đã được bộc lộ trong phần tình trạng kỹ thuật đối với vaccine rotavirus nằm trong khoảng từ 1,5ml đến 2,5ml. Các vaccine chứa các chất làm ổn định vaccine và các dung dịch đệm vaccine bổ sung vào tổng thể tích liều vaccine. Như vậy, hiện tượng giảm thể tích liều lượng cho mỗi đơn vị vaccine rotavirus có cùng khả năng gây ra tính sinh miễn dịch cần thiết để phòng bệnh đối với hiện tượng nhiễm rotavirus ở trẻ sơ sinh sẽ làm giảm cơ hội trào ra chế phẩm vaccine được dùng cho trẻ sơ sinh. Do đó, việc tạo ra liều chế phẩm vaccine rotavirus thấp đến 1ml, tốt hơn nếu chỉ là 0,8ml, hoặc tốt nhất nếu chỉ là 0,5ml, cho mỗi liều dùng cho người không có dung dịch đệm mà là hiệu nghiệm bằng hoặc thậm chí hiệu nghiệm hơn các vaccine rotavirus sẵn có với chất đệm hoặc chất kháng axit có thể tích liều lượng cao cho mỗi đơn vị vaccine là hoàn toàn không hiển nhiên.

Các tài liệu trong tình trạng kỹ thuật bộc lộ các chế phẩm vaccine rotavirus mà tất cả đều cần được làm ổn định trong chế phẩm lỏng ở nhiệt độ của tủ lạnh khoảng

$5\pm 3^{\circ}\text{C}$ hoặc ở dạng bột đông khô lạnh mà cần phải hoàn nguyên vaccin trước khi dùng vaccin với chất pha loãng thích hợp. Đã có bàn luận rằng, việc hoàn nguyên vaccin đối với bột đông khô lạnh đòi hỏi kỹ năng đặc biệt, và sự cẩn thận. Ngoài ra, các yêu cầu bảo chế riêng đối với các chất pha loãng cùng với vaccin làm tăng gấp đôi chi phí sản xuất vaccin cũng như chi phí vận chuyển. Sự thiếu hụt về kỹ năng, cẩn thận và cơ sở hạ tầng thích hợp về các yêu cầu đối với kho xưởng tăng thêm vấn đề với nguồn cung cấp vaccin rotavirus đông khô lạnh. Đối với vaccin lỏng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, thời hạn sử dụng của vaccin bị giới hạn chỉ đến 2 năm. Các vaccin có sẵn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C còn đi kèm với hiện tượng sụt chuẩn độ trong quá trình bảo quản và vận chuyển mà là điều không mong muốn. Nhưng đã phát hiện ra rằng hoàn toàn không có hiện tượng hao hụt trong quá trình vận chuyển và bảo quản các chế phẩm vaccin rotavirus ở nhiệt độ -20°C . Cơ hội của nhiễm bẩn vaccin cũng giảm đến mức độ đáng kể hơn đối với các vaccin ở nhiệt độ -20°C . Ngoài ra, phương tiện dự trữ vaccin ở nhiệt độ -20°C đã được thiết lập ở hầu khắp 120 nước trên toàn thế giới để dự trữ vaccin phòng bệnh bại liệt. Do đó, theo các phương tiện hiện có để bảo quản vaccin và dự trữ vaccin tương tự kho dự trữ vaccin phòng bệnh bại liệt sẽ giúp đáng kể trong việc làm giảm gánh nặng do bệnh tật do rotavirus trên thế giới. Mong muốn rằng thiết lập được các cách thay thế, mà theo đó mức ổn định vaccin rotavirus được gia tăng tiếp, sao cho vaccin có thể có mặt ở mọi nơi xa xôi của trái đất này. Do đó, các chế phẩm vaccin rotavirus mới được bộc lộ trong sáng chế, trong đó các chế phẩm vaccin rotavirus là ổn định trong thời gian ít nhất là 5 năm, hoàn toàn mới và chưa từng được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mục đích của sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là tạo ra vaccin rotavirus ổn định ở điều kiện axit và không chứa chất đệm.

Một mục đích chính khác của sáng chế là tạo ra thể tích liều thấp đến 1ml hoặc thậm chí chỉ 0,8ml, tốt hơn là thể tích liều thấp 0,5ml vaccin rotavirus.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tạo ra chế phẩm vaccin rotavirus ổn định với thể tích vaccin thấp đến 0,5ml mỗi liều.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là làm giảm mức trào ra ngoài vaccin rotavirus và giảm đến mức tối thiểu sự lãng phí vaccin kèm theo bởi người nhận vaccin và nhờ đó tăng mức độ tuân thủ vaccin.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tạo ra chế phẩm vaccin rotavirus mà không cần áp dụng bất kỳ kỹ thuật pha loãng hoặc hoàn nguyên cụ thể nào trước khi hoặc trong khi dùng vaccin.

Một mục đích nữa của sáng chế là tạo ra vaccin rotavirus mà là ổn định trong thời gian ít nhất là 5 năm ở nhiệt độ -20°C .

Mục đích tiếp theo của sáng chế là tạo ra thể tích liều thấp vaccin rotavirus mà là ổn định trong thời gian 2 năm ở nhiệt độ $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, và trong thời gian 6 tháng ở nhiệt độ 25°C , và trong thời gian 1 tuần ở 37°C .

Một mục đích nữa của sáng chế là tạo ra chế phẩm vaccin rotavirus không chứa chất đệm, thể tích liều lượng thấp đến 1ml mà là ổn định trong dạ dày ở độ pH=2 đến độ pH=4 trong thời gian ít nhất là 20 phút.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tạo ra chế phẩm vaccin rotavirus không chứa chất đệm, thể tích liều lượng thấp đến 1ml mà là ổn định ở độ pH axit nằm trong khoảng từ 2 đến 4 mà không bổ sung các chất đệm hoặc các tác nhân làm ổn định trong điều kiện axit.

Mục đích tiếp theo của sáng chế là tạo ra chế phẩm vaccin rotavirus không chứa chất đệm, ổn định trong điều kiện axit, thể tích liều lượng thấp mà không cần dùng bất kỳ chất kháng axit hoặc chất đệm nào, trước khi hoặc sau khi hoặc trong khi dùng vaccin cho đối tượng.

Theo cách khác, sáng chế còn có mục đích tạo ra thể tích liều thấp vaccin rotavirus 0,5ml cùng với sự có mặt của chất đệm, mà có tác dụng ngang bằng chống nhiễm rotavirus ở người.

Mục đích tiếp theo của sáng chế là tạo ra thể tích liều thấp vaccin rotavirus không có chất đệm, mà có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch tương đương hoặc mạnh hơn so với các vaccin rotavirus được bổ sung chất kháng axit hoặc các chất đệm trong các chế phẩm vaccin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin, trong đó mức hụt chuẩn độ vaccin rotavirus là không nhiều hơn 0,55 FFU cho mỗi 0,5ml ở độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4 trong thời gian ít nhất là một giờ.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin, trong đó mức hụt chuẩn độ vaccin rotavirus là không nhiều hơn 0,68 FFU cho mỗi 0,5ml ở độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4 trong thời gian ít nhất là 20 phút.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin rotavirus khác nhau với thể tích liều lượng nằm trong khoảng từ 1ml đến 0,5ml, trong đó các chế phẩm vaccin này không chứa bất kỳ chất đệm hoặc chất kháng axit, và minh họa ví dụ giảm không đáng kể chuẩn độ vaccin ở độ pH=2 và pH trong khoảng thời gian 30 phút.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất khả năng trung hòa axit của chế phẩm rotavirus thể tích liều thấp nằm trong khoảng từ 0,5ml đến 1ml cho mỗi đơn vị vaccin so với chế phẩm vaccin rotavirus khi có mặt các chất đệm thiết lập được thông qua thử nghiệm Baby Rosset Rice.

Theo phương án tiếp theo, sáng chế đề xuất vaccin rotavirus không chứa chất đệm có thể tích liều chỉ 0,5ml mà có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch tương đương hoặc mạnh hơn xét theo chuyển đảo huyết thanh bốn lần sau khi dùng vaccin tương tự mức chuyển đảo huyết thanh đạt được với chế phẩm vaccin khi có mặt chất đệm hoặc dùng chất kháng axit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phòng bệnh tiêu chảy ở người do rotavirus, phương pháp này bao gồm các bước dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm vaccin rotavirus ổn định chứa chủng rotavirus 116E, tổ hợp gồm các loại đường được chọn từ sucroza, lactoza và trehaloza, chất thủy phân lactalbumin, albumin tái tổ hợp trong huyết thanh của người, không có bất kỳ chế phẩm đệm nào trong chế phẩm vaccin rotavirus này.

Theo một phương án tiếp nữa, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin rotavirus ổn định, mà là ổn định ở nhiệt độ -20°C trong thời gian ít nhất là 5 năm.

Theo phương án tiếp theo, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin rotavirus ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C , 25°C và 37°C lần lượt trong thời gian 2 năm, 6 tháng và 3 tuần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án 1: Các chế phẩm rotavirus được đệm và độ axit dạ dày

Như đã nêu trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế, việc sử dụng các chất đệm thường được áp dụng đối với chế phẩm vacxin rotavirus, mà có được thực hiện bởi các nhà sản xuất vacxin rotavirus khác nhau cho đến nay, và do đó chế phẩm vacxin Rota chứa chủng 116E ở nhiệt độ -20°C (SPG và DMEM) đã được thử với dung dịch đệm xitrat-bicacbonat, và ban đầu là các điều kiện nước muối thông thường.

Bharat Biotech International Limited thu được các chủng rotavirus của người 116E từ Viện Y tế Quốc gia (National Institute of Health) theo hợp đồng chuyển nguyên liệu với Học viện quốc gia về các bệnh dị ứng và các bệnh lây nhiễm (NIAID), NIH, Bethesda, USA. Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của các chủng rotavirus 116E đã được thông báo trong tài liệu.

Ba chế phẩm vacxin rotavirus với rotavirus 116E được bảo quản ở nhiệt độ -20°C được lấy từ 3 nhóm (Nhóm I, II và III) như nêu chi tiết dưới đây. Các chế phẩm vacxin rotavirus ở cả ba nhóm dưới đây chứa kháng nguyên rotavirus sống bị giảm độc lực của chủng 116E đã được hòa tan trong 10% SPG (sucroza, kali dihydrophosphat, và đikali hydrophosphat) và môi trường thiết yếu tối thiểu của Dulbecco. Các chế phẩm vacxin này được xử lý riêng rẽ như nêu chi tiết dưới đây:

Nhóm I: 0,5ml chế phẩm chứa rotavirus 116 E ở nhiệt độ -20°C .

Nhóm II: 2ml (tương đương 4 liều dùng cho người, mỗi liều dùng cho người 0,5ml) chế phẩm chứa rotavirus 116 E đã được trộn với 5ml nước muối thông thường.

Nhóm III: 0,570ml chế phẩm chứa rotavirus 116 E + hỗn hợp [gồm 1,42ml dung dịch đệm xitrat-bicacbonat + 8ml 34,8 micro đương lượng (mEq) HCl].

Như đã nêu trên, Nhóm I bao gồm chế phẩm vacxin rotavirus ở nhiệt độ -20°C , trong đó chất đệm hoặc nước muối không được bổ sung vào chế phẩm vacxin và chuẩn độ vacxin được đo trong thời gian 120 phút tiếp theo. Ở nhóm II, 2ml chế phẩm vacxin rotavirus 116E (được bảo quản ở nhiệt độ -20°C) được lấy và được bổ sung 5ml nước muối thông thường, và chuẩn độ vacxin được đo ở chuẩn độ đích 10^6 FFU/ml đến 120 phút. Ở nhóm III, 0,57 ml chế phẩm vacxin rotavirus 116E (được bảo quản ở nhiệt

độ -20°C) được lấy và được bổ sung 1,42ml dung dịch đệm xitrat bicacbonat và 8ml 34,8mEq axit clohydric.

Nhóm#	0 phút tính theo FFU/0,5ml	60 phút tính theo FFU/ml	120 phút tính theo FFU/ml	Nhận xét
Nhóm I	$10^{6,35}$	$10^{6,17}$	$10^{6,32}$	Rất ổn định
Nhóm II	$10^{5,76}$	$10^{5,84}$	$10^{5,69}$	Khá ổn định
Nhóm III	$10^{4,61}$	$10^{5,30}$	$10^{5,11}$	Khá ổn định

Bảng 2: Chuẩn độ vaccin của chế phẩm vaccin rotavirus (ở nhiệt độ bảo quản: -20°C) khi có các chất đệm tại thời điểm 0 phút, 60 phút và 120 phút.

Như vậy, bảng trên cho thấy rằng cả khi cho virus tiếp cận với các điều kiện nước muối thông thường và khi có dung dịch đệm, chuẩn độ kháng nguyên rotavirus đều là ổn định, và do đó vaccin này là ổn định.

Phương án 2: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch đối với các chế phẩm vaccin rotavirus ở các độ pH khác nhau.

Ví dụ 1: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch được thực hiện sau khi đưa các chế phẩm vaccin rotavirus trực tiếp đến môi trường có tính axit bằng cách trực tiếp bổ sung 34,8mEq axit clohydric (HCl) vào chế phẩm vaccin rotavirus. Độ pH của các chế phẩm vaccin này được giảm thẳng từ độ pH=7 đến các trị số độ pH thấp hơn độ pH=2, và độ pH=4 bằng cách trực tiếp bổ sung axit vào, và tiếp đó chuẩn độ kháng nguyên của vaccin được đo ở độ pH nhất định thấp hơn các trị số độ pH=2, và độ pH=4. Tiếp đó, chuẩn độ vaccin được đo trong khoảng thời gian đến 1 giờ ở độ pH khác nhau thấp hơn 2 và 4. Các quan sát dưới đây được thực hiện. Hỗn hợp phản ứng này được thử nghiệm tại các thời điểm khác nhau và các mức pH khác nhau. Chi tiết được thể hiện dưới đây trong bảng dưới đây. Các chế phẩm vaccin rotavirus này (ở nhiệt độ bảo quản -20°C) chứa kháng nguyên của rotavirus 116E sống đã được làm giảm độc lực, 10% SPG (natri phosphat glutamat) được hòa tan trong môi trường thiết yếu tối thiểu của Dulbecco.

Chi tiết về	Chuẩn độ tính theo FFU/liều 0,5ml					Nhận xét
	Chuẩn độ thực tại thời điểm 0 phút	Chuẩn độ đã được điều chỉnh với yếu tố pha loãng tại thời điểm 0 phút	Chuẩn độ thực sau thời gian 1 giờ	Chuẩn độ đã được điều chỉnh với yếu tố pha loãng sau thời gian 1 giờ	Log hao hụt sau thời gian 1 giờ.	
0,5ml chế phẩm vaccin rotavirus 116E ở độ pH=7,4	$10^{4,95}$	NA	$10^{4,94}$	$10^{4,94}$	-	-
0,5ml chế phẩm vaccin rotavirus 116E + 34,8mEq HCl ở độ pH=4,0	$10^{3,58}$	$10^{5,05}$	$10^{3,58}$	$10^{5,05}$	Nil	Không có tác động của độ pH
0,5ml chế phẩm vaccin rotavirus 116E + 34,8mEq HCl ở độ pH=2,0	$10^{3,54}$	$10^{5,01}$	$10^{2,93}$	$10^{4,40}$	0,55	Tác động biên của độ pH

Bảng 3: Kết quả của thử nghiệm peroxidaza miễn dịch ở chuẩn độ đích $10^{5,0}$ FFU/liều 0,5ml tại thời điểm 0 phút và 60 phút bằng cách trực tiếp bổ sung axit vào các chế phẩm vaccin rotavirus (nhiệt độ bảo quản: -20°C).

Lưu ý: mức giảm đã tính được về trị số chuẩn độ nhiễm do pha loãng = $10^{1,47}$ FFU. Như vậy, chuẩn độ vaccin thực sau khi pha loãng là $10^{2,93}$ ở độ pH=2. Tất cả các mẫu được chuẩn độ lặp lại ba lần theo thử nghiệm peroxidaza miễn dịch. Vaccin rotavirus dùng qua đường miệng (chuẩn độ đích $10^{5,0}$ FFU/0,5ml) là ổn định ở độ pH=4,0. Chuẩn độ đích có nghĩa là nồng độ tối thiểu của kháng nguyên của rotavirus 116E trong lọ vaccin dự định đạt được trong lọ nhất định. Chuẩn độ gốc ở độ pH trung tính của vaccin này là $10^{4,95}$ FFU/0,5ml tại thời điểm 0 phút. Chuẩn độ vaccin ở

độ pH=2 tại thời điểm 0 phút là $10^{3,54}$ FFU/0,5ml và chuẩn độ giảm đến $10^{2,93}$ FFU/0,5ml trong khoảng thời gian 1 giờ. Như vậy, sau khi bổ sung yếu tố pha loãng vào, trị số 1,47 do bổ sung axit, với trị số chuẩn độ thực ($10^{2,93}$ FFU/0,5ml), chuẩn độ vaccin điều chỉnh ở độ pH=2 sau thời gian 1 giờ nhờ bổ sung axit vào là $10^{4,40}$ so với chuẩn độ vaccin gốc $10^{4,95}$ ở độ pH=7 tại thời điểm 0 phút. Do đó, vaccin này có tổng giảm log về chuẩn độ vaccin là 0,55 chỉ ở độ pH=2,0 trong thời gian 1 giờ. Điều này cho thấy rằng ngay cả ở độ pH với trị số thấp hơn là 2, tức là môi trường cụ thể có tính axit như ở dạ dày của người, chế phẩm vaccin rotavirus có khả năng duy trì chuẩn độ vaccin của nó ở trị số $10^{4,40}$ FFU/0,5ml. Ở chuẩn độ vaccin đó, vaccin này có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch đủ kháng lần nhiễm rotavirus tiếp theo. Trong thử nghiệm lâm sàng được thực hiện với vaccin Rota 116E ở chuẩn độ $10^{4,0}$, vaccin gây ra mức chuyển đảo huyết thanh 4 lần khoảng 62%, mà là điều đáng khích lệ (Nita Bhandari *et al*, *J Infect Dis* 2009, 200, 421-9).

Ví dụ 2: Thử nghiệm này được lặp lại với vaccin khác (ở nhiệt độ bảo quản -20°C), trong đó chuẩn độ đích là $10^{6,0}$ FFU/0,5ml (liều). Các trị số chuẩn độ đã được tính cùng với yếu tố pha loãng được thể hiện trong bảng dưới đây ở các trị số độ pH khác nhau tại thời điểm 0 phút và sau thời gian 1 giờ. Các chế phẩm vaccin rotavirus này (ở nhiệt độ bảo quản -20°C) chứa kháng nguyên rotavirus 116E sống đã được làm giảm độc lực, 10% SPG được hòa tan trong DMEM.

Chi tiết về mẫu vaccin	Độ pH	‘Chuẩn độ đã được điều chỉnh với yếu tố pha loãng tại thời điểm 0 giờ tính theo FFU/0,5ml	Chuẩn độ đã được điều chỉnh với yếu tố pha loãng sau thời gian 1 giờ tính theo FFU/0,5ml	Mức hụt log sau thời gian 1 giờ	Nhận xét
0,5ml chế phẩm vaccin rotavirus 116E	7,2	$10^{5,35}$	$10^{5,30}$	0,05 (không hụt)	Không có tác động của độ

					pH
0,5ml chế phẩm vacxin rotavirus 116E + 34,8 mEq HCl	4,0	$10^{5,33}$	$10^{5,09}$	0,24 (mức hụt biên)	Không có tác động của độ pH
0,5ml chế phẩm vacxin rotavirus 116E + 34,8 mEq HCl	2,0	$10^{4,89}$	$10^{4,21}$	0,68 (mức hụt biên)	Tác động biên của độ pH

Bảng 4: Kết quả của thử nghiệm peroxidaza miễn dịch ở chuẩn độ đích $10^{6,0}$ FFU/liều 0,5ml tại thời điểm 0 phút và 60 phút bằng cách trực tiếp bổ sung axit vào các chế phẩm vacxin rotavirus (nhiệt độ bảo quản: -20°C).

Kết luận: Chỉ hụt 0,24 log ở chuẩn độ vacxin ở các mẫu vacxin ở độ pH=4,0, mà được xem là không tác động đến độ pH trong các tình huống thực tế giữ trong thời gian 1 giờ. Ở độ pH=2,0, có mức hụt 0,46 log ở chuẩn độ tại thời điểm 0 giờ và hụt 0,68 log10 FFU tại thời điểm 1 giờ. Tức là có tác dụng biên đến độ pH đối với các trị số chuẩn độ vacxin ở độ pH axit thấp hơn với trị số bằng 2.

Theo bảng trên đây, các tác giả sáng chế thấy rằng chuẩn độ vacxin $10^{4,89}$ FFU/0,5ml ở độ pH=2 được duy trì cho đến trị số chuẩn độ $10^{4,21}$ FFU/0,5ml; chuẩn độ log trong khoảng từ 4,89 đến 4,21 là đủ tốt để sao chép rotavirus trong ruột của dạ dày của trẻ sơ sinh ở lứa tuổi 6 tuần đến 2 năm. Mức độ axit của dạ dày của trẻ sơ sinh cũng là độ pH=2, thể hiện môi trường dạ dày mô phỏng. Vacxin này vẫn có khả năng tiếp tục với chuẩn độ 4,89 Log 10 FFU/0,5ml, mà là đủ để đi qua dạ dày và sau đó được củng cố vào lòng tơ của ruột và tiếp tục sao chép rotavirus, chịu trách nhiệm về việc tạo ra đáp ứng miễn dịch ở trẻ sơ sinh, nhờ đó đem lại tác dụng bảo vệ và ngăn ngừa bệnh viêm dạ dày ruột do rotavirus. Do vậy, vacxin này được phát hiện là ổn

định ở độ pH axit bằng 2 trong khoảng thời gian ít nhất là 1 giờ mà không hề hụt đáng kể về chuẩn độ vaccin.

Phương án 3: Thử nghiệm *in vitro* để chứng minh rằng vaccin rotavirus 116E không cần chất kháng axit:

Ngoài các kết luận từ các kết quả thử nghiệm lâm sàng dưới đây trong bản mô tả này, còn chứng minh được các điều kiện tương tự mô phỏng *in vitro* tính axit của dạ dày dùng vaccin một cách trực tiếp không có chất đệm.

Ví dụ 3.1: 1ml vaccin (chế phẩm 3A) chứa rotavirus 116E, tổ hợp gồm sucroza (50%), lactoza (0,5%) và trehaloza (0,5%), chất thủy phân lactalbumin (1%), albumin huyết thanh của người (0,4%), được lấy và được bổ sung với 1,25ml dung dịch HCl 0,1N và trộn kỹ. Mẫu được lấy và thử nghiệm về hàm lượng virus ở các mức độ pH khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.1 dưới đây.

Mẫu số	Chi tiết về mẫu	Hàm lượng virus (FFU/ml)
1	độ pH=2,0 - 0 phút	5,72
2	độ pH=2,0 - 10 phút	4,78
3	độ pH=2,0 - 30 phút	3,84
4	độ pH=3,0 - 0 phút	5,96
5	độ pH=3,0 - 10 phút	5,96
6	độ pH=3,0 - 30 phút	5,91
7	Đối chứng	6,10

Bảng 5.1: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch 1ml vaccin với rotavirus 116E (chế phẩm 3A)

Ví dụ 3.2: 0,8 ml vaccin chứa rotavirus 116E, tổ hợp gồm sucroza (40%), và trehaloza (0,5%), chất thủy phân lactalbumin (20%), polyvinyl pyrrolidin (0,5%) (chế phẩm 3B) được lấy và được bổ sung với 1,25ml dung dịch HCl 0,1N và trộn kỹ. Mẫu

được lấy và thử nghiệm về hàm lượng virus ở các mức độ pH khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.2 dưới đây.

Mẫu số	Chi tiết về mẫu	Hàm lượng virus (FFU/ml)	Hàm lượng virus (FFU/0,8ml)
1	độ pH=2,0 - 0 phút	4,71	4,62
2	độ pH=2,0 - 10 phút	4,69	4,60
3	độ pH=2,0 - 30 phút	4,41	4,32
4	độ pH=3,0 - 0 phút	5,97	5,88
5	độ pH=3,0 - 10 phút	5,94	5,85
6	độ pH=3,0 - 30 phút	5,93	5,84
7	Đối chứng	6,10	

Bảng 5.2: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch 0,8ml vaccin với rotavirus 116E (chế phẩm 3B)

Ví dụ 3.3: 0,5ml vaccin Rotavirus 116E chứa tổ hợp gồm sucroza (60%), và trehaloza (0,5%), protein của đậu nành (20%), pyridoxin-HCl (0,1%), polyvinyl pyrrolidin (0,25%) (chế phẩm 3C) được lấy và được bổ sung với 1,25ml dung dịch HCl 0,1N và trộn kỹ. Mẫu được lấy và thử nghiệm về hàm lượng virus ở các mức độ pH khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.3 dưới đây.

Mẫu số	Chi tiết về mẫu	Hàm lượng virus (FFU/0,5ml)
1	độ pH=2,0 - 0 phút	4,29
2	độ pH=2,0 - 10 phút	4,21
3	độ pH=2,0 - 30 phút	3,39
4	độ pH=3,0 - 0 phút	5,20
5	độ pH=3,0 - 10 phút	5,17

6	độ pH=3,0 - 30 phút	5,08
7	Đối chứng	5,80

Bảng 5.3: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch 0,8ml vaccin với rotavirus 116E (chế phẩm 3C)

Ví dụ 3.4: 0,5ml vaccin Rotavirus 116E chứa 10% SPG được hòa tan trong DMEM (chế phẩm 3D) được lấy và được bổ sung với 1,25ml dung dịch HCl 0,1N và trộn kỹ. Mẫu được lấy và thử nghiệm về hàm lượng virus ở các mức độ pH khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.4 dưới đây.

Mẫu số	Chi tiết về mẫu	Hàm lượng virus (FFU/0,5ml)
1	độ pH=2,0 - 0 phút	4,78
2	độ pH=2,0 - 10 phút	4,48
3	độ pH=2,0 - 30 phút	4,29
4	độ pH=3,0 - 0 phút	5,22
5	độ pH=3,0 - 10 phút	5,17
6	độ pH=3,0 - 30 phút	4,70
7	Đối chứng	5,80

Bảng 5.4: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch của 0,8ml vaccin với rotavirus 116E (chế phẩm 3D)

Ví dụ 3.5: 0,5ml vaccin Rotavirus 116E chứa sucroza (40%), trehaloza (0,5%), lactoza (5%), rHSA (0,5%), LAH (1%) và trộn dung dịch đệm (amoni axetat + amoni bicarbonat + điamoni orthophosphat) (chế phẩm 3D) được lấy và được bổ sung với 1,25ml dung dịch HCl 0,1N và trộn kỹ. Mẫu được lấy và thử nghiệm về hàm lượng virus ở các mức độ pH khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.5 dưới đây.

Mẫu số	Chi tiết về mẫu	Hàm lượng virus (FFU/0,5ml)
1	độ pH=2,0 - 0 phút	4,77
2	độ pH=2,0 - 10 phút	4,65
3	độ pH=2,0 - 30 phút	4,39
4	độ pH=3,0 - 0 phút	5,21
5	độ pH=3,0 - 10 phút	5,19
6	độ pH=3,0 - 30 phút	4,87
7	Đối chứng	5,80

Bảng 5.5: Thử nghiệm peroxidaza miễn dịch của 0,8ml vaccin với rotavirus 116E (chế phẩm 3D)

Kết luận: Từ các bảng trên đây, thấy rõ ràng rằng các chế phẩm vaccin Rotavirus 116E ở độ pH=2,0 trong thời gian 30 phút cũng có thể chịu đựng khi không có bất kỳ chất đệm hoặc chất kháng axit nào.

Phương án 4: Phân tích Baby Rossett Rice

Thử nghiệm BRR là quy trình đã được phê chuẩn về khả năng trung hòa axit của các chế phẩm vaccin rotavirus. Do vậy, các chế phẩm vaccin chọn lọc chứa dung dịch đệm xitrat phosphat và dung dịch đệm xitrat bicarbonat được đánh giá về khả năng trung hòa axit bằng cách áp dụng thử nghiệm này. Các thử nghiệm in vitro được thực hiện trong các điều kiện mô phỏng dạ dày của trẻ sơ sinh bằng cách áp dụng thử nghiệm Baby Rosette Rice (BRR). Các chế phẩm khác nhau với các tổ hợp chất đệm khác nhau được chọn lọc cho các thử nghiệm trung hòa axit và kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây ở các trị số độ pH khác nhau, trong đó các điều kiện được mô phỏng như dạ dày của trẻ sơ sinh. Các chế phẩm vaccin này được pha loãng bằng nước dùng để tiêm đến 10ml, sau đó được bổ sung 4ml dung dịch HCl 0,1N, sau đó 0,5ml dung dịch HCl 0,1N được bổ sung vào mỗi phút cho đến khi độ pH đạt 4,0. ANC được xác định là thời gian tính bằng phút cần thiết để duy trì độ pH trên 4,0.

Chế phẩm vaccin 4A	Chuẩn độ đích của kháng nguyên rotavirus 116E là 10^6 FFU/0,5ml; 10% SPG, và DMEM (lượng vừa đủ)
Chế phẩm vaccin 4B	Chuẩn độ đích của kháng nguyên rotavirus 116E là 10^6 FFU/0,5ml; 10% SPG, và DMEM (lượng vừa đủ) được bổ sung vào 2,5ml dung dịch đệm xitrat bicacbonat
Chế phẩm vaccin 4C	Chuẩn độ đích của kháng nguyên rotavirus 116E là 10^6 FFU/0,5ml, tổ hợp gồm ít nhất là 2 loại đường (sucroza 50% và trehaloza 0,5%) và chất thủy phân lactalbumin 0,5%. (mẫu 8 dưới đây).
Chế phẩm vaccin 4D	Chuẩn độ đích của kháng nguyên rotavirus 116E là 10^6 FFU/0,5ml, tổ hợp gồm ít nhất là 2 loại đường (Sucroza-40%, Trehaloza-0,5%), 0,5% chất thủy phân lactalbumin, 0,35% albumin huyết thanh của người và dung dịch đệm phosphat 1,1M.

Bảng 6: Chi tiết về các chế phẩm vaccin:

Các quan sát dưới đây (Bảng 7) được tiến hành cho thử nghiệm Baby Rosset Rice mà được thực hiện với các chế phẩm vaccin 4A đến 4D nêu trên.

Các chế phẩm vaccin	Độ pH ban đầu	Độ pH sau khi bổ sung axit	Thể tích dung dịch HCl 0,1N được bổ sung vào	Trị số theo thử nghiệm Baby Rosset Rice	Chuẩn độ vaccin ban đầu tính theo FFU/0,5 ml	Chuẩn độ vaccin tính theo FFU/0,5 ml sau 1 giờ
Chế phẩm vaccin			4,0ml	BRR ngắn	$10^{4,83}$	$10^{3,83}$

4A ở nhiệt độ - 20°C không có chất đệm của liều 0,5ml.	7,48	1,95		hơn 0 phút (giảm ngay lập tức về độ pH)		
Chế phẩm vaccin 4B ở nhiệt độ - 20°C với 2,5ml dung dịch đệm xitrat bicarbonat của liều 0,5ml.	8,35	4,22	10,0ml	BRR = 12 phút	$10^{6,17}$	$10^{6,15}$
Chế phẩm vaccin 4C ở $5\pm 3^\circ\text{C}$ không có chất đệm của liều 0,5ml.	7,28	3,98	5,0ml	BRR = 2 phút	$10^{5,30}$	$10^{5,02}$
Chế phẩm vaccin 4D ở $5\pm 3^\circ\text{C}$ với dung dịch đệm của liều 1,5ml hoặc 2ml.	6,75	4,33	10,5ml	BRR của khoảng 13 phút	$10^{6,12}$	$10^{6,11}$

Bảng 7: Phân tích Baby Rosset Rice so sánh các chế phẩm vaccin rotavirus có và không có chất đệm.

Kết luận: Như vậy, từ bảng trên đây các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng ngay cả đối với chế phẩm vaccin 4A trên đây mà thể hiện sụt giảm ngay lập tức từ độ pH=7,48 đến độ pH=1,95, chuẩn độ vaccin được duy trì từ $10^{4,83}$ FFU/0,5ml và $10^{3,83}$ FFU/0,5ml. Tương tự, chuẩn độ vaccin cũng được duy trì trong trường hợp chế phẩm vaccin 4C trong khoảng từ $10^{5,30}$ đến $10^{5,02}$ FFU/0,5ml khi độ pH giảm từ 7,28 đến độ pH=3,98 trong thời gian 2 phút. Do đó, ngay cả khi trị số BBR chỉ là 2 phút, chuẩn độ vaccin được duy trì ở mức độ tương đối tức là $10^{5,02}$ FFU/0,5ml. Mức chuẩn độ vaccin này là đủ để tạo ra đáp ứng miễn dịch và bằng cách đó đem lại tác dụng bảo vệ và ngăn ngừa bệnh viêm dạ dày ruột do rotavirus ở trẻ sơ sinh.

Phương án 4: Thử nghiệm lâm sàng không có chất đệm đối với ROTAVAC® chứa chủng rotavirus 116E

Giả thiết và cơ sở của nghiên cứu

Hiện tượng truyền rotavirus tự nhiên được cho là xảy ra qua đường phân-miệng. Rotavirus thường không ổn định trong điều kiện axit và tin rằng môi trường có tính axit tác động đến sức sống của virus này.

Do có bản chất không ổn định trong điều kiện axit, các rotavirus lây nhiễm hữu hiệu động vật có vú ở khắp nơi, hầu hết trong số chúng có trị số độ pH của dạ dày khoảng 2. Một khả năng là dạ dày của trẻ sơ sinh có thể dễ cho phép rotavirus sống sót hơn dạ dày của người lớn, vì mức độ pH ở dạ dày của trẻ sơ sinh có xu hướng là khoảng 3,2 trong khi ở người lớn là khoảng 1,0. Đây có thể là lý do cho 60% đến 90% ca bệnh do rotavirus ở người đã được thông báo xảy ra ở trẻ em dưới 3 tuổi.

Thiết kế nghiên cứu

Nhằm để kiểm tra giả thuyết này, thử nghiệm ngẫu nhiên đa trung tâm rộng có kiểm soát được thực hiện để đánh giá và so sánh đáp ứng miễn dịch đối với vaccine ở đối tượng nhận ROTAVAC với dung dịch đệm xitrat bicacbonat với các đối tượng nhận ROTAVAC không có chất đệm.

Do đó, nghiên cứu này bao gồm ba nhóm điều trị dưới đây:

- Nhóm I (nhận ROTAVAC® và dùng 2,5ml dung dịch đệm 5 phút trước),
- Nhóm II (nhận ROTAVAC® không có chất đệm),
- Nhóm III (nhận ROTAVAC® được trộn ngay lập tức với 2,5ml dung dịch đệm trước khi dùng).

Người khảo sát nghiên cứu và người đánh giá an toàn (những người phối hợp nghiên cứu) không biết về sự phân nhóm điều trị. Việc che giấu này được thực hiện nhờ một y tá tham gia nghiên cứu dùng vaccine cho mỗi nhóm điều trị đã phân. Tất cả các đối tượng nhận 3 liều vaccine cách nhau 4 tuần. Đáp ứng miễn dịch đối với vaccine được thử 4 tuần sau liều vaccine thứ ba (ngày 84) và so với gốc (ngày 0). Mức độ sinh miễn dịch được thử theo chuẩn độ trung bình nhân (GMT) của huyết thanh kháng rotavirus IgA và giai đoạn chuyển đảo huyết thanh (số lần tăng về mức kháng thể

trước khi dùng vaccin so với sau dùng vaccin) ở các nhóm điều trị.

Kết quả nghiên cứu và các kết luận

Đáp ứng miễn dịch sau khi dùng vaccin có thể so sánh được với không có khác biệt đáng kể về mặt thống kê về đáp ứng của IgA kháng rotavirus giữa các nhóm điều trị. Quan trọng là, mức chuyển đảo huyết thanh và GMT đạt được ở nhóm II (dùng ROTAVAC[®] không có chất đệm) là tương tự như hai nhóm điều trị khác, trong đó ROTAVAC[®] được dùng với chất đệm.

GMT của IgA kháng rotavirus sau khi dùng vaccin ở nhóm, trong đó ROTAVAC được dùng không có chất đệm, là 20,7U/ml so với 19,6U/ml và 19,2U/ml lần lượt ở hai nhóm mà nhận dung dịch đệm kháng axit 5 phút trước vaccin và đã được trộn đồng thời với vaccin (Bảng 8). Các khác biệt giữa các nhóm là không đáng kể về mặt thống kê ($p > 0,05$, thử nghiệm T của Student's).

Bảng 8: Chuẩn độ trung bình nhân & 95% CI cho các kết quả (ngày 0 & ngày 84)

Thăm	Nhóm I (N = 290)		Nhóm II (N = 287)		Nhóm III (N = 286)	
	GMT	95% CI	GMT	95% CI	GMT	95% CI
ngày 0	10,5	(9,4, 11,7)	10,8	(9,7, 11,9)	10,2	(9,2, 11,3)
ngày 84	19,6	(17,0, 22,7)	20,7	(17,9, 24,0)	19,2	(16,8, 22,1)

N = số

đối tượng được đánh giá ở mỗi nhóm; GMT = Trung bình nhân; 95% CI (LL, UL) = khoảng thời gian tự tin (Giới hạn dưới, Giới hạn trên)

Tương tự, bốn lần giai đoạn chuyển đảo huyết thanh quan sát được ở các nhóm mà nhận ROTAVAC[®] không có chất đệm kháng axit và có chất đệm là tương tự lần lượt ở các mức 29,2%, 24,5% và 25,1% (Bảng 9). Ngoài ra, giới hạn dưới của 95% khoảng thời gian tự tin của khác biệt về giai đoạn chuyển đảo huyết thanh (2 lần) giữa các nhóm điều trị là $> -10\%$, biểu thị sự không thấp kém hơn về đáp ứng miễn dịch đạt được với cả ba phác đồ điều trị (bảng 10).

Bảng 9: Giai đoạn chuyển đảo huyết thanh và 95% CI (thay đổi 2, 3 hoặc 4 lần về chuẩn độ kháng thể) giữa mức gốc và ngày 84 sau khi dùng vaccin

Số lần thay	Nhóm I (N = 290)		Nhóm II (N = 287)		Nhóm III (N = 286)	
	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI

đôi						
2	30,7	(25,7, 36,2)	35,2	(29,9, 40,9)	33,5	(28,3, 39,2)
3	27,6	(22,8, 33,1)	32,4	(27,3, 38,1)	31,8	(26,7, 37,4)
4	24,5	(19,8, 29,7)	29,2	(24,3, 34,8)	25,1	(20,5, 30,5)

*N= số đối tượng được đánh giá ở mỗi nhóm; (95% CI) = khoảng thời gian tự tin
(Giới hạn dưới, Giới hạn trên)*

Bảng 10: Khác biệt về % chuyển đảo huyết thanh 2 lần sau khi dùng vaccin ở các nhóm điều trị

% chuyển đảo huyết thanh 2 lần sau khi dùng vaccin (ngày 84)						
	Nhóm I (N = 290)		Nhóm II (N = 287)		Nhóm III (N = 286)	
	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
ngày 84	30,7	(25,7, 36,2)	35,2	(29,9, 40,9)	33,5	(28,3, 39,2)
Khác biệt về % mức chuyển đảo huyết thanh với 95% CI thử nghiệm 2 mặt, Chi bình phương)						
Nhóm				% (95% CI của khác biệt)		
Nhóm I so với Nhóm II				4,5 (-3,5, 12,5)		
Nhóm II so với Nhóm III				1,6 (-6,5, 9,7)		
Nhóm I so với Nhóm III				2,9 (-4,7, 10,5)		

Khả năng gây tác dụng có hại và mức an toàn liên quan đến các tác dụng phụ yêu cầu và không yêu cầu là tương đương đối với ba nhóm với khác biệt không đáng kể về mặt thống kê. Vaccin ROTAVAC® được dung nạp tốt ở cả ba nhóm điều trị mà nhận vaccin có hoặc không có dung dịch đệm kháng axit.

Phương án 5: Chế phẩm Rotavirus 116E mới

Dữ liệu về mức ổn định của chế phẩm ORV 116E lỏng ở 37°C, 25°C và 2°C đến 8°C

Các chế phẩm vaccin rotavirus có thể tích liều là 0,5ml không có chất đệm (các mẫu 1 đến 12, 14 đến 16), và có chất đệm trộn vào ở thể tích liều 0,5ml (mẫu 13) đã được xét nghiệm trong một khoảng thời gian kéo dài đến 5 năm, được thể hiện dưới đây. Chi tiết của các chế phẩm khác nhau được nêu dưới đây cùng với mức ổn định

của chúng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian đến 4 tuần, ở nhiệt độ 25°C trong thời gian ít nhất là 6 tháng, và ở nhiệt độ 5±3°C trong thời gian đến 2 năm đến 5 năm. Các nghiên cứu này đã cho thấy rằng các chế phẩm vaccin rotavirus không có chất đệm ở thể tích liều 0,5ml về bản chất cũng là ổn định trong khoảng thời gian dài ở nhiệt độ của tủ lạnh trong thời gian ít nhất là 2 năm. Các chế phẩm vaccin rotavirus cũng được thấy là ổn định trong thời gian 5 năm ở nhiệt độ của tủ lạnh.

Mẫu 1 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 50%, Lactoza 0,5%, HSA 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 0,05%.

Mức độ ổn định của mẫu 1:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,02	6,0			6,43		6,21	6,16	6,16	6,07
25°C	6,02	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37°C	6,02	5,32	2,63							

Mẫu 2 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 50%, Trehaloza 0,5%, HSA 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 0,5%.

Mức độ ổn định của mẫu 2:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,09	6,14			6,19		6,07	6,10	6,05	6,01
25°C	6,09	6,02	6,06	5,63	5,51	2,48				
37°C	6,09	5,47	3,23							

Mẫu 3 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 50%, Trehaloza 1,0%, HSA 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 0,5%.

Mức độ ổn định của mẫu 3:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,22	6,24			6,26		6,14	6,20	6,13	6,04
25°C	6,22	6,18	6,15	5,80	5,34	2,03				

37°C	6,22	5,35	3,22							
------	------	------	------	--	--	--	--	--	--	--

Mẫu 4 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 40%, Lactoza 0,5%, và chất thủy phân lactalbumin 1,0%.

Mức độ ổn định của mẫu 4:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,19	6,18			6,08		6,21	6,24	6,12	
25°C	6,19	5,66	5,10	4,8	3,01					
37°C	6,19	4,23	2,01							

Mẫu 5 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 40%, Maltoza 5,0% và chất thủy phân lactalbumin 1,0%.

Mức độ ổn định của mẫu 5:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,35	6,37			6,18		6,01	6,17	6,08	
25°C	6,35	5,89	5,11	4,77	2,43					
37°C	6,35	5,31	3,58							

Mẫu 6 được điều chế chứa rotavirus 116E, sucroza 40%, Trehaloza 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 1%.

Mức độ ổn định của mẫu 6:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,19	6,15			6,10		6,03	6,22	6,13	
25°C	6,19	5,87	5,43	5,12	3,25					
37°C	6,19	4,02	2,52							

Mẫu 7 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 40%, Trehaloza 1,0% và chất thủy phân lactalbumin 1,0%.

Mức độ ổn định của mẫu 7:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,34	5,79			6,00		5,55	6,07	6,09	
25°C	6,34	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37°C	6,34	5,32	2,63							

Mẫu 8 được điều chế chứa rotavirus 116E, sucroza 50%, Trehaloza 0,5%, và chất thủy phân lactalbumin 0,5%.

Mức độ ổn định của mẫu 8:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,34	6,34			6,33	6,31	6,24	6,14	6,08	
25°C	6,34	6,32	6,14	6,01	5,25					
37°C	6,34	5,11	4							

Mẫu 9 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 70%, Trehaloza 0,5%.

Mức độ ổn định của mẫu 9:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,38	6,31			6,23	6,44	6,35	6,26	6,18	
25°C	6,38	6,41	6,35	6,23	5,57					
37°C	6,38	5,07	4,01							

Mẫu 10 được điều chế chứa rotavirus 116E, Sucroza 50%, lactoza 0,5%, Maltoza 0,5%, HSA 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 0,05%.

Mức độ ổn định của mẫu 10:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,25	6,15			6,03	6,34	6,08	6,12	6,11	6
25°C	6,25	6,14	6,27	6,12	5,88					
37°C	6,25	5,02	4,35							

Mẫu 11 được điều chế chứa rotavirut 116E, Sucroza 50%,Trehaloza 0,5%, maltoza 0,5%, HSA 0,5%.

Mức độ ổn định của mẫu 11:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,68	6,62	6,95	6,84	6,64	6,65	6,37	6,72	6,05	
25°C	6,68	6,50	6,20	6,04	5,32	4,47				
37°C	6,68	6,10	5,58	4,26						

Mẫu 12 được điều chế chứa rotavirut 116E, Sucroza 50%,Trehaloza 0,5%, HSA 0,5% và chất thủy phân lactalbumin 0,05%.

Mức độ ổn định của mẫu 12:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
5±3°C	6,62	6,76	6,98	7,00	6,86	6,74	5,99	6,46	6,17	
25°C	6,62	6,46	6,42	5,99	5,13	3,25				
37°C	6,62	5,58	5,06							

Mẫu 13 được điều chế chứa rotavirut 116E, sucroza (40%), trehaloza (0,5%), lactoza (5%), rHSA (0,5%), LAH (1%) và trộn dung dịch đệm (amoni axetat + amoni bicarbonat + điamoni orthophosphat).

Mức độ ổn định của mẫu 13:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng

5±3°C	6,61	6,59	6,58	6,60	6,53	6,54	6,18	6,01	5,83	
25°C	6,61	6,46	6,44	5,79	5,25	4,15				
37°C	6,61	5,56	5,01							

Mức độ ổn định của mẫu 13 ở nhiệt độ -20°C:

Nhiệt độ	Ngày 0	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	60 tháng
-20°C	6,61	6,59	6,59	6,56	6,54	6,52	6,21	6,11	6,13	6,09

Các mẫu 14, 15 và 16 được sản xuất với rotavirus 116E, 10% SPG được hòa tan trong DMEM. Các mẫu 14, 15, và 16 được giữ ở nhiệt độ -20°C, và mức độ ổn định được kiểm tra trong thời gian 60 tháng. Các chế phẩm vaccin 13, 14, và 15 này được thấy là rất ổn định ở nhiệt độ -20°C trong thời gian ít nhất là 5 năm.

Mẫu vaccin	Ngày 0	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng	36 tháng	48 tháng	60 tháng
Mẫu 14 (10 ^{4,0} FFU/0,5ml)	4,25	4,01	4,08	4,15	4,25	4,02	4,18	4,12	4,08
Mẫu 15 (10 ^{5,0} FFU/0,5ml)	5,55	5,42	5,68	5,37	5,77	5,89	5,32	5,40	5,32
Mẫu 16 (10 ^{6,0} FFU/0,5ml)	6,12	6,12	6,06	6,33	6,36	6,27	6,15	6,11	6,05

Do đó, đã xác nhận được rằng các chế phẩm vaccin rotavirus khác nhau có thể tích liều 0,5ml là ổn định ở nhiệt độ -20°C trong 5 năm, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian 2 năm, ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 6 tháng, và ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 tuần. Bất kể thành phần của chế phẩm vaccin, vaccin rotavirus ở mức thể tích liều từ 0,5ml đến 1ml được thấy là ổn định trong điều kiện axit, như được minh họa bằng ví dụ theo phương án 3 cũng như trong khoảng độ pH từ 2 đến 4. Do đó, các tác giả sáng chế cho rằng bất kể chi tiết của chế phẩm vaccin, bất kỳ vaccin rotavirus nào chứa rotavirus 116E sống bị giảm độc lực đều có khả năng chịu được môi trường axit mạnh trong dạ dày của trẻ sơ sinh và gây ra đáp ứng miễn dịch đối với hiện tượng nhiễm rotavirus. Các chế phẩm vaccin này được thể hiện trong

bản mô tả này chỉ nhằm mục đích giải thích chiều sâu và chiều rộng sáng chế. Tác giả sáng chế không thể nêu tất cả các chi tiết của chế phẩm vaccin, mặc dù nhiều chế phẩm đã được nêu ở phương án 3, Ví dụ 3 và phương án 5. Do đó, toàn bộ các thay đổi hiển nhiên mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra đối với chế phẩm vaccin rotavirus chứa chủng rotavirus 116E được bao trùm trong phạm vi của sáng chế này. Cần phải hiểu rõ và chắc chắn rằng các chế phẩm vaccin mà không được nêu cụ thể trong bản mô tả này nhưng chứa rotavirus 116E sống bị giảm độc lực cũng được bao trùm trong phạm vi của sáng chế này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vaccin rotavirus lỏng chứa:
rotavirus sống bị giảm độc lực của chủng 116E;
sucroza ở nồng độ 50%;
lactoza ở nồng độ 0,5%;
sản phẩm thuỷ phân lactalbumin ở nồng độ 0,05%; và
albumin huyết thanh người tái tổ hợp ở nồng độ 0,5%;
trong đó chế phẩm không chứa chất đệm hoặc chất chống axit, và
trong đó chế phẩm có thể tích liều là 0,5 ml.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó rotavirus có chuẩn độ khoảng 10^6 FFU/0,5 ml.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 12 tháng.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 24 tháng.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 36 tháng.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 60 tháng.
7. Chế phẩm vaccin rotavirus lỏng chứa:
rotavirus sống bị giảm độc lực của chủng 116E;
sucroza ở nồng độ 50%;
trehaloza ở nồng độ 0,5%;
sản phẩm thuỷ phân lactalbumin ở nồng độ 0,5%; và
albumin huyết thanh người tái tổ hợp ở nồng độ 0,5%;
trong đó chế phẩm không chứa chất đệm hoặc chất chống axit, và

trong đó chế phẩm có thể tích liều là 0,5 ml.

8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó rotavirut có chuẩn độ khoảng 10^6 FFU/0,5 ml.
9. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 12 tháng.
10. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 24 tháng.
11. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 36 tháng.
12. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 60 tháng.
13. Chế phẩm vacxin rotavirut dạng lỏng chứa:
rotavirut sống bị giảm độc lực của chủng 116E;
sucroza ở nồng độ 50%;
trehaloza ở nồng độ 1,0%;
sản phẩm thủy phân lactalbumin ở nồng độ 0,5%; và
albumin huyết thanh người tái tổ hợp ở nồng độ 0,5%;
trong đó chế phẩm không chứa chất đệm hoặc chất chống axit, và
trong đó chế phẩm có thể tích liều là 0,5 ml.
14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó rotavirut có chuẩn độ khoảng 10^6 FFU/0,5 ml.
15. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 12 tháng.
16. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 24 tháng.

17. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 36 tháng.
18. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian đến 60 tháng.