



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

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

(11)



1-0040309

(51)⁷ A61K 39/205; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2017-02731

(22) 23/12/2014

(86) PCT/SG2014/000614 23/12/2014

(87) WO 2016/105274 A1 30/06/2016

(45) 25/06/2024 435

(43) 25/10/2017 355A

(73) Yisheng Biopharma (Singapore) Pte. Ltd. (SG)

Serangoon Central Post Office, P.O. Box 584, Singapore 915503

(72) Li Lietao (SG); Zhang Yi (CN); Liu Fang (CN).

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) CHẾ PHẨM VẮCXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI CHỨA TÁ DƯỢC PIKA VÀ KIT
DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh đại chứa IPRV và tá dược PIKA, và kit
dược phẩm chứa chế phẩm vắc xin bệnh đại này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực miễn dịch, đặc biệt là đề cập đến chế phẩm phòng bệnh dại để điều trị dự phòng và/hoặc điều trị bệnh dại do sự lây nhiễm vi rút dại, phương pháp và việc sử dụng chúng, và đặc biệt là đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh dại để điều trị dự phòng và/hoặc điều trị bệnh dại do sự lây nhiễm vi rút dại với lịch trình tăng tốc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi rút dại là một vi rút được bao bọc bằng gen ARN sợi đơn mã hóa năm protein cấu trúc. Bệnh dại là loại bệnh được lây truyền từ động vật sang người thông qua sự lây nhiễm mang vi rút bám nhờ nước bọt, hoặc thông qua màng nhầy niêm mạc còn nguyên vẹn. Tỷ lệ tử vong gần như là 100% sau khi bắt đầu triệu chứng lâm sàng, và đây vẫn là một trong những bệnh nhiễm trùng được biết đến là gây tử vong nhiều nhất.

Ở vùng phát triển hơn, sự lây nhiễm bệnh dại qua các loài chó là hiếm gặp do sự tiêm chủng bắt buộc đối với vật nuôi, chẳng hạn ở Mỹ, ít trường hợp mắc bệnh dại ở người là do các loại dơi bị bệnh dại. Ở các nước phát triển, bệnh dại ở người bị lây bởi chó dại phổ biến hơn, gây ra 25.000-30.000 người chết mỗi năm ở riêng Ấn Độ. Những con chó bị lạc hoặc chó con mà không được tiêm chủng là những con vật mang khả năng gây bệnh và chúng sống chung với những nạn nhân chẳng hạn như trẻ em ở các làng quê. Chương trình tiêm chủng cho những con chó đi lạc thường bị thất bại ở những vùng này. Theo báo cáo của WHO, hàng năm trên thế giới có hơn 60.000 người chết do bệnh dại. Vùng phổ biến nhất là châu Á và châu Phi. Vụ bộc phát bệnh dại gần đây nhất ở Bali Indonesia đe dọa sự sống của hơn 130 người.

Cho đến nay, không có phương pháp điều trị hiệu quả bệnh dại khi đã bị nhiễm bệnh. Việc điều trị chẳng hạn bằng thuốc kháng vi rút, steroid, chất điều biến miễn dịch và truyền globulin miễn dịch thường không đạt hiệu quả. May mắn thay, có thể phòng ngừa bệnh dại bằng cách tiêm phòng khi tiếp xúc với những động vật có khả năng bị dại bằng việc điều trị vết thương ngay tại chỗ và dự phòng sau phơi nhiễm thích hợp (PEP). Trong những trường hợp nghiêm trọng hơn, có thể cần phải dùng đồng thời globulin

miễn dịch bệnh dại (RIG). Những người có nguy cơ nghề nghiệp bị động vật cắn cao cũng được khuyến cáo dự phòng chống vi rút dại. Hàm lượng kháng thể dại bằng hoặc lớn hơn 0,5 đơn vị quốc tế (IU), được xác định bằng phép thử ức chế tập trung huỳnh quang nhanh (RFFIT) đối với một huyết thanh tham chiếu của WHO, được coi là có tính bảo vệ ở các loài động vật có vú. Chi tiết về thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Laboratory Techniques in Rabies, Edited by F X Meslin, M M Kaplan H Koprowski, 4th Edition, ISBN 92 4 1544 1.

Vắc xin bệnh dại có sẵn trên thị trường được dựa trên các chủng cố định của vi rút bệnh dại, chẳng hạn chủng pitman Moore (PM), chủng Kissling của chủng vi rút thách thức (CVS), hoặc giảm độc qua phôi trứng 40-50 đời (LEP) và giảm độc qua phôi trứng 180 đời (HEP) từ gà Flury, chủng Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA) cố định của vi rút Street-Alabama-Dufferin (SAD) và các biến thể SAD khác. Các chủng vi rút này được làm thích ứng vào bốn hệ thống nuôi cấy chính được WHO chấp thuận, bao gồm tế bào lưỡng bội ở người, phôi gà hoặc vịt, tế bào thận ở chuột và dòng tế bào vero.

Các tá được thường là các hợp chất, mà khi được dùng với một kháng nguyên (hoặc trộn lẫn, hoặc được dùng trước khi dùng kháng nguyên) làm tăng cường hoặc cải biến đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đặc biệt. Nhôm thường được bổ sung vào vắc xin bệnh dại dưới dạng tá được nhằm nâng cao hiệu quả của vắc xin bất hoạt. Tuy nhiên, nhôm đã được phát hiện là trì hoãn sự sản sinh kháng thể và không có hiệu quả cung cấp sự bảo vệ tốt hơn trong thử nghiệm sau tiếp xúc. Do đó, các nghiên cứu về tá được thích hợp đối với vắc xin bệnh dại vẫn đang được tiến hành.

Tuy nhiên, vắc xin bất hoạt không bền trong quá trình tinh chế, đông khô lạnh và bảo quản. Các tác nhân ổn định hóa học và/hoặc sinh học do đó được bổ sung vào dung dịch vắc xin. Ví dụ về các tác nhân ổn định hóa học được biết đến là anbumin ở người, chất thủy phân gelatin, các rượu đường, các axit amin và các chất không độc khác. Prince et al, Patent Mỹ số US 4,164,565 mô tả việc sử dụng anbumin làm chất ổn định hóa trong vắc xin. Do đó, một chế phẩm vắc xin bệnh dại thông thường sẽ bao gồm kháng nguyên của vi rút dại bất hoạt được nuôi cấy trong dòng tế bào thích hợp, có hoặc không có tá được, và được ổn định hóa bằng anbumin và các tác nhân ổn định hóa hoặc các tá được khác.

Đối với mục đích phòng bệnh, vắc xin thường được tiêm 3 lần để tạo ra khoảng 3 đến 4 năm miễn dịch. Khi tiếp xúc với vi rút dại, vắc xin thường được tiêm 4 lần vào các

ngày 0, 3, 7 và 14, hoặc năm lần với lịch trình Essen bao gồm 5 lần tiêm vào các ngày 0, 3, 7, 14, và 28.

Vắcxin bệnh dại sau tiếp xúc thường được sử dụng để phòng ngừa bệnh chết người sau phơi nhiễm với các động vật bị nghi ngờ. Mặc dù hàng triệu người nhận PEP mỗi năm sau khi bị tiếp xúc với các động vật bị nghi ngờ dại, vẫn có báo cáo về cái chết liên quan tới bệnh dại sau khi nhận PEP, hoặc thậm chí cả khi dùng đồng thời globulin miễn dịch.

Một phân tích nghiên cứu 1120 trường hợp người bị bệnh dại ở Quảng Tây, Trung Quốc chỉ ra rằng 27,2% người chết là do tiêm phòng thất bại; trong đó 78,2% trường hợp tử vong xảy ra trước khi tiêm lần thứ 5. Những thất bại này có thể liên quan đến sự sản sinh chậm kháng thể trung hòa vi rút dại (RVNA) bằng vắcxin phòng bệnh dại, thiếu đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T, thiếu đáp ứng miễn dịch do các biến thể riêng lẻ, hoặc sự sai lệch từ hướng dẫn điều trị sau tiếp xúc của WHO chẳng hạn không tiêm globulin miễn dịch.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng động vật và con người có thể tạo ra kháng thể trung hòa vi rút dại khi bị lây nhiễm hoặc đáp ứng với tiêm chủng. Các nghiên cứu rất sớm trên động vật đã chỉ ra rằng IgM và IgG được tạo ra bởi vắcxin đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ động vật được tạo miễn dịch khỏi thách thức của vi rút. Do đó, việc sản xuất sớm các nồng độ kháng thể trung hòa cao hơn là rất quan trọng trong việc bảo vệ các bệnh nhân có khả năng tiếp xúc với vi rút.

Mặt khác, có những nghiên cứu thử nghiệm và đề xuất các phác đồ tiêm chủng mới có thể cải thiện hiệu quả của vắc-xin, làm giảm sự phức tạp về lâm sàng (nghĩa là ít tiêm hơn hoặc thời gian lâm sàng ngắn hơn) và chi phí. Patent châu Âu số 1 593 392 đề xuất phương pháp chủng ngừa bệnh dại trước và sau tiêm chủng với liều lượng giảm.

Trong sáng chế này, các tác giả mô tả một loại vắcxin phòng bệnh dại hiệu quả hơn, có thể tạo ra các hàm lượng kháng thể trung hòa vi rút sớm hơn và cao hơn. Công thức đặc hiệu được mô tả trong sáng chế bao gồm kháng nguyên dại bất hoạt đã được tinh chế, tá dược PIKA và anbumin huyết thanh ở người được trộn lẫn trong một dung dịch đệm có hoặc không có các tá dược khác là an toàn và ổn định cho việc sử dụng ở người với thời hạn sử dụng lâu dài. Các tác giả còn mô tả phương pháp sử dụng chế phẩm với một chế độ tiêm chủng mới mà đòi hỏi thăm khám lâm sàng ít hơn và thời

gian tạo miễn dịch ngắn hơn.

Tài liệu chuyên ngành

Các tài liệu tham khảo sau đây có thể được quan tâm:

- Wunner, W. H., Larson, J. K., Dietzschold, B., & Smith, C. L. (1988). The molecular biology of rabies viruses. *Review of Infectious Diseases*, 10 (Supplement 4), S771-S784
- Sudarshan MK, Madhusudana SN, Mahendra BJ, Rao NS, Ashwath Narayana DH, et al. (2007). Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *Int J Infect Dis* 11:29-35.
- Jackson AC, Warrell MJ, Pupprecht CE, Ertl HC, Dietzschold B, et al. (2003). Management of rabies in humans. *Clin Infect Dis* 36:60-63.
- World Health Organization (2014). Rabies Fact Sheet N° 99. Retrieved from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>
- Putra, A. A. G., Hampson, K., Girardi, J., Hiby, E., Knobel, D., Mardiana, W., & Scott-Orr, H (2013). Response to a rabies epidemic, Bali, Indonesia, 2008–2011. *Emerging infectious diseases*, 19(4), 648.
- World Health Organization (2010). Current strategies for human rabies pre and post-exposure prophylaxis. Retrieved from http://www.who.int/rabies/human/WHO_strategy_prepost_exposure/en/
- U.S. Patent No. 4,164,565
- Wang, S. et al (2010). A new PIKA adjuvant rabies vaccine. *Journal of Applied preventive medicine* 16(1), 1-4.
- Deshmukh DG, Damle AS, Bajaj JK, Bhakre JB, Patil NS. Fatal rabies despite post-exposure prophylaxis. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Apr-Jun;29(2):178-80
- Shantavasinkul, P., Tantawichien, T., Wacharapluesadee, S., Jeamanukoolkit, A., Udomchaisakul, P., Chattranukulchai, P., & Hemachudha, T. (2010). Failure of rabies postexposure prophylaxis in patients presenting with unusual manifestations. *Clinical Infectious Diseases*, 50(1), 77-79

- Wilde H, Sirikawin S, Sabcharoen A, Kingnate D, Tantawichien T, Harischandra PA, Chaiyabutr N, de Silva DG, Fernando L, Liyanage JB, Sitprija V. Failure of postexposure treatment of rabies in children. Clin Infect Dis. 1996 Feb;22(2):228-32
- European Patent No. 1 593 392
- Bertoletti, A, (2012) PIKA dose response to determine effective concentration for monocyte-derived DC activation. Singapore Institute for Clinical Sciences, Biomedical Sciences Institutes.
- World Health Organization (2007). Rabies vaccines WHO position paper (1st ed.). Retrieved from http://www.who.int/immunization/sage/SAGEmeetingRabies_PP_Draft_oct12.pdf

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Xét đến các thiếu sót trong tình trạng kỹ thuật nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm vắc xin bệnh dại, bao gồm: a) vi rút dại bất hoạt được tinh chế (còn gọi là IPRV), b) tá dược PIKA, và c) anbumin huyết thanh ở người (còn gọi là HSA). Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa 0,2 IU đến 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị IPRV, 250 µg đến 5000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị tá dược PIKA, và 0,1% đến 0,9% nồng độ HSA (trước khi làm đông khô hoặc sau khi hoàn nguyên).

Liều lượng đơn vị đối với chế phẩm vắc xin của sáng chế được điều chế vào một thể tích được chọn từ nhóm gồm có 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, và khoảng giữa hai giá trị thể tích bất kỳ trong các thể tích sau: 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, và 2,0 ml. Điều này được hiểu rằng thể tích sử dụng quá lớn và quá nhỏ dẫn đến sự bất tiện trong thực hành lâm sàng, khi được áp dụng ở người. Do đó, liều lượng đơn vị đối với người trưởng thành có thể thường được điều chế thành 0,5 ml hoặc 1,0 ml để tiêm (dạng lỏng hoặc sau khi hoàn nguyên dạng bột được đông khô lạnh), và 0,15 ml hoặc 0,2 ml đối với cách áp dụng dạng dùng trong mũi.

Trong một số phương án, lượng IPRV được chọn từ nhóm gồm có 0,2 IU, 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, 3,0 IU, 3,5 IU, 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và khoảng giữa hai giá trị thể tích bất kỳ trong các giá trị IU sau: 0,2 IU, 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, 3,0 IU, 3,5 IU, và 4,0 IU. Trong một số phương án, lượng IPRV

nằm trong khoảng từ 0,2 IU đến 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, lượng IPRV được chọn từ nhóm gồm có 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau trên mỗi liều lượng đơn vị: 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, và 2,5 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể, lượng IPRV đối với người trưởng thành có thể nằm trong khoảng từ 1,0 IU đến 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, ví dụ, 1,0 IU hoặc 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong các phương án khác, khi được áp dụng cho trẻ em, lượng IPRV trên mỗi liều lượng đơn vị có thể giảm xuống; ví dụ, lượng IPRV có thể nằm trong khoảng từ 0,5 IU đến 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, ví dụ, 0,5 IU hoặc 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, nồng độ IPRV nằm trong khoảng giữa 0,05 IU/ml và 40,0 IU/ml, chẳng hạn 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 IU/ml, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ trong số các nồng độ sau: 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, và 40 IU/ml.

Trong một số phương án, lượng tá dược PIKA thích hợp đối với chế phẩm vắc xin theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm có 250 µg, 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 3000 µg, 4000 µg, 5000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ trong số các lượng sau: 250 µg, 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 3000 µg, 4000 µg, 5000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, đối với việc sử dụng ở người, lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 250 µg đến 4000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, lượng tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 2500 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và giá trị nằm giữa hai trong số các lượng sau: 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 2500 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong các phương án khác, khi áp dụng đối với trẻ em, lượng tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị có thể bị giảm, ví dụ, lượng tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1.000 µg, 1250 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và giá trị nằm giữa hai trong số các lượng sau: 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg và 1250 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

Tá dược PIKA thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong chế phẩm vắc xin của sáng chế. PIKA là một chất tương tự về hóa học tổng hợp của dsRNA mà đã được chứng minh là một chất chủ vận TLR3 nhờ các nghiên cứu tiền lâm sàng. Tá dược PIKA bao gồm Poly I:C, một chất kháng sinh (ví dụ, kanamycin) và một ion dương (ví dụ, canxi clorua). Tá dược PIKA tan được trong dung dịch nước với độ pH nằm trong khoảng 6,0 và 8,0. Trừ khi có chỉ định khác, tá dược PIKA thích hợp cho chế

phẩm vắc xin đại của sáng chế là tá dược PIKA được mô tả trong WO2006/131023, được đưa vào đây bằng cách tham chiếu với tính toàn vẹn của nó. Trong các phương án có liên quan, tá dược PIKA không đồng nhất về khối lượng phân tử, ở đây khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 66.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 66.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 138.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 150.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 138.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 150.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 300.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 300.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 337.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 337.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 500.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 500.000 đến 2.000.000 Daltons.

Trong các phương án có liên quan, phân tử tá dược PIKA trong vắc xin đại có khối lượng phân tử trung bình bằng hoặc lớn hơn 100.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 120.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 138.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 150.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 250.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 300.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 337.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 500.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 750.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.000.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.200.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.500.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 2.000.000 Daltons.

Trong một số phương án, tỉ lệ của IPRV so với tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có: 1IU/100µg, 1IU/125µg, 1IU/200µg, 1IU/250µg, 1IU/300µg, 1IU/350µg, 1IU/400µg, 1IU/450µg, 1IU/500µg, 1IU/550µg, 1IU/600µg, 1IU/700µg, 1IU/800µg, 1IU/1000µg, 1IU/1500µg, 1IU/2000µg và tỉ lệ nằm giữa hai tỉ lệ bất kỳ nêu trên. Trong một phương án cụ thể, tỉ lệ của IPRV so với tá dược PIKA là 1IU/500µg. Trong một phương án cụ thể, lượng IPRV bằng 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA bằng 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác, lượng IPRV bằng 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA bằng 2000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác, lượng IPRV bằng 3,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA bằng 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác nữa, lượng IPRV bằng 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA bằng 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác nữa, lượng IPRV bằng 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA bằng 2000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin của sáng chế còn bao gồm chất đệm được dụng. Trong một số phương án, chất đệm được dụng được chọn từ nhóm gồm có: PBS, axetat, tris-hydroxymetyl aminometan, bicarbonat, và cacbonat. Trong một số phương án, độ pH của chất đệm được chọn từ nhóm gồm có: 7,00, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,30, 7,35, 7,40, 7,45, 7,50, 7,55, 7,60, 7,65, 7,70, 7,75, 7,80, 7,85, 7,90, 7,95, 8,00 và và khoảng giữa hai giá trị pH sau: 7,00, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,30, 7,35, 7,40, 7,45, 7,50, 7,55, 7,60, 7,65, 7,70, 7,75, 7,80, 7,85, 7,90, 7,95, và 8,00. Trong một số phương án cụ thể, chất đệm là PBS, và độ pH chất đệm PBS được chọn từ nhóm gồm có: 7,3, 7,4, 7,5, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên.

Trong một số phương án, lượng HSA thích hợp đối với chế phẩm vắc xin của sáng chế được chọn từ nhóm gồm có 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45%, 0,50%, 0,60% theo nồng độ (trước khi làm đông khô hoặc sau khi hoàn nguyên), và giá trị giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên. Anbumin ở người được bổ sung trong vắc xin đại như một chất ổn định quá trình, quá trình đông khô lạnh và bảo quản. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng anbumin được biết đến là một chất gây dị ứng đối với một số động vật, nhưng riêng anbumin ở người là một loại thuốc được chấp nhận để sử dụng ở người và nó có thể được sử dụng an toàn trong các ứng dụng ở người.

Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế còn chứa maltoza. Trong một số phương án, lượng maltoza nằm trong khoảng giữa 1,0 % và 6,0% theo nồng độ (trước khi đông khô lạnh hoặc sau khi hoàn nguyên). Trong một số phương án, lượng maltoza được chọn từ nhóm gồm có 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 6,0% theo nồng độ, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên. Trong một số phương án cụ thể, lượng maltoza bằng 5,0% theo nồng độ.

Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế không chứa gelatin.

Trừ khi có chỉ định khác, kháng nguyên đại có sẵn bất kỳ có thể được sử dụng để điều chế chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế. WHO đã chấp thuận một vài chủng vi rút đại để sản xuất vắc xin, bao gồm nhưng không giới hạn bởi chủng Pitman-Moore (PM), chủng vi rút Pasteur (PV), chủng vi rút thách thức (CVS), chủng giảm độc qua phôi trứng 40-50 đời (LEP) và giảm độc qua phôi trứng 180 đời (HEP) từ chủng phôi thai gà Flury, chủng Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA) của vi rút

Street-Alabama-Dufferin (SAD) và các biến thể SAD khác. Các chủng vi rút được chấp thuận này được làm tương thích trong nuôi cấy mô não, phôi gà hoặc vịt, dòng tế bào gốc (như dòng tế bào thận của chuột đồng), tế bào lưỡng bội của con người, hoặc dòng tế bào liên tục (như dòng tế bào Vero). Các chủng vi rút kể trên có thể được sử dụng để sản xuất các vắc xin sau khi bất hoạt và tinh chế. Trong một số phương án, IPRV được chọn từ nhóm gồm có chủng CTN, chủng aG, chủng Pitman-Moore (PM) và chủng vi rút Pasteur (PV). Trong một số phương án cụ thể, IPRV được chọn từ nhóm gồm có chủng CTN-1, chủng Pitman-Moore L503 và chủng PV-2061.

Trong một số phương án cụ thể, IPRV được chuẩn bị trong tế bào Vero hoặc tế bào gốc ở thận của chuột đồng (PHK). IPRV được tạo ra bằng cách truyền chủng vi rút cố định vào tế bào Vero hoặc tế bào PHK. Sau khi thu hồi phần nổi trên mặt của môi trường nuôi cấy, vi rút được thu hoạch, được cô đặc, bất hoạt, tinh chế và bảo quản dưới dạng kháng nguyên.

Trừ khi có chỉ định khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế có thể được điều chế ở dạng lỏng, bao gồm nhưng không giới hạn bởi dung dịch hoặc huyền phù. Trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại được điều chế dưới dạng rắn, chẳng hạn dạng sấy đông lạnh hoặc làm khô lạnh.

Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, chứa hoặc bao gồm: 2,0 IU/ml IPRV, 1,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,3% HSA. Trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, chứa hoặc bao gồm: 2,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA, 0,3% HSA. Trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, chứa hoặc bao gồm: 1,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,3% HSA; hoặc 1,5 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,3% HSA; hoặc 2,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,5% HSA; hoặc 4,0 IU/ml IPRV, 1,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,5% HSA.

Sáng chế cũng đề cập đến kit dược phẩm, chứa hoặc bao gồm: a) chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, b) đồ chứa, chẳng hạn ống nhỏ hoặc ống thuốc tiêm, c) hướng dẫn sử dụng, và tùy ý d) nước dùng để tiêm. Trong một số phương án đặc biệt, để thuận tiện cho việc vận chuyển và bảo quản, kit dược phẩm được điều chế thành dạng đông khô lạnh. Do đó, kit dược phẩm chứa hoặc bao gồm a) chế phẩm vắc xin bệnh dại đông khô lạnh, b) ống nhỏ chứa chế phẩm vắc xin bệnh dại được đông khô lạnh, và c) hướng dẫn sử dụng. Khi cần thiết, nước dùng để tiêm có thể được kết hợp vào kit

được phẩm để hoàn nguyên chế phẩm vắc xin bệnh dại trước khi sử dụng. Trong một số phương án cụ thể, hướng dẫn sử dụng đề xuất chế độ cấp thuốc sau: chế độ 2-2-1 đối với việc bảo vệ sau tiếp xúc và/hoặc chế độ 2-1 cho việc phòng ngừa, trong đó chế độ 2-2-1 nói trên đề cập đến 2 đơn vị liều lượng được cho sử dụng trong ngày 0, 2 đơn vị liều lượng được cho sử dụng trong ngày 3 và 1 đơn vị liều lượng được cho sử dụng trong ngày 7; trong đó chế độ 2-1 đề cập đến 2 đơn vị liều lượng được cho sử dụng trong ngày 0, và 1 đơn vị liều lượng được cho sử dụng trong ngày 7. Trong một phương án cụ thể khác, hướng dẫn sử dụng đề xuất chế độ cấp thuốc sau: chế độ 2-2-2 đối với bảo vệ sau tiếp xúc, trong đó chế độ 2-2-2 này đề cập đến 2 đơn vị liều lượng được cho sử dụng lần lượt trong các ngày 0, 3, và 7. Trong một phương án cụ thể khác, hướng dẫn sử dụng đề xuất chế độ cấp thuốc sau: chế độ 1-1-1 đối với bảo vệ sau tiếp xúc, trong đó chế độ 1-1-1 này đề cập đến 1 đơn vị liều lượng được cho sử dụng lần lượt trong các ngày 0, 3, và 7.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch với vi rút dại bằng cách cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA theo sáng chế. Vật chủ có thể là con người hoặc động vật không phải người. Việc dùng thuốc có thể được thực hiện bằng cách tiêm hoặc bằng cách hít.

Sáng chế cũng mô tả chế phẩm vắc xin bệnh dại để sử dụng trong phương pháp điều trị. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm vắc xin bệnh dại để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại. Chế phẩm vắc xin bệnh dại có thể để sử dụng trong phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch đối với vi rút dại. Chế phẩm vắc xin dại có thể sử dụng trong các phương pháp điều trị và phòng ngừa, và các phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch được mô tả trong sáng chế này.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng chế phẩm vắc xin bệnh dại trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại. Trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại gây ra bởi sự lây nhiễm vi rút dại. Trong một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất chế phẩm vắc xin bệnh dại, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại gây ra bởi sự lây nhiễm vi rút dại. Thuốc có thể sử dụng trong các phương pháp điều trị và phòng ngừa, và các phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch được mô tả trong sáng chế này.

Trong tình trạng kỹ thuật, có hai lịch trình vắc xin trong cơ thường được sử dụng:

một là lịch trình Essen bao gồm 5 lần tiêm vào các ngày 0, 3, 7, 14, và 28 sau phơi nhiễm; lịch trình khác là lịch trình Zagreb bao gồm 4 lần tiêm trong đó hai lần tiêm vào ngày 0 ở các vị trí khác nhau, và hai lần tiêm bổ sung khác vào ngày 7 và ngày 21. Tuy nhiên, chế độ cấp thuốc đang tồn tại thường bị hạn chế, do lịch tiêm chủng mở rộng đòi hỏi phải có 5 lần thăm khám lâm sàng và hàm lượng thấp sự sản sinh kháng thể trong giai đoạn sớm của sự tạo miễn dịch. Trái lại, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị sự lây nhiễm vi rút đại với lịch trình tăng tốc. Trong một số phương án cụ thể, phương pháp bao gồm bước cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh đại của sáng chế, trong đó vật chủ này đã tiếp xúc với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, vật chủ là con người. Trong một số phương án cụ thể khác, vật chủ là động vật không phải người, chẳng hạn động vật gặm nhấm, chó và khỉ.

Sáng chế đề xuất chế độ dùng thuốc tăng tốc, trong đó chế phẩm vắc xin được tiêm cho vật chủ 5 lần trong vòng 7 ngày sau phơi nhiễm với vi rút đại, với ngày 0 là ngày mà vật chủ tiếp xúc với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin được dùng cho vật chủ dựa trên chế độ sau: 1) lần tiêm thứ nhất vào ngày 0 sau phơi nhiễm, 2) lần tiêm thứ hai vào ngày 0 sau phơi nhiễm, 3) lần tiêm thứ ba vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm, 4) lần tiêm thứ tư vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm, và 5) lần tiêm thứ năm vào ngày 6 hoặc 7 sau phơi nhiễm, tương ứng. Ngoài ra, trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin được dùng cho vật chủ dựa trên chế độ sau: lần tiêm thứ nhất và thứ hai vào ngày 0 sau phơi nhiễm; lần tiêm thứ 3 và thứ 4 vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm; và lần tiêm thứ 5 và/hoặc thứ 6 vào ngày 7 sau phơi nhiễm, tương ứng. Các chế phẩm vắc xin bệnh đại được mô tả trong sáng chế có thể được sử dụng theo chế độ dùng thuốc tăng tốc.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phòng ngừa bệnh đại do sự lây nhiễm vi rút đại, và chế phẩm vắc xin bệnh đại để sử dụng trong phương pháp này. Trong một số phương án cụ thể, phương pháp bao gồm bước cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế, trong đó vật chủ không bị tiếp xúc với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, vật chủ là con người. Trong một số phương án cụ thể khác, vật chủ là động vật không phải người, chẳng hạn loài gặm nhấm, chó và khỉ. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh đại của sáng chế được dùng cho vật chủ 3 lần trong vòng 7 ngày. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được dùng cho vật chủ dựa trên chế độ sau: 1) lần tiêm thứ nhất vào ngày 0; 2) lần tiêm thứ hai vào ngày 0; và 3) lần tiêm thứ ba vào ngày 7, tương ứng. Dự phòng hoặc phòng ngừa bao gồm việc điều trị cho một đối

trọng, cụ thể là người, không có bệnh, hoặc không có triệu chứng của bệnh. Các phương pháp đặc biệt được ưu tiên để phòng ngừa bệnh dại, hoặc dự phòng, là phương pháp dự phòng trước khi tiếp xúc (PEP), trong đó vắc xin được tiêm trước khi đối tượng tiếp xúc, hoặc có nguy cơ tiếp xúc, với vi rút dại sống. Đối tượng có thể được xác định là có khả năng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh. Trong trường hợp bệnh dại, đối tượng có thể được xác định là có khả năng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh dại. Ví dụ, do họ đã đến thăm hoặc dự định đến thăm một đất nước hoặc một vùng mà có bệnh dại, hoặc do họ làm việc với vi rút, hoặc với các động vật.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, việc cấp thuốc được thực hiện bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa, tiêm bắp, tiêm trong màng bụng, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, cấp thuốc tại chỗ, cấp thuốc qua da và cấp thuốc trong da. Trong một số phương án cụ thể, việc cấp thuốc cho động vật có thể được thực hiện bằng cách tiêm trong màng bụng. Trong một số phương án cụ thể khác, việc cấp thuốc cho con người được thực hiện bằng cách tiêm bắp hoặc tiêm trong tĩnh mạch. Trong một số phương án cụ thể khác, việc cấp thuốc được thực hiện bằng cách hít, cung cấp qua trực tràng, cung cấp qua mũi, cung cấp qua miệng (bao gồm cả hít).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. dữ liệu về độ độc của vắc xin bệnh dại PIKA, và tính toán sự chuyển hóa liều lượng.

Fig. 2. Quy trình sản xuất kháng nguyên IPRV.

Fig. 3. Sự tạo kháng thể bởi các chế phẩm tạo miễn dịch khác nhau.

Fig. 4. Hàm lượng IgG huyết thanh được tạo bởi vắc xin bệnh dại PIKA trong loài khỉ được tiêm chủng.

Fig. 5. kháng thể trung hòa được tạo bởi vắc xin bệnh dại PIKA trong loài khỉ được tiêm chủng (trục Y đơn vị IU).

Mô tả chi tiết các phương án của sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết một số phương án và các ví dụ được sau đây. Trong suốt bản mô tả này, nơi các ẩn

phẩm được tham chiếu, sự mô tả các ấn phẩm này được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu trong tính toàn vẹn của chúng để mô tả đầy đủ hơn tình trạng kỹ thuật liên quan đến sáng chế này.

Trước khi sáng chế này được mô tả thêm, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể được mô tả, vì các phương án này có thể biến đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế với mục đích chỉ để mô tả các phương án cụ thể, và không có mục đích giới hạn, vì phạm vi của sáng chế sẽ được giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong sáng chế có ý nghĩa giống như hiểu biết thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Mặc dù các phương pháp và các vật liệu bất kỳ giống hoặc tương đương với các phương án và vật liệu được mô tả trong sáng chế cũng có thể được sử dụng trong thực hành và thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả ngay bây giờ. Cần phải lưu ý rằng, khi được sử dụng trong tài liệu này và trong các yêu cầu bảo hộ, dạng số ít bao gồm cả các tham chiếu số nhiều trừ khi ngữ cảnh có quy định rõ ràng khác.

Định nghĩa các thuật ngữ

Thuật ngữ "tá dược" như được mô tả, đề cập đến hợp chất hoặc hỗn hợp các hợp chất bất kỳ làm tăng hoặc đa dạng hóa đáp ứng miễn dịch của vật chủ với hợp chất có tính kháng nguyên.

"PIKA" đề cập đến hợp chất bao gồm poly I:C, một chất kháng sinh (ví dụ, kanamycin), và một ion dương (ví dụ, canxi). PIKA thể hiện các đặc trưng của một tá dược với sự giảm các tác dụng phụ bất lợi (ví dụ, độc tính giảm) so với, ví dụ PICKCa và công hiệu lớn hơn (ví dụ, kích thích đáp ứng miễn dịch tăng cường) so với, ví dụ Av-PICKCa.

"vắc xin bệnh đại PIKA" đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh đại chứa kháng nguyên IPRV và tá dược PIKA. Thuật ngữ "vắc xin bệnh đại PIKA", "chế phẩm vắc xin bệnh đại PIKA", "chế phẩm vắc xin chứa PIKA", "chế phẩm vắc xin bệnh đại chứa tá dược PIKA", "vắc xin bệnh đại có tá dược PIKA" và "chế phẩm vắc xin có tá dược PIKA" có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau.

Thuật ngữ "động vật" bao gồm con người và tất cả các động vật có vú nuôi trong nhà và hoang dã, bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, gia súc, ngựa, bò, lợn, cừu, dê, chó, mèo, loài gặm nhấm, khỉ và các loài động vật tương tự.

"Kháng nguyên" đề cập đến hợp chất mà khi được dùng tạo ra đáp ứng miễn dịch, ví dụ hình thành kháng thể, bao gồm các kháng thể liên kết đặc biệt với kháng nguyên. Hai trong số các dấu hiệu đặc trưng của kháng nguyên là tính gây miễn dịch của chúng, là khả năng tạo đáp ứng miễn dịch *in vivo* của chúng, và tính kháng nguyên của chúng, là khả năng được ghi nhận chọn lọc bởi các kháng thể có nguồn gốc là các kháng nguyên.

Thuật ngữ "miễn dịch qua trung gian tế bào" và "đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào" đề cập đến sự bảo vệ miễn dịch được cung cấp bởi các tế bào lympho, chẳng hạn như sự bảo vệ được cung cấp bởi các tế bào lympho T khi chúng đến rất gần các tế bào bị nạn của chúng. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thường bao gồm sự tăng sinh tế bào lympho. Khi "sự tăng sinh tế bào lympho" được đo, khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch của các tế bào lympho đối với một kháng nguyên cụ thể được đo. Sự tăng sinh tế bào lympho có nghĩa là để chỉ sự tăng sinh tế bào B, tế bào T hỗ trợ hoặc tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL).

Khái niệm "đáp ứng miễn dịch tăng cường" hoặc tương tự có nghĩa là đáp ứng miễn dịch được nâng cao, được cải thiện hoặc được tăng cường cho lợi ích của vật chủ, so với tình trạng đáp ứng miễn dịch trước đây, ví dụ trước khi dùng chế phẩm tạo miễn dịch của sáng chế.

Thuật ngữ "miễn dịch thể dịch" và "đáp ứng miễn dịch thể dịch" đề cập đến dạng miễn dịch mà trong đó các phân tử kháng thể được tạo ra trong phản ứng với sự kích thích kháng nguyên.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" đề cập đến phản ứng bất kỳ với một hợp chất kháng nguyên bởi hệ thống miễn dịch của đối tượng có xương sống. Các đáp ứng miễn dịch điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn bởi miễn dịch thể dịch thuộc tế bào cũng như là cục bộ và có hệ thống, chẳng hạn các phản ứng CTL, bao gồm sự cảm ứng kháng nguyên đặc hiệu của CD8⁺ CTLs, các phản ứng tế bào T hỗ trợ bao gồm các phản ứng tăng sinh tế bào T và giải phóng cytokin, và các phản ứng tế bào B bao gồm phản ứng kháng thể.

Thuật ngữ "gây ra đáp ứng miễn dịch" được sử dụng trong tài liệu này thường bao gồm việc tạo ra và/hoặc tăng tiềm lực của đáp ứng miễn dịch.

Thuật ngữ "tạo đáp ứng miễn dịch" đề cập đến đáp ứng miễn dịch được kích thích, được bắt đầu, hoặc được tạo ra.

Thuật ngữ "tăng sức mạnh đáp ứng miễn dịch" đề cập đến đáp ứng miễn dịch tồn tại trước mà được cải thiện, được bổ trợ, bổ sung, khuếch đại, tăng cường, tăng lên, hoặc kéo dài.

Thuật ngữ "điều trị" và các thuật ngữ tương tự được sử dụng trong tài liệu này thường đề cập đến việc đạt được hiệu quả dược lý và/hoặc sinh lý mong muốn. Hiệu quả có thể là phòng ngừa theo khái niệm phòng ngừa hoàn toàn hoặc một phần bệnh hoặc triệu chứng bệnh và/hoặc có thể là trị liệu theo khái niệm làm ổn định một phần hoặc hoàn toàn hoặc chữa bệnh và/hoặc tác dụng bất lợi do bệnh. "Điều trị" khi được sử dụng trong tài liệu này bao gồm phương pháp điều trị bệnh bất kỳ cho đối tượng, đặc biệt là con người, và bao gồm: (i) ngăn ngừa bệnh xảy ra trong một chủ thể có thể bị mắc bệnh nhưng vẫn chưa được chẩn đoán là có bệnh; (ii) ức chế bệnh, tức là, đình chỉ sự phát triển của bệnh; hoặc (iii) làm giảm bệnh, tức là, gây ra sự suy thoái của bệnh. Thuật ngữ "phòng ngừa" hoặc "ngăn ngừa" và thuật ngữ tương tự được sử dụng trong tài liệu này thường đề cập đến việc điều trị để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh.

Thuật ngữ "trộn" bao gồm phương pháp bất kỳ để kết hợp các thành phần của chế phẩm; các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, trộn lẫn, định lượng, hòa tan, tạo nhũ tương, làm đông kết, tạo huyền phù, hoặc sự kết hợp vật lý khác các thành phần của chế phẩm.

Thuật ngữ "liều lượng đơn vị" khi được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến các đơn vị gián đoạn vật lý thích hợp làm liều lượng đơn vị cho đối tượng người và động vật, mỗi đơn vị chứa một lượng xác định trước chế phẩm của sáng chế được tính toán theo một lượng đủ để tạo ra tác dụng mong muốn. Trong trường hợp bất kỳ, thuật ngữ "liều lượng đơn vị" không nên được hiểu là thể tích của chế phẩm vắc xin chứa trong đồ chứa (chẳng hạn ống nhỏ).

Chế phẩm vắc xin bệnh dại

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh dại, chứa hoặc bao gồm: a) vi rút dại được tinh chế bất hoạt (còn gọi là IPRV), b) tá dược PIKA, và c) anbumin huyết thanh ở người (còn gọi là HSA). Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa từ 0,2 IU đến 4,0 IU IPRV trên mỗi liều lượng đơn vị, từ 250 µg đến 5000 µg tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị, và từ 0,1% đến 0,9% nồng độ HSA, ở đây nồng độ được định nghĩa là khối lượng trong thể tích (w/v) trong quá trình tạo công thức, tức là 0,1% HSA đề cập đến hàm lượng 1mg HSA trong tổng thể tích 1 ml. Trong quá trình đông khô lạnh, nước được loại ra bằng cách thăng hoa từ pha rắn sang pha khí. Lượng HSA bằng nhau được đo theo khối lượng được giữ lại trong bột đông khô và nồng độ w/v được khôi phục sau khi hoàn nguyên.

Liều lượng đơn vị thích hợp đối với chế phẩm vắc xin theo sáng chế được điều chế vào một thể tích được chọn từ nhóm gồm có 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, và khoảng giữa hai giá trị bất kỳ trong số các thể tích sau: 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, và 2,0 ml. Cần hiểu rằng thể tích cấp thuốc quá lớn hoặc quá nhỏ dẫn đến sự bất tiện trong thực hành lâm sàng, khi được áp dụng ở người. Do đó, liều lượng đơn vị cho người trưởng thành có thể thường được điều chế thành 0,5 ml hoặc 1,0 ml cho một lần tiêm (dạng lỏng hoặc sau khi hoàn nguyên của dạng bột đông khô), và 0,15 ml hoặc 0,2 ml đối với các ứng dụng dạng dùng đường mũi.

Trong một số phương án, lượng IPRV được chọn từ nhóm gồm có 0,2 IU, 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, 3,0 IU, 3,5 IU, 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và khoảng giữa hai giá trị bất kỳ trong số các giá trị IU sau: 0,2 IU, 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, 3,0 IU, 3,5 IU, và 4,0 IU. Trong một số phương án, lượng IPRV nằm trong khoảng từ 0,2 IU đến 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, lượng IPRV được chọn từ nhóm gồm có 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và khoảng giữa hai giá trị bất kỳ trong số các giá trị sau trên mỗi liều lượng đơn vị: 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, và 2,5 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể, lượng IPRV đối với người trưởng thành có thể nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị ví dụ, 1,0 IU hoặc 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong các phương án khác, khi áp dụng đối với trẻ em, lượng IPRV trên mỗi liều lượng đơn vị có thể giảm; ví dụ, lượng IPRV có thể nằm trong khoảng từ 0,5 IU đến 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, ví dụ, 0,5 IU hoặc 1,0

IU trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, nồng độ của IPRV nằm trong khoảng giữa 0,05 IU/ml và 40,0 IU/ml, chẳng hạn 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 IU/ml, và trong khoảng giữa hai giá trị nồng độ bất kỳ sau: 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, và 40 IU/ml.

Trong một số phương án, lượng tá dược PIKA thích hợp đối với chế phẩm vắc xin của sáng chế được chọn từ nhóm gồm có 250 µg, 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 3000 µg, 4000 µg, 5000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau: 250 µg, 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 3000 µg, 4000 µg, 5000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, đối với người trưởng thành, lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng giữa 250 µg và 4000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án cụ thể, lượng tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 2500 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau: 500 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg, 2500 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một số phương án, khi áp dụng cho trẻ em, lượng tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị có thể giảm, ví dụ, lượng tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau: 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg, và 1250 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

Trong nhiều tác dược có sẵn để sử dụng cho động vật có vú, chỉ có một vài tá dược, bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, được sử dụng rộng rãi trong vắc xin bệnh dại cho con người. Các tá dược khác bị từ chối sử dụng cho con người bởi vì chúng gây ra các phản ứng cục bộ hoặc có hệ thống nghiêm trọng. Ví dụ, tá dược bổ sung Freund chứa dầu khoáng, không có khả năng chuyển hóa và gây ra bệnh ung thư trong các động vật thí nghiệm. Gần đây, vắc xin bệnh dại không chứa muối nhôm được nghiên cứu. Nó có thể tạo ra các nồng độ kháng thể trung hòa bệnh dại có thể so sánh được dưới dạng các vắc xin có bổ sung tá dược nhôm.

Tá dược PIKA, chứa Poly I:C, chất kháng sinh (ví dụ, kanamycin), và ion dương (ví dụ, canxi) như được mô tả trong WO2006/131023, được đưa vào đây bằng cách tham chiếu với tính toàn vẹn của nó, đã được thừa nhận là tăng cường tính miễn dịch của kháng nguyên bệnh dại trong các nghiên cứu trên động vật. Trong các phương án liên quan, tá dược PIKA không đồng nhất về đối tượng phân tử, trong đó khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 66.000 đến 1,200.000 Daltons, hoặc từ 66.000 đến

660.000 Daltons, hoặc từ 138.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 138.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 150.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 150.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 300.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 300.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 337.000 đến 660.000 Daltons, hoặc từ 337.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 500.000 đến 1.200.000 Daltons, hoặc từ 500.000 đến 2.000.000 Daltons.

Trong các phương án có liên quan, các phân tử tá dược PIKA trong chế phẩm vắc xin có khối lượng phân tử trung bình bằng hoặc lớn hơn 100.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 120.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 138.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 150.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 250.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 300.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 337.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 500.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 750.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.000.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.200.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 1.500.000 Daltons, hoặc bằng hoặc lớn hơn 2.000.000 Daltons.

Tá dược PIKA thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong chế phẩm vắc xin của sáng chế. Trong một số phương án, khối lượng phân tử của tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 66.000 Daltons đến 1.200.000 Daltons. Trong một phương án được ưu tiên, khối lượng phân tử của tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 66.000 Daltons đến 660.000 Daltons.

Trong một số phương án, tỉ lệ của IPRV so với tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có: 1IU/100µg, 1IU/125µg, 1IU/200µg, 1IU/250µg, 1IU/300µg, 1IU/350µg, 1IU/400µg, 1IU/450µg, 1IU/500µg, 1IU/550µg, 1IU/600µg, 1IU/700µg, 1IU/800µg, 1IU/1000µg, 1IU/1500µg, 1IU/2000µg, và tỉ lệ nằm giữa hai giá trị bất kỳ sau: 1IU/100µg, 1IU/125µg, 1IU/200µg, 1IU/250µg, 1IU/300µg, 1IU/350µg, 1IU/400µg, 1IU/450µg, 1IU/500µg, 1IU/550µg, 1IU/600µg, 1IU/700µg, 1IU/800µg, 1IU/1000µg, 1IU/1500µg, và 1IU/2000µg. Trong một phương án cụ thể, tỉ lệ của IPRV so với tá dược PIKA là 1IU/500µg. Trong một phương án cụ thể, lượng IPRV là 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA là 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác, lượng IPRV is 4,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA is 2000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án cụ thể khác, lượng IPRV là 3,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA là 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án khác nữa, lượng IPRV là 1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA là 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị. Trong một phương án khác nữa, lượng IPRV là

1,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA là 2000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

Theo tiêu chuẩn WHO, người ta biết được trong tình trạng kỹ thuật rằng, hiệu lực của vắc xin bệnh dại tinh chế bất hoạt có hoặc không có tá dược lớn hơn 2,5 IU, dựa trên thử nghiệm hiệu lực NIH hoặc biến thể của thử nghiệm NIH, là thích hợp để phòng ngừa hoặc điều trị sau tiếp xúc với sự lây nhiễm vi rút dại. Trong sản xuất hiện nay, hiệu lực của vắc xin thường lớn hơn 4,5 IU khi sản xuất và hiệu lực giảm tùy thuộc vào thời gian bảo quản. Trong thời hạn sử dụng của vắc xin, hiệu lực không nên giảm xuống dưới 2,5 IU.

Liều lượng kháng nguyên thấp được sử dụng trong sáng chế có thể được tăng cường bằng cách bổ sung tá dược PIKA để tạo ra miễn dịch bảo vệ hiệu quả cao ở chuột và khi tiêm chủng (xem các ví dụ 1-3 và 6). Nghiên cứu trên động vật cũng cho thấy rằng chế phẩm bệnh dại chứa tá dược PIKA có thể tạo ra nồng độ sớm hơn và cao hơn khi sản xuất kháng thể đặc hiệu (xem ví dụ 1).

Do đó, chế phẩm vắc xin bệnh dại tạo thành đạt được hiệu lực cao hơn với lượng kháng nguyên thấp hơn. Trên thực tế, chế phẩm vắc xin bệnh dại liều lượng kháng nguyên thấp hơn làm giảm các chi phí sản xuất và tác dụng phụ tiềm tàng, trong khi vắc xin có hiệu quả trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại sự nhiễm trùng vi rút dại.

Hơn nữa, các tác giả đã phát hiện ra rằng vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA thể hiện sự ổn định nhiệt mạnh hơn khi lượng HSA và maltoza đã mô tả ở trên được bổ sung mà không có mặt geletin. HSA và maltoza được biết đến là chất ổn định hóa đối với vắc xin bệnh dại; tuy nhiên, người ta chưa biết rằng khi kết hợp chúng với một lượng cụ thể, chế phẩm vắc xin theo sáng chế thể hiện sự ổn định nhiệt.

Quy trình sản xuất chế phẩm vắc xin bệnh dại

Trừ khi có chỉ định khác, kháng nguyên bệnh dại có sẵn bất kỳ có thể được sử dụng để điều chế chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế. Chủng vi rút dại thường được sử dụng nhất để sản xuất vắc xin, bao gồm nhưng không giới hạn bởi chủng CTN-1, chủng aG, chủng Pitman Moore (PM), chủng Kissling của chủng vi rút thách thức (CVS), hoặc giảm độc qua phôi trứng 40-50 đời (LEP) và giảm độc qua phôi

trứng 180 đời (HEP) từ gà Flury, chủng Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA) cố định của vi rút Street-Alabama-Dufferin (SAD) và các biến thể SAD khác.

Trong một số phương án cụ thể, kháng nguyên vắc xin đại được tinh chế bất hoạt thu được từ chủng vi rút aG rabies được nuôi cấy trong dòng tế bào ở thận của chuột bạch (PHK). Vi rút được chuẩn bị và được rắc vào tế bào PHK. Các tế bào sau đó được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy vi rút trước khi chúng được thu hoạch để tạo ra dung dịch chứa vi rút.

Trong một phương án cụ thể khác của sáng chế, kháng nguyên vắc xin đại được tinh chế bất hoạt thu được từ chủng vi rút đại CTN-1 được nuôi cấy trong dòng tế bào Vero. Chủng vi rút đại CTN-1 được cấy truyền và rắc vào dòng tế bào Vero, và sau đó được thu hoạch để tạo ra dung dịch chứa vi rút.

Dung dịch chứa vi rút đã thu hoạch sau đó đi qua một quy trình cô đặc và bất hoạt để tạo ra kháng nguyên bất hoạt. Dung dịch chứa vi rút được tinh chế bất hoạt sau đó thu được nhờ phương pháp sắc ký cột sau khi bổ sung HSA (Xem Fig. 1 đối với sự minh họa quy trình sản xuất). Trong một số phương án cụ thể, lượng HSA thích hợp đối với chế phẩm vắc xin được chọn từ nhóm gồm có 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5% theo nồng độ, và giá trị nằm giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên.

Trong một số phương án, tá dược PIKA được sản xuất từ các polymer polynucleotit chuỗi đơn, PolyI và PolyC, tiếp theo là bổ sung mono-kanamycin sulfat (Kanamycin) và canxi clorua (CaCl_2) để tạo ra tá dược cuối cùng. Trong một số phương án, độ pH của tá dược PIKA được chọn từ nhóm gồm có: 6,0, 6,05, 6,1, 6,15, 6,2, 6,25, 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45, 7,5, 7,55, 7,6, 7,65, 7,7, 7,75, 7,8, 7,85, 7,9, 7,95, 8,0 và giá trị nằm giữa bất kỳ hai giá trị pH nêu trên: 6,0, 6,05, 6,1, 6,15, 6,2, 6,25, 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45, 7,5, 7,55, 7,6, 7,65, 7,7, 7,75, 7,8, 7,85, 7,9, 7,95, và 8,0. Trong một số phương án cụ thể, độ pH của tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh đại được sản xuất bằng cách kết hợp IPRV và tá dược PIKA trong dung dịch đệm phosphat. IPRV và tá dược PIKA

được trộn lẫn dưới độ pH được chọn từ nhóm gồm có : 6,0, 6,05, 6,1, 6,15, 6,2, 6,25, 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45, 7,5, 7,55, 7,6, 7,65, 7,7, 7,75, 7,8, 7,85, 7,9, 7,95, 8,0 và giá trị nằm giữa bất kỳ hai giá trị pH nêu trên: 6,0, 6,05, 6,1, 6,15, 6,2, 6,25, 6,3, 6,35, 6,4, 6,45, 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, 7,4, 7,45, 7,5, 7,55, 7,6, 7,65, 7,7, 7,75, 7,8, 7,85, 7,9, 7,95, và 8,0.

Trong một số phương án, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế không chứa gelatin.

Trong một số phương án, sản phẩm cuối cùng chứa: 2,0 IU/ml IPRV, 1,0 mg/ml tá dược PIKA, 5,0% maltoza, và 0,3% HSA. Trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, chứa hoặc bao gồm: 2,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA, 0,3% HSA. Trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, chứa hoặc bao gồm: 1,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,3% HSA; hoặc 1,5 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,3% HSA; hoặc 2,0 IU/ml IPRV, 2,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,5% HSA; hoặc 4,0 IU/ml IPRV, 1,0 mg/ml tá dược PIKA và 0,5% HSA.

Sản phẩm cuối cùng được cho đầy vào một ống nhỏ đã vô trùng với thể tích đầy bằng 1ml/ống để tạo ra liều đơn vị, và sau đó được bịt nắp. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng thể tích đầy 1ml/ống bao gồm cả sai sót vận hành. Do đó, thể tích đầy 1ml/ống có thể nằm trong khoảng từ 0,90 đến 1,20 ml/ống, chẳng hạn từ 1,10 đến 1,12 ml/ống.

Cần lưu ý rằng thể tích đầy không bị giới hạn bởi 1ml/ống, và có thể là giá trị thích hợp bất kỳ được chọn từ nhóm gồm: 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml/ống, và thể tích bất kỳ nằm giữa hai giá trị nêu trên. Trong một phương án được ưu tiên, khi áp dụng đối với người trưởng thành, thể tích quá lớn hoặc quá nhỏ dẫn đến sự bất tiện trong thực hành lâm sàng, do đó thể tích cấp cho người là 1ml. Do đó, chế phẩm theo sáng chế được điều chế dưới dạng 1ml/ống. Khi áp dụng đối với trẻ em hoặc các đối tượng khác, thể tích đầy và liều đơn vị có thể được điều chỉnh thích hợp.

Trong một số phương án, dạng lỏng của vắc xin bệnh dại có thể cũng được điều chế thành dạng rắn tương ứng của nó. Trong tình huống này, chế phẩm dạng lỏng còn

được đông khô lạnh. Dạng rắn của vắc xin bệnh dại được đóng gói cùng với nước tiêm tùy ý. Vắc xin được hoàn nguyên trước khi sử dụng, thể tích cuối cùng để tiêm được chọn từ nhóm gồm có: 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,25 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, và thể tích bất kỳ nằm giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên.

Trong một số phương án, dạng lỏng của vắc xin bệnh dại ở nồng độ thích hợp được điều chế để ứng dụng qua đường mũi. Trong trường hợp này, thể tích của chế phẩm vắc xin bệnh dại nằm trong khoảng từ 0,05 ml đến 0,1 ml, 0,1 ml đến 0,15 ml, 0,15 ml đến 0,2 ml, 0,2 ml đến 0,25 ml, 0,25 ml đến 0,3 ml, 0,3 ml đến 0,35 ml, 0,35 ml đến 0,4 ml, 0,4 ml đến 0,45 ml, 0,45 ml đến 0,5 ml và khoảng bất kỳ nằm giữa hai thể tích sau: 0,05 ml đến 0,1 ml, 0,1 ml đến 0,15 ml, 0,15 ml đến 0,2 ml, 0,2 ml đến 0,25 ml, 0,25 ml đến 0,3 ml, 0,3 ml đến 0,35 ml, 0,35 ml đến 0,4 ml, 0,4 ml đến 0,45 ml, 0,45 ml đến 0,5 ml. Nồng độ của IPRV nằm trong khoảng từ 0,05 IU/ml đến 40,0 IU/ml, chẳng hạn 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 IU/ml, và giá trị nằm giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên.

Tính an toàn của chế phẩm vắc xin bệnh dại

Theo nguyên tắc, cách đánh giá sự an toàn của thuốc là cách tiếp cận để xác định rủi ro và giảm thiểu rủi ro. Đối với các ứng dụng đầu tiên ở người, tính an toàn có thể được đánh giá trên các loài động vật được chọn sử dụng để thử nghiệm. Việc chuyển đổi từ dữ liệu về độc tính trên động vật sang liều an toàn tối đa được khuyến cáo trên người có thể bao gồm các bước sau: 1) xác định mức độ tác động bất lợi không quan sát được (NOAEL), 2) chuyển đổi NOAEL sang liều lượng tương đương ở người (HED) trong hầu hết các loài thử nghiệm có liên quan, và 3) áp dụng yếu tố an toàn phù hợp (ví dụ 10).

Theo hướng dẫn của FDA đối với Công nghiệp - Ước lượng liều khởi đầu an toàn tối đa trong các thử nghiệm lâm sàng ban đầu đối với việc trị liệu ở các tình nguyện viên khỏe mạnh trưởng thành, liều lượng tương đương ở người có thể được tính từ các nghiên cứu tiền lâm sàng ở động vật được chọn từ các động vật mẫu nêu trong bảng dưới đây:

Bảng 1: Chuyển đổi liều lượng của động vật sang liều lượng tương đương ở người

Loài	Thể trọng tham chiếu (kg)	Khoảng khối lượng làm việc (kg)	Chia liều lượng động vật cho	Nhân liều lượng động vật với
Người lớn	60	---	---	---
Trẻ em	20	---	---	---
Chuột	0,02	0,011-0,034	12,3	0,081
Chuột đồng	0,08	0,047-0,157	7,4	0,135
Chuột cống	0,15	0,080-0,270	6,2	0,162
Chồn sương	0,3	0,160-0,540	5,3	0,189
Lợn Guinea	0,4	0,208-0,700	4,6	0,216
Thỏ	1,8	0,9-3,0	3,1	0,324
Chó	10	5-17	1,8	0,541
Linh trưởng:				
Khi	3	1,4-4,9	3,1	0,324
Khi đuôi sóc	0,35	0,140-0,720	6,2	0,162
Khi sóc	0,6	0,290-0,970	5,3	0,189
Khi đầu chó	12	7-23	1,8	0,541
Lợn rất nhỏ	20	10-33	1,4	0,73
Lợn nhỏ	40	25-64	1,1	0,946

Động vật bất kỳ trên đây thích hợp để đánh giá mức độ an toàn của sản phẩm nghiên cứu có thể được chọn làm mẫu động vật để nghiên cứu. Thông thường, ít nhất phải có một loại động vật gặm nhấm thử nghiệm và ít nhất một loại động vật linh trưởng thí nghiệm cần được lựa chọn để đánh giá trước khi ứng dụng của con người. Các động vật thử nghiệm cần được kiểm tra độc tính cấp tính với ứng dụng đơn lẻ và độc tính lâu dài với ứng dụng lặp đi lặp lại.

Chế phẩm vắc xin bệnh dại của sáng chế chứa tá dược PIKA được thử nghiệm ở cả loài gặm nhấm và linh trưởng để cho thấy độ an toàn tuyệt hảo (xem chi tiết về các thử nghiệm độ an toàn trong các ví dụ 5 và 7).

Độ ổn định của chế phẩm vắc xin bệnh dại

Vắc xin thường được vận chuyển hoặc bảo quản trước khi thử nghiệm. Thời hạn sử dụng thông thường đối với vắc xin nằm trong khoảng từ 1 đến 3 năm. Do đó, độ ổn định nhiệt của vắc xin được đòi hỏi để đảm bảo hiệu lực của vắc xin ở thời điểm cấp thuốc. Do tỷ lệ hiện mắc bệnh dại cao, vắc xin thường được phân phối cho các nước nhiệt đới, nơi không có hệ thống phân phối được làm lạnh. Ở các vùng này, các chế phẩm vắc xin được cung cấp phải có độ ổn định nhiệt ở nhiệt độ cao.

Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế được thử nghiệm ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C và 37°C trong khoảng thời gian dài để xác định sự ổn định nhiệt (chi tiết xem ở ví dụ 13).

Kit

Trong một số phương án, kit chứa chế phẩm vắc xin bệnh dại trong một công thức chất lỏng vô trùng (ví dụ, nước), ở đây công thức là vô trùng, và được cung cấp trong một đồ chứa vô trùng, ống vô trùng, ống thuốc tiêm vô trùng, hoặc ống tiêm vô trùng.

Trong một số phương án, kit chứa chế phẩm vắc xin bệnh dại, được đông khô lạnh và trong đồ chứa vô trùng; và đồ chứa bao gồm chất lỏng vô trùng để hoàn nguyên chế phẩm đông khô lạnh. Trong một số phương án, kit còn bao gồm các hướng dẫn để hoàn nguyên chế phẩm đã đông khô.

Trong một số phương án, kit sẽ bao gồm thêm các hướng dẫn sử dụng, ví dụ, liều lượng và tần suất sử dụng. Trong một số phương án, hướng dẫn này được in trực tiếp lên kit. Trong các phương án khác, hướng dẫn là vật liệu được in được cung cấp dưới dạng vật chèn trong bao gói. Các hướng dẫn có thể cũng được cung cấp dưới dạng phương tiện khác, ví dụ, đĩa compact, đĩa đa năng kỹ thuật số, và những vật tương tự.

Sáng chế cũng đề cập đến kit dược phẩm, chứa hoặc bao gồm: a) chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế, b) đồ chứa, chẳng hạn ống nhỏ hoặc ống thuốc tiêm, c) hướng dẫn sử dụng, và tùy ý d) nước pha tiêm. Trong một số phương án cụ thể, để thuận tiện cho việc vận chuyển và bảo quản, kit dược phẩm được điều chế thành dạng

đông khô. Do đó, kit được phẩm chứa hoặc bao gồm a) chế phẩm vắc xin bệnh dại được đông khô, b) ống nhỏ giữ chế phẩm vắc xin bệnh dại đã đông khô, và c) hướng dẫn sử dụng. Khi cần thiết, nước pha tiêm có thể được kết hợp vào kit được phẩm để hoàn nguyên chế phẩm vắc xin bệnh dại dạng lỏng trước khi sử dụng. Trong một số phương án cụ thể, hướng dẫn sử dụng gợi ý chế độ cấp thuốc như sau: chế độ 2-2-1, chế độ 2-2-2, chế độ 1-1-1, và/hoặc chế độ 2-1, trong đó chế độ 2-2-1 đề cập đến 2 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 0, 2 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 3 và 1 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 7; trong đó chế độ 2-2-2 đề cập đến 2 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 0, 3 và 7; trong đó chế độ 1-1-1 đề cập đến 1 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 0, 3 và 7; trong đó chế độ 2-1 đề cập đến 2 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 0, và 1 liều lượng đơn vị được dùng trong ngày 7.

Phương pháp cấp thuốc

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch với vi rút dại bằng cách cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA theo sáng chế. Vật chủ có thể là người hoặc động vật không phải người. Việc dùng thuốc có thể được thực hiện bằng cách tiêm hoặc bằng cách hít.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh dại để sử dụng trong phương pháp điều trị y tế. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm vắc xin bệnh dại để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại. Chế phẩm vắc xin bệnh dại có thể được sử dụng trong phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch với vi rút dại. Chế phẩm vắc xin bệnh dại hữu dụng trong các phương pháp điều trị y tế và phòng ngừa, và các phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch được mô tả trong tài liệu này.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng chế phẩm vắc xin bệnh dại trong sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại. Trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại gây ra bởi sự lây nhiễm vi rút dại. Trong một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vắc xin bệnh dại, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh dại gây ra bởi sự lây nhiễm vi rút dại. Thuốc này có thể sử dụng trong các phương pháp điều trị y tế và phòng ngừa, và các phương pháp tạo đáp ứng miễn dịch được mô tả trong tài liệu này.

Trong tình trạng kỹ thuật, có hai chương trình vắc xin trong cơ được sử dụng

thông dụng: một là chương trình Essen bao gồm 5 lần tiêm vào các ngày 0, 3, 7, 14, và 28 sau phơi nhiễm; hai là chương trình Zagreb bao gồm 4 lần tiêm trong đó hai lần tiêm vào ngày 0 ở các vị trí khác nhau, và hai lần tiêm bổ sung khác vào ngày 7 và ngày 21. Tuy nhiên, chế độ cấp thuốc hiện tại thường bị hạn chế, do lịch trình tiêm chủng mở rộng đòi hỏi 5 lần lâm sàng và các nồng độ thấp của sự sản xuất kháng thể trong giai đoạn đầu của tiêm chủng. Khi xem xét điều này, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị sự lây nhiễm vi rút đại với lịch trình tăng tốc. Trong một số phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm bước cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế, trong đó vật chủ này đã bị tiếp xúc với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, vật chủ là con người. Trong một số phương án cụ thể khác, vật chủ là động vật không phải người, chẳng hạn loài gặm nhấm, chó và khỉ.

Trong một số phương án cụ thể, sáng chế đề xuất chế độ cấp thuốc tăng tốc, trong đó chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được cho vật chủ dùng trong 5 lần trong vòng 7 ngày sau phơi nhiễm với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được cho vật chủ dùng dựa theo chế độ sau: 1) lần thứ nhất vào ngày 0 sau phơi nhiễm, 2) lần thứ hai vào ngày 0 sau phơi nhiễm, 3) lần thứ ba vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm, 4) lần thứ tư vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm, và 5) lần thứ năm vào ngày 6 hoặc 7 sau phơi nhiễm, tùy ý, 6) lần thứ sáu vào ngày 6 hoặc 7 sau phơi nhiễm, lần lượt. Ngoài ra, trong một số phương án cụ thể khác, chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được cho vật chủ dùng dựa theo chế độ sau: lần thứ nhất và lần thứ hai vào ngày 0 sau phơi nhiễm; lần thứ 3 và thứ 4 vào ngày 2 hoặc 3 sau phơi nhiễm; và lần thứ 5 và/hoặc lần thứ 6 vào ngày 7 sau phơi nhiễm, lần lượt.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng ngừa sự lây nhiễm vi rút đại, và chế phẩm vắc xin bệnh đại để sử dụng trong phương pháp này. Trong một số phương án cụ thể, phương pháp bao gồm bước cho vật chủ dùng chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế, trong đó vật chủ này chưa bị tiếp xúc với vi rút đại. Trong một số phương án cụ thể, vật chủ là người. Trong một số phương án cụ thể khác, vật chủ là động vật không phải người, chẳng hạn động vật gặm nhấm, chó và khỉ. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được cho vật chủ dùng 3 lần trong vòng 7 ngày. Trong một số phương án cụ thể, chế phẩm vắc xin bệnh đại theo sáng chế được cho vật chủ dùng dựa theo chế độ sau: 1) lần thứ nhất vào ngày 0; 2) lần thứ hai vào ngày 0; và 3) lần thứ ba vào ngày 7, lần lượt. Phòng ngừa hoặc ngăn chặn bao gồm việc điều trị cho một đối tượng, cụ thể là người, không

bị bệnh, hoặc không có triệu chứng của bệnh. Các phương pháp ngăn chặn hoặc phòng ngừa bệnh dại được ưu tiên đặc biệt là các phương pháp phòng ngừa trước khi tiếp xúc (PEP), trong đó vắc xin được dùng trước khi đối tượng tiếp xúc, hoặc có nguy cơ tiếp xúc với, vi rút dại còn sống. Đối tượng có thể được xác định là có khả năng mắc bệnh, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh. Trong trường hợp bệnh dại, đối tượng có thể được xác định là có khả năng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh dại. Ví dụ, do họ đã đến thăm hoặc có dự định đến thăm một đất nước hoặc vùng mà ở đó có bệnh dại, hoặc do họ làm việc với vi rút, hoặc với động vật.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, việc cấp thuốc được thực hiện bằng cách tiêm ngoài ruột, tiêm bắp, tiêm trong màng bụng, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, cung cấp tại chỗ, cung cấp qua da và cung cấp trong da. Trong một số phương án cụ thể, việc cấp thuốc cho động vật có thể được thực hiện bằng cách tiêm trong màng bụng. Trong một số các phương án cụ thể khác, việc cấp thuốc cho con người được thực hiện bằng cách tiêm bắp hoặc tiêm trong tĩnh mạch. Trong một phương án cụ thể khác, việc cấp thuốc được thực hiện bằng cách hít, cung cấp qua trực tràng, cung cấp qua mũi, cung cấp qua đường miệng (bao gồm cả hít).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Đáp ứng miễn dịch thể dịch và thử nghiệm thách thức vi rút ở chuột

Các quy trình thực hiện:

Quy trình thực hiện 1: Đáp ứng miễn dịch thể dịch

Chuột OF1 được cho dùng IPRV (chủng PV được sản xuất trong tế bào BHK 21, 0,2 IU) có hoặc không có tá dược PIKA (75µg) trong các ngày 0, 3, 7, 14 và 30. Các mẫu máu được lấy 5 lần trong thời gian 60 ngày sau khi tiêm chủng, và được thử nghiệm đối với các kháng thể trung hòa vi rút bằng thử nghiệm ức chế tập trung huỳnh quang nhanh (RFFIT), và cũng được phân tích IgG, IgM bằng cách sử dụng phương pháp ELISA.

Quy trình thực hiện 2: Thử nghiệm thách thức vi rút

Chuột OF1 bị nhiễm dưới da vi rút dại hoang dã (5×10^6 icLD₅₀), sau đó chúng được dùng một mình tá dược PIKA (50 µg), liều lượng cao hoặc thấp IPRV (0,1 hoặc 0,2 IU, chủng PV) mà không có tá dược, với 50 µg Al₂O₃, hoặc với 50 µg PIKA vào 6

giờ, 3 và 7 ngày sau khi nhiễm vi rút. Tỷ lệ sống sót của chuột được quan sát.

Tóm tắt kết quả:

(1) Đáp ứng miễn dịch thể dịch (tức là nồng độ kháng thể khi sử dụng thử nghiệm RFFIT) quan sát được là cao hơn ở những động vật nhận chế phẩm vắc xin bệnh dại có tá dược PIKA. Trong khi chế phẩm vắc xin chứa tá dược PIKA có thể tạo ra nồng độ cao hơn của việc sản xuất IgG và IgM sớm 4 ngày sau khi tiêm chủng. Chế phẩm vắc xin chứa tá dược nhôm làm giảm nồng độ kháng thể trong giai đoạn sớm. Nồng độ các kháng thể IgG được sinh ra bởi chế phẩm vắc xin bệnh dại có hoặc không có tá dược được trình bày trong Fig. 3.

(2) Dưới thử nghiệm thách thức vi rút liều lượng gây chết người mà 95% chuột bị chết khi không được tiêm chủng hoặc với vắc xin chứa tá dược nhôm, và chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA cung cấp sự bảo vệ 90% ngay cả khi even mức độ IPRV dưới mức tối ưu (0,1 IU) được sử dụng. Tất cả chuột được tiêm chủng với mức độ IPRV tối ưu (0,2 IU) với tá dược PIKA còn sống sót, trong khi chỉ có 30% chuột còn sống sót khi được tiêm chủng với mức độ IPRV tối ưu và tá dược nhôm.

Kết luận, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA có thể tạo ra nồng độ kháng thể trung hòa cao hơn 6-7 lần sau khi tiêm chủng so với vắc xin chứa tá dược nhôm truyền thống. Mức độ IgG cao được duy trì trong thời kỳ quan sát 60 ngày, tạo ra sự bảo vệ dịch thể lâu dài sau khi tiêm chủng.

Sự gia tăng sớm hơn trong kháng thể trung hòa cũng có thể cung cấp sự bảo vệ hiệu quả hơn cho những bệnh nhân được tiêm vắc xin sau phơi nhiễm. Một kết luận trực tiếp hơn có thể được rút ra, là tất cả chuột được tiêm chủng vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA đều sống sót qua thử thách virus gây chết người.

Ví dụ 2. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào ở chuột

2.1. Sự tạo ra IL-2 yếu tố sinh trưởng tế bào T và sự tăng sinh tế bào đơn nhân lách in vitro

Quy trình thực hiện: chuột C3H được tiêm chủng với đối chứng PBS, IPRV (0,1 IU) có hoặc không có tá dược PIKA (10 μ g), dưới da. Sau một tuần, chuột bị giết và các tế bào đơn nhân lách được tách ra để đánh giá sự sản sinh IL-2 bằng cách sử dụng phương pháp Gillis. Tóm lại, các tế bào đơn nhân lách được nuôi cấy và được kích

thích bằng đối chứng, IPRV, tá dược PIKA hoặc ConA. Chất nổi trên bề mặt sau đó được thu hoạch sau 24 giờ và được lọc trước khi chuẩn độ IL-2. Chất nổi trên bề mặt được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào CTLL, mà sự sinh trưởng của nó phụ thuộc vào sự có mặt của IL-2. Sự sản sinh IL-2 được chuẩn độ bằng cách đo sự tăng sinh tế bào CTLL. Hơn nữa, ^3H -thymidin được bổ sung để xác định sự tăng sinh tế bào đơn nhân lách bằng cách đo ^3H -thymidin kết hợp sau khi kích thích.

Tóm tắt: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa 0,1 IU IPRV và 10 μg tá dược PIKA có thể tăng cường sự sản sinh IL-2 và sự tăng sinh tế bào đơn nhân lách. Khi được sử dụng để kích thích in vitro, một mình tá dược PIKA tạo ra sự sản sinh IL-2 yếu và sự tăng sinh tế bào đơn nhân lách cao, chỉ ra rằng tá dược PIKA liên quan đến các cơ chế đa tế bào để kích hoạt các tế bào đơn nhân lách bên cạnh các tế bào trợ T mà đòi hỏi IL-2.

2.2. Kích hoạt đại thực bào

Quy trình thực hiện: 3 nhóm chuột Kunming (cân nặng trung bình 20g) được tiêm chủng bằng đối chứng nước muối, 0,1 IU IPRV có hoặc không có tá dược PIKA (10 μg). Chuột được tiêm trong màng bụng vào các ngày 0, 3, 7 và 14. Các đại thực bào màng bụng được thu hồi và được cách ly 4 giờ sau mỗi lần tiêm chủng để kiểm tra bằng kính hiển vi. Hoạt động thực bào của đại thực bào được tính và được trình bày trong bảng sau:

Bảng 2: Chỉ số thực bào của đại thực bào

Nhóm	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 7	Ngày 14
Đối chứng nước muối	11%(0,13)	31%(0,47)	34%(0,49)	6%(0,12)
IPRV	4%(0,09)	10%(0,12)	27%(0,45)	12%(0,14)
IPRV+PIKA	82%(1,48)	70%(1,9)	66%(2,46)	45%(1,14)

Lưu ý: lệ phần trăm chỉ ra số đại thực bào có hoạt động thực bào trên số đại thực bào không có hoạt động thực bào; Số trong dấu ngoặc đơn chỉ ra số tế bào hồng cầu bị nhấn chìm bởi mỗi đại thực bào.

Bảng 2 cho thấy rằng tá dược PIKA có thể tăng cường hoạt động của đại thực bào trong khi một mình IPRV ức chế sự hoạt động của đại thực bào.

2.3. Sự tăng sản xuất Interferon- γ (IFN- γ)

Kháng nguyên bệnh dại (0,1 hoặc 0,2 IU) được sinh ra trong tế bào PHK có hoặc không có tá dược PIKA (10 hoặc 50 μ g) so với tiêu chuẩn. Chuột BALB/c được tiêm chủng qua màng bụng với một hoặc hai liều lượng của ba chế phẩm trên vào ngày 0 hoặc các ngày 0 và 7, lần lượt. Chuột bị giết sau 7 ngày tiêm chủng (tức là ngày thứ 7 đối với chuột nhận một liều, và ngày thứ 14 đối với chuột nhận hai liều). Các tế bào đơn nhân lách bị cô lập để thử nghiệm sự sản sinh IFN- γ bằng cách sử dụng phương pháp ELISPOT.

Kết quả: Chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV được sinh ra trong tế bào PHK và tá dược PIKA đã tạo ra sự sản sinh IFN- γ ở chuột sớm 7 ngày sau liều thứ nhất. Nhóm không có tá dược PIKA không có sự sản sinh IFN- γ đáng kể. Ở chuột nhận hai liều chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV được sinh ra trong tế bào PHK và tá dược PIKA (50 μ g) đã tạo ra IFN- γ cao hơn 2 lần so với nhóm tiêu chuẩn. Ngay cả với mức độ tá dược PIKA dưới mức tối ưu (10 μ g), chuột tạo ra mức độ IFN- γ đáng kể sau liều thứ hai. Điều này chỉ ra rằng chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T sớm sau khi tiêm chủng và tăng cao lên đến 14 ngày sau khi tiêm chủng.

Chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa mức độ IPRV dưới mức tối ưu (0,1 IU) và (10 μ g) tá dược của hai ví dụ trên tương đương với chế phẩm sử dụng ở người chứa 24,39 IU IPRV và 2,439 μ g tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị (xem Fig. 1 và Bảng 1 để chuyển đổi). Đây là biểu thị cho liều lượng ở người bằng khoảng 2,4 IU IPRV và 240 μ g tá dược PIKA, khi hệ số an toàn bằng 10 thường sử dụng được áp dụng. Đối với mức độ IPRV tối ưu (0,2 IU) và tá dược (50 μ g hoặc 75 μ g) được sử dụng, liều lượng biểu thị cho người bằng khoảng 4 IU IPRV và 1,200 μ g hoặc tá dược PIKA.

Ví dụ 3. Hiệu lực của kháng nguyên IPRV với tá dược tiềm năng

Lượng IPRV giống nhau được sử dụng để điều chế các chế phẩm vắc xin không có tá dược, có tá dược PIKA và có tá dược nhôm. Chuột được tiêm chủng với các chế phẩm vắc xin bệnh dại khác nhau và được thách thức với chủng CVS trong não. ED₅₀ được đo sử dụng phương pháp NIH. Lượng tá dược bổ sung và ED₅₀ thu được được trình bày trong Bảng 3:

Bảng 3: Thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm vắc xin bệnh dại

	Lượng tá dược (μg)		ED ₅₀
	Ngày 0	Ngày 7	
IPRV (0,2 IU)	0	0	221
IPRV (0,2 IU) + PIKA	100	100	22
IPRV (0,2 IU) + Nhôm	1000	1000	132

Kết quả: ED₅₀ của chế phẩm vắc xin có tá dược PIKA giảm khoảng 10 lần trong chế phẩm vắc xin có tá dược nhôm chỉ giảm khoảng 1 lần. Kết luận, tá dược PIKA có tác dụng tiềm năng tốt hơn đáng kể với kháng nguyên bệnh dại so với tá dược nhôm.

Ví dụ 4. Tối ưu hóa công thức vắc xin

Vắc xin bệnh dại hiện nay thường chứa kháng nguyên IPRV lớn hơn 4,5IU. Tuy nhiên, đối với vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA theo sáng chế, mức độ kháng nguyên được đề xuất là < 4,5 IU. Điều này được khuyến cáo dựa trên nghiên cứu tiền lâm sàng, bao gồm cả thử nghiệm với chuột đồng màu vàng trên thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm (Ví dụ 5). Kết quả cho thấy rằng chế phẩm vắc xin bệnh dại PIKA chứa 2 IU kháng nguyên có sự bảo vệ tốt hơn chế phẩm vắc xin có sẵn trên thị trường với kháng nguyên > 4,5 IU. Như vậy, các tác giả đã thử nghiệm các mức độ kháng nguyên kháng nhau nằm trong khoảng từ 0,25 đến 3,0 IU ở dạng liều lượng cuối cùng; điều này làm giảm tiềm năng của tác dụng phụ và cũng làm giảm giá thành của vắc xin trong khi vẫn giữ được mức độ hiệu quả tốt bằng sự bổ sung tá dược PIKA. Với mục đích thử nghiệm, liều lượng của PIKA được giữ không đổi là 1,0 mg. Ngoài ra, sự ảnh hưởng lên hiệu quả của vắc xin dựa trên sự khác nhau về liều lượng PIKA và nồng độ anbumin ở người cũng được nghiên cứu.

4.1. Hiệu quả của vắc xin với độ chuẩn khác nhau của kháng nguyên IPRV được bổ sung

Trong khi các thành phần khác (PIKA, HSA và Maltoza) của vắc xin bệnh dại được giữ không đổi, hiệu quả bảo vệ miễn dịch của các chế phẩm vắc xin với độ chuẩn kháng nguyên khác nhau được xem xét trong Bảng 4 dưới đây:

Bảng 4: Hiệu quả bảo vệ miễn dịch của vắc xin với độ chuẩn kháng nguyên khác nhau

Nhóm	Công thức				Kết quả
	Kháng nguyên IPRV (IU/liều)	PIKA (mg/liều)	HSA (%)	Mal (%)	Hiệu lực (IU/liều)
V-1	0,25	1,0	0	5,0	1,7
V-2	0,5	1,0	0	5,0	3,4
V-3	1,0	1,0	0	5,0	3,0
V-4	1,5	1,0	0	5,0	3,3
V-5	2,0	1,0	0	5,0	4,7
V-6	2,5	1,0	0	5,0	3,7
V-7	3,0	1,0	0	5,0	5,1

Phân tích: Hiệu lực vắc xin với độ chuẩn kháng nguyên nằm trong khoảng 0,5 và 3,0 IU/liều (lượng tương đối của đơn vị quốc tế) được bổ sung luôn luôn lớn hơn 2,5 IU/liều (hiệu lực tương đối của đơn vị quốc tế), đáp ứng các đòi hỏi tiêu chuẩn đối với vắc xin bệnh dại được khuyến cáo bởi WHO, cũng như trong Dược điển của Cộng hòa Nhân dân Trung Hoa, ấn bản năm 2010, Tập 3.

4.2. Hiệu quả của các chế phẩm vắc xin với lượng tá dược PIKA khác nhau được bổ sung

Với lượng IPRV, HSA và Maltoza giữ không đổi, hiệu quả bảo vệ miễn dịch của các vắc xin với lượng tá dược PIKA khác nhau được xem xét trong Bảng 5:

Bảng 5: Hiệu quả bảo vệ miễn dịch của vắc xin với lượng tá dược PIKA khác nhau

Nhóm	Công thức				Kết quả
	Kháng nguyên IPRV (IU/liều)	PIKA (mg/liều)	HSA (%)	Mal (%)	Hiệu lực (IU/liều)
P-1	2,0	0,25	0	5,0	6,8
P-2	2,0	0,5	0	5,0	6,0
P-3	2,0	0,75	0	5,0	5,6
P-4	2,0	1,0	0	5,0	4,7
P-5	2,0	1,25	0	5,0	4,4
P-6	2,0	1,5	0	5,0	6,6
P-7	2,0	2,0	0	5,0	8,9

Phân tích: Khi lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng giữa 0,25 và 2,0 µg/liều, hiệu quả của chế phẩm vắc xin tạo thành luôn lớn hơn 2,5 IU/liều, đáp ứng các đòi hỏi tiêu chuẩn đối với vắc xin bệnh dại được khuyến cáo bởi WHO. Khi sử dụng làm thuốc chống vi rút, đến 4mg PIKA được chấp nhận sử dụng nhiều lần ở đối tượng người với tác dụng trị liệu tốt và được dung nạp tốt. Hơn nữa, 1,0mg tá dược PIKA được sử dụng trong thử nghiệm giai đoạn I ở người để tăng cường kháng nguyên bệnh dại với hiệu quả phòng ngừa tốt. Do đó, lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 0,25 đến 4 mg PIKA sẽ là an toàn và hiệu quả để bổ sung vào công thức cuối cùng.

4.3. Ảnh hưởng của nồng độ HSA tới độ ổn định của vắc xin bệnh dại

Độ ổn định của vắc xin bệnh dại chứa PIKA đã được đông khô dưới các nồng độ HSA khác nhau được đánh giá trong Bảng 6 dưới đây:

Bảng 6: Ảnh hưởng của nồng độ HSA tới độ ổn định của vắc xin bệnh dại

Nhóm	Công thức				Kết quả (hiệu lực vắc xin)	
	Kháng nguyên IPRV (IU/liều)	PIKA (mg/liều)	HSA (%)	Mal (%)	Hiệu lực ở tháng 0 (IU/liều)	Độ ổn định tăng tốc (IU/liều)
H-1	2,0	1,0	0	5,0	4,7	4,9
H-2	2,0	1,0	0,1	5,0	5,5	6,9
H-3	2,0	1,0	0,2	5,0	7,8	4,6
H-4	2,0	1,0	0,3	5,0	7,9	10,5
H-5	2,0	1,0	0,5	5,0	10,9	7,2
H-6	2,0	1,0	1,0	5,0	9,1	5,5

Phân tích: Với nồng độ của các thành phần còn lại (Antigen, PIKA và Maltose) được giữ không đổi, hiệu lực của vắc xin và độ ổn định tăng tốc luôn lớn hơn 2,5 IU/liều, khi nồng độ của HSA nằm trong khoảng giữa 0 và 1,0%. Các kết quả này đáp ứng các đòi hỏi tiêu chuẩn của WHO đối với các sản phẩm tương tự trên thị trường.

Do đó, công thức cân bằng của chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA sẽ bao gồm IPRV-2,0IU; tá dược PIKA -1,0mg; anbumin ở người-0,3% (3mg trong 1ml chế

phẩm vắc xin cuối cùng trước khi đông khô hoặc sau khi hoàn nguyên); và maltoza-5% (tức là 50mg trong 1ml chế phẩm vắc xin cuối cùng trước khi đông khô hoặc sau khi hoàn nguyên).

Ví dụ 5. Thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm ở chuột đồng vàng

Quy trình thực hiện: 7 nhóm chuột đồng vàng, giống cái, từ 7 đến 8 tuần tuổi, trọng lượng từ 100 đến 150 g (15 con mỗi nhóm) bị cho lây nhiễm 0,1 ml vi rút bệnh dại hoang dã 50 LD₅₀ chủng BD06. Vắc xin được tiêm bắp ở chân sau. Tỷ lệ sống sót của động vật được quan sát trong 45 ngày. Thông tin về nhóm như sau:

Nhóm 1: Đối chứng nước muối với lịch trình tiêm chủng 1-1-1-1-1 (tức là tiêm một liều duy nhất lúc 2 giờ và các ngày 3, 7, 14, 28 sau phơi nhiễm);

Nhóm 2: Vắc xin bệnh dại có sẵn trên thị trường (IPRV chủng LEP từ gà Flury được tạo ra trong các tế bào ở phôi gà con, >2,5 IU) với lịch trình tiêm chủng giống như nhóm 1;

Nhóm 3: Globulin miễn dịch với bệnh dại ở người ở 2 vị trí tức là một nửa của 1,5 IU được tiêm ở sau chân phải và một nửa còn lại được tiêm ở sau chân trái vào 2 giờ sau phơi nhiễm;

Nhóm 4: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV chủng CTN-1 được tạo ra trong dòng tế bào Vero và tá dược PIKA với lịch trình tiêm chủng 1-1-1-1-1;

Nhóm 5: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV chủng CTN-1 được tạo ra trong dòng tế bào Vero và tá dược PIKA với lịch trình tiêm chủng 2-2-1 (tức là tiêm liều kép vào 2 giờ, 2 ngày sau phơi nhiễm và tiêm một liều đơn vào 7 ngày sau phơi nhiễm).

Nhóm 6: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV chủng aG được tạo ra trong tế bào PHK và tá dược PIKA với lịch trình tiêm chủng 1-1-1-1-1;

Nhóm 7: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV chủng aG được tạo ra trong tế bào PHK và tá dược PIKA với lịch trình tiêm chủng 2-2-1 (tức là tiêm liều kép vào 2 giờ, 2 ngày sau phơi nhiễm và tiêm một liều đơn vào 7 ngày sau phơi nhiễm).

Chế phẩm: chế phẩm vắc xin bệnh dại được sử dụng trong các nhóm 4-5 chứa 2,0 IU/ml IPRV, 1000 µg/ml tá dược PIKA, 5% maltoza, và 0,3% HSA, được tiêm với liều lượng đơn vị bằng 0,1 ml, tương đương với liều lượng được sử dụng ở người theo

trọng lượng cơ thể, chế phẩm chứa 10,8 IU IPRV và 5405 μ g tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị (xem Fig. 1 và Bảng 1 để chuyển đổi). Sau khi chia cho hệ số an toàn bằng 10, kết quả của nghiên cứu này là chỉ dẫn cho việc áp dụng ở người bằng khoảng 1,0 IU IPRV và 500 μ g PIKA.

Tóm tắt kết quả: Vắc xin bệnh dại có sẵn trên thị trường với lịch trình tiêm chủng tiêu chuẩn chỉ cung cấp sự bảo vệ có giới hạn sau thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm, trong khi chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA có thể tạo ra sự bảo vệ tốt hơn đáng kể khi sử dụng chế độ tương tự. Cả chế phẩm vắc xin bệnh dại PIKA với chế độ nâng cao và sự chủng ngừa thụ động với globulin miễn dịch bảo vệ 80% cho các đối tượng ($p < 0,005$). Tỷ lệ bảo vệ cho tất cả các nhóm thử nghiệm được chỉ ra dưới đây:

Bảng 7: Thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm ở chuột đồng vàng

Nhóm		Tổng số đối tượng	Số đối tượng sống sót	Số đối tượng bị chết	Tỷ lệ tử vong (%)	Tỷ lệ bảo vệ (%)
1	Đối chứng nước muối	15	1	14	93,3	/
2	Vắc xin bệnh dại Novartis (1-1-1-1-1)	15	3	12	80,0	20,0
3	Globulin miễn dịch	15	12	3	20,0	80,0
4	Vắc xin bệnh dại PIKA (1-1-1-1-1) tế bào Vero	15	10	5	33,3	66,7
5	Vắc xin bệnh dại PIKA (2-2-1) tế bào Vero	15	12	3	20,0	80,0
6	Vắc xin bệnh dại PIKA (1-1-1-1-1) tế bào PHK	15	7	8	53,3	46,7
7	Vắc xin bệnh dại PIKA (2-2-1) tế bào PHK	15	10	5	33,3	66,7

Kết luận, vắc xin có sẵn trên thị trường chỉ cung cấp sự bảo vệ có giới hạn, trong khi chế phẩm vắc xin bệnh dại theo sáng chế cung cấp sự bảo vệ mạnh hơn đáng kể. Bằng cách sử dụng lịch trình 2-2-1 tăng tốc (tức là liều kép cho hai lần tiêm đầu tiên), chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV chủng CTN-1 được tạo ra trong tế bào Vero và tá

được PIKA có thể cung cấp mức độ bảo vệ tương tự như globulin miễn dịch bệnh dại ở người.

Ví dụ 6. Thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm ở chuột

Quy trình thực hiện: Bốn nhóm chuột (20 con/nhóm) tiếp xúc với liều lượng cao vi rút dại CQ92 được tiêm 0,06 ml vắc xin bệnh dại có sẵn trên thị trường từ các nguồn khác nhau, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA hoặc PBS làm đối chứng âm vào các ngày 0, 3, 6 và 9.

Chế phẩm: chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA, được sử dụng trong nhóm 1 chứa 1,5 IU/ml IPRV chủng PM được tạo ra trong tế bào PHK, 1000 µg/ml tá dược PIKA, và 0,2% HSA, được tiêm với liều lượng đơn vị 0,06 ml, tương đương với chế phẩm sử dụng ở người chứa 21,95 IU IPRV và 14,634 µg tá dược PIKA trên mỗi liều lượng đơn vị (xem Fig.1 và Bảng 1 để chuyển đổi). Đây là chỉ dẫn đối với liều lượng ở người bằng khoảng 2 IU IPRV và 1,500 µg tá dược PIKA, khi áp dụng hệ số an toàn bằng 10 thông dụng.

Sau đó chuột được quan sát trong 21 ngày sau khi tiêm lần cuối cùng. Tỷ lệ sống sót được thể hiện trong bảng 8 dưới đây:

Bảng 8: Thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm ở chuột

Nhóm		Liều lượng kháng nguyên (IU/ml)	Liều lượng tá dược (µg/ml)	Số đối tượng sống sót	Số đối tượng bị chết	Tỷ lệ sống sót
1	Vắc xin bệnh dại PIKA	1,5	1.000 PIKA	16	4	80%
2	Vắc xin so sánh (Pháp)	2,5	-	2	18	10%
3	Vắc xin so sánh (Trung Quốc)	2,5	1.000 Alu	3	17	15%
4	Đối chứng PBS	-	-	4	16	20%

Tóm tắt kết quả: Chuột từ các nhóm vắc xin so sánh mang lại mức độ bảo vệ tương tự

như nhóm đối chứng dưới thử thách vi rút liều gây tử vong. Vắc xin bệnh dại với tá dược PIKA xác định sự bảo vệ 80% đối với chuột sau thử nghiệm bảo vệ sau phơi nhiễm khi liều lượng kháng nguyên thấp hơn được sử dụng. Tóm lại, chế phẩm theo sáng chế làm tăng đáng kể tỉ lệ bảo vệ của vắc xin bệnh dại đối với sự lây nhiễm vi rút dại liều gây tử vong ở loài chuột với mức độ kháng nguyên giảm.

Ví dụ 7. Nghiên cứu độ độc cấp tính ở loài gặm nhấm

Quy trình thực hiện: Năm nhóm chuột Kunming (KM) từ 3 đến 5 tuần tuổi, 20 con (10 con đực và 10 con cái, cân nặng trung bình 20g trong mỗi nhóm), được cho dùng liều duy nhất 0,2 ml chế phẩm chỉ ra trong bảng dưới đây:

Bảng 9: Độ độc cấp tính ở loài gặm nhấm

Nhóm	Chế phẩm thử nghiệm	Thể tích tiêm	Hàm lượng nguyên liệu thử nghiệm	
			Tá dược PIKA	Kháng nguyên bệnh dại
1	Đối chứng 0,1M PBS	0,2ml	-	-
2	Một mình tá dược PIKA	0,2ml	200 µg	-
3	Tá dược PIKA	0,2ml	200 µg	-
4	Chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa PIKA (1/2 liều)	0,2ml	100 µg	0,2 IU
5	Chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa PIKA (đủ liều)	0,2ml	200 µg	0,4 IU

Sau đó các con chuột được theo dõi 4 giờ sau khi dùng thuốc cho các phản ứng ngộ độc, tử vong và các triệu chứng lâm sàng bất thường, tiếp theo là quan sát hàng ngày trong 14 ngày. Khối lượng cơ thể được đo trước khi tiêm lần thứ nhất và vào các ngày 1, 4, 7, 11, và 14 sau khi tiêm. Sự hấp thu thức ăn được ghi nhận vào các ngày 1, 7 và 14 sau khi tiêm. Các con chuột bị giết vào ngày 14 sau đó kiểm tra bệnh lý vĩ mô trên các cơ quan sau đây: tim, gan, lá lách, phổi, thận, tuyến thượng thận, não, dạ dày, ruột, khí quản, tinh hoàn, mào tinh hoàn, tử cung, buồng trứng, tuyến ức, hạch bạch huyết (bao gồm cả hạch bạch huyết ở cổ tử cung, hạch bạch huyết màng treo ruột và hạch bạch huyết Peyer thuộc vùng xương chậu), cơ chi sau bên trái và phải.

Kết quả: Các con vật trong nhóm nghiên cứu không cho thấy sự khác biệt đáng kể về

sự hấp thụ thức ăn và trọng lượng cơ thể so với nhóm đối chứng. Không quan sát thấy các triệu chứng lâm sàng bất thường vào 14 ngày sau khi dùng thuốc trong khi tất cả động vật sống sót với liều tối đa của thuốc được dùng mà không có phản ứng ngộ độc và những bất thường trong suốt quá trình kiểm tra cơ thể bằng thị giác.

Kết luận, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA được dung nạp tốt ở chuột KM đến liều lượng tối đa 0,4 IU kháng nguyên bệnh dại với 200µg PIKA. Chuột nhận chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa 0,4 IU IPRV và 200 µg tá dược PIKA có biên độ an toàn (MOS) nằm trong khoảng từ 150 đến 300 lần khi 2 IU IPRV và 1000 µg PIKA được sử dụng để áp dụng cho con người. Việc tính toán MOS được thể hiện trong bảng 10 dưới đây:

Bảng 10: Độ độc cấp tính ở chuột Kunming– Sự tính toán biên độ an toàn

Nhóm nghiên cứu	Thể tích (khối lượng)/lần tiêm	Liều hiệu quả	
		Liều (ml/kg BW)	MOS
Liều cho người	2,0ml (60kgBW)/ lần tiêm	0,03	/
½ liều ở chuột	0,2ml (20gBW)/ lần tiêm	5,00	150
Đủ liều ở chuột	0,2ml (20gBW)/ lần tiêm	10,00	300

Ví dụ 8. Thử nghiệm phản ứng dị ứng ở loài gặm nhấm

Quy trình thực hiện: Bảy nhóm lợn lang Dunkin-Hartley có khối lượng từ 299,6g đến 339,1g, 6 con (3 con đực và 3 con cái) mỗi nhóm, được tiêm bắp ba liều chế phẩm như thể hiện trong bảng 11 dưới đây vào mỗi hai ngày. Động vật được thử thách tiêm tĩnh mạch với liều kép từ 10 đến 14 ngày sau tiêm chủng:

Bảng 11: Phản ứng dị ứng ở loài gặm nhấm – kế hoạch tiêm chủng và thách thức

Nhóm	Chế phẩm thử nghiệm	Tiêm chủng (0,5 ml/lần tiêm, 3 lần tiêm)		Thử thách (1 lần tiêm)	
		Liều lượng IPRV	Liều lượng PIKA	Liều lượng	Thể tích
1	Đối chứng âm NaCl 0,9%	-	-	-	1 ml
2	Đối chứng dương BSA	-	-	40 mg	1 ml
3	Một mình tá dược PIKA	-	1,5 mg	1,0 mg	1 ml
4	Tá dược PIKA + 0,3% HSA	-	1,5 mg	1,0 mg	1 ml
5	IPRV (Tế bào Vero) không có HSA	3 IU/ml	-	2 IU / 1,0 mg	1 ml
6	IPRV (tế bào PHK) không có HSA	3 IU/ml	-	2 IU / 1,0 mg	1 ml
7	PIKA + IPRV (tế bào Vero, + 0,3% HSA (liều thấp)	1,5 IU/ml	1,5 ml	1 IU / 0,5 mg	1 ml
7,1	PIKA + IPRV (tế bào Vero, không có HSA, liều thấp)	1,5 IU/ml	1,5 ml	1 IU / 1,5 mg	1 ml
8	PIKA + IPRV (tế bào PHK, + 0,3% HSA (liều cao)	3 IU/ml	1,5 ml	2 IU / 1,0 mg	1 ml
8,1	PIKA + IPRV (tế bào PHK, không có HSA, liều cao)	3 IU/ml	1,5 ml	2 IU / 1,0 mg	1 ml

Kết quả: Tất cả các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy không có dấu hiệu của phản ứng dị ứng, trong khi các con vật trong nhóm đối chứng dương bắt đầu thể hiện phản ứng dị ứng trong vòng 1 phút sau thử thách. Các triệu chứng bao gồm: trầy xước mũi, ho, ban xuất huyết, mất điều hòa và chứng liệt co cứng. Động vật trong nhóm tá dược PIKA hoặc chế phẩm vắc xin bệnh dại không có anbumin ở người không thể hiện bất kỳ phản ứng dị ứng rõ ràng nào trong suốt quá trình tiêm chủng và thử thách, trong khi nhóm tá dược PIKA và chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa anbumin ở

người thể hiện mức độ khác nhau của phản ứng dị ứng. hai cặp động vật (1 con đực và 1 con cái) lấy từ nhóm 6 và 7 (với 0,3% HSA) được tiêm bổ sung lần lượt vắc xin bệnh dại chứa PIKA với liều thấp 1 ml (thể tích thách thức) hoặc liều cao mà không có human anbumin ở người (được đánh dấu là Nhóm 6,1 và 7,1). Không quan sát thấy phản ứng dị ứng với thử nghiệm thách thức bổ sung khi vắng mặt anbumin ở người.

Kết luận là, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA và tá dược PIKA mà không bổ sung anbumin ở người không gây dị ứng và được dung nạp tốt trong các động vật thử nghiệm sau tiêm nhiều liều lên đến 3 IU kháng nguyên bệnh dại và 1,500 µg tá dược PIKA thông qua đường tiêm bắp. MOS đối với chế phẩm vắc xin bệnh dại được sử dụng trong phản ứng dị ứng bằng 25 lần đối với nhóm liều thấp và 50 lần đối với nhóm liều cao. Các tính toán được trình bày dưới đây:

Bảng 12: Phản ứng dị ứng ở lợn lang – Tính toán biên độ an toàn

Nhóm nghiên cứu	Thể tích/lần tiêm	Tổng thể tích / Thể trọng	Liều hiệu quả	
			Tổng liều /kg BW	MOS
Liều ở người	1,0ml	5,0ml/60kgBW	0,03	/
Tá dược PIKA	0,5ml	2,5ml/0,3kgBW	8,30	50
Nhóm liều thấp	0,5ml (pha loãng 1/2)	2,5ml/0,3kgBW	4,17	25
Nhóm liều cao	0,5ml (tiêu chuẩn)	2,5ml/0,3kgBW	8,30	50

Ví dụ 9. Độ độc mãn tính với liều lặp lại và nghiên cứu hiệu quả ở động vật linh trưởng

Quy trình thực hiện để đánh giá độ an toàn: Bốn nhóm khỉ nâu từ 2-3 năm tuổi với 8 con mỗi nhóm (4 con đực và 4 con cái) cân nặng từ 2,5 kg đến 4,0 kg được cho dùng chế phẩm vắc xin bệnh dại PIKA với liều lượng leo thang (hai nhóm), một mình PIKA hoặc NaCl 0,9% (Nhóm đối chứng) bằng cách tiêm vào cơ đenta 5 lần trong vòng 6 tuần, tức là các ngày 0, 2, 7, 28 và 42. Hai lần tiêm đầu tiên được tiêm ở hai vị trí (tức là liều kép), xem Bảng 13 dưới đây.

Bảng 13: Các nhóm nghiên cứu độ độc mãn tính ở động vật linh trưởng

Nhóm	Chế phẩm thử nghiệm	Mỗi liều			Thể tích	
		PIKA (μg)	IPRV (IU)	Đối chứng	Mỗi lần tiêm	Tổng
1	Đối chứng	/	/	NaCl 0,9%	0,5 ml	3,5 ml
3	1000 $\mu\text{g/ml}$ tá dược PIKA + 0,3 % anbumin	1.000	/	/	0,5 ml	3,5 ml
4	500 $\mu\text{g/ml}$ tá dược PIKA + 1 IU/ml IPRV + 0,3 % HSA (liều thấp)	500	1 IU	/	0,5 ml	3,5 ml
5	1000 $\mu\text{g/ml}$ tá dược PIKA + 2 IU/ml IPRV + 0,3 % HSA (liều cao)	1.000	2 IU	/	1,0 ml	7,0 ml

Các triệu chứng lâm sàng ở vị trí tiêm và thuộc hệ thống của khi được quan sát vài lần trước và sau khi tiêm chủng. Các mẫu máu được lấy 4 lần trong các ngày -0 (tức là thời kỳ kiểm dịch động vật), 44 và 70. Các mẫu máu được sử dụng cho các thử nghiệm huyết học, thử nghiệm đông máu, và thử nghiệm sinh hóa huyết thanh.

Quy trình thực hiện để có hiệu quả: Đáp ứng miễn dịch thể dịch và hiệu lực được đo vào các ngày 44 và 70. Hai con khi đực và hai con khi cái bị giết vào các ngày 45 và 70 để kiểm tra mô học. Các cơ quan được cân, cắt lát và cố định trước khi nhuộm màu để kiểm tra bằng kính hiển vi ánh sáng.

Kết quả:

1. Không có các triệu chứng lâm sàng ở vị trí tiêm và thuộc hệ thống quan sát được ở tất cả các con vật được dùng tá dược PIKA hoặc chế phẩm vắc xin bệnh dại PIKA. Tất cả các giá trị trong thử nghiệm nằm trong phạm vi của nền trung tâm dữ liệu, không có thay đổi đáng kể nào được báo cáo. Trọng lượng của các cơ quan khác nhau cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm đối chứng và các nhóm thử nghiệm khác.

2. Đáp ứng miễn dịch thể dịch được thể hiện bởi độ chuẩn trung bình hình học của IgG đặc hiệu bệnh dại và hiệu lực kháng nguyên vô hiệu hóa trong huyết thanh máu được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA hoặc FAVN tương ứng. Các bảng 14-15 và các Fig. 4-5 minh họa sự tăng đáp ứng miễn dịch của động vật linh trưởng được cho dùng PIKA và chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa PIKA.

Bảng 14: IgG trong huyết thanh (thử nghiệm ELISA)

Ngày kiểm tra	Một mình PIKA	Chế phẩm bệnh dại chứa PIKA (một nửa)	Chế phẩm bệnh dại chứa PIKA (đầy đủ)
Ngày 44	11,396	48,062	93,256
Ngày 70	8,879	20,552	55,550

Bảng 15: Hiệu lực (thử nghiệm FAVN)

Ngày kiểm tra	Đối chứng PBS	PIKA	Chế phẩm bệnh dại chứa PIKA (một nửa)	Chế phẩm bệnh dại chứa PIKA (đầy đủ)
Ngày 44	0,115	0,113	4,795	7,366
Ngày 70	0,115	0,890	5,653	5,670

Vào ngày 44, các nhóm vắc xin bệnh dại PIKA liều thấp và liều cao đã tạo ra trung bình 4,795 và 7,366 IU kháng thể trung hòa tương ứng ở khi, tức là cao hơn 9,6 và 14,7 lần so với mức bảo vệ 0,5 IU được yêu cầu bởi WHO. Hiệu lực của kháng thể trung hòa giảm nhẹ xuống 5,653 ở nhóm liều cao và tăng lên đến 5,670 ở nhóm liều thấp vào ngày 70.

Tóm lại, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa IPRV được tạo ra trong dòng tế bào Vero được dung nạp tốt và đã chứng minh có khả năng miễn nhiễm tốt ở khi nân sau khi tiêm bắp lặp lại trong một khoảng thời gian quan sát là 84 ngày. Các kháng thể đặc hiệu rất quan trọng trong việc vô hiệu hóa vi rút tự do và chống lại sự lây truyền bệnh dại.

Việc tính toán biên độ an toàn (MOS) được thể hiện trong bảng 16 dưới đây và nó được xác định bằng: $MOS = \frac{\text{tổng liều được thử nghiệm ở động vật linh trưởng (mg/kg)}}{\text{tổng liều ở người được đề xuất (mg/kg)}}$.

Bảng 16: Độ độc mãn tính ở động vật linh trưởng – Biên độ an toàn

Nhóm nghiên cứu	Thể tích /lần tiêm (chế độ)	Tổng thể tích /Khối lượng cơ thể	Liều có hiệu quả	
			Tổng liều/kg	MOS
Liều ở người	1,0ml (2-2-1)	5,0ml/60kgBW	0,083	/
Nhóm nửa liều	0,5ml (2-2-1-1-1)	3,5ml/3kgBW	1,667	14
Nhóm đủ liều	1,0ml (2-2-1-1-1)	7,0ml/3kgBW	2,333	28

Biên độ an toàn của vắc xin bệnh dại PIKA khi 2 IU IPRV và 1000 μ g tá dược PIKA với 0,3% HSA được sử dụng ở người trưởng thành trên liều lượng thử nghiệm độ độc ở khỉ bằng 28 lần đối với nhóm đủ liều và 14 lần đối với nhóm nửa liều.

Ví dụ 10. Thử nghiệm an toàn và hiệu quả ở những tình nguyện viên khỏe mạnh

Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I được thực hiện với chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA (1 IU IPRV và 1000 μ g tá dược PIKA). Những tình nguyện viên khỏe mạnh được chia thành ba nhóm với 10 đối tượng trong mỗi nhóm. Các đối tượng trong mỗi nhóm được cho dùng chế phẩm vắc xin bệnh dại PIKA hoặc vắc xin so sánh (9,4 IU IPRV) mà không có tá dược vào các ngày 0, 3, 7, 14 và 28. Các mẫu máu được thu thập vào các ngày 0, 7, 10, 30 và 60 để đánh giá độ chuẩn kháng thể trung hòa với kết quả chỉ ra dưới đây:

Bảng 17: Độ chuẩn của kháng thể trung hòa (IU/ml)

Ngày	Vắc xin so sánh	Vắc xin bệnh dại PIKA
0	0	0
7	0	0,13
10	0,25	0,42
30	3,24	5,32
60	8,55	17,81

Tóm tắt kết quả: Không có tác dụng bất lợi rõ ràng quan sát được trong quá trình thử nghiệm. Vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA khả năng tạo ra kháng thể trung hòa sớm 7 ngày sau khi tiêm chủng lần đầu tiên. So với vắc xin so sánh, vắc xin bệnh dại PIKA tạo ra kháng thể trung hòa sớm hơn và độ chuẩn cao hơn.

Ví dụ 11. Sự tạo kháng thể sớm ở các tình nguyện viên khỏe mạnh

Một thử nghiệm thí điểm khác ở người gồm 4 tình nguyện viên khỏe mạnh, các đối tượng được cho dùng chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa 2 IU IPRV và 1000 µg tá dược PIKA bằng cách sử dụng chế độ 2-2-1 vào các ngày 0, 3 và 7 (tức là 4 IU IPRV và 2000 µg tá dược PIKA trong tổng số được dùng vào các ngày 0 và 3 ở hai vị trí khác nhau). Các mẫu máu được lấy vào các ngày 0, 7 và 14 sau tiêm chủng. Đáp ứng miễn dịch thể dịch được đánh giá với kết quả được trình bày trong Bảng 18:

Bảng 18: Độ chuẩn trung bình của kháng thể trung hòa (IU/ml) ở 4 đối tượng người

	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14
Độ chuẩn kháng thể trung bình	0,00	1,08	18,06

Tóm tắt kết quả: Bốn tình nguyện viên đã không báo cáo bất kỳ tác động tiêu cực rõ ràng nào trong thời gian thử nghiệm. Chế phẩm vắc xin bệnh dại có khả năng tạo ra kháng thể trung hòa lớn hơn 0,5 IU sớm 7 sau khi tiêm chủng đầu tiên. Giá trị này được coi là có tính bảo vệ theo tiêu chuẩn của WHO. Do đó, liều vắc xin lên đến 4 IU IPRV và 2000 µg tá dược PIKA đối với hai lần tiêm đầu tiên là an toàn và có hiệu quả trong việc tạo miễn dịch bảo vệ sớm và mức độ cao ở đối tượng con người.

Ví dụ 12. Đáp ứng miễn dịch lâu dài ở các tình nguyện viên khỏe mạnh

Các tình nguyện viên khỏe mạnh được tiêm chủng bằng vắc xin bệnh dại chứa 1,5 IU IPRV và 1.000 µg/ml tá dược PIKA. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập từ các mẫu máu được thu thập vào 2,5 năm sau khi chủng ngừa. Các tế bào được kích thích bằng đối chứng PBS hoặc mức độ khác nhau của IPRV và được thử nghiệm về sự sản sinh Interferon-γ bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm ELISPOT. Kết quả đã chỉ ra rằng các tình nguyện viên vẫn sản sinh ra mức độ Interferon-γ đáng kể khi kích thích vào 2,5 năm sau khi chủng ngừa bằng vắc xin bệnh dại chứa tá dược PIKA.

Ví dụ 13. Phân tích độ ổn định của vắc xin bệnh dại được đông khô

Thử nghiệm độ ổn định lâu dài ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C và thử nghiệm tăng tốc ở nhiệt độ 37°C được lập ra để phân tích độ ổn định của chế phẩm vắc xin. Bốn lô chế phẩm

vắc xin bệnh dại đã đông khô (1,0ml/ống) được thử nghiệm (Lô số II-20130401, II-20130402, II-20130501 và II-20130901).

Các chế phẩm

Lô số II-20130402, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa:

2,0 IU/liều IPRV, 1000 µg /liều tá được PIKA, 5,0% maltoza, 0,3% HSA, và $7,60 \pm 0,05$ đệm PBS.

Lô số II-20130401, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa:

1,5 IU/ liều IPRV, 2000 µg/ liều tá được PIKA, 5,0% maltoza, 0,3% HSA, và $7,60 \pm 0,05$ đệm PBS.

Lô số II-20130501, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa:

2,0 IU/ liều IPRV, 2000 µg/ liều tá được PIKA, 5,0% maltoza, 0,3% HSA, và $7,60 \pm 0,05$ đệm PBS.

Lô số II-20130901, chế phẩm vắc xin bệnh dại chứa:

4,0 IU/ liều IPRV, 1000 µg/ liều tá được PIKA, 5,0% maltoza, 0,5% HSA, và $7,60 \pm 0,05$ đệm PBS.

13.1. Thử nghiệm độ ổn định lâu dài

Bốn lô chế phẩm vắc xin nêu trên được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C để thử nghiệm độ ổn định lâu dài, được thiết lập theo tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc và châu Âu trong thời gian 42 tháng. Những thông số được thử nghiệm bao gồm về bề ngoài, độ pH, hàm lượng ẩm, nội độc tố, tính vô khuẩn, hiệu lực, sự đồng nhất, dư lượng anbumin huyết thanh bò, dư lượng gentamycin sulfat, dư lượng protein từ tế bào chủ, hàm lượng Kanamycin, hàm lượng PIKA content, khối lượng phân tử của PIKA, và dư lượng DNA từ tế bào chủ.

Kết quả lên đến 6 tháng thỏa mãn theo tiêu chuẩn Dược điển Trung Quốc (tái bản 2010) và Dược điển châu Âu (E7,0), hiệu lực vắc xin vẫn cao hơn đáng kể 2,5 IU/ml như được yêu cầu theo tiêu chuẩn WHO. Không có sự sai lệch đáng kể về bề ngoài, độ pH, hàm lượng ẩm, nội độc tố, và tính vô khuẩn quan sát được từ tháng 0.

13.2. Thử nghiệm độ ổn định tăng tốc

Thử nghiệm độ ổn định tăng tốc cũng được thực hiện trên 4 lô bằng cách bảo quản vắc xin ở nhiệt độ 37°C trong 6 tháng. Nó hoạt động như một chỉ dẫn sơ bộ cho sự ổn

định lâu dài. Các thử nghiệm chất lượng về vẻ bề ngoài, độ pH, hàm lượng ẩm, nội độc tố, tính vô khuẩn, và hiệu lực vắc xin được thực hiện vào tháng 1, 2, 3, và 6 tương ứng. Kết quả thử nghiệm đối với bốn lô chế phẩm vắc xin bệnh dại mô tả ở trên được nêu trong Bảng 19.

Bảng 19: Kết quả thử nghiệm độ ổn định tăng tốc

Lô số II-20130401						
Thời gian bảo quản	Thông số thử nghiệm					
	Bề ngoài	pH	Hàm lượng ẩm	Nội độc tố	Tính vô khuẩn	Hiệu lực (IU)
1 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	6,6
2 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	9,1
3 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	6,2
6 Tháng	Chất lượng	7,5	1,6%	<25	Chất lượng	8,1

Lô số II-20130402						
Thời gian bảo quản	Thông số thử nghiệm					
	Bề ngoài	pH	Hàm lượng ẩm	Nội độc tố	Tính vô khuẩn	Hiệu lực (IU)
1 Tháng	Chất lượng	7,4	1,5%	<25	Chất lượng	4,9
2 Tháng	Chất lượng	7,4	1,5%	<25	Chất lượng	9,5
3 Tháng	Chất lượng	7,4	1,7%	<25	Chất lượng	5,5
6 Tháng	Chất lượng	7,4	1,7%	<25	Chất lượng	8,1

Thời gian bảo quản	Thông số thử nghiệm					
	Bề ngoài	pH	Hàm lượng ẩm	Nội độc tố	Tính vô khuẩn	Hiệu lực (IU)
1 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	5,7

2 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	10,0
3 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	6,2
6 Tháng	Chất lượng	7,4	1,6%	<25	Chất lượng	9,1

Lô số II-20130901						
Thời gian bảo quản	Thông số thử nghiệm					
	Bề ngoài	pH	Hàm lượng ẩm	Nội độc tố	Tính vô khuẩn	Hiệu lực (IU)
1 Tháng	Chất lượng	7,5	1,1%	<25	Chất lượng	7,4
2 Tháng	Chất lượng	7,6	1,1%	<25	Chất lượng	11,7
3 Tháng	Chất lượng	7,6	1,2%	<25	Chất lượng	7,2
6 Tháng	---	---	---	---	---	---

Chế phẩm vắc xin được sản xuất và được thử nghiệm theo tiêu chuẩn GMP. Sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 1, 2, 3, và 6 tháng, hiệu lực vắc xin vẫn cao hơn đáng kể 2,5 IU/ml như được yêu cầu theo tiêu chuẩn WHO. Không có sự sai lệch đáng kể về bề ngoài, độ pH, hàm lượng ẩm, nội độc tố, và tính vô khuẩn quan sát được từ tháng 0. Kết quả hoạt động như là một chỉ dẫn sơ bộ cho sự ổn định lâu dài của chế phẩm vắc xin bệnh dại.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm vắc xin bệnh dại, chứa:

- a) vi rút dại được tinh chế bất hoạt (IPRV),
- b) tá dược PIKA, và
- c) anbumin huyết thanh ở người (HSA);

trong đó

IPRV được điều chế trong các tế bào Vero,

lượng IPRV nằm trong khoảng từ 0,5 IU đến 3,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị,

lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 250 µg đến 3000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị, và

lượng HSA nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,9% theo nồng độ.

2. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng IPRV nêu trên được chọn từ khoảng giữa hai lượng bất kỳ trong số các lượng sau: 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, và 3,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị.

3. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng IPRV nêu trên được chọn từ nhóm gồm có: 0,5 IU, 1,0 IU, 1,5 IU, 2,0 IU, 2,5 IU, và 3,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị.

4. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng IPRV nêu trên nằm trong khoảng từ 1,0 IU đến 2,5 IU trên mỗi liều lượng đơn vị.

5. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng tá dược PIKA được chọn từ khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau: 250 µg, 500 µg, 1000 µg , 1500 µg, 2000 µg, và 3000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

6. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng tá dược PIKA được chọn từ 250 µg, 500 µg, 1000 µg , 1500 µg, 2000 µg, và 3000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

7. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng tá dược PIKA nằm trong khoảng từ 1000 µg đến 3000 µg, hoặc nằm trong khoảng từ 1500 µg đến

2500 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

8. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng tá dược PIKA bằng khoảng 2000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

9. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng HSA được chọn từ khoảng giữa hai giá trị bất kỳ sau: 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, và 0,6% theo nồng độ.

10. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó lượng HSA được chọn từ 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, và 0,6% theo nồng độ.

11. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó lượng IPRV là 2,0 IU trên mỗi liều lượng đơn vị, và lượng tá dược PIKA là 1000 µg trên mỗi liều lượng đơn vị.

12. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, chế phẩm này còn bao gồm chất đệm được dụng; và độ pH của chất đệm này nằm trong khoảng từ pH 7,0 đến pH 8,0.

13. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó chế phẩm này không chứa gelatin.

14. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa maltoza, trong đó lượng maltoza nằm trong khoảng giữa 1,0 % và 6,0 % theo nồng độ.

15. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó IPRV là chủng CTN.

16. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 15, trong đó IPRV là chủng CTN-1.

17. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chế phẩm ở dạng lỏng.

18. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 17, trong đó chế phẩm ở trong dung

dịch hoặc trong huyền phù.

19. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó liều lượng đơn vị được điều chế vào thể tích nhất định được chọn từ thể tích bất kỳ nằm giữa hai giá trị thể tích sau: 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, và 2,0 ml.

20. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó liều lượng đơn vị được điều chế vào thể tích nhất định được chọn từ nhóm gồm có 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, hoặc 2,0 ml.

21. Chế phẩm vắc xin bệnh dại, là dạng rắn của chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20.

22. Chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm 21, trong đó dạng rắn này là dạng đông khô lạnh.

23. Kit dược phẩm, chứa hoặc bao gồm:

- a) chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20,
- b) ống nhỏ,
- c) hướng dẫn sử dụng, và
- d) nước pha tiêm tùy ý.

24. Kit dược phẩm, chứa hoặc bao gồm:

- a) chế phẩm vắc xin bệnh dại theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 22,
- b) ống nhỏ,
- c) hướng dẫn sử dụng, và
- d) nước pha tiêm tùy ý.

	IPRV/liều (IU)	PIKA/liều (μ g)	IPRV/liều (IU/kg)	PIKA/liều (μ g/kg)	IPRV HED* (x60kg)	PIKA HED* (x60kg)
Ví dụ 1 và Ví dụ 2			Thể trọng (kg) = 0,02		Hệ số chuyển đổi = 12,3	
Đáp ứng miễn dịch thể dịch	0,1	10	5,000	500,00	24,39	2.439
Thử nghiệm thách thức vi rút	0,1	50	5,000	2.500,00	24,39	12.195
Sự sản sinh IL-2 và hoạt động đại thực bào	0,1	10	5,000	500,00	24,39	2.439
Sự sản sinh IFN-gama	0,2	50	10,000	2.500,00	48,78	12.195
Ví dụ 5 thử nghiệm bảo vệ ở chuột đồng			Thể trọng (kg) = 0,15		Hệ số chuyển đổi = 7,4	
IPRV (1-1-1-1-1)	0,4		2,667		21,62	
Đủ liều (2-2-1)	0,2	100	1,333	666,67	10,81	5.405
Đủ liều (1-1-1-1-1)	0,2	100	1,333	666,67	10,81	5.405
Ví dụ 6 thử nghiệm bảo vệ ở chuột			Thể trọng (kg) = 0,02		Hệ số chuyển đổi = 12,3	
PIKA IPRV	0,09	60	4,500	3.000,00	21,95	14.634
*HED: Liều tương đương ở người						

FIG. 1

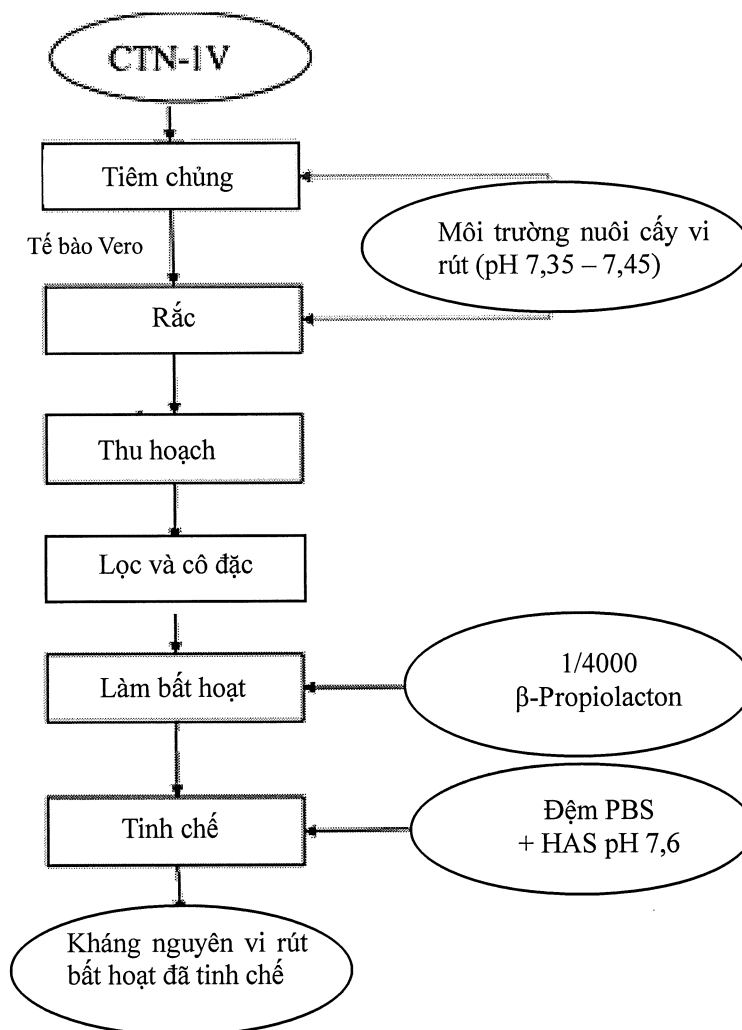


FIG. 2

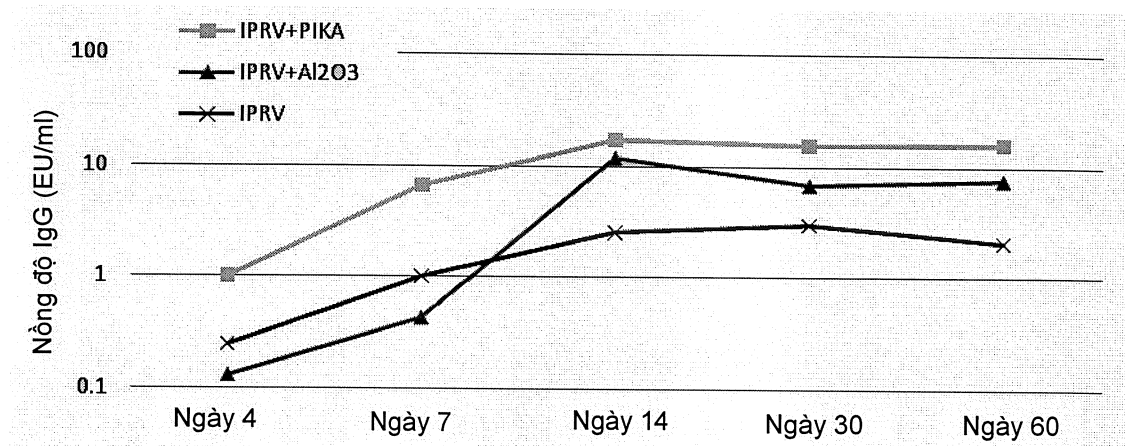


FIG. 3

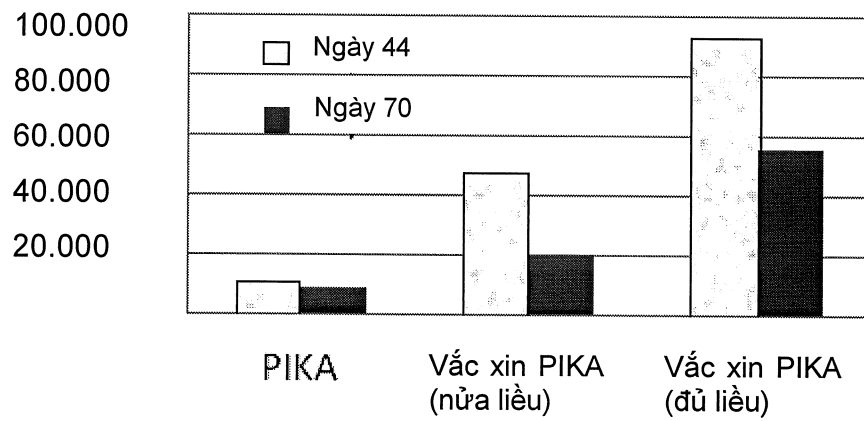


FIG. 4

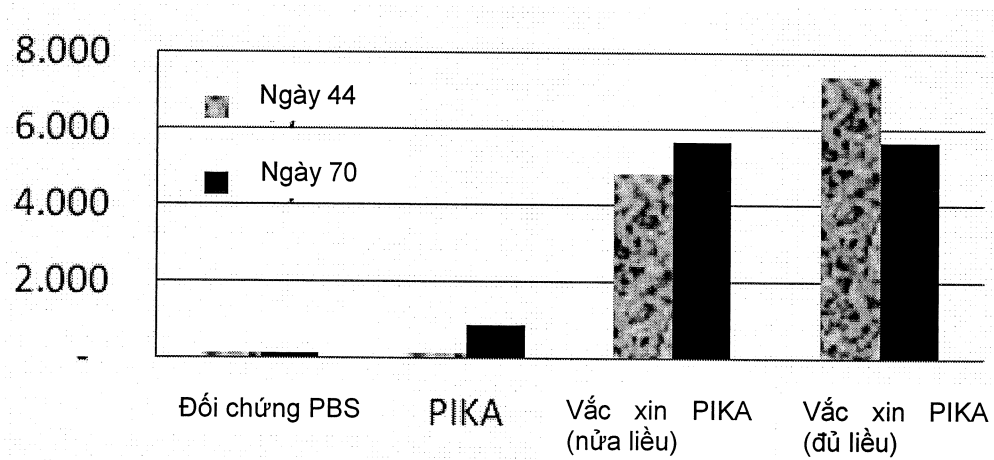


FIG. 5