



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

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



1-0038382

(51)^{2020.01} A61K 39/29; A61K 39/00; A61P 31/20; (13) B
A61K 9/00; A61K 31/7084

(21) 1-2020-01331 (22) 01/08/2018
(86) PCT/SG2018/050391 01/08/2018 (87) WO 2019/032046 A1 14/02/2019
(30) 10201706540X 10/08/2017 SG
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/09/2020 390
(73) Yisheng Biopharma (Singapore) Pte. Ltd. (SG)
Serangoon Central Post Office, PO Box 584, Singapore 915503, Singapore
(72) ZHANG, Yi (CN).
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) CHẾ PHẨM ĐỂ ĐIỀU TRỊ VÀ/HOẶC PHÒNG NGỪA LÂY NHIỄM VIRUT
VIÊM GAN B

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa lây nhiễm virus viêm gan B và các bệnh gián tiếp do nhiễm virus viêm gan B. Trong một số phương án, chế phẩm chứa axit polyribonucleic - axit polyribocytidylic (PIC), ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, và kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B. Trong một số phương án, chế phẩm chứa PIC, ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và kháng nguyên lõi virus viêm gan B.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa lây nhiễm virus viêm gan B và các bệnh gián tiếp bởi lây nhiễm virus viêm gan B. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm, gồm axit polyribonucleosinic – axit polyribonucleotidylic (PIC), ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B, và/hoặc kháng nguyên lõi của virus viêm gan B.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự lây nhiễm virus viêm gan B (Hepatitis B virus - HBV) là một vấn đề sức khỏe toàn cầu quan trọng. Gần 2 tỷ người là người mang mầm bệnh viêm gan B, và khoảng 400 triệu người trong số họ đang bị nhiễm dai dẳng (Hiệp hội nghiên cứu về gan của châu Âu, Hướng dẫn thực hành lâm sàng EASL: management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 2012. 57 (1):167-185). Xơ gan, suy gan hoặc ung thư gan phát triển ở 15% -40% bệnh nhân bị nhiễm trùng mạn tính (Lok AS, McMahon BJ, Chronic hepatitis B: cập nhật 2009. Hepatology. 2009. 50 (3):661-662). Ước tính có 600.000 người chết vì hậu quả của nhiễm trùng mạn tính hàng năm, chẳng hạn như bệnh xơ gan và ung thư gan (Lok AS et al., Chronic Hepatitis B. Hepatology. 2007. 45:507-539; World Health Organization, Hepatitis B (Fact sheet N°204). 2013; National Institutes of H. National Institutes of Health consensus development conference statement: Management of Hepatitis B. Ann Intern Med. 2009. 150:104-110).

Hiện nay, 10µg hoặc 20µg kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) được sử dụng trong vắc-xin viêm gan B dự phòng. Tuy nhiên, 40µg HBsAg có thể được dùng cho bệnh nhân nhận điều trị thẩm tách máu hoặc bệnh nhân trước cấy ghép (Mahoney FJ., Update on Diagnosis, Management, và Prevention of Hepatitis B Virus Infection, Clin. Microbiol. Rev. 1999, 12:351-366; Bock M et al., Hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: A randomized clinical trial. Nephrology 2009; 14:267-272; Somi MH et al., Improving hepatitis B vắc-xin efficacy in end-stage renal

diseases patients và role of adjuvants. ISRN Gastroenterol. 2012; 2012:960413; Bauer T và Jilg W., Hepatitis B surface antigen-specific T và B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination, *Vắc-xin* 2006; 24:572-577). Trong điều kiện lâm sàng, an toàn khi tiêm vắc-xin bao gồm 60µg, 80µg, hoặc 90µg HBsAg.

Kháng nguyên lõi của virus viêm gan B (HBcAg), nằm trên thành phần bên trong của hạt HBV, là một trong những dấu hiệu của nhiễm HBV hoặc các bệnh qua trung gian nhiễm HBV. Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 20170049817 bộc lộ việc điều chế chế phẩm chống lại HBV bằng cách sử dụng HBcAg biến đổi. Toàn bộ nội dung của đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 20170049817 được đưa vào đây bằng cách tham chiếu.

Hơn nữa, một số bệnh nhân nhạy cảm với HBV và cho thấy sự đề kháng với các phác đồ tiêm chủng tiêu chuẩn. Khi nhận các điều trị thẩm tách máu, các bệnh nhân mắc bệnh thận giai đoạn cuối cho thấy tỷ lệ xuất hiện cao hơn và tiên lượng xấu hơn so với người bình thường. Tuy nhiên, sau khi tiêm vắc-xin HBV, các bệnh nhân bị уре huyết hoặc các bệnh nhân trước cấy ghép cho thấy tỉ lệ chuyển đảo huyết thanh thấp hơn đáng kể so với những người có miễn dịch. Mặc dù các kháng thể bảo vệ được tạo ra, các chuẩn độ kháng thể cực đại là thấp và thời gian đáp ứng miễn dịch cũng ngắn (Bauer T. và Jilg W., Hepatitis B surface antigen-specific T và B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after Hepatitis B vaccination, *Vắc-xin* 2006; 24:572-577; Bock M, Barros E và JV Veronese F, Hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: A randomized clinical trial, *Nephrology* 2009; 14, 267-272).

Khi một vắc-xin chứa 40µg HBsAg (gấp đôi liều lượng được sử dụng thông thường) được dùng cho bệnh nhân thẩm tách, hiệu quả của vắc-xin là không đạt yêu cầu, và chỉ nằm trong khoảng từ 50% đến 60% của tất cả các đối tượng tiêm chủng có các kháng thể bảo vệ được phát triển (Mary S et al., High-Dose Hepatitis B Vắc-xin in Patients Waiting for Lung Transplantation, Presentation at the Fifth Annual Conference on Vắc-xin Research, Baltimore, Maryland, May 7, 2002).

Hơn nữa, chỉ 5% người trưởng thành bị nhiễm trùng mạn tính sau khi bị nhiễm HBV cấp tính. Nếu một đối tượng bị nhiễm bệnh trong thời gian chu kỳ sinh, đối tượng có nhiều khả năng bị nhiễm trùng mạn tính. Sau khi nhiễm trùng cấp tính lần đầu tiên, 25%-30% trẻ em dưới 5 tuổi bị nhiễm trùng mạn tính và 90% trẻ sơ sinh được sinh ra bởi các bà mẹ dương tính với HBeAg có nguy cơ bị nhiễm trùng mạn tính (Mahoney FJ, Update on Diagnosis, Management, và Prevention of Hepatitis B Virus Infection, Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12:351-366). Ngoài ra, bệnh nhân bị ức chế miễn dịch sau khi bị nhiễm trùng cấp tính (ví dụ, nhiễm HIV) dễ có xu hướng phát triển nhiễm HBV mạn tính (Mehta N et al., Impaired generation of hepatitis B virus-specific memory B cells in HIV infected individuals following vaccination. Vắc-xin. 2010. 7; 28(21): 3672-8).

Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (U. S. Food và Drug Administration - US FDA) đã chấp thuận các loại thuốc sau đây như là lựa chọn thay thế cho điều trị nhiễm HBV mạn tính: IFN- α biến đổi polyetyleneglycol (PEG), và nucleosit hoặc các chất tương tự nucleotit (ví dụ, Lamivudine). Các phương pháp điều trị nhiễm HBV mạn tính và các loại thuốc này được sử dụng để ngăn chặn sự phát triển của bệnh, điều đó có nghĩa là việc sử dụng lâu dài các loại thuốc chống vi-rút hoặc IFN- α biến đổi PEG là không thể tránh khỏi.

Tuy nhiên, hiện nay, việc điều trị chống virus thường gặp phải thất bại. Khoảng 30% trong số các bệnh nhân đã đạt được các mục tiêu của điều trị, và chỉ 10% bệnh nhân được coi là được chữa khỏi. Việc điều trị chống virus dài hạn có nhiều khả năng tạo ra tính kháng virus và IFN- α có thể tạo ra các tác dụng phụ đáng kể (Nebbia G et al., Hepatitis B infection: current concepts và future challenges. *QJM*. 2012. 105(2):109-13). Do đó, việc điều trị với hiệu quả điều trị đầy đủ đối với nhiễm trùng mạn tính là cần thiết.

Phản ứng tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ chống virus đặc hiệu được quan sát thấy ở những bệnh nhân đã khỏi bệnh nhiễm trùng cấp tính. Những phản ứng này mạnh hơn so với ở bệnh nhân mạn tính, và phản ứng tế bào T đặc hiệu với virus ở bệnh nhân mạn tính là yếu và tức thời (Webster, G. J et al., Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells

specific for structural và nonstructural Hepatitis B virus proteins in patients with chronic Hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol. 2004; 78:5707-5719; Urbani, S et al., Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV co-infection. Hepatology. 2005; 41:826-831).

Do đó, đây là một chiến lược đầy tiềm năng để phát triển vắc-xin trị liệu bằng cách kích hoạt hiệu quả các đáp ứng miễn dịch tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ T (Sobao Y et al., J Hepatol 2002; 36:105-15; Sette AD et al., The Journal of Immunology 2001; 166: 1389-1397; Chang, J. J et al., J Virol 2005; 79:3038-3051; Guidotti LG et al., Science 1999; 284:825-9; Webster, G. J et al., Hepatology 2000; 32:1117-1124; Wieland, S. F. & Chisari, F. V. J Virol 2005; 79:9369-9380; Webster, G. J et al., J Virol 2004; 78:5707-719; Urbani, S et al., Hepatology 2005; 41:826-31; Maini, M. K et al., J Exp Med 2000; 191:1269-1280).

Theo báo cáo, các đáp ứng miễn dịch tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ có hiệu giá cao có khả năng loại bỏ virus trong nhiễm HBV cấp tính (Mary S et al., High-Dose Hepatitis B Vắc-xin in Patients Waiting for Lung Transplantation, Presentation at the Fifth Annual Conference on Vắc-xin Research, Baltimore, Maryland, May 7, 2002; Rehmann B et al., Nature Reviews Immunology 2005; 5:215-229; Bertoletti A et al., Journal of Hepatology 2003; 39:115-124; Bertoletti A et al., Journal of General Virology 2006; 87:1439-1449; Guidotti LG et al., Ann Rev Immunol 2001; 19:65-91; Ferrari C et al., J Immunol 1990; 145:3442-9; Penna A et al., J Clin Invest 1996; 98:1185-94; Penna A et al., Hepatology 1997; 25:1022-7; Rehmann B et al., J Exp Med 1995; 181:1047-58; Jung M et al., Virology 1999; 261:165-72).

Theo quan sát từ các nghiên cứu tiền lâm sàng, một số phương pháp có khả năng làm giảm tải ADN HBV. Ví dụ, một phương pháp là thực hiện rửa kháng virus ngắn hạn bằng Lamivudine trước khi tiêm chủng. Ví dụ khác, một số phương pháp gồm việc khơi gợi đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T với vắc-xin HBsAg (Bertoletti A et al., Curr Opin Immunol 2000; 12:403-8; Chisari FV. American Journal of Pathology 2000; 156:1117-1132; Kakimi K et al., J Exp Med 2000; 192:921-30; Kakimi K et al., J Immunol 2001; 167:6701-5; Thimme R et al., J Virol 2003; 77:68-76; Pol S et al.,

Lancet. 1994; 344:342; Mancini M et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:12496-12501).

Tá được phèn thường được sử dụng để kích hoạt miễn dịch qua trung gian kháng thể và giúp xây dựng phòng ngừa hiệu quả chống nhiễm trùng HBV. Tuy nhiên, tá được phèn không có khả năng phát triển các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T hiệu quả.

Axit polyribonucleosinic – axit polyribocytidylic (PIC, còn được gọi là Poly I:C) được chứng minh là một chất điều hòa miễn dịch mạnh trong các thử nghiệm trên động vật, nhưng không phải trong các thử nghiệm ở người, có thể là do sự thoái hóa nhanh chóng bởi các nhân huyết thanh ở người.

Một PIC được ổn định hóa, còn được gọi là PIKA (một hợp chất chứa PIC, một hoặc nhiều chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, một hoặc nhiều ion dương, và chất khác bất kỳ để điều chế PIKA), có thể được hòa tan bởi các dung dịch (PH: 6,0-8,0). PIKA có khả năng tăng cường sản xuất kháng thể trung hòa, và tạo miễn dịch qua trung gian tế bào T (Li L et al., Zhong Guo Mian Yi Xue Za Zhi 2006; 22:983-986). Theo sáng chế, PIC, các chất kháng sinh và các ion dương có thể là các chất được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế số WO2006/131023. Công bố đơn sáng chế số WO2006/131023 được đưa vào đây bằng cách tham chiếu.

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20090136538A1 bộc lộ rằng vắc-xin viêm gan B có bán trên thị trường là một huyền phù lỏng gồm HBsAg tinh khiết được hấp thụ vào tá được nhôm hydroxit. Vắc-xin viêm gan B là vắc-xin ổn định nhiệt, nhưng sự mất hiệu lực 50% của vắc-xin đã được báo cáo là được ghi nhận sau 9 tháng ở nhiệt độ trong khoảng từ 20°C đến 26°C, sau 1 tháng ở nhiệt độ trong khoảng từ 36°C đến 40°C, và sau 3 ngày ở nhiệt độ 45°C. Vì vậy cần có vắc-xin viêm gan B ổn định để cho phép sự bao phủ miễn dịch rộng hơn và để tăng cường sự an toàn miễn dịch, đặc biệt là ở một số nước hoặc khu vực đang phát triển. Toàn bộ bản mô tả của công bố đơn sáng chế Mỹ số 20090136538A1 được đưa vào đây bằng cách tham chiếu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa sự lây nhiễm virus viêm gan B hoặc các bệnh gián tiếp bởi sự lây nhiễm HBV, và phương pháp sử dụng chế phẩm này. Trong một số phương án, chế phẩm chứa có PIC, ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, và HBsAg. Trong một số phương án, chế phẩm chứa PIC, ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, HBsAg và HBcAg.

Trong một số phương án, nồng độ PIC trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 250µg/liều lượng đơn vị đến 6000µg/liều lượng đơn vị. Trong một số phương án, tỉ lệ của HBsAg so với PIC nằm trong khoảng từ 1:50 đến 1:5. Trong một số phương án, tỉ lệ của HBcAg so với PIC nằm trong khoảng từ 1:50 đến 1:5.

Trong một số phương án, liều lượng đơn vị được biểu diễn bằng thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 ml đến 250,0 ml.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm có khả năng khơi gợi sự sản xuất kháng thể bảo vệ, và/hoặc đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T CD4⁺ và CD8⁺. Chế phẩm có khả năng phòng ngừa sự lây nhiễm HBV, làm giảm bớt sự lây nhiễm HBV, hãm lại sự phát triển lây nhiễm HBV, và/hoặc loại bỏ HBV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng không bị nhiễm HBV, đối tượng nhiễm HBV mạn tính, và đối tượng nhiễm HBV cấp tính, và khơi gợi hoặc tăng cường các đáp ứng miễn dịch chống lại HBV.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm được dùng cho đối tượng ở một tần suất. Trong một số phương án, tần suất này có thể gồm hai tháng một lần, hai tháng hai lần, hai tháng ba lần, hai tháng bốn lần, hai tháng năm lần, một tháng một lần, một tháng hai lần, ba tuần một lần, ba tuần hai lần, hai tuần hai lần, hai tuần một lần và một tuần một lần.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất kit. Kit này gồm ít nhất một đồ chứa. Trong một số phương án, đồ chứa chứa chế phẩm, hoặc ít nhất một thành phần của chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được mô tả kỹ hơn về các phương án điển hình. Một số trong những phương án điển hình này được mô tả chi tiết bằng cách tham khảo các hình vẽ. Những phương án này là những phương án điển hình không giới hạn, trong đó các con số giống như để tham chiếu thể hiện các cấu trúc tương tự trong suốt cái nhìn khác của các hình vẽ, và trong đó:

FIG. 1 minh họa sự sản xuất IgG kháng HBsAg ở chuột sau khi cho dùng chế phẩm theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 2 minh họa sự sản xuất IgG1 kháng HBsAg ở chuột sau khi cho dùng chế phẩm theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 3 minh họa sự sản xuất IgG2a kháng HBsAg ở chuột sau khi cho dùng chế phẩm theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 4 là biểu đồ minh họa số tế bào tạo điểm vết IFN- γ trong các tế bào lá lách ở chuột sau khi cho dùng chế phẩm theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 5 là biểu đồ minh họa số tế bào tạo điểm vết IFN- γ trong PBMC của đối tượng người khỏe mạnh sau khi cho dùng chế phẩm theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 6 minh họa phổ tế bào học dòng chảy của một đối tượng trong nhóm đủ liều theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 7 minh họa sự sản sinh xytokin PBMC của các đối tượng người khỏe mạnh được tiêm chủng dưới sự kích thích của một peptit đơn theo một số phương án của sáng chế;

FIG. 8 minh họa hiệu quả của chế phẩm trên chuột chuyển gen HBV theo một số phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong mô tả chi tiết sau đây, nhiều chi tiết cụ thể được nêu ra bằng các ví dụ để

cung cấp sự hiểu biết thấu đáo về bản mô tả có liên quan. Tuy nhiên, rõ ràng với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng sáng chế này có thể được thực hiện mà không có chi tiết như vậy. Những sửa đổi khác nhau đối với các phương án được tiết lộ cũng rõ ràng đối với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và các nguyên tắc chung được định nghĩa ở đây có thể được áp dụng cho các phương án và ứng dụng khác mà không lệch ra khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Điều này sẽ được hiểu rằng trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây đều có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Điều này sẽ được hiểu rằng các dạng số ít “một”, “và”, và “cái” bao gồm các tham chiếu số nhiều trừ khi ngữ cảnh ra lệnh rõ ràng khác. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “và/hoặc” bao gồm các kết hợp bất kỳ và tất cả của một hoặc nhiều mục được liệt kê liên quan. Cũng sẽ được hiểu rõ ràng thuật ngữ “gồm”, và/hoặc “bao gồm”, khi được sử dụng trong sáng chế này, xác định sự có mặt của các yếu tố, các bước, các quá trình hoạt động, và/hoặc các thành phần, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung của một hoặc nhiều yếu tố, bước, quá trình hoạt động, và/hoặc các thành phần khác của nó.

Cần lưu ý rằng trừ khi có chỉ định khác, thuật ngữ “điều trị”, hoặc “việc điều trị”, có nghĩa là giảm bớt sự nhiễm HBV, ngăn chặn sự phát triển bệnh, và/hoặc loại bỏ HBV bằng cách cho dùng chế phẩm và khơi gợi hoặc nâng cao đáp ứng miễn dịch. Trừ khi có chỉ định khác, thuật ngữ “ngăn chặn”, hoặc “sự phòng ngừa”, có nghĩa là phát triển phòng vệ hiệu quả chống lại sự xâm nhập của virus bằng cách cho dùng chế phẩm và khơi gợi hoặc nâng cao đáp ứng miễn dịch.

Sáng chế đề xuất chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa sự nhiễm HBV. Trong một số phương án của sáng chế, chế phẩm chứa có PIC, ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, và HBsAg. Trong một số phương án của sáng chế, chế phẩm có thể còn bao gồm HBcAg và/hoặc thành phần bất kỳ khác để hoàn thành chế phẩm.

Cần lưu ý rằng các thành phần của chế phẩm là không giới hạn. Theo một số phương án của sáng chế, các thành phần của chế phẩm được xác định tốt nhất bởi một hoặc nhiều, thường là sự kết hợp của các thuộc tính cụ thể. Các thuộc tính cụ thể có thể bao gồm khối lượng phân tử, kích thước phân tử, nồng độ, độ PH, khả năng hòa tan, hoặc thuộc tính bất kỳ khác theo sáng chế. Ví dụ, chế phẩm có thể gồm một số chất (ví dụ, natri bicarbonat) để điều chỉnh độ PH của chế phẩm.

Theo một số phương án của sáng chế, các phân tử PIC của chế phẩm không đồng nhất về khối lượng phân tử. Thuật ngữ “không đồng nhất” được sử dụng ở đây có nghĩa là các phân tử PIC trong chế phẩm có khối lượng phân tử khác nhau. Trong một số phương án, các phân tử PIC với khối lượng phân tử của chúng bằng hoặc lớn hơn 66.000 Dalton (66.000 Dalton bằng với 6,4 Svedbergs) có thể được sử dụng trong chế phẩm. Ví dụ, các phân tử PIC, mà khối lượng phân tử của chúng nằm trong khoảng giữa 66.000 Dalton và 1,200.000 Dalton (tức là, giữa 6,4 và 24,0 Svedbergs), có thể được sử dụng trong chế phẩm. Một ví dụ khác, khối lượng phân tử của các phân tử PIC có thể lớn hơn 150.000 Dalton. Trong một số phương án, khối lượng phân tử của các phân tử PIC có thể nằm trong khoảng từ 100.000 Dalton đến 200.000 Dalton, từ 300.000 Dalton đến 4.000.000 Dalton, từ 500.000 Dalton đến 1.000.000 Dalton, từ 1.000.000 Dalton đến 1.500.000 Dalton, từ 1.500.000 Dalton đến 2.000.000 Dalton, từ 2.000.000 Dalton đến 2.500.000 Dalton, từ 2.500.000 Dalton đến 3.000.000 Dalton, từ 3.000.000 Dalton đến 3.500.000 Dalton, từ 3.500.000 Dalton đến 4.000.000 Dalton, từ 4.000.000 Dalton đến 4.500.000 Dalton, hoặc từ 4.500.000 Dalton đến 5.000.000 Dalton.

Theo một số phương án của sáng chế, chất kháng sinh trong chế phẩm có thể là tobramycin, anthracyclin, butyrosin sulfat, gentamicin, hygromycin, amikacin, dibekacin, nebramycin, beta-lactam, neomycin, puromycin, streptomycin, streptozotocin, kanamycin, hoặc các chất tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Trong một số phương án, chất kháng sinh có thể là kanamycin.

Theo sáng chế, nồng độ của chất kháng sinh có thể nằm trong khoảng từ 10 đơn vị/ml đến 100.000 đơn vị/ml. Trong một phương án cụ thể, nồng độ của chất kháng sinh có thể nằm trong khoảng từ 100 đơn vị/ml đến 10.000 đơn vị/ml. Trong một phương án

cụ thể khác, nồng độ của chất kháng sinh có thể nằm trong khoảng từ 500 đơn vị/ml đến 5.000 đơn vị/ml. Cần lưu ý rằng nồng độ này có thể được đưa ra theo một số thuộc tính (ví dụ, tác dụng phụ của việc sử dụng kháng sinh lâu dài hoặc liều cao, việc tạo ra vi sinh vật kháng kháng sinh, v.v.). Trong một số phương án, nồng độ của chất kháng sinh (ví dụ, kanamycin) không lớn hơn 1000 IU/ml theo đánh giá về sự an toàn và độc chất học tiền lâm sàng.

Cần lưu ý với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, chất kháng sinh và nồng độ của nó là không giới hạn. Trong một số phương án, chất kháng sinh và nồng độ của nó có thể được đưa ra theo các đặc trưng của đối tượng (ví dụ, tuổi tác, sự dị ứng kháng sinh, v.v.) và các đặc trưng bất kỳ khác. Ví dụ, đối với trẻ em dưới 5 tuổi, nồng độ của chất kháng sinh có thể giảm xuống. Ví dụ, đối với đối tượng dị ứng với các chất kháng sinh như ampicillin, chất kháng sinh trong chế phẩm có thể là chất kháng sinh khác ampicillin (ví dụ, kanamycin, v.v.)

Theo một số phương án của sáng chế, ion dương được cung cấp bởi một muối hoặc phức chất, bao gồm cả muối hoặc phức chất hữu cơ hoặc vô cơ (ví dụ, clorua, florua, hydroxit, phosphat, sulfat, v.v.). Ví dụ, ion dương có thể là canxi, có thể được cung cấp bởi canxi carbonat, canxi clorua, canxi florua, canxi hydroxit, canxi phosphat, or canxi sulfat. Các ion dương điển hình có thể bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, canxi, catmi, liti, magie, xeri, xesi, crôm, coban, đoteri, gali, iôt, sắt, và/hoặc kẽm. Trong một phương án cụ thể, ion dương có thể là canxi. Theo một số phương án của sáng chế, nồng độ của ion dương có thể nằm trong khoảng từ 0,01 μmol /liều lượng đơn vị đến 10 mmol/liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể, nồng độ của ion dương nằm trong khoảng từ 0,02 μmol /liều lượng đơn vị đến 5 mmol/liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác, nồng độ của ion dương nằm trong khoảng từ 0,1 μmol /liều lượng đơn vị đến 1 mmol/liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác nữa, nồng độ của ion dương nằm trong khoảng từ 0,1 μmol /liều lượng đơn vị đến 100 μmol /liều lượng đơn vị.

Theo một số phương án của sáng chế, nồng độ của PIC có thể nằm trong khoảng từ 250 μg /liều lượng đơn vị đến 6000 μg /liều lượng đơn vị. Trong một số phương án,

nồng độ của PIC có thể là 250µg/liều lượng đơn vị, 500µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị, 1500µg/liều lượng đơn vị, 2000µg/liều lượng đơn vị, 3000µg/liều lượng đơn vị, 4000µg/liều lượng đơn vị, 5000µg/liều lượng đơn vị, hoặc 6000µg/liều lượng đơn vị. Nồng độ của PIC là không giới hạn. Nồng độ của PIC có thể là giá trị bất kỳ nằm giữa 250µg/liều lượng đơn vị và 6000µg/liều lượng đơn vị. Ví dụ, nồng độ của PIC có thể nằm trong khoảng từ 500µg/liều lượng đơn vị đến 4000µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị đến 3000µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị đến 2500µg/liều lượng đơn vị.

Theo một số phương án của sáng chế, khi chế phẩm được dùng cho người lớn, nồng độ của PIC có thể là 500µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị, 1500µg/liều lượng đơn vị, 2000µg/liều lượng đơn vị, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 500µg/liều lượng đơn vị và 2000µg/liều lượng đơn vị. Khi chế phẩm được dùng cho người vị thành niên (ví dụ, trẻ em), nồng độ của PIC có thể là 250µg/liều lượng đơn vị, 500µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị, 1250µg/liều lượng đơn vị, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 250µg/liều lượng đơn vị và 1250µg/liều lượng đơn vị.

Theo một số phương án của sáng chế, liều lượng đơn vị có thể là khối lượng, thể tích, hoặc đặc trưng bất kỳ khác của liều lượng cụ thể của chế phẩm. Ví dụ, liều lượng đơn vị có thể là thể tích của một bao gói riêng biệt (ví dụ, viên nén) của chế phẩm. Liều lượng đơn vị có thể là khối lượng, thể tích, hoặc đặc trưng bất kỳ khác của một thành phần của chế phẩm. Ví dụ, liều lượng đơn vị có thể là nồng độ của PIC hoặc PIKA trong một liều lượng cụ thể của chế phẩm. Trong một số phương án, liều lượng đơn vị có thể là thể tích của một liều lượng cụ thể của chế phẩm. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, giá trị của liều lượng đơn vị được thể hiện bằng thể tích của một bao gói riêng biệt có thể là 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 20,0 ml, 30,0 ml, 40,0 ml, 50,0 ml, 60,0 ml, 70,0 ml, 80,0 ml, 90,0 ml, 100,0 ml, 150,0 ml, 200,0 ml, 250,0 ml, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 0,1 ml và 250,0 ml. Những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng liều lượng đơn vị cao hoặc thấp có thể không thuận tiện cho các hoạt động lâm sàng. Giá trị của liều lượng đơn vị có thể được thiết lập theo một số thuộc tính bao gồm các phương thức dùng thuốc

(ví dụ, cấp thuốc qua đường mũi, tiêm tĩnh mạch, cấp thuốc qua đường miệng, v.v.), các đặc trưng của đối tượng (ví dụ, con người, thể trọng, lịch sử tiêm chủng, v.v.), các đặc trưng của chế phẩm (ví dụ, nồng độ của PIC, độ PH của chế phẩm, v.v.), và/hoặc thuộc tính bất kỳ khác. Ví dụ, khi chế phẩm được cấp bằng cách tiêm cho đối tượng người hoặc đối tượng khác có cùng chiều cao hoặc cân nặng, giá trị liều lượng đơn vị có thể nằm trong khoảng từ 0,5 ml đến 1,0 ml. Ví dụ khác, khi phương pháp cấp thuốc là cấp bằng đường mũi, giá trị liều lượng đơn vị có thể nằm trong khoảng từ 0,15 ml đến 0,2 ml. Cụ thể hơn, ví dụ khác, khi chế phẩm được cấp bằng cách tiêm tĩnh mạch vào đối tượng người hoặc đối tượng khác có cùng kích thước hoặc cân nặng, giá trị liều lượng đơn vị có thể nằm trong khoảng từ 30,0 ml đến 100,0 ml. Cần lưu ý rằng mặc dù liều lượng đơn vị được sử dụng ở đây thể hiện thể tích của chế phẩm, điều đó không có nghĩa là chế phẩm bị giới hạn là chế phẩm dạng lỏng. Ví dụ, khi chế phẩm ở dạng rắn (ví dụ, bột khô, bột được đông khô, v.v.) và có thể được điều chế tiếp thành dạng lỏng, liều lượng đơn vị có thể thể hiện thể tích của chế phẩm ở dạng lỏng.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm có thể còn bao gồm các chất để ổn định chế phẩm. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, các chất này có thể gồm gelatin, sacaroza, đường kết tinh, lactoza, maltoza, trehaloza, glucoza, dextran phân tử thấp, sorbitol, polysorbat 20, mannitol PEG, albumin ở máu người, albumin huyết thanh ở người tái tổ hợp, natri caprylat, ure, nhôm hydroxit, phenol đỏ, magie clorua, kali clorua, natri clorua, natri thiosulphat, kali dihydro, axit ascorbic, triclometan, phenol, thiomersal, hoặc các chất tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm có thể còn bao gồm một chất đệm có sinh lý học khả dụng. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, chất đệm sinh lý học khả dụng có thể bao gồm chất đệm axetat, chất đệm trisamin, chất đệm bicarbonat, chất đệm carbonat, nước muối đệm phosphat, hoặc chất tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Giá trị PH của chất đệm có sinh lý học khả dụng có thể nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0. Trong một số phương án, giá trị PH của chất đệm có sinh lý học khả dụng có thể bằng 6,0, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 6,0 và 8,0. Trong một số phương án cụ thể, chất đệm có sinh lý

học khả dụng là nước muối đệm phosphat (PH: 7,3-7,5).

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm có thể ở dạng bột khô, dung dịch (ví dụ, dung dịch tiêm, dung dịch nước, dung dịch nước muối, hỗn dịch, thuốc mỡ, dạng nhỏ giọt, nhũ tương, gel, si-rô, huyết thanh, v.v.), viên nén, viên nén được bao, viên thuốc đạn, thuốc viên, hạt, viên nén bọc đường, viên nang, hoặc các dạng khác tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Trong một số phương án, chế phẩm có thể được điều chế thành dung dịch tiêm. Dạng của chế phẩm là không giới hạn. Các dạng của chế phẩm và phương pháp điều chế chúng được mô tả trong tình trạng kỹ thuật (ví dụ, Stanley A Plotkin et al., Vắc-xin, 4th edition, W.B. Saunders Company 2003) nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án của sáng chế, HBsAg có thể được tạo ra bởi các vi sinh vật gồm có *Hansenula Polymorpha*, tế bào buồng trứng ở chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO), *Pichia pastoris*, hệ thống biểu hiện ở côn trùng, hoặc các loại tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. HBsAg với độ tinh khiết lớn hơn 99% có thể được dùng cho trẻ nhỏ, trẻ em trên 5 tuổi, và người trưởng thành. Theo một số phương án của sáng chế, HBcAg có thể được tạo ra bằng các phương pháp và tái tổ hợp. HBcAg có thể được tạo ra bởi *Escherichia coli*, *Hansenula Polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, hệ thống biểu hiện ở côn trùng, hoặc các loại tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Trong một số phương án, tỉ lệ khối lượng của HBsAg so với PIC có thể là 1:50, 1:40, 1:30, 1:25, 1:20, 3:50, 1:15, 1:10, 1:5, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 1:50 và 1:5. Trong một số phương án cụ thể, tỉ lệ khối lượng của HBsAg so với PIC có thể là 1:25. Cần lưu ý rằng tỉ lệ khối lượng của HBsAg so với PIC là không giới hạn. Ví dụ, một chế phẩm với tỉ lệ khối lượng của HBsAg so với PIC gần bằng 1:25 (ví dụ, thấp hơn hoặc cao hơn 10%) có khả năng cung cấp sự an toàn đầy đủ, và khơi gợi sớm hơn cũng mạnh hơn (tức là, kháng thể có hiệu giá cao hơn được tạo ra) đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T.

Trong một số phương án, nồng độ của HBsAg trong chế phẩm có thể nằm trong

khoảng từ 10µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, nồng độ của HBsAg trong chế phẩm có thể là 10µg/liều lượng đơn vị, 15µg/liều lượng đơn vị, 20µg/liều lượng đơn vị, 25µg/liều lượng đơn vị, 30µg/liều lượng đơn vị, 35µg/liều lượng đơn vị, 40µg/liều lượng đơn vị, 50µg/liều lượng đơn vị, 60µg/liều lượng đơn vị, 70µg/liều lượng đơn vị, 80µg/liều lượng đơn vị, 90µg/liều lượng đơn vị, 100µg/liều lượng đơn vị, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 10µg/liều lượng đơn vị và 100µg/liều lượng đơn vị. Trong một số phương án, nồng độ của HBsAg trong chế phẩm có thể là 20µg/liều lượng đơn vị, 40µg/liều lượng đơn vị, hoặc 60µg/liều lượng đơn vị.

Trong một số phương án, nồng độ của HBcAg trong chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 10µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, nồng độ của HBcAg trong chế phẩm có thể là 10µg/đơn vị, 15µg/liều lượng đơn vị, 20µg/liều lượng đơn vị, 25µg/liều lượng đơn vị, 30µg/liều lượng đơn vị, 35µg/liều lượng đơn vị, 40µg/liều lượng đơn vị, 50µg/liều lượng đơn vị, 60µg/liều lượng đơn vị, 70µg/liều lượng đơn vị, 80µg/liều lượng đơn vị, 90µg/liều lượng đơn vị, 100µg/liều lượng đơn vị, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 10µg/liều lượng đơn vị và 100µg/liều lượng đơn vị. Trong một số phương án, nồng độ của HBcAg có thể nằm trong khoảng từ 10µg/liều lượng đơn vị đến 50µg/liều lượng đơn vị, hoặc từ 50µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm có thể được dùng cho đối tượng không bị nhiễm HBV, đối tượng bị nhiễm HBV mạn tính (còn gọi là “đối tượng mạn tính” hoặc “đối tượng HBV mạn tính” trong sáng chế), và đối tượng bị nhiễm HBV cấp tính (còn gọi là “đối tượng cấp tính” hoặc “đối tượng HBV cấp tính”). Trong một số phương án, chế phẩm của sáng chế có khả năng khơi gợi đáp ứng miễn dịch tế bào T CD4⁺ và tế bào T CD8⁺ mạnh hơn so với sự kết hợp của kháng nguyên và tá dược phèn. Ví dụ, chế phẩm của sáng chế có thể khơi gợi sự sản sinh xytokin cao hơn (2-30 lần) so với sự kết hợp của kháng nguyên và tá dược phèn.

Trong một phương án cụ thể, chế phẩm có thể gồm 20µg/liều lượng đơn vị HBsAg, 20µg/liều lượng đơn vị HBcAg và 500µg/liều lượng đơn vị PIC. Trong một

phương án cụ thể khác, chế phẩm có thể gồm 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg, 40µg/liều lượng đơn vị HBcAg và 1000µg/liều lượng đơn vị PIC.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm HBV, tốt hơn là sự nhiễm HBV mạn tính.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa sự nhiễm HBV ở dạng bột khô hoặc bột đông khô.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm có thể được sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm HBV. Trong một số phương án, thuốc này có thể bao gồm vắc-xin phòng bệnh, vắc-xin điều trị, chế phẩm vắc-xin, hoặc các loại thuốc tương tự, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Trong một phương án cụ thể, chế phẩm có thể được sử dụng để điều chế thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm HBV mạn tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm HBV được đề xuất. Phương pháp này có thể được định hình theo các đặc trưng của chế phẩm (ví dụ, liều lượng đơn vị, PH, v.v.), phương pháp cấp thuốc (ví dụ, cấp thuốc qua đường miệng, cấp thuốc qua đường mũi, tiêm tĩnh mạch, v.v.), các đặc trưng của đối tượng (ví dụ, tuổi tác, giới tính, dị ứng kháng sinh, v.v.), mục đích sử dụng (ví dụ, điều trị hoặc phòng ngừa chống lại sự nhiễm HBV), và/hoặc thuộc tính bất kỳ khác để thực hiện việc cấp chế phẩm dùng cho các đối tượng. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, trong một số phương án, khi chế phẩm được sử dụng để điều trị sự nhiễm HBV, phương pháp có thể bao gồm việc cấp chế phẩm ở lượng có hiệu quả điều trị cho các đối tượng. Tương tự, khi chế phẩm được sử dụng để phòng ngừa sự lây nhiễm HBV, phương pháp có thể bao gồm việc cấp chế phẩm ở lượng có hiệu quả dự phòng cho các đối tượng. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” được sử dụng ở đây đề cập đến một lượng đủ để khơi gợi đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T và làm giảm hoặc loại bỏ sự lây nhiễm. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả dự phòng” được sử dụng ở đây đề cập đến một lượng đủ để khơi gợi kháng thể bảo vệ chống lại sự nhiễm virus. Ví dụ, như được khuyến cáo bởi Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), nồng độ của kháng thể bảo vệ có thể ít nhất bằng

10 mIU/ml.

Trong một số phương án, phương pháp có thể được định hình theo các đặc trưng của chế phẩm. Đặc trưng của chế phẩm có thể bao gồm liều lượng đơn vị, độ PH của chế phẩm, hoặc các đặc trưng tương tự khác. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm việc điều chỉnh độ PH của chế phẩm đến khoảng 6,0-8,0 bằng cách bổ sung một chất đệm có sinh lý học khả dụng vào hợp chất. Ví dụ khác, phương pháp có thể bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm ở một lượng nhất định (ví dụ, lượng nhỏ hơn, lớn hơn, hoặc bằng với liều lượng đơn vị) theo đánh giá về liều lượng đơn vị.

Trong một số phương án, phương pháp có thể được định hình theo các phương pháp cấp thuốc. Ví dụ, việc cấp thuốc có thể là theo hệ thống hoặc tại chỗ. Các phương pháp cấp thuốc có thể bao gồm tiêm ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, tiêm bắp, tiêm trong màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong da, cấp thuốc trong khối u, cấp thuốc xung quanh khối u, v.v.), cấp thuốc xuyên qua da, và các cách cấp thuốc khác bất kỳ để thực hiện phương pháp. Cụ thể hơn, trong một số phương án, các phương pháp cấp thuốc có thể còn bao gồm cấp qua đường trực tràng, cấp qua âm đạo, cấp qua đường mũi, cấp qua đường miệng, cấp qua đường mắt, cấp thuốc dưới lưỡi, và xông hít. Cần lưu ý rằng phương pháp cấp thuốc là không giới hạn. Đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các biến thể và thay đổi khác vẫn nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Trong một số phương án, phương pháp có thể được định hình theo tần suất cấp thuốc. Tần suất cấp thuốc có thể là hai tháng một lần, hai tháng hai lần, hai tháng ba lần, hai tháng bốn lần, hai tháng năm lần, một tháng một lần, một tháng hai lần, ba tuần một lần, ba tuần hai lần, hai tuần hai lần, hai tuần một lần, một tuần một lần, hoặc tần suất thích hợp bất kỳ khác để thực hiện phương pháp. Ví dụ, khi chế phẩm được dùng cho các đối tượng không bị nhiễm HBV, chế phẩm ở lượng có hiệu quả phòng ngừa có thể được dùng cho các đối tượng với tần suất hai tháng ba lần, một tháng hai lần, hoặc sáu tháng ba lần. Ví dụ khác, khi chế phẩm được dùng cho các đối tượng bị nhiễm HBV, chế phẩm ở lượng có hiệu quả điều trị có thể được dùng cho các đối tượng với tần suất hai tháng bốn lần, hai tháng năm lần, một tháng hai lần, ba tuần một lần, ba tuần hai lần,

hoặc một tuần một lần. Theo sáng chế, một tháng gồm 28, 29, 30, hoặc 31 ngày, và một tuần gồm 7 ngày.

Trong một số phương án cụ thể, phương pháp có thể bao gồm việc cấp (ví dụ, bằng cách tiêm bắp) chế phẩm cho các đối tượng với tần suất hai tháng ba lần. Ví dụ, phương pháp này có thể bao gồm các bước:

- 1) vào ngày 0, cấp chế phẩm với lượng thứ nhất cho đối tượng;
- 2) từ ngày 25 đến ngày 31, cấp chế phẩm với lượng thứ hai cho đối tượng;
- 3) từ ngày 53 đến ngày 59, cấp chế phẩm với lượng thứ ba cho đối tượng.

Lượng thứ nhất, lượng thứ hai, và lượng thứ ba có thể giống nhau, hoặc khác nhau. Ví dụ, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba bằng với lượng có hiệu quả điều trị, hoặc lượng có hiệu quả phòng ngừa. Ví dụ khác, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba được thiết lập theo nồng độ của HBsAg (ví dụ, 20µg/liều lượng đơn vị, 40µg/liều lượng đơn vị, v.v.), nồng độ của HBcAg (ví dụ, 10µg/liều lượng đơn vị, 20µg/liều lượng đơn vị, 50µg/liều lượng đơn vị, 100µg/liều lượng đơn vị, v.v.), và/hoặc nồng độ của PIC (ví dụ, 500µg/liều lượng đơn vị, 1000µg/liều lượng đơn vị). Trong một số phương án, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba gồm 20µg/liều lượng đơn vị HBsAg và 500µg/liều lượng đơn vị PIC. Trong một số phương án, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba gồm 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg và 1000µg/liều lượng đơn vị PIC. Trong một số phương án, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba gồm 10µg/liều lượng đơn vị đến 50µg/liều lượng đơn vị HBcAg. Trong một số phương án, ít nhất một trong số lượng thứ nhất, lượng thứ hai và lượng thứ ba gồm 50µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị HBcAg.

Theo một số phương án của sáng chế, kit để điều trị và/hoặc phòng ngừa nhiễm HBV được đề xuất. Kit có thể gồm ít nhất một đồ chứa, một mũi kim, nước để tiêm, hướng dẫn sử dụng, hoặc thành phần khác, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, kit có thể gồm ba đồ chứa. Chế phẩm được chứa trong các đồ chứa có thể gồm cấu thành và/hoặc lượng chế phẩm giống hoặc khác nhau. Ví dụ, ít nhất một đồ chứa (ví dụ, hai,

hoặc ba đồ chứa) có thể gồm 20µg/liều lượng đơn vị HBsAg và 500µg/liều lượng đơn vị PIC. Ít nhất một đồ chứa (ví dụ, hai, hoặc ba đồ chứa) có thể gồm 10µg/liều lượng đơn vị đến 20µg/liều lượng đơn vị HBcAg. Ví dụ khác, ít nhất một đồ chứa (ví dụ, hai, hoặc ba đồ chứa) có thể gồm 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg và 1000µg/liều lượng đơn vị PIC. Ít nhất một đồ chứa (ví dụ, hai, hoặc ba đồ chứa) có thể gồm 50µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị HBcAg. Trong một số phương án khác, chế phẩm trong một đồ chứa có thể ở dạng lỏng (ví dụ, hỗn dịch, dung dịch, v.v.). Trong một số phương án, chế phẩm trong một đồ chứa có thể ở dạng rắn (ví dụ, bột khô, bột được đông khô, v.v.). Chế phẩm ở dạng rắn có thể được điều chế thành dạng lỏng (ví dụ, hỗn dịch, dung dịch, v.v.), và lưu trữ trong một hoặc nhiều container tiệt trùng (ví dụ, ống, chai, ống thuốc, ống tiêm, v.v.) trước khi sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế các chế phẩm

Trong một số phương án, chế phẩm chứa HBsAg, PIC, kanamycin, và canxi clorua, trong đó tỉ lệ của HBsAg với PIC là 1:25. Cụ thể hơn, chế phẩm chứa 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg, 1000µg/liều lượng đơn vị PIC, 800 IU/liều lượng đơn vị kanamycin, và 0,16 µmol/liều lượng đơn vị Ca^{2+} .

Trong một số phương án, chế phẩm chứa HBcAg, HBsAg, PIC, kanamycin, và canxi clorua. Chế phẩm chứa 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg, 1000µg/liều lượng đơn vị PIC, 800 IU/liều lượng đơn vị kanamycin, và 0,16 µmol/liều lượng đơn vị Ca^{2+} . Cụ thể hơn, nồng độ của HBcAg nằm trong khoảng từ 10µg/liều lượng đơn vị đến 50µg/liều lượng đơn vị.

Trong một số phương án, chế phẩm chứa HBcAg, HBsAg, PIC, kanamycin, và canxi clorua. Chế phẩm chứa 40µg/liều lượng đơn vị HBsAg, 1000µg/liều lượng đơn vị PIC, 800 IU/liều lượng đơn vị kanamycin, và 0,16 µmol/liều lượng đơn vị Ca^{2+} . Cụ thể hơn, nồng độ của HBcAg nằm trong khoảng từ 50µg/liều lượng đơn vị đến 100µg/liều lượng đơn vị.

Ví dụ 2: Nghiên cứu độc chất học trước lâm sàng

Ví dụ 2 minh họa các nghiên cứu độc chất học trước lâm sàng của chế phẩm và các thành phần chính của nó (gồm có PIC, ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, và ít nhất một ion dương, tập hợp là “PIKA”) theo một số phương án của sáng chế. Như được minh họa trong Bảng 1, chuột được sử dụng trong ví dụ 2 có thể trọng trung bình bằng 0,019 kg, và có khả năng uống 0,2 ml chế phẩm mà chứa 8µg HBsAg (0,4 mg/kg) và 200µg PIC (10 mg/kg), hoặc có khả năng uống 0,2 ml PIKA mà chứa 200µg PIC (10 mg/kg). Liều lượng của chế phẩm được sử dụng ở chuột cao hơn khoảng 1,200 lần so với liều lượng được khuyến cáo sử dụng ở người (20µg HBsAg (0,0003 mg/kg) và 500µg PIKA (0,0083 mg/kg)). Liều lượng tối đa được khuyến cáo sử dụng ở người gấp hai lần liều lượng tối thiểu được khuyến cáo, cung cấp biên độ an toàn (MoS) bằng 600. Theo các nghiên cứu độc chất học mạn tính ở loài chuột gặm nhấm, giá trị MoS bằng 600 đến liều lượng tối thiểu được khuyến cáo ở người, và 300 đến liều lượng tối đa được khuyến cáo ở người, tương ứng. Theo nghiên cứu tiền lâm sàng của loài linh trưởng, các giá trị MoS bằng 40 đến liều lượng tối thiểu được khuyến cáo ở người, và 20 đến liều lượng tối đa được khuyến cáo ở người, tương ứng.

Bảng 1. MoS trong các nghiên cứu độc chất học tiền lâm sàng

Độ an toàn	MoS của PIC hoặc PIKA	MoS của chế phẩm
Độc chất học cấp tính ở loài gặm nhấm		
Liều lượng tối thiểu được khuyến cáo ở người	1.200	1.200
Liều lượng tối đa được khuyến cáo ở người	600	600
Độc chất học mạn tính ở loài gặm nhấm		
Liều lượng tối thiểu được khuyến cáo ở người	600	600
Liều lượng tối đa được khuyến cáo ở người	300	300
Độc chất học mạn tính ở loài linh trưởng		
Liều lượng tối thiểu được khuyến cáo ở người	40	40
Liều lượng tối đa được khuyến cáo ở người	20	20
Xét thể trọng của đối tượng người lấy làm ví dụ là 60 kg, MoS được xác định như sau: $MoS = (\text{liều lượng được sử dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng, mg/kg}) \div (\text{liều lượng được khuyến cáo ở người, mg/kg})$		

Ví dụ 3: Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch trước lâm sàng ở loài gặm nhấm

Phương pháp

Loài gặm nhấm được sử dụng trong ví dụ 3 là chuột BALB/c 6 tuần tuổi, được chia thành 6 nhóm. Mỗi nhóm gồm 18 con chuột (9 chuột đực, với thể trọng nằm trong khoảng từ 17,3 g đến 20,7 g; 9 chuột cái, với thể trọng nằm trong khoảng từ 19,0 g đến 23,7 g). Như được minh họa trong Bảng 2, chế phẩm và các chất khác được dùng cho chuột vào các ngày 1, ngày 8, ngày 22, ngày 36, ngày 50, ngày 64 và ngày 78 bằng cách tiêm ở phía trước cơ cẳng chân.

Bảng 2. Lịch trình cấp thuốc

Nhóm	Tên nhóm	Chuột BALB/c	HBsAg (μ g)	tá được		đối chứng PBS (μ l)
				PIKA (μ g)	Alum (μ g)	
1	Nhóm đối chứng dung môi	9M, 9F	-	-	-	250
2	Nhóm đối chứng kháng nguyên	9M, 9F	15	-	-	-
3	Nhóm đối chứng vắc-xin	9M, 9F	3	-	80	-
4	Nhóm liều lượng thấp	9M, 9F	3	50	-	-
5	Nhóm liều lượng trung bình	9M, 9F	9	150	-	-
6	Nhóm liều lượng cao	9M, 9F	15	250	-	-

Vào ngày 3, ngày 24, ngày 38, ngày 52, ngày 66, ngày 80, và ngày 106, các mẫu máu được lấy để đo hiệu giá của kháng thể kháng-HBsAg, để xác định đáp ứng miễn dịch thể dịch.

Vào ngày 38, ngày 80, và ngày 106, ba con chuột đực và ba con chuột cái ở mỗi nhóm bị giết để xác định đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Peptit HBsAg hoặc HBsAg CD8⁺ được sử dụng để kích thích in vitro các tế bào lá lách. Tần suất các tế bào lá lách sản sinh IFN- γ được đo bằng ELISPOT.

Kết quả

Như được minh họa trong FIG. 1, FIG. 2, và FIG. 3, chế phẩm (gồm HBsAg và PIKA) khơi gợi đáp ứng miễn dịch thể dịch mạnh hơn (được thể hiện bởi sự sản sinh IgG, IgG1, và IgG2a), điều này chỉ ra rằng PIKA tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch chống lại HBsAg.

Theo FIG. 3, chế phẩm sản sinh đáp ứng miễn dịch loại Th1 mạnh và sự sản sinh

IgG2a tăng lên đáng kể.

Theo FIG. 4, kết quả của các thử nghiệm ELISPOT chỉ ra rằng số tế bào lá lách sản sinh IFN- γ tăng lên đáng kể sau khi kích thích in vitro. Chế phẩm (gồm HBsAg và PIKA) tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T.

Sự tăng giá trị hiệu giá IgG2a chỉ ra rằng đáp ứng miễn dịch chính được khơi gợi bởi chế phẩm thuộc về đáp ứng miễn dịch loại Th1. Đáp ứng miễn dịch loại Th1 và đáp ứng miễn dịch tế bào là tác dụng quan trọng của vắc-xin điều trị. Đáp ứng miễn dịch loại Th1 phòng ngừa sự nhiễm virus, và loại bỏ các tế bào bị nhiễm. Ngoài ra, sự tăng số tế bào lá lách sản sinh IFN- γ chỉ ra rằng chế phẩm tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch tế bào.

Ví dụ 4: Nghiên cứu độc chất học mạn tính ở loài linh trưởng

Phòng thí nghiệm:

Ví dụ 4 được thực hiện ở Trung tâm quốc gia đánh giá độ an toàn của thuốc, Viện kiểm soát dược phẩm và sinh phẩm quốc gia, Trung Quốc.

Phương pháp

Loài linh trưởng được sử dụng trong ví dụ 4 là khỉ Rehusus được chia thành năm nhóm. Mỗi nhóm gồm 8 con khỉ Rehusus (4 con cái và 4 con đực; 1,6-3,2 năm tuổi; 3-3,5 kg). Chế phẩm, HBsAg, PIKA hoặc PBS được dùng cho linh trưởng 5 lần (vào ngày 0, ngày 14, ngày 28, ngày 56, và ngày 84) trong ba tháng theo Bảng 3.

Bảng 3. Sự phân nhóm và lịch trình cấp thuốc

Nhóm	Động vật	HBsAg		PIKA		Đối chứng
		Liều lượng (μ g)	Nồng độ (mg/kg)	Liều lượng (μ g)	Nồng độ (mg/kg)	
1	4M, 4F	-	-	1.000	0,31	-
2	4M, 4F	40	0,012	-	-	-
3	4M, 4F	40	0,012	1.000	0,31	-

4	4M, 4F	60	0,018	1.500	0,46	-
5	4M, 4F	-	-	-	-	PBS

Mỗi nhóm nhận 40µg HBsAg và 1.000µg PIC (hoặc PIKA), hoặc 60µg kháng nguyên HBsAg và 1.500µg PIC (hoặc PIKA).

Các triệu chứng lâm sàng tại chỗ (ví dụ, tại chỗ cấp thuốc) và toàn thân được quan sát, và các mẫu máu được lấy 5 lần từ ngày 2 đến ngày 126. Vào ngày 85 (tức là, 24 giờ sau lần cấp thuốc thứ năm) và ngày 126, các con khỉ bị giết. 36 bộ phận của các con khỉ cái và 32 bộ phận của các con khỉ đực được sử dụng để xét nghiệm mô học.

Các xét nghiệm mô học

Các xét nghiệm mô học gồm:

- các triệu chứng lâm sàng,
- vẻ bên ngoài, tóc, hoạt động, phản ứng, hô hấp, tu thể, đầu-vai (gồm mắt, tai, miệng, mũi), bụng, hậu môn, vùng chậu, màu da, sự căng cơ, chấn thương, khối u;
- hành vi liên quan đến triệu chứng;
- triệu chứng tại chỗ cấp thuốc;
- thể trọng;
- việc cho ăn;
- nhiệt độ cơ thể;
- huyết học: T, APTT, RBC, WBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, MPV, % số đếm, Neut %, Lymph %, Mono %, Eos %, Baso % hồng cầu lưới;
- thử nghiệm sinh hóa: AST, ALT, BUN, CHO, GLU, TBIL, CRE, ALP, CK, LDH, TP, ALB, TG, GGT, Ca, P, K⁺, Na⁺, Cl⁻, IgA, IgG, IgM, C3, C4;
- thử nghiệm nước tiểu;
- phân tích bệnh lý và mô học của các cơ quan sau: não, tủy sống, tim, động mạch, phổi (bao gồm phế quản), gan, thận, lách, tụy, dạ dày, tá tràng, ruột chay, hồi tràng, đại tràng, trực tràng, manh tràng, tinh hoàn, tuyến tiền liệt, buồng trứng, tử cung,

âm đạo, bàng quang, tuyến yên, tuyến giáp, tuyến cận giáp, tuyến cận giáp, tuyến thượng thận, dây thần kinh tọa, cơ bắp, hạch bạch huyết màng treo ruột, hạch bạch huyết bẹn, tuyến ức, tuyến vú, xương ức, vị trí cấp thuốc;

– đáp ứng miễn dịch thể dịch: hiệu giá kháng thể trong huyết thanh được đo bằng phương pháp ELISA.

Kết quả

Không quan sát thấy các triệu chứng tại chỗ hoặc toàn thân. Không quan sát thấy những thay đổi bất thường trong các xét nghiệm huyết học và xét nghiệm sinh hóa huyết thanh. Kết quả xét nghiệm mô học lá lách cho thấy số lượng đại thực bào được kích hoạt tăng lên và phân bào tại các trung tâm mầm của tủy trắng lá lách. Các trung tâm mầm của tủy trắng lá lách là những khu vực chính của sự tăng sinh tế bào lympho, đặc biệt là các khu vực chính của kích hoạt tế bào B sau khi kích thích kháng nguyên. PIKA tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên, và khơi gợi sự tăng sinh tế bào lympho. Không quan sát thấy sự hoại tử lá lách hay chết tế bào. Do đó, kết quả chỉ ra những thay đổi mô học của lá lách không phải là bệnh lý, mà là sinh lý; các đáp ứng miễn dịch có thể đảo ngược. Không quan sát được hiện tượng bất thường trong kết quả mô học của bất kỳ cơ quan nào khác.

Các hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cho thấy các loài linh trưởng phát triển các đáp ứng miễn dịch thể dịch tăng cường sau khi dùng chế phẩm chứa HBsAg và PIKA. Bảng 4 minh họa đáp ứng miễn dịch của loài linh trưởng.

Bảng 4. Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh

Nhóm	HBsAg (mg/kg)	PIC hoặc PIKA (mg/kg)	Hiệu giá kháng thể					
			Ngày 0	Ngày 21	Ngày 43	Ngày 85	Ngày 100	Ngày 126
1	-	0,31	0	0	0	0	0	0
2	0,012	-	0	2	6	148	620	253
3	0,012	0,31	0	72	444	1585	4502	2379

4	0,018	0,46	0	140	602	5261	11459	4912
5	PBS		0	0	0	0	0	0

Ví dụ 5: Nghiên cứu lâm sàng về chế phẩm ở đối tượng người khỏe mạnh

Phòng thí nghiệm

Khoa Tiêu hóa và Gan mật của Bệnh viện Đa khoa Singapore, Singapore; Phòng thí nghiệm lâm sàng & Đơn vị nghiên cứu của Bệnh viện đa khoa Changi, Singapore.

Phương pháp

Các đối tượng người khỏe mạnh được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm. Hai trong số ba nhóm nhận được liều tăng dần của chế phẩm, và nhóm thứ ba nhận vắc-xin HBV có sẵn thương mại. Chế phẩm và vắc-xin được cấp bằng cách tiêm bắp ở vùng có hình tam giác của cánh tay trên.

Chế phẩm và vắc-xin

Nhóm A (hoặc nhóm “nửa liều”): chế phẩm chứa 20µg HBsAg và 500µg PIKA;

Nhóm B (hoặc nhóm “đủ liều”): chế phẩm chứa 40µg HBsAg và 1000µg PIKA;

Nhóm C (hoặc nhóm “đối chứng”): vắc-xin chứa 20µg HBsAg và 500µg tá được phèn (ví dụ, vắc-xin có sẵn thương mại từ GSK: ENGERIX™-B)

Lịch trình cấp thuốc

Để thực hiện các thử nghiệm mù kép, đối tượng nhận chế phẩm hoặc vắc-xin ba lần và giả được một lần trong 6 tháng như được minh họa trong bảng 5.

Bảng 5. Lịch trình cấp thuốc

nhóm	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 28	Ngày 56	Ngày 84	Ngày 168	Ngày 196
A & B	×		×	×		○	
C	×		×	○		×	

× có nghĩa là cấp chế phẩm hoặc vắc-xin; ○ có nghĩa là cấp giả được.

Kết quả

1. Biên độ liều lượng an toàn

Liều lượng chế phẩm và vắc-xin được sử dụng trong ví dụ 5 được dựa trên liều lượng trong ví dụ 1. Các nghiên cứu độc chất học tiền lâm sàng của các loài linh trưởng và động vật gặm nhấm cung cấp thông tin chính về biên độ an toàn. Ví dụ 2 đánh giá độ sai cho phép của chế phẩm, hoặc chỉ PIKA.

Việc sử dụng các vắc-xin có sẵn thương mại cũng được đưa vào xem xét. Các vắc-xin có sẵn thương mại thường được cấp ba lần trong 6 tháng (10 μ g hoặc 20 μ g HBsAg). Đối với các đối tượng thẩm tách máu và các đối tượng sắp được cấy ghép, vắc-xin được cấp 4 lần (40 μ g HBsAg), mỗi vắc-xin có thể được cấp ở tháng 0, tháng 1, tháng 2, và tháng 6.

Các nghiên cứu miễn dịch tiền lâm sàng xác nhận thêm rằng liều lượng khuyến cáo cung cấp đáp ứng miễn dịch đầy đủ. Theo kết quả, khi tỉ lệ của kháng nguyên đối với PIKA bằng hoặc gần bằng 1:25, đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T đạt được sự cân bằng đầy đủ. Đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, việc tăng tỉ lệ của kháng nguyên đối với PIKA (1:25) có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch thể dịch.

Để áp dụng liều lượng cao HBsAg (40 μ g) vào nghiên cứu lâm sàng, chế phẩm chứa 1000 μ g PIKA theo tỉ lệ (1:25). Theo kết quả của ví dụ 1, đối tượng có thể chịu được 40 μ g HBsAg và 1000 μ g PIKA. Để giảm các nguy cơ lâm sàng, các đối tượng trong nhóm nửa liều được cấp 20 μ g HBsAg và 500 μ g PIKA. Biên độ an toàn của nhóm nửa liều chỉ ra rằng sự kết hợp của 40 μ g HBsAg và 1000 μ g PIKA là tối ưu.

2. Lịch trình cấp thuốc tối ưu hóa

Bằng cách điều chỉnh lịch trình cấp thuốc thông thường (ba lần trong 6 tháng), chế phẩm đạt hiệu quả hơn. Sáng chế còn đề xuất một lịch trình cấp thuốc tăng tốc để khơi gợi việc sản xuất kháng thể chống vi-rút bảo vệ. Cụ thể hơn, lịch trình cấp thuốc tăng tốc có số lần cấp thuốc thường xuyên hơn với lịch trình cấp thuốc thông thường, kết quả là, lịch trình cấp thuốc tăng tốc có thể khơi gợi đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Trong ví dụ 5, lịch trình cấp thuốc (ba lần trong 2 tháng) cung cấp đủ thời

gian để giảm nguy cơ của các đối tượng giữa hai khoảng thời gian cấp thuốc và đủ thời gian để quan sát phản ứng miễn dịch.

3. Hiệu giá kháng thể

Kết quả của các đáp ứng miễn dịch thể dịch được dựa trên việc đánh giá các mẫu máu của mỗi nhóm thu thập vào các ngày 0, ngày 56, ngày 84, và ngày 196. Các mẫu máu được đánh giá để thu được chuẩn độ của các kháng thể kháng HBV. Kết quả cho thấy khả năng gây miễn dịch của chế phẩm vượt qua nhóm đối chứng (nhóm C, vắc-xin có sẵn thương mại ENGERIX™-B). Theo bảng 6, kết quả cho thấy cả nhóm đủ liều (Nhóm B) và nhóm nửa liều (Nhóm A), một khi được áp dụng lịch trình cấp thuốc tăng tốc, tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh hơn và sớm hơn.

Bảng 6. Số lượng và phần trăm đối tượng mà thu được hiệu giá bằng 10 mIU/ml

Nhóm	N	Chế phẩm		Phèn (µg)	Số lượng và phần trăm đối tượng mà thu được hiệu giá bằng 10 mIU/ml			
		HBsAg (µg)	PIKA (µg)		Ngày 0	Ngày 56	Ngày 84	Ngày 196
A	11	20	500	-	0 (0%)	8 (72,73%)	10 (90,91%)	10 (90,91%)
B	10	40	1000	-	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
C	11	20	-	500	0 (0%)	6 (54,55%)	7 (63,64%)	9 (81,82%)

N có nghĩa là số lượng đối tượng trong nhóm

WHO khuyến cáo rằng hiệu giá tiêu chuẩn của các kháng thể kháng virus nên bằng 10 mIU/ml để cung cấp sự bảo vệ khỏi lây nhiễm HBV. Theo bảng 6, vào ngày 56 (tức là, sau khi cấp thuốc lần thứ hai), tất cả các đối tượng trong nhóm dùng đủ liều đã đạt được hiệu giá tiêu chuẩn, trong khi 72,73% các đối tượng trong nhóm nửa liều và 54,55% các đối tượng trong nhóm đối chứng đạt được hiệu giá tiêu chuẩn. Vào ngày 196, tỉ lệ phần trăm các đối tượng có hiệu giá tiêu chuẩn trong nhóm đủ liều, nhóm nửa

liều và nhóm đối chứng là 100%, 90,91%, và 81,82%, tương ứng.

Bảng 7. Số lượng và phần trăm đối tượng mà thu được hiệu giá bằng 150 mIU/ml

N có nghĩa là tổng số đối tượng

Nhóm	N	Chế phẩm		Phèn (μ g)	Số lượng và phần trăm đối tượng mà thu được hiệu giá bằng 150 mIU/ml			
		HBsAg (μ g)	PIKA (μ g)		Ngày 0	Ngày 56	Ngày 84	Ngày 196
A	11	20	500		0 (0%)	3 (27,27%)	9 (81,82%)	10 (90,91%)
B	10	40	1000		0 (0%)	4 (40%)	10 (100%)	10 (100%)
C	11	20		500	0 (0%)	4 (36,36%)	4 (36,36%)	5 (45,45%)

Theo bảng 7, các đối tượng trong nhóm đủ liều (Nhóm B) và nhóm nửa liều (Nhóm A) có được đáp ứng miễn dịch thể dịch mạnh mẽ hơn vào ngày 84 và ngày 196, tương ứng. Vào ngày 84, tất cả các đối tượng trong nhóm đủ liều thu được hiệu giá kháng thể trên 150 mIU/ml; 81,82% các đối tượng trong nhóm nửa liều, và 36,36% các đối tượng trong nhóm đối chứng, thu được hiệu giá kháng thể trên 150 mIU/ml. Vào ngày 196, tỉ lệ phần trăm các đối tượng thu được hiệu giá trên 150 mIU/ml trong nhóm đủ liều, nhóm nửa liều, và nhóm đối chứng là 100%, 90,91%, và 45,45%, tương ứng.

Các nghiên cứu lâm sàng điều tra thêm về đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T đặc hiệu HBV. Các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T đặc hiệu HBV được đánh giá bởi Đơn vị tạo điểm vết (Spot Forming Unit - SFU) trong mỗi giếng (bao gồm 10^5 tế bào). Như được minh họa trong FIG. 5, vào ngày 56, SFU trung bình của các đối tượng trong nhóm đủ liều (Nhóm B) và nhóm nửa liều (Nhóm A) là 230 và 138, tương ứng, trong khi không có SFU được quan sát thấy trong nhóm đối chứng (Nhóm C). Vào ngày 84, SFU trung bình của các đối tượng trong nhóm đủ liều và nhóm nửa liều là 134 và 157, tương ứng, trong khi SFU trung bình của các đối tượng trong nhóm đối chứng là 186. Vào ngày 196, SFU trung bình của các đối tượng trong nhóm đủ liều

và nhóm nửa liều giống với ngày 84, trong khi SFU trung bình của các đối tượng trong nhóm đối chứng chỉ bằng 24.

Hơn nữa, sự sản xuất xytokin của các tế bào $CD4^+$ T từ một đối tượng được chọn theo kết quả ELISPOT được đánh giá bằng phương pháp tế bào học dòng chảy. Như được minh họa trong FIG. 7, dưới sự kích thích của một peptit đơn, các tế bào $CD4^+$ T từ các đối tượng trong nhóm đủ liều (Nhóm B) biểu hiện ba xytokin (gồm IFN- γ , TNF- α , và IL-2), trong khi các tế bào $CD4^+$ T từ các đối tượng trong nhóm nửa liều (Nhóm B) và nhóm đối chứng (Nhóm C) biểu hiện hai trong ba xytokin. FIG. 6 minh họa kết quả đánh giá bằng phương pháp tế bào học dòng chảy của một đối tượng trong nhóm đủ liều.

Kết quả của các nghiên cứu lâm sàng cho thấy nhóm đủ liều và nhóm nửa liều thể hiện độ dung sai thích hợp đối với chế phẩm. Đáp ứng miễn dịch thể dịch hiệu giá cao và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T cho thấy chế phẩm có thể khơi gợi sự bảo vệ hiệu quả trong các đối tượng nhiễm HBV mạn tính.

Ví dụ 6: Hiệu quả của chế phẩm trên các bệnh nhân bị nhiễm HBV

Bệnh nhân thứ nhất:

Mr. Zhao, nam, 39 tuổi, bị nhiễm HBV (HBsAg +; HBeAg +; HBcAb +) đã được 9 năm. Ông ấy tiếp nhận điều trị chống virus bằng cách dùng Lamivudine hoặc Entecavir. Sau khi dùng điều trị chống virus được 2 tháng, thử nghiệm đã chỉ ra rằng HBV-ADN là $3,6 \times 10^6$ bản sao/ml; nồng độ HBsAg lớn hơn 225 ng/ml; nồng độ HBeAg lớn hơn 76,5 PEIU/ml; kháng thể kháng-HBeAg âm tính; nồng độ của kháng thể kháng-HBcAg là 3 PEIU/ml. Chế phẩm được cấp một lần trong mỗi 2 tuần hoặc 4 tuần. Chế phẩm chứa 40 μ g HBsAg và 1000 μ g PIKA được cấp mỗi lần. Từ ngày 112 sau khi cấp lần thứ nhất đến ngày 330 (cấp lần cuối cùng), liều lượng chế phẩm được tăng lên đến 50 μ g HBsAg và 1500 μ g PIKA. Từ ngày 260, nồng độ của HBV-ADN bắt đầu giảm. Vào ngày 302, nồng độ của HBV-ADN là $1,5 \times 10^4$ bản sao/ml. Trong khi đó, nồng độ của HBeAg giảm chậm. Sau 2 năm kể từ khi cấp thuốc lần thứ nhất, nồng độ của HBeAg đạt đến 38,27 PEIU/ml. Trong suốt quá trình cấp chế phẩm, vào ngày 42 nồng độ của

ALT và AST cho thấy sự tăng lên tạm thời, và từ ngày 260 nồng độ trở về bình thường.

Bệnh nhân thứ hai:

Mr. Song, nam, 46 tuổi, bị nhiễm HBV (HBsAg +; HBeAb +; HBcAb +) đã được 4 năm. Ông ấy tiếp nhận điều trị chống virus bằng cách dùng Anti-HBV TF. Trước khi cấp chế phẩm, một thử nghiệm đã cho thấy rằng nồng độ HBV-ADN là $6,0 \times 10^3$ bản sao/ml; nồng độ của HBsAg lớn hơn 225 ng/ml; HBeAg âm tính; nồng độ của kháng thể kháng-HBeAg lớn hơn 2,0 PEIU/ml; nồng độ của kháng thể kháng-HBcAg lớn hơn 3,9 PEIU/ml; ALT là bất thường (57 U/L). Chế phẩm được cấp một lần trong mỗi 2 tuần hoặc 4 tuần. Chế phẩm chứa 40 μ g HBsAg và 1000 μ g PIKA được cấp mỗi lần. Bắt đầu từ ngày 112 sau khi cấp thuốc lần thứ nhất, liều lượng của chế phẩm tăng đến 50 μ g HBsAg và 1500 μ g PIKA. Vào ngày 171, nồng độ của HBV-ADN giảm xuống (< 500 bản sao/ml). Nồng độ của HBsAg đi xuống đến 77,35 ng/ml, và ALT trở lại bình thường. Từ ngày 246 đến ngày 330, chế phẩm chứa 60 μ g HBsAg và 2000 μ g PIKA được cấp một lần trong mỗi tuần hoặc bốn tuần. Sau 2 năm kể từ khi cấp thuốc lần thứ nhất, nồng độ của HBV-ADN thấp hơn 500 bản sao/ml, nồng độ của HBsAg là 3,17 ng/ml, và nồng độ của ALT trở lại bình thường.

Bệnh nhân thứ ba:

Mr. Zhang, nam, 32 tuổi, bị nhiễm HBV (HBsAg +; HBeAb +; HBcAb +) đã được 8 năm. Trước khi cấp chế phẩm, một thử nghiệm đã cho thấy rằng HBV-ADN là âm tính; nồng độ của HBsAg lớn hơn 225 ng/ml; HBeAg là âm tính; nồng độ của kháng thể kháng-HBeAg lớn hơn 2,0 PEIU/ml; nồng độ của kháng thể kháng-HBcAg lớn hơn 3,9 PEIU/ml. Chế phẩm được cấp một lần trong mỗi 2 tuần hoặc 4 tuần. Chế phẩm chứa 40 μ g HBsAg và 1000 μ g PIKA được cấp mỗi lần. Bắt đầu từ ngày 112 sau khi cấp thuốc lần thứ nhất, liều lượng chế phẩm tăng đến 50 μ g HBsAg và 1500 μ g PIKA. Vào ngày 171, nồng độ của HBsAg đi xuống đến 49,86 ng/ml.

Ví dụ 7. Hiệu quả của các loại chế phẩm khác nhau

Trong ví dụ 7, 18 con chuột chuyển gen HBV biểu hiện HBV ADN ở mức độ cao được sử dụng. Tất cả chuột được chia thành ba nhóm (nhóm A, nhóm B, và nhóm

C), mỗi nhóm chứa 6 con chuột. Theo bảng 8, chế phẩm và các chất khác được cấp cho mỗi nhóm chuột. Chế phẩm và các chất khác được cấp cho chuột một lần trong 12 tuần. Việc quan sát tổng bảy ngày được thực hiện sau khi cấp thuốc lần cuối cùng. Khối lượng cơ thể của mỗi con chuột được đo hai lần trong một tuần. Sau khi cấp thuốc lần thứ nhất, HBV ADN được đo vào ngày 0, ngày 21, và ngày 42, tương ứng.

Bảng 8. Các chế phẩm được dùng cho chuột

Tên nhóm	Chế phẩm			
	PBS	PIKA	HBsAg	HBcAg
nhóm A	+			
nhóm B		50 μ g	10 μ g	
nhóm C		50 μ g	10 μ g	10 μ g

Theo FIG. 8, ngay cả ở những con chuột biểu hiện HBV-ADN ở mức độ cao, sau khi chế phẩm được cấp cho chuột từ nhóm B và nhóm C, HBV ADN giảm, chỉ ra rằng chế phẩm phòng ngừa và điều trị đáng kể bệnh nhiễm HBV.

Cần lưu ý rằng ví dụ 7 là chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ. Những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thay đổi dạng và các chi tiết của ví dụ 7 mà không lệch ra khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế. Ví dụ, tỉ lệ của HBsAg và/hoặc HBcAg đối với PIC (hoặc PIKA) có thể là 1:50, 1:40, 1:30, 1:25, 1:20, 3:50, 1:15, 1:10, 1:5, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 1:50 và 1:5.

Ví dụ 8. Độ ổn định của chế phẩm

Trong ví dụ 8, ba mẻ chế phẩm được sử dụng. Mỗi mẻ được chia thành hai nhóm (hai nhóm được đặt trong một lồng ấp được điều chỉnh nhiệt độ bằng 37°C, và 25°C, tương ứng.). Một vắc-xin viêm gan B chứa tá dược phen và HBsAg được sử dụng làm đối chứng. Nhóm chế phẩm được đặt ở nhiệt độ 37 °C trong 1 tuần, 2 tuần, và 4 tuần được pha loãng từng bước và được cấp cho chuột. Các mẫu máu được lấy để đo HBsAb. Tỉ lệ ED₅₀ của chế phẩm và vắc-xin đối chứng được đo. Nhóm chế phẩm được đặt ở nhiệt độ 25°C trong 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng và 4 tháng được pha loãng từng bước và được cấp cho chuột. Các mẫu máu được lấy để đo HBsAb. Tỉ lệ ED₅₀ của chế phẩm và

vắc-xin đối chứng được đo.

Theo bảng 9, sau khi đặt ở nhiệt độ 37°C, chế phẩm của sáng chế cho thấy hiệu lực cao hơn so với vắc-xin viêm gan B đối chứng; sau khi đặt ở nhiệt độ 25°C, chế phẩm của sáng chế cũng cho thấy hiệu lực cao hơn và độ ổn định hơn so với vắc-xin viêm gan B đối chứng.

Bảng 9. Nghiên cứu độ ổn định của chế phẩm

Mô		Alum+HBsAg			PIKA+HBsAg		
Hiệu lực	Thời gian/khoảng thời gian	1	2	3	1	2	3
4°C	Ngày 0	6,2	6,2	4,4	8,2	7,4	11,7
37°C	1 tuần	4,2	4,5	5,6	5,0	6,7	2,9
	2 tuần	4,9	3,8	4,1	10,1	10,1	4,4
	4 tuần	3,9	2,4	3,2	4,5	4,0	7,9
25°C	1 tháng	6,3	5,6	5,4	10,9	24,2	7,9
	2 tháng	5,4	5,4	5,7	13,1	9	7,4
	3 tháng	3,0	4,4	3,9	14,1	17,9	7,1
	6 tháng	1,7	2,3	1,8	18,3	9,3	9,9

Cần lưu ý rằng mặc dù một loại chế phẩm (tức là, chế phẩm chứa PIKA và HBsAg) được sử dụng trong ví dụ 8, ví dụ 8 là minh họa và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn. Đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết của ví dụ 8 có thể được thực hiện mà không lệch ra khỏi phạm vi của sáng chế. Chỉ đơn thuần bằng cách ví dụ, một loại khác (ví dụ, chế phẩm chứa PIKA, HBsAg và HBcAg) của chế phẩm có thể được sử dụng trong ví dụ 8. Ví dụ khác, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể sử dụng nồng độ chế phẩm khác nhau, hoặc nồng độ của mỗi chất trong chế phẩm khác nhau. Ví dụ, tỉ lệ của HBsAg và/hoặc HBcAg đối với PIC (hoặc PIKA) có thể là 1:50, 1:40, 1:30, 1:25, 1:20, 3:50, 1:15, 1:10, 1:5, hoặc giá trị bất kỳ nằm giữa 1:50 và 1:5.

Theo sáng chế, chế phẩm cung cấp ít nhất một trong các ưu điểm sau:

- an toàn tốt cả trong các nghiên cứu chất độc học cấp tính và mạn tính;
- tăng cường đáp ứng miễn dịch thể dịch, và tạo ra hiệu giá cao hơn và sự sản sinh kháng thể sớm hơn;
- kích hoạt hiệu quả đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T;
- giảm lượng tải HBV ADN trong các đối tượng bị nhiễm HBV.

Khi sáng chế được mô tả bằng cách tham chiếu đến các phương án cụ thể, sẽ được hiểu rằng các phương án này là minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Các phương án thay thế của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế có liên quan. Các phương án thay thế này được coi là bao gồm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa lây nhiễm virus viêm gan B, bao gồm:
axit polyribonucleosinic – axit polyribonucleotidylic (PIC), ít nhất một chất kháng sinh hoặc hợp chất polyamit, ít nhất một ion dương, và HBsAg,
trong đó nồng độ của HBsAg trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 20 µg/liều lượng đơn vị đến 60 µg/liều lượng đơn vị.
2. Chế phẩm theo điểm 1, còn bao gồm HBcAg.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó HBsAg được tạo ra bởi *Hansenula polymorpha*, tế bào CHO, hệ thống biểu hiện ở côn trùng, *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc *Pichia pastoris*.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó HBcAg được tạo ra bởi *Escherichia coli*, *Hansenula polymorpha*, hệ thống biểu hiện ở côn trùng, *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc *Pichia pastoris*.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất kháng sinh được chọn từ nhóm gồm có tobramycin, anthracyclin, butyrosin sulfat, gentamicin, hygromycin, amikacin, dibekacin, nebramycin, beta-lactam, neomycin, puromycin, streptomycin, streptozotocin, và kanamycin.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hợp chất polyamit được chọn từ nhóm gồm có muối spermidin, spermidin, N-(3-aminopropyl), N-(3-aminopropyl)-1,4-butanedi-amin, spermin BR, spermin, OS-dimethylphosphoramidothioat, polylysine, và aminoglycosit.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ion dương được chọn từ nhóm gồm có canxi, catmi, liti, magie, xeri, xesi, crôm, coban, đơteri, gali, iôt, sắt, và kẽm.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỉ lệ của HBsAg so với PIC là 1:30, 1:25, hoặc 1:20.
9. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó tỉ lệ của HBcAg so với PIC là 1:30, 1:25, or 1:20.
10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó nồng độ của PIC trong chế phẩm nằm trong khoảng

từ 250µg/liều lượng đơn vị đến 6000µg/liều lượng đơn vị

11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó nồng độ của PIC trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 500 µg/ liều lượng đơn vị đến 1500 µg/ liều lượng đơn vị.

12. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó nồng độ của HBcAg trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10 µg/ liều lượng đơn vị đến 100 µg/ liều lượng đơn vị.

13. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó một liều lượng đơn vị nằm trong khoảng từ 0,1 ml đến 250,0 ml.

14. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm còn chứa ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm có gelatin, sacaroza, đường kết tinh, lactoza, maltoza, trehalose, glucose, dextran phân tử thấp, sorbitol, polysorbat 20, manitol PEG, albumin trong máu người, albumin huyết thanh ở người tái tổ hợp, natri caprylat, ure, nhôm hydroxit, phenol đỏ, magie clorua, kali clorua, natri clorua, natri thiosulphat, kali dihydro, axit ascorbic, triclotetan, phenol, và thiomersal hoặc ít nhất một chất đệm có sinh lý học khả dụng, trong đó chất đệm có sinh lý học khả dụng được chọn từ nhóm gồm có chất đệm axetat, chất đệm trisamin, chất đệm bicarbonat, chất đệm carbonat, và dung dịch muối đệm phosphat.

15. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó độ PH của chế phẩm nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

16. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm ở dạng lỏng hoặc dạng rắn, trong đó dạng lỏng được chọn từ nhóm gồm có dung dịch tiêm, hỗn dịch, thuốc mỡ, nhũ tương, dạng giọt, xi-rô, và gel; trong đó dạng rắn được chọn từ nhóm gồm có bột khô, bột được đông khô, viên nén, viên nang, viên thuốc đạn, hạt, và viên nén bao đường.

17. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm chất kháng sinh, trong đó chất kháng sinh bao gồm kanamycin và ion dương bao gồm canxi.

1/4

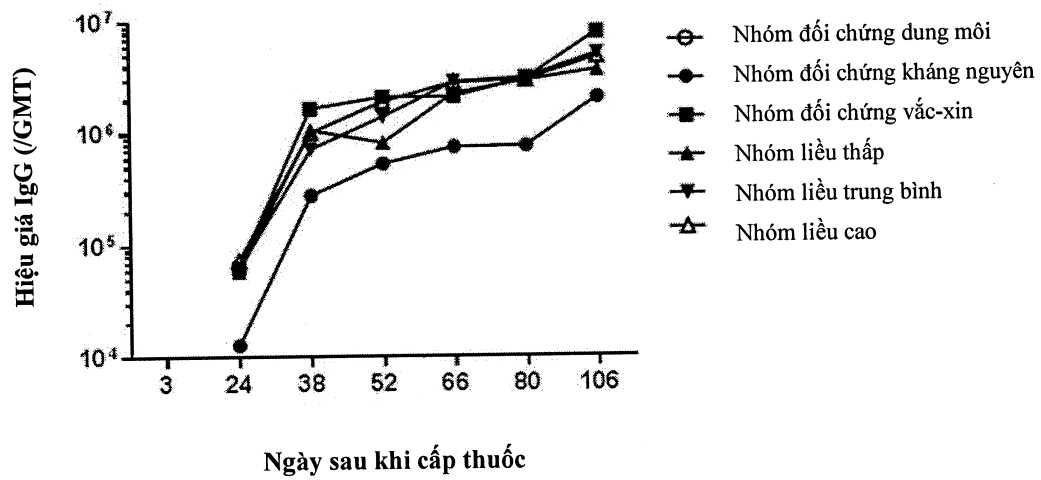


FIG.1

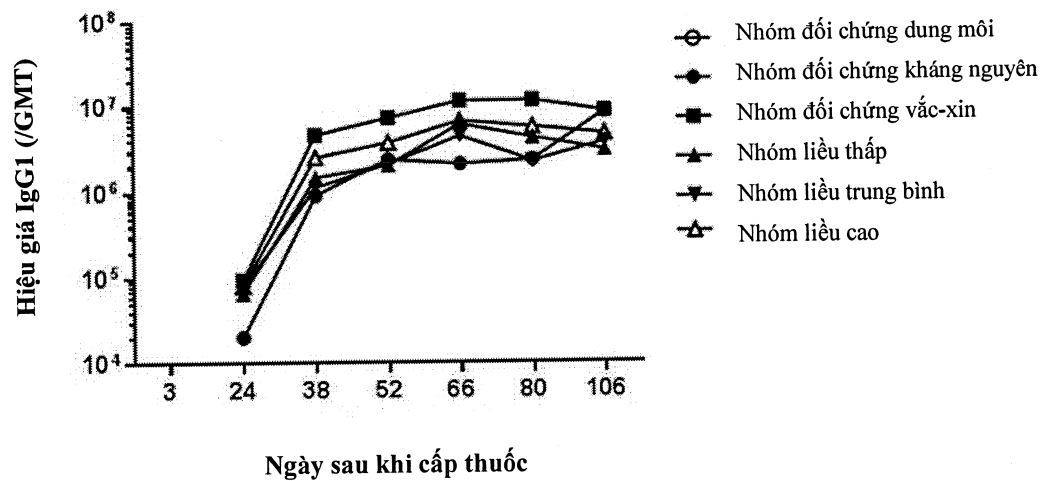


FIG.2

2/4

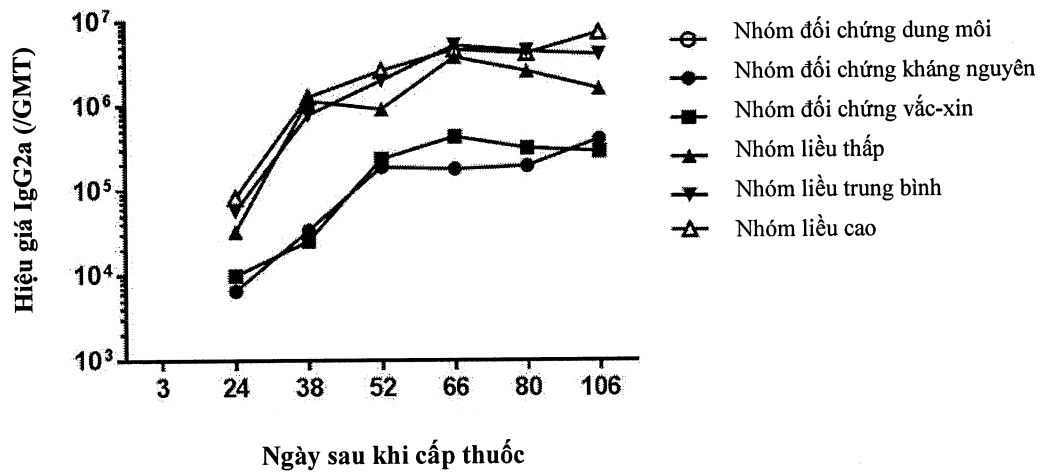


FIG.3

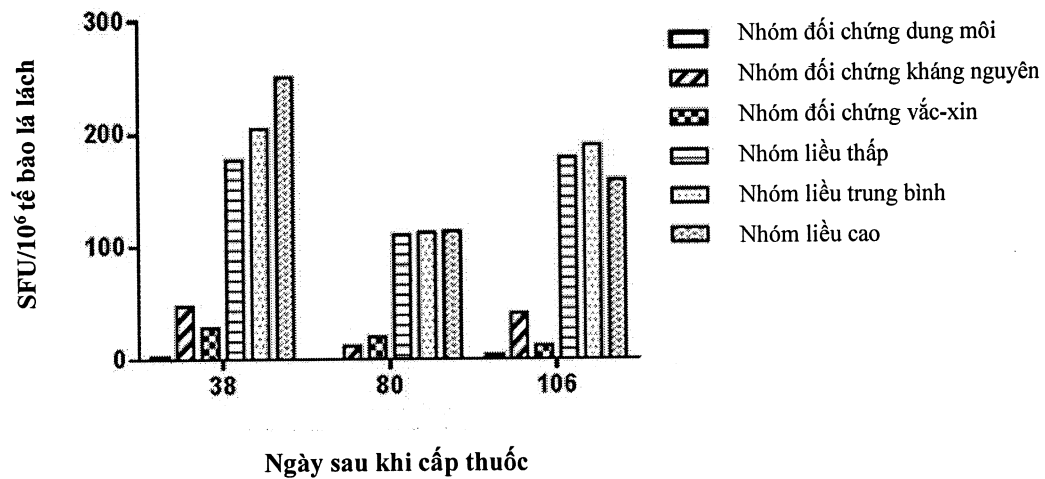


FIG.4

3/4

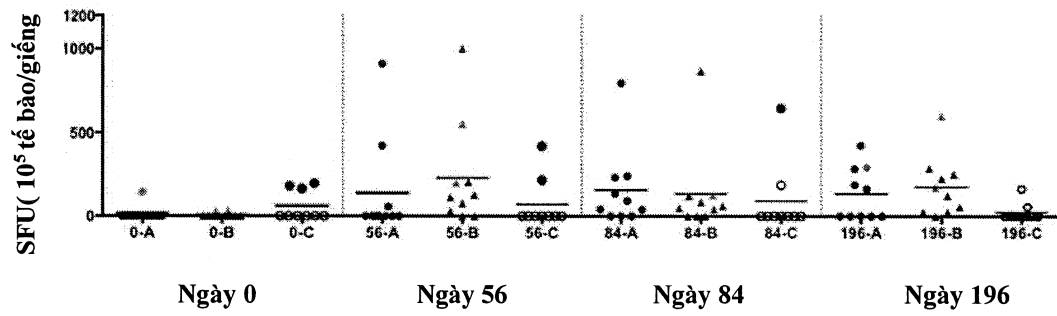


FIG.5

Không được kích thích

Ngày 56

Ngày 84

Ngày 196

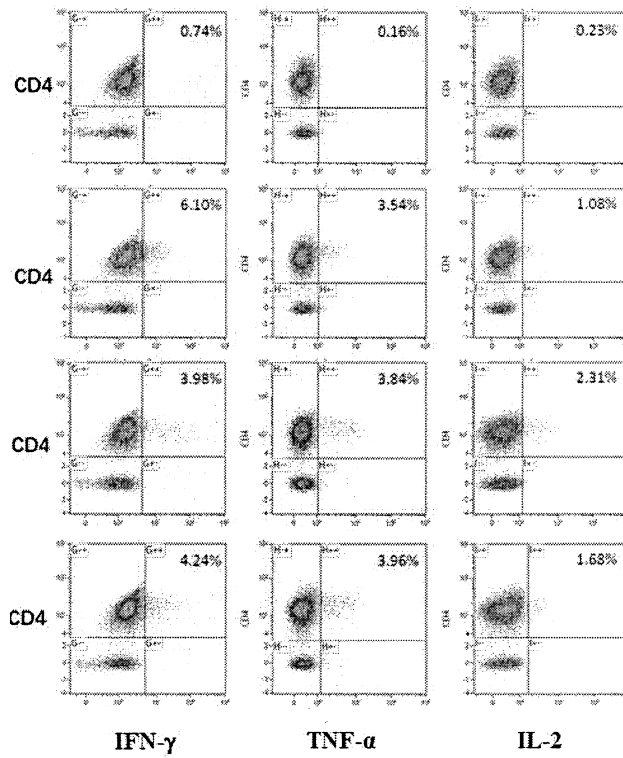


FIG.6

4/4

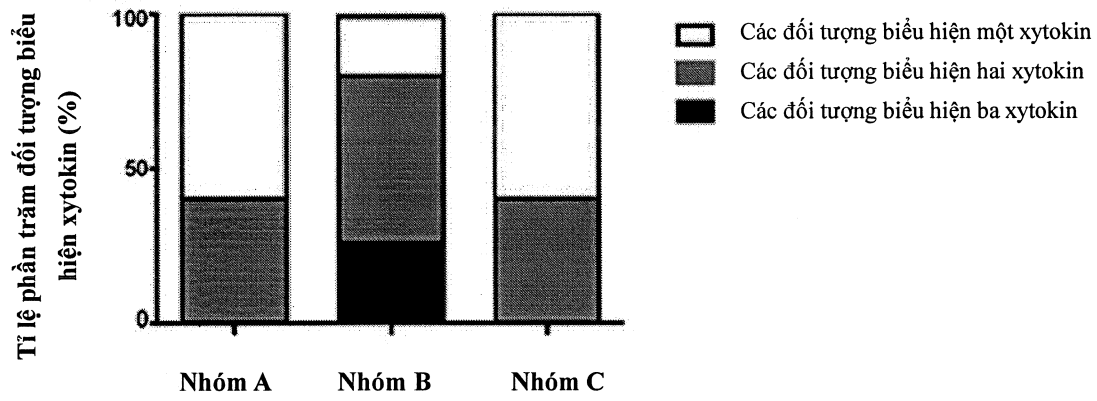


FIG.7

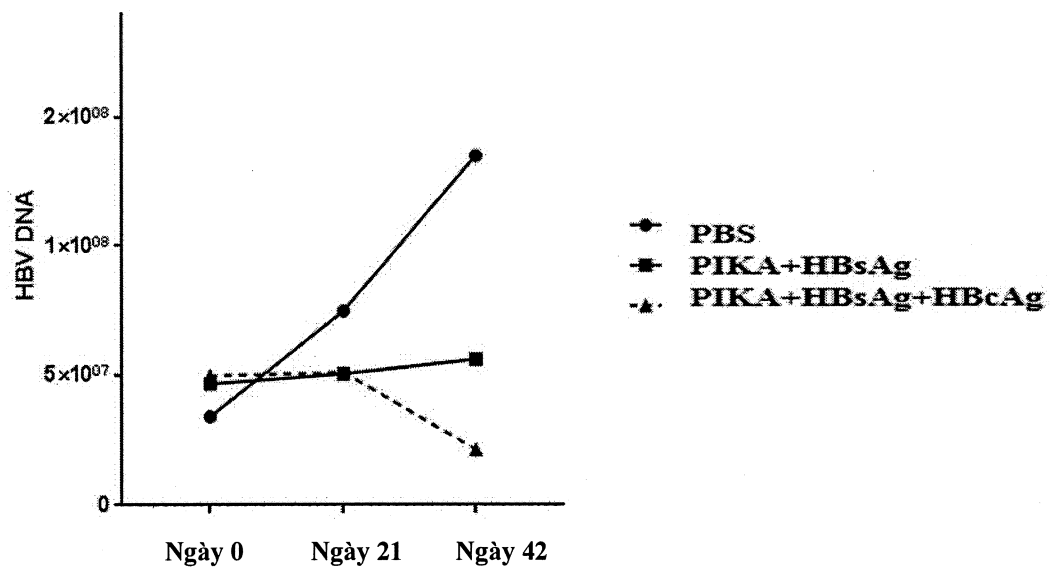


FIG.8