



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

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

(11)



1-0044222

(51)^{2019.01} A61K 39/00; A61K 39/05; A61K 39/29; (13) B
A61K 39/102; A61K 39/12; A61K
39/13; A61K 39/02; A61K 39/08

(21) 1-2020-00873

(22) 13/07/2018

(86) PCT/IB2018/055180 13/07/2018

(87) WO2019/016654 24/01/2019

(30) 201721025513 18/07/2017 IN

(45) 25/03/2025 444

(43) 27/07/2020 388A

(71) SERUM INSTITUTE OF INDIA PVT LTD. (IN)

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

(72) RAKESH KUMAR (IN); SHARMA, Inder Jit (IN); SHITOLE, Anil Vyankatrao (IN); DODDAPANENI, Manohar (IN); SHARMA, Hitt Jyoti (IN).

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

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH

(21) 1-2020-00873

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch bao gồm kháng nguyên biến độc tố bạch hầu (D), kháng nguyên biến độc tố uốn ván (T), kháng nguyên bề mặt *Hepatitis B* (HBsAg), kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt (wP), sacarit thuộc vỏ ngoài của *Haemophilus influenzae* type B (Hib) được cộng hợp với protein mang, kháng nguyên của virus bại liệt bất hoạt (IPV) và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung và phương pháp điều chế chế phẩm này. Vắc xin kết hợp dạng hoàn toàn lỏng, thể hiện khả năng gây miễn dịch được cải thiện, khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch được giảm và độ ổn định được cải thiện. Các phương pháp được cải thiện để bất hoạt formaldehyd, thông số hấp phụ của kháng nguyên biến độc tố bạch hầu (D), kháng nguyên biến độc tố uốn ván (T) và kháng nguyên bề mặt *Hepatitis B* (HepB) được hấp phụ riêng lên trên tá chất nhôm photphat được cải thiện, giảm thiểu hàm lượng nhôm tổng số (Al^{3+}) và nồng độ của 2-phenoxyetanol (2-PE) làm chất bảo quản được tối ưu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch và phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin kết hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vaccin kết hợp mà có thể cung cấp khả năng gây miễn dịch chống lại một lượng lớn bệnh luôn có lợi thế so với vaccin đơn vì nó làm giảm số lượng mũi tiêm, giảm các biến chứng liên quan đến tiêm bắp, giảm chi phí quản lý và sản xuất, giảm chi phí lưu trữ, giảm nguy cơ trì hoãn hoặc bỏ lỡ tiêm chủng và cải thiện sự tuân thủ của bệnh nhân bằng cách giảm số lượng tiêm chủng riêng biệt. Hơn nữa, các chế phẩm vaccin kết hợp ở dạng hoàn toàn lỏng có những ưu điểm khác biệt so với các chế phẩm cần pha chế. Thời gian chuẩn bị trung bình được nhận thấy đối với vaccin ở dạng hoàn toàn lỏng là gần bằng một nửa so với vaccin không hoàn toàn lỏng. Trong cùng một nghiên cứu, hầu hết tất cả các nhân viên chăm sóc sức khỏe (97,6%) đều tuyên bố rằng họ thích sử dụng vaccin hoàn toàn lỏng trong thực hành hàng ngày. (Tham khảo: *Soubeyrand B, et al; Assessment of preparation time with fully-liquid versus non-fully liquid paediatric hexavalent vaccines. A time and motion study; Vaccine 2015; 33:3976-82*).

Các vaccin kết hợp đã biết và có sẵn hiện nay có thể không chứa các công thức bào chế thích hợp của các kháng nguyên thích hợp ở các dạng gây miễn dịch thích hợp để đạt được mức độ an toàn, hiệu quả và khả năng gây miễn dịch mong muốn ở một số người dễ mắc bệnh với một số lượng bệnh trong một lần tiêm. Số lượng các vaccin kết hợp khác nhau có thể được tạo ra chỉ với một vài kháng nguyên bổ sung đáng để cân nhắc. Bằng cách bổ sung 1 đến 4 thành phần kháng nguyên khác (ví dụ: HIB (ở dạng đông khô hoặc lỏng), HBV, IPV, HAV) vào DTwP hoặc DTaP, có 44 loại vaccin kết hợp khác nhau có thể được tạo ra. Con số sẽ tăng lên hàng ngàn nếu các thành phần riêng lẻ từ các nhà sản xuất khác nhau được xem xét. Vì mỗi loại

vắc xin riêng lẻ được kết hợp mới (có tính đến sự khác biệt về thành phần theo nguồn) phải được phát triển riêng biệt để chứng minh độ an toàn, ổn định, tương thích và hiệu quả, việc phát triển tất cả các loại vắc xin này trở thành một nhiệm vụ đầy thách thức.

Các kháng nguyên của vắc xin kết hợp:

Các kháng nguyên bạch hầu và uốn ván

Bạch hầu và uốn ván là những bệnh nhiễm trùng cấp tính lần lượt do *Corynebacterium diphtheriae* và *Clostridium tetani* gây ra. Trong cả hai trường hợp, đây là một ngoại độc tố mạnh của những vi khuẩn này, gây ra bệnh lâm sàng. Các vắc xin bảo vệ chống lại các vi khuẩn này có chứa các độc tố này mà đã được biến đổi hóa học do đó không còn độc tính mà vẫn còn kháng nguyên. Độc tố bạch hầu và uốn ván được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Corynebacterium diphtheriae* và *Clostridium tetani*, trong môi trường có chứa chất chiết từ bò. Các độc tố bị bất hoạt bằng cách sử dụng phương pháp xử lý sau đây bao gồm nhiệt, tia UV, formalin/formaldehyd, glutaraldehyd, acetyletyleneimin, v.v ... để tạo ra các độc tố [Diphtheria (D) và Tetanus (T)]. Những lo ngại liên quan đến bệnh não xốp ở bò (bệnh bò điên) (Bovine spongiform encephalopathy-BSE), bệnh não xốp dạng lây truyền (Transmissible spongiform encephalopathy - TSE), bệnh Creutzfeldt - Jakob (bệnh CJD và bệnh CJD biến thể) có thể phát sinh từ các thành phần có nguồn gốc động vật được sử dụng trong môi trường nuôi cấy chứa chất chiết từ bò lây truyền qua vắc xin. (Tham khảo: WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products; 2003 & EMEA/CPMP/BWP/819/01; 24 April 2001).

Các kháng nguyên ho gà

Sự ra đời của vắc xin toàn tế bào chứa các vi sinh vật ho gà *Bordetella pertussis* bất hoạt theo cách hóa học và nhiệt vào những năm 1940 đóng vai trò làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh ho gà do ho gà *B. pertussis* gây ra.

Các vắc xin DTP toàn tế bào thường liên quan đến một số tác dụng phụ cục bộ (ví dụ, ban đỏ, sưng và đau tại chỗ tiêm), sốt và các biểu hiện toàn thân nhẹ khác (ví dụ, buồn ngủ, khó chịu và chán ăn) (Tham khảo: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD,

Marcy SM, Manclarck CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. Paediatrics 1981; 68:650-60) & (Tham khảo: Long SS, DeForest A, Pennridge Pediatric Associates, và cộng sự, Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. Paediatrics 1990; 85:294-302). Các biểu hiện toàn thân nghiêm trọng hơn (ví dụ, co giật {có hoặc không sốt} và các đợt hạ huyết áp nhược trương) xảy ra ít thường xuyên hơn (tỷ lệ một trường hợp trên 1750 liều được tiêm) ở những trẻ được tiêm vắc xin DTP toàn tế bào (Tham khảo: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclarck CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. Paediatrics 1981; 68:650-60). Bệnh não cấp tính xảy ra thậm chí hiếm hơn (tỷ lệ 0-10,5 trường hợp với một triệu liều tiêm). Các chuyên gia đồng ý rằng vắc xin ho gà toàn tế bào gây tổn thương não kéo dài trong một số trường hợp hiếm gặp. (Tham khảo: Institute of Medicine; DPT vaccine and chronic nervous system dysfunction, a new analysis; Washington D.C., National Academy Press, 1994).

Một số báo cáo trích dẫn mối quan hệ giữa tiêm vắc xin ho gà toàn tế bào, khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và các tác dụng phụ nghiêm trọng đã dẫn đến khả năng chấp nhận vắc xin bị sụt giảm và hậu quả của dịch bệnh lại tái diễn (*Miller, DL, Ross, EM, Alderlade, R., Bellman, MH, và Brawson, NS B (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children: Brit Med. J. 282: 1595-1599*).

Các phản ứng bất lợi liên quan đến ho gà toàn bộ tế bào (Whole cell pertussis - wP) là một trở ngại cho việc tiếp tục sử dụng vắc xin này trên toàn thế giới và do đó vắc xin kết hợp có nguồn gốc wP đã dần được thay thế bằng các vắc xin kết hợp có nguồn gốc ho gà vô bào trong nền công nghiệp vắc xin.

Gần đây, các vắc xin ho gà có thành phần được xác định đã được phát triển. Tất cả các vắc xin có nguồn gốc ho gà vô bào dạng sáu thành phần (DTaP IPV PRP-T-HBsAg) đã được báo cáo trước đây (EP1028750).

Infanrix® Hexa (GSK) hiện là loại vắc xin kết hợp nhi khoa sáu thành phần duy nhất trên thị trường toàn cầu có chứa Salk IPV. Sản phẩm này (DTaP3 -IPV-HBV/Hib) được bán dưới dạng ống tiêm đã được đổ đầy trước sản phẩm năm thành phần được đóng gói cùng với cộng hợp PRP-T kháng nguyên Hib đông khô trong một lọ riêng biệt để được pha lại với phần còn lại của vắc xin trước khi sử dụng.

Vắc xin sáu thành phần thứ hai, Hexyon® (còn được gọi là Hexacima® và Hexaxim®) là sản phẩm sáu thành phần hoàn toàn lỏng từ Sanofi Pasteur; tuy nhiên vắc xin này cũng vắc xin ho gà vô bào (aP). Vắc xin này gần như được dành cho các thị trường tư nhân ở châu Âu và trên toàn thế giới. Vắc xin sáu thành phần khác, cũng gồm aP, được Merck và Sanofi Pasteur cùng phát triển, hiện đang trong các nghiên cứu lâm sàng giai đoạn III.

Vắc xin kết hợp bảy thành phần đang được Bharat Biotech International phát triển bao gồm DT, ho gà *Acellular*, Sabin IPV (type 1: 40 DU, type 2:8 DU, type 3 :32DU), rotavirus chủng đơn lẻ (chủng G9 tức là chủng 116E), *Haemophilus influenza* type b PRP cộng hợp với TT và vắc xin viêm gan B tái tổ hợp.

Tuy nhiên, đã có những lo ngại mới nổi về hiệu quả lâu dài của vắc xin ho gà vô bào (aP), đặc biệt là ở các nước đang phát triển. Các báo cáo gần đây cho thấy rằng sự thiếu hụt khả năng miễn dịch bệnh ho gà ở tuổi vị thành niên và điều này chịu trách nhiệm cho sự gia tăng các trường hợp nhiễm bệnh ở trẻ dưới sáu tháng tuổi, trước khi chúng được tiêm phòng đầy đủ. Hiệu quả của vắc xin được ước tính là 24 phần trăm ở độ tuổi 8 đến 12 tuổi được chủng ngừa ở giai đoạn trẻ nhỏ với aP. Một nghiên cứu quan sát tại Úc cũng cho thấy tỷ lệ mắc bệnh cao hơn ở thanh thiếu niên đã được tiêm vắc xin aP ở giai đoạn trẻ nhỏ so với những người được tiêm vắc xin wP (nguy cơ tương đối 3,3, độ tin cậy 95% trong khoảng 2,4- 4,5).

Từ góc độ chi phí, các kháng nguyên aP trong lịch sử đã vượt quá chi phí của kháng nguyên wP từ 10 đến 30 lần do chênh lệch sản xuất và chi phí sử dụng bản quyền sáng chế và do đó tạo thành gánh nặng kinh tế cho các nước đang phát triển. Do đó, chi phí của vắc xin sáu thành phần có nguồn gốc wP sẽ phù hợp hơn để sử dụng trong khu vực công của các nước tài nguyên thấp.

Do đó, việc sử dụng kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) trong vắc xin sáu thành phần dành cho các nước đang phát triển đã trở nên quan trọng cả về chi phí và những lo ngại mới nổi về hiệu quả lâu dài của vắc xin aP, đặc biệt là ở các nước đang phát triển.

So với vắc xin ho gà toàn tế bào (wP) tốt nhất, vắc xin aP không hiệu quả trong các chương trình tiêm chủng mở rộng (*Vickers và cộng sự, 2006; Cherry 2012*).

Các nghiên cứu gần đây về sự bùng phát trong cộng đồng dân số được tiêm chủng cao đã chỉ ra rằng thời gian bảo vệ của các vắc xin aP là quá ngắn (*Klein và cộng sự, 2012; Misegades và cộng sự, 2012*), dẫn đến giảm khả năng miễn dịch ở trẻ lớn và thanh thiếu niên, và sự gia tăng tương ứng các trường hợp mắc bệnh ở nhóm tuổi này (*Skowronski và cộng sự, 2002; Klein và cộng sự, 2012*). Điều này trái ngược với các vắc xin wP, mà giúp bảo vệ tốt trong những năm thiếu niên (*Klein và cộng sự 2012*). Do những thiếu sót này, tại các quốc gia chuyển sang dùng vắc xin aP vào những năm 1990, chúng ta hiện có một thế hệ trẻ em không chỉ được bảo vệ tốt trước bệnh ho gà kém mà còn có thể phản ứng kém với thuốc tăng cường, vì vắc xin mà trẻ em được tạo nền miễn dịch có thể xác định đáp ứng miễn dịch của chúng đối với tiêm chủng tăng cường sau này (*Podda và cộng sự 1995; Mascart và cộng sự 2007; Sheridan và cộng sự 2012; Liko, Robison and Cieslak 2013; Smits và cộng sự. 2013*).

Một trong những yếu tố quan trọng nhất góp phần vào khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch của wP là sự hiện diện của lipo-oligosacarit (LOS), nội độc tố từ màng ngoài của vi khuẩn.

Việc bất hoạt các độc tố trong các vắc xin wP có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, nhưng không phát hiện được độc tố không bền nhiệt trong sản phẩm cuối cùng. Quy trình bất hoạt các độc tố wP của lượng lớn ho gà toàn tế bào (wP) được thực hiện bởi nhiều nhà sản xuất bằng cách sử dụng xử lý nhiệt/formalin. Một số báo cáo trích dẫn việc sử dụng thimerosal để bất hoạt wP. Tuy nhiên, việc sử dụng thimerosal gây mất tính kháng nguyên của IPV (*Vaccine 1994 Volume 12 No. 9 851 - 856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine*), và do đó, trong trường hợp vắc xin kết hợp có chứa IPV, có thể cần phải

được trình bày trong một lọ tách biệt với wP chứa thimerosal để duy trì hoạt lực của nó theo thời gian hoặc thay đổi bất hoạt lượng lớn ho gà tại nguồn. Một số kháng nguyên, tức là PT hoạt động cũng có thể đóng vai trò là chất thay đổi đáp ứng miễn dịch và sự khác biệt đáng kể về đáp ứng miễn dịch với các kháng nguyên khác nhau giữa các loại vắc xin khác nhau đã được theo dõi (WHO, 1993).

Chiết xuất hóa học của LOS dẫn đến giảm đáng kể hàm lượng nội độc tố (20%) và giảm đáng kể độc tính liên quan đến nội độc tố (lên đến 97%), tùy thuộc vào thử nghiệm in vitro hoặc in vivo được sử dụng. Việc trích xuất LOS không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của sản phẩm và quan trọng hơn là không ảnh hưởng đến hoạt lực và/hoặc độ ổn định của DTP thấp. Hơn nữa, hầu như không có sự khác biệt nào trong các đáp ứng kháng thể và tế bào T được quan sát thấy. (Tham khảo: *Waldely Oliveira Dias et. al; An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin; Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:2, 339–348; February 2012*)

Các kháng nguyên viêm gan B

Có nhiều chủng virus viêm gan B khác nhau. Viêm gan B là bệnh gây ra bởi virus *hepatitis B* (Hep B) mà lây nhiễm vào gan của con người, và gây ra một chứng viêm gọi là viêm gan. Vắc xin phòng bệnh có chứa một trong các protein vỏ của virus, kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg). Hiện nay đã có sẵn vắc xin được sử dụng cho tiêm chủng hàng loạt, ví dụ như sản phẩm Recombivax HB® và Comvax® của Merck, Engerix-B® và Pediarix® của Glaxo SmithKline Biologicals. Vắc xin kết hợp có thành phần viêm gan B được kết hợp với cả kết quả tuân thủ và kết quả tuân thủ cao hơn so với vắc xin đơn kháng nguyên HepB. (Tham khảo: *Kurosky. et. al; Effect of Combination Vaccines on Hepatitis B Vaccine Compliance in Children in the United States; The Pediatric Infectious Disease Journal. 36(7):e189–e196, JUL 2017*). Một số tài liệu tham khảo trích dẫn sự hấp phụ của kháng nguyên bề mặt viêm gan B lên nhôm photphat kết hợp với các kháng nguyên khác. Thành phần viêm gan B về cơ bản không nên chứa thiomersal (phương pháp điều chế HBsAg không có thiomersal đã được công bố trước đây trong EP1307473). Hexavac®, một loại vắc xin kết hợp đã bị rút khỏi thị trường do khả năng gây miễn dịch thấp của thành phần viêm gan B. Do

đó, cần phải có một chế phẩm vắc xin kết hợp chứa kháng nguyên viêm gan B với khả năng gây miễn dịch đủ hoặc tăng cường.

Kháng nguyên *haemophilus influenzae* (Hib)

Haemophilus influenzae là một loài cầu trực khuẩn gram âm mà là một phần thông thường của hệ vi sinh vật đường hô hấp trên. *Haemophilus influenzae* type b (Hib b) là nguyên nhân chính gây viêm màng não do nhiễm trùng máu xâm lấn ở trẻ nhỏ và là nguyên nhân chính gây viêm màng não trong 2 năm đầu đời. Tiêm vắc xin chống lại *haemophilus influenzae* bắt đầu ở Canada vào năm 1987 với vắc xin polysaccharit [polyribose ribitol photphat (PRP)]. Vỏ ngoài polyribosylribitol photphat (PRP) của Hib là một yếu tố độc lực chính đối với sinh vật. Kháng thể với PRP là tác nhân chính cho hoạt động diệt khuẩn trong huyết thanh và tăng mức độ kháng thể có liên quan đến việc giảm nguy cơ mắc bệnh xâm lấn. PRP là một kháng nguyên độc lập tế bào T và do đó được đặc trưng bởi a) gây ra đáp ứng kháng thể kém ở trẻ em và trẻ dưới 18 tháng tuổi, b) đáp ứng kháng thể thay đổi và định lượng nhỏ hơn mà so với thấy được với các kháng nguyên phụ thuộc tế bào T, c) sản xuất một tỷ lệ cao hơn immunoglobulin M (IgM) và d) không có khả năng gây ra đáp ứng tăng cường.

Các vắc xin ban đầu chỉ dựa trên thành phần PRP đã tỏ ra không hiệu quả ở trẻ sơ sinh. Những nỗ lực tiếp theo được hướng tới vắc xin cộng hợp PRP, trong đó PRP được cộng hợp với các protein được gọi là protein mang như protein màng ngoài của các *Neisseria meningitides*, biến độc tố bạch hầu, biến độc tố uốn ván và CRM 197. Việc đưa các thành phần cộng hợp Hib vào vắc xin kết hợp có liên quan đến việc giảm khả năng gây miễn dịch của Hib. Hơn nữa, các cộng hợp Hib không ổn định trong môi trường nước và không thể tồn tại trong quá trình lưu trữ kéo dài ở dạng này. Do đó, polysaccharit PRP của *Haemophilus influenzae* b (Hib) thường được bào chế dưới dạng chất rắn khô, được tái tạo tại thời điểm phân phối với công thức dạng lỏng của các kháng nguyên khác. Ví dụ trong Infanrix® hexa (WO99/48525).

Kháng nguyên bại liệt

Sự khác nhau của các loại vắc xin hiện có:

- Vắc xin bại liệt đường uống sống bị suy yếu (bị giảm hoạt lực) (OPV) do Tiến sĩ Albert Sabin phát triển năm 1961. OPV, bao gồm các chủng Sabin, được đưa vào bằng đường uống.

- Vắc xin bại liệt (IPV) bất hoạt (bị chết) được phát triển vào năm 1955 bởi Tiến sĩ Jonas Salk. IPV, bao gồm các chủng Salk, được đưa vào dưới dạng tiêm.

Gần đây, virus bại liệt Sabin bất hoạt, được điều chế bằng cách bất hoạt virus bại liệt chủng Sabin bằng formalin, đã được phát triển để tiêm và cũng đã có sẵn trong các sản phẩm thương mại.

Cả hai loại vắc xin bại liệt sống (OPV) và bất hoạt (IPV) đều có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh bại liệt trên toàn thế giới. Vắc xin bại liệt có thể chứa các chủng Salk và Sabin.

Năm 1955, tiến sĩ Jonas Salk đã thành công trong việc bất hoạt virus bại liệt đại, do đó có thể bào chế nó ở dạng thuốc tiêm và đặt tên là chủng Salk, bao gồm Mahoney type 1, MEF type 2 và Saukett type 3 đã được sử dụng trong vắc xin chống lại bệnh bại liệt. Các chủng Sabin bao gồm các chủng Sabin 1 và Sabin 2.

Liều vắc xin bại liệt tiêu chuẩn được chấp nhận hiện tại có chứa 40 D đơn vị kháng nguyên của virus bại liệt bất hoạt type 1 (Mahoney), 8 D đơn vị kháng nguyên của virus bại liệt bất hoạt type 2 (MEF-I) và 32 D đơn vị kháng nguyên của virus bệnh bại liệt bất hoạt loại 3 (Saukett). Infanrix-hexa® (WO99/48525).

IPV hiện có sẵn dưới dạng công thức bào chế độc lập không chứa tá chất, hoặc các dạng kết hợp khác nhau, bao gồm DT-IPV (với biến độc tố bạch hầu và *Tetanus*) và vắc xin IPV sáu thành phần (ngoài ra còn có ho gà, viêm gan B và *Haemophilus influenzae b*) ví dụ, Infanrix® hexa (WO99/48525).

Tuy nhiên, khi so sánh với OPV, chi phí sản xuất chung cho IPV cao hơn đáng kể. Điều này chủ yếu là do các yêu cầu cho: (i) nhiều virus hơn cho mỗi liều; (ii) xử lý sau nuôi cấy bổ sung (nghĩa là cô đặc, tinh sạch và bất hoạt), và thử nghiệm QC liên quan (iii); mất mát kháng nguyên hoặc thu hồi kém ở phía thu hồi sau nuôi cấy và iV) lưu trữ. Cho đến nay, thách thức tài chính là một nhược điểm lớn đối với việc đổi mới và triển khai IPV ở các nước thu nhập thấp và trung bình.

Nhu cầu IPV toàn cầu trong tương lai sau khi loại bỏ virus bại liệt có thể tăng từ mức 80 triệu liều hiện tại lên 450 triệu liều mỗi năm. Do đó, các phương pháp tiếp cận "kéo dài" nguồn cung IPV có thể sẽ cần đến.

Các công thức bào chế vắc xin hiệu quả giảm liều mà cung cấp sự bảo vệ chống lây nhiễm bằng cách sử dụng kháng nguyên IPV liều thấp hơn là điều mong muốn trong trường hợp mà việc cung cấp vắc xin thông thường không đủ để đáp ứng nhu cầu toàn cầu hoặc khi chi phí sản xuất vắc xin thông thường ngăn việc vắc xin được bán ở một mức giá phải chăng cho các nước đang phát triển. Ngoài ra việc phơi nhiễm với liều IPV thấp hơn; so với các công thức bào chế bán trên thị trường hiện tại có thể an toàn hơn. Do đó, các chiến lược khác nhau để làm cho IPV có sẵn với giá cả phải chăng hơn cần được đánh giá. Do đó, vắc xin kết hợp bao gồm IPV giảm liều có thể làm để nó rẻ hơn và dễ dàng quản lý.

Trong trường hợp của vắc xin cúm đại dịch, việc sử dụng các tá chất đã được cho phép để giảm liều, tăng tính sẵn có và giảm chi phí vắc xin. Do đó, người ta đã suy đoán rằng một công thức bào chế vắc xin có tá chất của IPV sẽ làm giảm chi phí và cũng làm tăng số lượng liều IPV có sẵn trên toàn thế giới.

Hơn nữa, các muối nhôm đã được coi là an toàn, đã được sử dụng trong vắc xin kết hợp có chứa IPV, có rào cản phát triển thấp nhất và không tốn kém để sản xuất. Tuy nhiên, các tá chất nhôm không được biết đến để cho phép giảm liều đáng kể.

Các kháng nguyên khác

Các kháng nguyên khác mà có thể được đưa vào vắc xin kết hợp là *Haemophilus influenzae* (các type huyết thanh a, c, d, e, f và các chủng không có vỏ ngoài), viêm gan (các chủng A, C, D, E, F và G), viêm màng não A, B hoặc C, cúm, phế cầu khuẩn, liên cầu khuẩn, bệnh than, sốt xuất huyết, sốt rét, sởi, quai bị, rubella, BCG, viêm não Nhật Bản, Rotavirus, đậu mùa, sốt vàng da, thương hàn, zona, virus thủy đậu và các loại khác.

Phạm vi và loại kháng nguyên được sử dụng trong vắc xin kết hợp phụ thuộc vào độ tuổi dân số mục tiêu được sử dụng như trẻ sơ sinh, trẻ mới biết đi, trẻ em, thanh thiếu niên và người lớn. Vắc xin kết hợp được biết đến sớm nhất có thể ngăn ngừa lây

nhiễm *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium Diphtheriae*, và virus bại liệt bất hoạt (IPV) tùy ý và/hoặc virus viêm gan B và/hoặc *Haemophilus influenzae* type B đã biết/24148, WO97/00697, WO2000/030678, WO2008/028956, US 6013264 và WO2005089794).

Trong khi đó, việc tiêm vắc xin nhiều liều phải sử dụng chất bảo quản để tránh tạp nhiễm vi sinh vật. Đối với các sản phẩm vắc xin kết hợp do Liên Hợp Quốc xuất khẩu sang các nước kém phát triển, v.v., vắc xin nhiều liều có chứa chất bảo quản được ưu tiên, xem xét môi trường của các quốc gia mà vắc xin được sử dụng, phương pháp phân phối, chi phí, v.v.. Ví dụ về chất bảo quản được sử dụng trong các sản phẩm vắc xin có thể chứa thimerosal, 2-PE, phenol, formaldehyd và liều thông thường của chất bảo quản được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khả năng gây miễn dịch, khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch, độ ổn định và duy trì đúng dạng của các kháng nguyên trong chế phẩm vắc xin kết hợp phụ thuộc vào cách chế phẩm được bào chế mà gồm quy trình tạo kháng nguyên riêng lẻ, trình tự bổ sung các kháng nguyên, việc sử dụng các tá chất cụ thể với số lượng cụ thể cho một số kháng nguyên nhất định, hấp phụ riêng lẻ hoặc hấp phụ kết hợp các kháng nguyên lên trên tá chất, mức độ hấp phụ của kháng nguyên lên tá chất, tổng hàm lượng phèn, nồng độ và loại chất bảo quản được sử dụng, việc sử dụng các thông số khác nhau bao gồm khuấy trộn, nhiệt độ và độ pH.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vắc xin kết hợp ổn định, dạng lỏng cho thấy khả năng gây miễn dịch được cải thiện và khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch được giảm và quy trình sản xuất vắc xin này.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm

a) biến độc tố bạch hầu (D) và biến độc tố uốn ván được tinh sạch ở mức cao được sản xuất sử dụng môi trường bán tổng hợp và sau đó được giải độc tố.

b) thành phần *B. pertussis* toàn tế bào bất hoạt (wP) được điều chế bằng cách sử dụng kết hợp giữa bất hoạt bằng nhiệt và hóa học, các chủng *Bordetella pertussis* đặc

trung theo tỷ lệ cụ thể dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và tăng hoạt lực.

c) kháng nguyên polysaccharit thuộc vỏ ngoài của *Haemophilus influenzae* type B (Hib) (PRP) cộng hợp với protein mang (CP)

d) IPV (virus bại liệt bất hoạt) Salk hoặc Sabin liều tiêu chuẩn hoặc liều giảm được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp bất hoạt bằng formaldehyd cải tiến và có thể còn được hấp phụ lên trên nhôm hydroxit.

e) thông số hấp phụ tối ưu của (các) kháng nguyên sao cho kháng nguyên bề mặt *Hepatitis B* (HepB) được hấp phụ riêng lên trên tá chất nhôm photphat, các kháng nguyên D và T được hấp phụ riêng lên trên tá chất nhôm photphat nhờ đó giúp khả năng gây miễn dịch được cải thiện.

f) hàm lượng phèn tối thiểu nhờ đó đảm bảo khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch được giảm.

g) nồng độ tối ưu của 2-phenoxyetanol (2-PE) làm chất bảo quản.

Mục đích của sáng chế

Một số mục đích của sáng chế, mà ít nhất một phương án trong bản mô tả này thỏa mãn, như sau:

Mục đích của sáng chế là cải thiện một hoặc nhiều vấn đề thuộc tình trạng kỹ thuật hoặc ít nhất là cung cấp một giải pháp thay thế hữu ích.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp có khả năng gây miễn dịch hơn, ít gây phản ứng liên hệ miễn dịch hơn, ổn định, ở dạng lỏng phù hợp để phòng ngừa và điều trị nhiều hơn một trạng thái bệnh và đáp ứng tiêu chí bảo vệ huyết thanh cho từng thành phần gây miễn dịch nói trên.

Đối tượng khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp này.

Các đối tượng và hiệu quả có lợi khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết sau đây, mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo phương án thứ nhất của sáng chế, chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm nhóm các kháng nguyên/chất gây miễn dịch được chọn từ nhóm gồm nhưng không bị giới hạn ở biến độc tố bạch hầu (D), biến độc tố uốn ván (T), *B. pertussis* toàn tế bào (wP), cộng hợp *Haemophilus influenzae* type B(Hib) PRP-CP, *Hepatitis B* (HepB), virus bại liệt bất hoạt (IPV) và còn bao gồm tá chất có nguồn gốc từ nhôm và các chất bảo quản.

Theo phương án thứ hai của sáng chế, chế phẩm vắc xin kết hợp có thể còn bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm nhưng không giới hạn ở lần lượt *Haemophilus influenzae* (các type huyết thanh a, c, d, e, f và các chủng không có vỏ ngoài), *Hepatitis* (các chủng A, C, D, E, F và G), *meningitis* A, B, C, Y, W-135, hoặc X, cúm, *Staphylococcus aureus*, (các) *Salmonella typhi*, kháng nguyên ho gà vô bào, adenylate cyclaza biến đổi, kháng nguyên sốt rét (RTS, S), phế cầu khuẩn, liên cầu khuẩn, bệnh than, sốt xuất huyết, sốt rét, sởi, quai bị, rubella, BCG, virus u nhú ở người, viêm não Nhật Bản, sốt xuất huyết, Zika, Ebola, Chikungunya, Rotavirus, bệnh đậu mùa, sốt vàng da, Flavivirus, zona, kháng nguyên virus thủy đậu

Theo phương án thứ ba của sáng chế, các chủng IPV được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm các chủng Sabin bất hoạt được chọn từ nhóm gồm type 1, type 2 và type 3 hoặc các chủng Salk bất hoạt được chọn từ nhóm gồm Mahoney type 1, MEF type 2 và Saukett type 3.

Trong một trong những khía cạnh của phương án thứ ba, virus bại liệt có thể được nuôi cấy theo phương pháp sau:

- dòng tế bào CCL81-VERO (từ thận khỉ) đã được sử dụng làm tế bào chủ để nuôi cấy virus bại liệt tức là các chủng sabin và salk.

- Sau khi lây nhiễm các tế bào chủ với chủng virus bại liệt mong muốn và ủ trong 72 giờ, môi trường chứa virus và mảnh vụn tế bào được gom lại và thu trong một vật chứa.

- Dịch lọc được lọc theo cách lọc dòng tiếp tuyến với băng 100KDa; được lọc bằng cách sử dụng đệm photphat và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion.

- Trước khi dùng cho bệnh nhân, virus phải được bất hoạt bằng các phương pháp bất hoạt thích hợp.

Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng sự mất mát kháng nguyên D ở mức phần trăm cao sau bất hoạt formaldehyd có thể là do sự hiện diện của chất đệm photphat mà gây ra sự kết tụ không mong muốn của các hạt virus bại liệt.

Do đó, một khía cạnh quan trọng của sáng chế bao gồm, quy trình bất hoạt bằng formalin được cải thiện bao gồm các bước sau:

- a) Sản phẩm virus gom được đã tinh sạch đã được thay đổi đệm từ đệm phosphat sang đệm tris trong phạm vi (30 đến 50 mM) có độ pH trong khoảng từ 7 đến 7,5,

- b) Môi trường M-199 chứa glycine (5 gm/l) đã được thêm vào hỗn hợp trên

- c) Formaldehyd nồng độ 0,025% đã được thêm vào và sau đó được đảo trộn,

- d) Hỗn hợp sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 đến 13 ngày ở điều kiện khuấy liên tục khối virus trên máy khuấy từ.

- e) Hỗn hợp sau khi ủ được đưa qua hệ thống TFF trung gian ((100 KDa, 0,1 m²) ở ngày 7 và cuối cùng lọc sau khi bất hoạt

- f) Sau đó khối đã lọc được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C

- g) thực hiện phản ứng ELISA D-Ag để xác định đơn vị D-Ag

Theo phương án thứ tư của sáng chế, các chủng IPV được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm các chủng Sabin bất hoạt được giảm liều được chọn từ nhóm gồm type 1, type 2 và type 3 hoặc các chủng Salk bất hoạt được chọn từ nhóm gồm Mahoney type 1, MEF type 2 và Saukett type 3.

Theo phương án thứ năm của sáng chế, IPV (các chủng Sabin và Salk) không được hấp phụ lên trên bất kỳ tá chất nào (ví dụ trước khi trộn với các thành phần khác nếu có).

Theo phương án thứ sáu của sáng chế, các thành phần IPV (các chủng Sabin và Salk) có thể được hấp phụ lên trên tá chất được chọn từ nhóm gồm muối nhôm (Al^{3+}) như nhôm hydroxit ($\text{Al}(\text{OH})_3$) hoặc nhôm photphat (AlPO_4), phèn, canxi photphat, MPLA, 3D-MPL, QS21, tá chất oligodeoxynucleotide chứa CpG, liposome hoặc nhũ tương dầu trong nước hoặc tổ hợp của chúng, (ví dụ, trước hoặc sau khi trộn với các thành phần khác nếu có). Nếu được hấp phụ, một hoặc nhiều thành phần IPV có thể được hấp phụ riêng lẻ hoặc cùng với nhau ở dạng hỗn hợp lên phèn hydroxit.

Thành phần IPV (các chủng Sabin & Salk) có thể được hấp phụ lên trên muối nhôm theo quy trình sau:

- Lấy thể tích $\text{Al}(\text{OH})_3$ đã hấp khử trùng mong muốn để có được nồng độ nhôm (Al^{3+}) cuối cùng trong khoảng 0,1 đến 0,8 mg/liều trong một bình chứa 50 ml
- Bổ sung khối IPV với đơn vị D-Ag đã điều chỉnh và đưa lên thể tích cần với chất pha loãng (10 M-199 + Glycine 0,5%),
- Điều chỉnh độ pH của công thức bào chế cuối cùng và thu được công thức bào chế cuối với độ pH trong khoảng từ 6 đến 6,8.

Ở một trong những khía cạnh của phương án thứ sáu, việc hấp phụ của IPV bất hoạt formalin có thể được thực hiện trên nhôm (Al^{3+}) với nồng độ được chọn từ 0,1mg/liều, 0,2mg/liều, 0,3mg/liều, 0,4mg/liều, 0,5mg/liều, 0,6mg/liều, 0,7mg/liều và 0,8mg/liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1mg/liều đến 1,25mg/liều trên mỗi type huyết thanh và ở độ pH được chọn từ 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 và 6,8, tốt hơn là 6,5.

Ở một khía cạnh khác của phương án thứ sáu, phần trăm thu hồi kháng nguyên D sau bất hoạt formalin trong sự có mặt tris có thể là 50%, 60%, 70% hoặc 80% và phần trăm hấp phụ sau hấp phụ nhôm hydroxit có thể nằm trong khoảng 70% đến 80%, 80% đến 90% hoặc 90% đến 99% hoặc 95% đến 99%.

Theo phương án thứ bảy của sáng chế, độc tố *Diphtheria* (ngoại độc tố) và độc tố *tetanus* (ngoại độc tố) lần lượt được thu từ *Corynebacterium Diphtheria* và *Clostridium tetani* và sau đó được giải độc tố bằng phương pháp bất hoạt thích hợp. Do đó, biến độc tố bạch hầu (D) và biến độc tố *tetani* (T) thu được tiếp tục được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel. Do đó DT tinh khiết thu được tiếp tục sử dụng để bào chế vắc xin kết hợp.

Theo một khía cạnh của phương án thứ bảy, độc tố *Diphtheria* được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Corynebacterium Diphtheriae* trong môi trường bán tổng hợp chứa các thành phần sau ở nồng độ tối ưu trong bất kỳ một trong các kết hợp sau:

Kết hợp 1:

Casein hydrolysate, mantoza monohydrat, axit acetic glacial, natri lactat, magiê sunfat, β -alanin, axit pimelic, axit nicotinic, cupric sunfat, kẽm sunfat, mangan clorua, L – Cystine, canxi clorua dihydrat, kali dihydrogen orthophotphat, di kali hydrogen photphat, sắt sunfat và WFI.

Kết hợp 2:

Casein hydrolysate, mantoza monohydrate, axit acetic glacial, natri lactat, magiê sunfat, β -alanin, axit pimelic, axit nicotinic, mangan clorua, L – Cystine, canxi clorua dihydrat, kali dihydrogen orthophotphat, di kali hydrogen photphat, sắt sunfat và WFI.

Kết hợp 3:

Casein hydrolysate, mantoza monohydrate, axit acetic Glacial, natri lactate, β -alanine, axit pimelic, axit nicotinic, cupric sunfat, kẽm sunfat, mangan clorua, l – cystine, canxi clorua dihydrate, kali dihydrogen orthophotphat, di kali hydrogen photphat, sắt sunfat và WFI.

Kết hợp 4:

cao nấm men, mantoza monohydrat, axit acetic glacial, natri lactate, magiê sunfat, β -alanine, axit pimelic, axit nicotinic, cupric sunfat, kẽm sunfat, mangan clorua, L –cystine, canxi clorua dihydrate, kali dihydrogen orthophotphat, di Kali hydrogen photphat, sắt sunfat và WFI.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ bảy, độc tố *Tetanus* được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Clostridium tetanus* trong môi trường bán tổng hợp chứa các thành phần sau ở nồng độ tối ưu trong bất kỳ một trong các kết hợp sau:

Kết hợp 1:

Casein tiêu hóa, canxi clorua, di kali hydrogen photphat, anhydrous dextrose, natri clorua, magie sunfat, riboflavin, thiamine hydroclorua, pyridoxine hydroclorua, canxi pantothenat, axit nicotinic, l- cystine, sắt clorua, dung dịch vitamin b12, biotin, Conc. HCl, NaOH, cồn tuyệt đối, và WFI

Kết hợp 2:

Casein tiêu hóa, canxi clorua, β -alanine di kali hydrogen photphat, anhydrous dextrose, natri clorua, magie sunfat, sắt sunfat, riboflavin, thiamine hydroclorua, pyridoxine hydroclorua, canxi pantothenate, axit nicotinic, l- cystine, sắt clorua, dung dịch vitamin b12, biotin, conc. HCL, NaOH, cồn tuyệt đối, và WFI

Kết hợp 3:

Casein tiêu hóa, canxi clorua, di kali hydrogen photphat, anhydrous dextrose, natri clorua, kẽm sunfat, riboflavin, thiamine hydroclorua, pyridoxine hydroclorua, canxi pantothenate, axit nicotinic, L- cystine, sắt clorua, dung dịch vitamin b12, biotin, conc. HCL, NaOH, cồn tuyệt đối, và wfi

Kết hợp 4:

Casein thủy phân, canxi clorua, di kali hydrogen photphat, anhydrous dextrose, natri clorua, magie sunfat, mangan clorua, riboflavin, thiamine hydroclorua, pyridoxine hydroclorua, canxi pantothenate, axit nicotinic, L- cystine, sắt clorua, dung dịch vitamin B12, biotin, Conc. HCl, NAOH, cồn tuyệt đối, và WFI

Ở một khía cạnh khác của phương án thứ bảy, độc tố *Diphtheria* và *Tetanus* đã được giải độc tố bằng cách sử dụng một hoặc kết hợp các phương pháp bất hoạt sau đây bao gồm nhiệt, tia UV, formin/formaldehyd, acetyletyleneimin, v.v.

Theo phương án thứ tám của sáng chế, kháng nguyên viêm gan (Hep) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm các kháng nguyên Hep có nguồn gốc từ bề mặt của chủng viêm gan B (HBsAg).

Theo một trong những khía cạnh của phương án thứ chín, HBsAg có thể được thực hiện bằng một trong các phương pháp sau:

- Bằng cách tinh sạch kháng nguyên ở dạng hạt từ huyết tương của người mang mầm bệnh viêm gan B mạn tính, vì một lượng lớn HBsAg được tổng hợp ở gan và được giải phóng vào máu khi bị nhiễm HBV
- Biểu hiện protein bằng phương pháp DNA tái tổ hợp

Theo phương án thứ chín của sáng chế, biến độc tố bạch hầu (D), biến độc tố uốn ván (T) và kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) được hấp phụ riêng lẻ lên trên tá chất được chọn từ nhóm gồm muối nhôm (Al^{3+}) như nhôm hydroxit ($Al(OH)_3$) hoặc nhôm photphat ($AlPO_4$), phen, canxi photphat, MPLA, 3D-MPL, QS21, tá chất oligodeoxynucleotide chứa CpG, liposome hoặc nhũ tương dầu trong nước hoặc tổ hợp của chúng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D), biến độc tố uốn ván (T) và kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) được hấp phụ riêng lẻ lên trên nhôm photphat.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thứ chín, kháng nguyên biến độc tố bạch hầu (D) đã hấp phụ lên trên nhôm photphat có tỷ lệ hấp phụ ít nhất 50%.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thứ chín, kháng nguyên biến độc tố uốn ván (T) đã hấp phụ lên trên nhôm photphat có tỷ lệ hấp phụ ít nhất 40%.

Theo một trong những khía cạnh khác của phương án thứ chín, kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) đã hấp phụ lên trên nhôm photphat có tỷ lệ hấp phụ ít nhất 70%.

Theo phương án thứ mười của sáng chế, kháng nguyên Hib được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp theo sáng chế có nguồn gốc từ polysacarit thuộc vỏ ngoài của chủng Hib b 760705.

Theo một khía cạnh của phương án thứ mười, kháng nguyên PRP Hib b được cộng hợp với protein mang được chọn từ nhóm gồm protein mang bao gồm nhưng không giới hạn ở CRM197, biến độc tố bạch hầu, phức hợp màng ngoài của *Neisseria meningitidis*, mảnh C của biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà, protein D của *H. influenzae*, *E.coli* LT, *E. coli* ST, và ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*, phức hợp màng ngoài c (phức hợp màng ngoài c-OMPC), các porin, các protein liên kết transferrin, pneumolysin, protein bề mặt phế cầu khuẩn A (PspA), thành phần bám dính bề mặt phế cầu A (PsaA), phế cầu khuẩn PhtD, các protein bề mặt phế cầu khuẩn BVH-3 và BVH-11, kháng nguyên bảo vệ của *Bacillus anthracis* và yếu tố phù được giải độc (EF) và yếu tố gây chết người (LF) của *Bacillus anthracis*, albumin trứng, keypet limpet hemocyanin (KLH), albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò (BSA), dẫn xuất protein được tinh chế của tuberculin (purified protein derivative of tuberculin - PPD), các protein tổng hợp, các protein sốc nhiệt, các protein ho gà, cytokine, lymphokine, kích thích tố, các yếu tố tăng trưởng, các protein nhân tạo bao gồm nhiều epitope tế bào T CD4 + người từ các kháng nguyên có nguồn gốc mầm bệnh khác nhau như N 19, các protein hấp thu sắt, độc tố A hoặc B từ các protein của *C. difficile* và *S.agalactiae*.

Tuy nhiên, tốt hơn là Hib b PRP được cộng hợp với biến độc tố uốn ván (TT) bằng cách hóa học CNBr, hóa học amin hóa khử, hóa học xyanua hóa hoặc bất kỳ phương pháp hóa học nào khác đã được tiết lộ trong *Kniskern và cộng sự*, "Conjugation: design, chemistry, and analysis" in Ellis và cộng sự., *Development and clinical uses of Haemophilus b conjugate vaccines*. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười, protein mang có mặt ở cả dạng tự do và dạng cộng hợp trong chế phẩm theo sáng chế, dạng không cộng hợp tốt hơn là không quá 20% tổng lượng protein mang trong toàn bộ chế phẩm, và tốt hơn nữa là có ít hơn 5% theo trọng lượng.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười, kháng nguyên Hib không bị hấp phụ đáng kể vào bất kỳ tá chất nào.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ mười, kháng nguyên Hib có thể không trải qua bước hấp phụ có chủ ý hoặc cố ý trên bất kỳ tá chất nào.

Theo phương án thứ mười một của sáng chế, việc điều chế kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp theo sáng chế tốt hơn là được tạo ra từ các chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229 được trộn theo tỷ lệ cụ thể và sau đó được bất hoạt bằng cách sử dụng các phương pháp bất hoạt cải tiến mà không có thimerosal do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và tăng hoạt lực và có thể hoặc không hấp phụ lên trên tá chất có nguồn gốc từ nhôm.

Theo một khía cạnh của phương án thứ mười một, việc điều chế kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp theo sáng chế tốt hơn là được thực hiện từ các chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229 trộn theo tỷ lệ 1: 1: 0,25: 0,25.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười một, điều chế kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp đã bị bất hoạt bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp xử lý bất hoạt sau đây bao gồm nhiệt, tia UV, formin/formaldehyd, acetyleneimin, v.v..

Tuy nhiên, tốt hơn là việc điều chế kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp đã bị bất hoạt bằng cách sử dụng kết hợp xử lý nhiệt và hóa học. Tuy nhiên, tốt hơn là nhiệt độ bất hoạt ở $56 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong 10 đến 15 phút với sự có mặt của formaldehyd, trong đó, khối wP vẫn không bị vón cục và dễ bị đồng nhất do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và cho hoạt lực wP tốt hơn trong thời gian dài hơn.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười một, việc điều chế kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) được sử dụng trong chế phẩm vắc xin kết hợp có thể hoặc không được hấp phụ lên trên tá chất có nguồn gốc từ nhôm như nhôm hydroxit, nhôm photphat hoặc kết hợp của chúng (ví dụ trước hoặc sau khi trộn với các thành phần khác nếu có). Nếu được hấp phụ, một hoặc nhiều chủng wP (tức là 134, 509, 25525 và 6229) có thể được hấp phụ riêng rẽ hoặc cùng nhau dưới dạng hỗn hợp.

Theo phương án thứ mười hai của sáng chế, biến độc tố bạch hầu (D) có lượng nằm trong khoảng 1-40 Lf; biến độc tố uốn ván (T) có lượng nằm trong khoảng 4-25 Lf; wP có lượng nằm trong khoảng 4-30 IOU trên mỗi 0,5 ml; cộng hợp *H. Influenzae* B PRP-TT có lượng nằm trong khoảng 1 - 20 μ g hàm lượng PRP trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên HBsAg có số lượng nằm trong khoảng 1 - 20 μ g mỗi 0,5 ml; Sabin IPV mà chứa type 1, type 2 và type 3, trong đó type 1 được chứa với lượng 1 - 50 DU/0,5ml, type 2 được chứa với lượng 1 - 20 DU/0,5ml và type 3 được chứa với lượng 1 - 50 DU/0,5ml và còn bao gồm tá chất có nguồn gốc từ nhôm và các chất bảo quản trong chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 25 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 20 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 4 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 2 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 16 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 14 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 12 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 13 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 10 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 8 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 15 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 10 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 8 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là vắc xin bại liệt bất hoạt Sabin (sIPV) mà chứa các chủng type 1, type 2, và type 3 có mặt với lượng lần lượt khoảng 40 DU, 8 DU, và 32 DU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Theo phương án thứ mười ba của sáng chế, biến độc tố bạch hầu (D) có lượng nằm trong khoảng 1-40 Lf; biến độc tố uốn ván (T) có lượng nằm trong khoảng 4-25 Lf; wP có lượng nằm trong khoảng 4-30 IOU trên mỗi 0,5 ml; cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nằm trong khoảng 1 - 20 µg hàm lượng PRP trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên HBsAg có số lượng nằm trong khoảng 1 - 20 ug mỗi 0,5 ml; virus bại liệt bất hoạt Salk (IPV) mà chứa các chủng Mahoney type 1, MEF Type 2 và Saukett type 3, trong đó Mahoney type 1 được chứa với lượng 1 - 50 DU/0,5ml, MEF type 2 được chứa với lượng 1 - 20 DU/0,5ml và Saukett type 3 được chứa với lượng 1 - 50 DU/0,5 ml và còn bao gồm tá chất có nguồn gốc từ nhôm và các chất bảo quản trong chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 25 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 20 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 4 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 2 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 16 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 14 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 12 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 13 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 10 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 8 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 15 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 10 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 8 μ g trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là vắc xin bại liệt bất hoạt Salk mà chứa các chủng Mahoney type 1, MEF type 2, và Saukett type 3 có mặt với lượng lần lượt khoảng 40 DU, 8 DU, và 32 DU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Theo phương án thứ mười bốn của sáng chế, biến độc tố bạch hầu có lượng nằm trong khoảng 1-40 Lf; biến độc tố uốn ván có lượng nằm trong khoảng 4-25 Lf; wP có lượng nằm trong khoảng 4-30 IOU trên mỗi 0,5 ml; cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nằm trong khoảng 1 - 20 μ g hàm lượng PRP trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hep có số lượng nằm trong khoảng 1 - 20 ug mỗi 0,5 ml; vắc xin bại liệt bất hoạt Sabin giảm liều (sIPV) được chứa trong chế phẩm vắc xin kết hợp, mà chứa type 1, type 2 và type 3, trong đó type 1 được chứa với lượng 2,5 - 10 DU/0,5 ml, type 2 được chứa với lượng 5 - 20 DU/0,5 ml và type 3 được chứa với lượng 1 - 20 DU/0,5ml và còn bao gồm tá chất có nguồn gốc từ nhôm và các chất bảo quản trong chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 25 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 20 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 4 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 2 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 16 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 14 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 12 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 13 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 10 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 8 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 15 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 10 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 8 µg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là vắc xin bại liệt bất hoạt Sabin giảm liều (sIPV) mà chứa các chủng type 1, type 2, và type 3 có mặt với lượng lần lượt khoảng 5 DU, 16 DU, và 10 DU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Theo phương án thứ mười lăm của sáng chế, biến độc tố bạch hầu có lượng nằm trong khoảng 1-40 Lf; biến độc tố uốn ván có lượng nằm trong khoảng 4-25 Lf; wP có lượng nằm trong khoảng 4-30 IOU trên mỗi 0,5 ml; cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nằm trong khoảng 1 - 20 µg hàm lượng PRP trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hep có số lượng nằm trong khoảng 1 - 20 ug mỗi 0,5 ml; virus bại liệt bất hoạt Salk giảm liều mà chứa các chủng Mahoney type 1, MEF Type 2 và Saukett type 3, trong đó Mahoney type 1 được chứa với lượng 5 - 15 DU/0,5ml, MEF type 2 được

chứa với lượng 1 - 18 DU/0,5ml và Saukett type 3 được chứa với lượng 5 - 15 DU/0,5 ml và còn bao gồm tá chất có nguồn gốc từ nhôm và các chất bảo quản trong chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 25 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 20 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố bạch hầu (D) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 10 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 4 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là biến độc tố uốn ván (T) có lượng khoảng 2 Lf trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 16 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 14 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là wP có lượng khoảng 12 IOU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 13 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 10 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là cộng hợp *H. Influenzae B* PRP-TT có lượng nồng độ PRP là 8 µg trên mỗi 0,5 ml.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 15 μg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 10 μg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên HBsAg có lượng khoảng 8 μg trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Tuy nhiên, tốt hơn là vắc xin bại liệt bất hoạt Salk giảm liều mà chứa các chủng Mahoney type 1, MEF type 2, và Saukett type 3 có mặt với lượng lần lượt khoảng 10 DU, 2 DU, và 10 DU trên mỗi 0,5 ml trong chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng.

Theo phương án thứ mười sáu của sáng chế, một hoặc nhiều kháng nguyên của chế phẩm vắc xin kết hợp cuối cùng có thể không được hấp phụ đáng kể vào bất kỳ tá chất nào.

Theo phương án thứ mười bảy của sáng chế, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều tá chất được chọn từ nhóm gồm muối nhôm (Al^{3+}) như nhôm hydroxit ($\text{Al}(\text{OH})_3$) hoặc nhôm photphat (AlPO_4), phèn, canxi photphat, MPLA, 3D-MPL, QS21, tá chất oligodeoxynucleotide chứa CpG, liposome, hoặc nhũ tương dầu trong nước.

Tuy nhiên, tốt hơn là chế phẩm bao gồm nhôm photphat (AlPO_4) làm tá chất.

Theo một trong những khía cạnh của phương án thứ mười bảy, các kháng nguyên của công thức bào chế cuối cùng có thể được hấp phụ lên trên gel nhôm photphat tại chỗ hoặc gel nhôm photphat làm sẵn hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một trong những khía cạnh ưu tiên của phương án thứ mười bảy, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa tá chất với lượng ít hơn hoặc bằng 2,5 mg/0,5 ml, và đặc biệt, với lượng nằm trong khoảng từ 1,5 mg/0,5 ml đến 0,1 mg/0,5 ml.

Tuy nhiên, ở khía cạnh ưu tiên khác của phương án thứ mười bảy, hàm lượng nhôm (Al^{+3}) trong chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp cuối cùng có thể không quá 1,25 mg mỗi 0,5 ml, tốt hơn là 1 mg mỗi 0,5 ml và tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mg mỗi 0,5 ml đến 0,63 mg mỗi 0,5 ml.

Theo phương án thứ mười tám của sáng chế, chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp có thể bao gồm chất bảo quản được chọn từ nhóm gồm 2-phenoxyetanol, benzethonium clorua (Phemerol), phenol, thiomersal, formaldehyd, methyl và các propyl paraben, hoặc rượu benzyl hoặc các tổ hợp của chúng.

Tuy nhiên, tốt hơn là chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp có thể chứa 2-phenoxyetanol (2-POE) làm chất bảo quản.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, lượng 2 - phenoxyetanol trong vắc xin kết hợp của sáng chế có thể tốt hơn là không nhiều hơn 3,5 mg/0,5 ml; tốt hơn nữa là 3,0 mg/0,5 ml; và tốt nhất là 2,5 mg/0,5 ml.

Theo phương án thứ mười chín của sáng chế, chế phẩm/công thức bào chế vắc xin kết hợp theo sáng chế có thể chứa các tá dược được dụng được lựa chọn từ nhóm bao gồm đường và các polyol, các chất hoạt động bề mặt, các polyme, các muối, các amino axit, các chất điều chỉnh độ pH (điều chỉnh độ pH của chế phẩm vắc xin) v.v.. các ví dụ về các loại đường và polyol được sử dụng có thể bao gồm sucroza, trehaloza, lactoza, mantoza, galactoza, mannitol, sorbitol, glycerol, v.v.. các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm các chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbate 20, polysorbate 80, v.v.. Các ví dụ về các polyme có thể bao gồm dextran, cacboxymethylcellulose, axit hyaluronic, xyclodextrin, v.v.. Các ví dụ về các muối có thể bao gồm NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂, v.v.. Các ví dụ về các axit amin có thể bao gồm arginine, glycine, histidine, v.v.. Các ví dụ về các chất điều chỉnh độ pH có thể bao gồm natri hydroxit, axit clohydric, v.v..

Theo phương án thứ hai mươi của sáng chế, vắc xin kết hợp nói trên có thể là dạng bào chế đông khô hoặc dạng lỏng, tốt hơn là dạng lỏng.

Theo phương án thứ hai mươi một của sáng chế, vắc xin kết hợp nói trên có thể ổn định ở nhiệt độ 2-8 độ C từ 12 đến 36 tháng; ở nhiệt độ 25 độ C từ 2 đến 6 tháng; ở nhiệt độ 37 độ C từ 1 tuần đến 4 tuần, có độ pH cuối cùng nằm trong khoảng từ pH 6,0 đến pH 7,0; tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ pH 6,2 đến pH 6,8; và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 6,3 đến pH 6,7.

Theo phương án hai mươi hai của sáng chế, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vắc xin nhiều thành phần ổn định với khả năng gây miễn dịch được cải thiện và giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch có thể đạt được khi vắc xin được sản xuất theo quy trình được trình bày dưới đây có tính đến i) quy trình tạo kháng nguyên riêng lẻ ii) trình tự bổ sung các kháng nguyên iii) việc sử dụng các tá chất cụ thể với số lượng cụ thể đối với một số kháng nguyên nhất định, iv) hấp phụ riêng lẻ hoặc hấp phụ kết hợp các kháng nguyên lên trên tá chất v) mức độ hấp phụ của kháng nguyên lên trên tá chất vi) sử dụng nồng độ phen tối thiểu vii) sử dụng nồng độ và loại chất bảo quản tối ưu và viii) sử dụng các thông số khác nhau bao gồm khuấy trộn, nhiệt độ và độ pH.

Các nguồn sinh học của các chủng được sử dụng trong vắc xin kết hợp SIIPL:

Biến độc tố bạch hầu:

Chủng *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 thu được từ Wellcome Research Laboratory, London, Vương quốc Anh bởi Viện nghiên cứu trung tâm của Cơ quan kiểm soát quốc gia (C.R.I.) Kasauli, Himachal Pradesh, India ở dạng đông khô trong năm 1973. Chủng đã được hồi sinh và tiếp tục đông khô bằng hệ thống Master Seed Lot- *C. diphtheriae* CN2000 A1 tại C.R.I. Kasauli.

Biến độc tố uốn ván

Chủng *Clostridium tetani* Harvard Strain số 49205 đã thu được từ The Rijks Institute Voor de Volksgezondheid (Hà Lan) bởi Cơ quan kiểm soát quốc gia C.R.I. Kasauli, ở dạng đông khô.

Ho gà:

Sản xuất số lượng lớn vắc xin ho gà tại SIIPL bao gồm việc sử dụng bốn chủng *Bordetella pertussis* đó là các chủng 134, 509, 6229 và 25525. Hạt virus gốc của chủng 134 và 509 có nguồn gốc từ Viện Rijks, Hà Lan, thu được thông qua Cơ quan kiểm soát quốc gia, Viện nghiên cứu trung tâm, Kasauli, Himachal Pradesh, Ấn Độ. Hạt virus gốc của các chủng 6229 và 25525 có thể tùy ý là từ viện Lister, Anh quốc.

Hepatitis b:

Rhein Biotech (Đức) đã xây dựng chủng *Hansenulapolyomorpha* tái tổ hợp có chứa gen kháng nguyên bề mặt HBsAg. Rhein Biotech cũng đã thực hiện Ngân hàng tế bào gốc (MCB Hansenulapolyomorpha K3/8-1 chủng ADW, 12/94) và đã thực hiện tất cả các thử nghiệm đặc tính trên ngân hàng này.

Haemophilus influenzae type b:

Các sinh vật nguồn để tạo ra nền tế bào là *Haemophilus influenzae* type b, chủng 760705. Chủng ban đầu được phân lập từ một bé trai 2 tuổi và 2 tháng tuổi (sinh ngày 14-8-74) vào tháng 11 năm 1976. Ba phân đoạn của chủng đã tiến hành trước khi bảo quản ở -70°C tại Trung tâm Y tế Hàn Lâm (AMC) , Đại học Amsterdam. Chủng này đã được chuyển sang SIIPL như một phần của sự hợp tác giữa SIIPL và Viện Vắc xin Hà Lan (NVI, Hà Lan).

IPV:

Chủng và nguồn virus bại liệt đã được đưa ra dưới đây.

Poliovirus type 1:

Chủng: Mahoney

Nguồn Dr. J.Salk (Pitman & Moore company)

Poliovirus type 2:

Chủng: MEF1

Nguồn Statens Serum Institute, Copenhagen

Poliovirus type 3:

Chủng: Saukett

Nguồn Statens Serum Institute, Copenhagen

Trong suốt bản mô tả, từ "bao gồm" hoặc các từ thay thế như "bao gồm" được chia động từ hoặc "bao gồm" dạng danh động từ sử dụng hiểu đơn giản là bao gồm các phần tử, thành phần, bước, hoặc nhóm các phần tử, các thành phần hoặc các bước đã nêu, nhưng không ngoại trừ các phần tử, thành phần hoặc bước, hoặc nhóm các phần tử, các thành phần hoặc các bước khác.

Việc sử dụng cách diễn đạt "ít nhất" hoặc "ít nhất một" đề xuất việc sử dụng một hoặc nhiều phần tử hoặc thành phần hoặc số lượng, vì việc sử dụng có thể theo phương án của sáng chế để đạt được một hoặc nhiều mục đích hoặc kết quả mong muốn. Trong khi các phương án nhất định của sáng chế đã được mô tả, các phương án này đã được trình bày chỉ nhằm mục đích làm ví dụ, không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay thế hoặc biến đổi công thức bào chế của sáng chế này, nằm trong phạm vi của sáng chế, có thể thực hiện bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật ngay khi xem xét nội dung bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này. Các thay thế hoặc biến đổi đó sẽ nằm trong tinh thần của sáng chế.

Các giá trị số được đưa ra cho các tham số vật lý, kích thước và đại lượng khác nhau chỉ là giá trị gần đúng và dự tính rằng các giá trị cao hơn giá trị số được gán cho tham số vật lý, kích thước và đại lượng nằm trong phạm vi của sáng chế trừ khi có tuyên bố cụ thể theo nghĩa ngược lại.

Mặc dù đã nhấn mạnh rõ ràng trong bản mô tả này về các dấu hiệu cụ thể của phương án được ưu tiên, nhưng sẽ được đánh giá cao rằng nhiều dấu hiệu bổ sung có thể được thêm vào và nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong phương án được ưu tiên mà không xa rời nguyên lý của sáng chế. Những thay đổi đó và những thay đổi khác trong phương án được ưu tiên của sáng chế sẽ rõ ràng đối với những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật từ bản mô tả sáng chế này, theo đó, có thể phải hiểu rõ rằng nội dung được mô tả ở trên chỉ được hiểu là mang tính minh họa cho sáng chế và không giới hạn sáng chế.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế được mô tả ở đây có một số hiệu quả kỹ thuật có lợi bao gồm, nhưng không giới hạn ở đó, việc thực hiện chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm D, T, wP, HBsAg, cộng hợp Hib PRP-TT và IPV và phương pháp sản xuất chế phẩm này. Khi so sánh với chế phẩm vắc xin kết hợp khác, sáng chế có được các hiệu quả có lợi sau:

1. Vắc xin kết hợp ở dạng hoàn toàn lỏng
2. Khả năng gây miễn dịch được cải thiện
3. Khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch được giảm

4. Độ ổn định ở nhiệt độ 2-8°C và nhiệt độ phòng đã được thử nghiệm qua khoảng thời gian 12 tháng đã được cải thiện.
5. Biến độc tố bạch hầu (D) và biến độc tố uốn ván (T) đã tinh sạch ở mức độ cao được sản xuất sử dụng môi trường bán tổng hợp của Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) hoặc Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE).
6. Kháng nguyên *B. pertussis* toàn tế bào (wP) antigen bao gồm các chủng *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 và 6229 theo tỉ lệ 1:1:0,25:0,25 bằng cách đó cải hiệu hoạt lực và khả năng gây miễn dịch chống lại *B. pertussis*.
7. Phương pháp bất hoạt thành phần *B. pertussis* toàn tế bào (wP) sử dụng kết hợp bất hoạt bằng nhiệt và bằng formaldehyd đã được cải thiện. Quy trình này không có thimerosal và kháng nguyên ho gà toàn tế bào bất hoạt vẫn không vón cục và đồng nhất do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và mang lại hiệu lực tốt hơn trong thời gian dài hơn.
8. Tỉ lệ PRP tự do thấp (dưới 7%) trong tổng khối cộng hợp Haemophilus influenzae Type b PRP-TT
9. Thông số hấp phụ của kháng nguyên biến độc tố bạch hầu (D), kháng nguyên biến độc tố uốn ván (T) và kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HepB) được hấp phụ riêng lẻ lên trên tá chất nhôm phosphat được cải thiện do đó cải thiện hoạt lực và khả năng gây miễn dịch.
10. Hàm lượng phèn (Al^{3+}) tối thiểu nhờ đó đảm bảo khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch được giảm.
11. Nồng độ của 2-phenoxyetanol (2-PE) làm chất bảo quản được tối ưu hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được nhằm để chứng minh các phương án thực hiện được ưu tiên của sáng chế. Các ví dụ cần được đánh giá cao bởi những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này trong đó các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ mà các kỹ thuật trình bày sau đây được phát hiện bởi các tác giả để thực hiện tốt trong thực tiễn

của sáng chế, và do đó có thể được cân nhắc để cấu thành các cách thức được ưu tiên với thực tiễn của nó. Tuy nhiên, những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, khi làm sáng tỏ bản mô tả, nên đánh giá đúng nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án thực hiện cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không tách khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1:

Bảng 1: Bảng này trình bày tóm tắt về tỷ lệ hấp phụ của các kháng nguyên riêng lẻ, số liệu về hoạt lực và độ ổn định của các kháng nguyên riêng lẻ trong vắc xin kết hợp SIIPL ở nhiệt độ 2-8°C trong khoảng thời gian 12 tháng.

Thử nghiệm	Giới hạn/Thông số	0 Ngày	6 tháng	12 tháng
Hoạt lực in-vivo của Hepatitis B (95% CL)	Ít nhất 1,0	Tuần thủ	NA	Tuần thủ
Hàm lượng Hib PRP ((µg/0.5 ml) (Tổng PRP)	Giá trị thực	8,1 µg/0,5ml	8,46 µg/0.5ml	10,03
Hoạt lực thành phần <i>Diphtheria</i> (IU/liều)	Ít nhất 30 IU/liều	98,5120 IU/liều (69,9650-137,247)	NA	95,8463 IU/liều
Hoạt lực thành phần <i>Tetanus</i> (IU/liều)	Ít nhất 40 IU/liều	139,030 IU/liều (88,2850-208,688)	NA	382,079 IU/liều
Hoạt lực thành phần ho gà (IU/liều)	Ít nhất 4 IU/liều	4,6749 IU/liều (2,6492-8,2763)	4,8410 IU/liều (2,7331-8,6081)	5,131
Hấp phụ Hepatitis-B (%)	Giá trị thực	89,44	82,65	75,52
Hấp phụ thành phần <i>Tetanus</i> (%)	Giá trị thực	59,0	41,0	NA
Hấp phụ thành phần <i>Diphtheria</i> (%)	Giá trị thực	79,0	72,0	NA
Kháng nguyên D (DU/0,5 ml)	Type 1= 40 DU / 0.5 ml, Type 2= 8 DU / 0.5 ml & Type 3= 32 DU / 0.5 ml (= 75 % giá trị danh nghĩa được chấp nhận)	Tuần thủ	Tuần thủ	Tuần thủ

NA- Không có sẵn

Bảng 2: Bảng này trình bày tóm tắt về tỷ lệ hấp phụ của các kháng nguyên riêng lẻ, số liệu về hoạt lực và độ ổn định của các kháng nguyên riêng lẻ trong vắc xin kết hợp ở nhiệt độ 25±2°C trong khoảng thời gian 12 tháng.

Thử nghiệm	Giới hạn/Thông số	0 Ngày	6 tháng	12 tháng
Hoạt lực in-vivo của Hepatitis B (95% CL)	Ít nhất 1,0	Tuân thủ	NA	Tuân thủ
Hàm lượng Hib PRP ((µg/0.5 ml) (Tổng PRP)	Giá trị thực	8,6 µg/0.5ml	8,20 µg/0,5ml	NA
Hoạt lực thành phần <i>Diphtheria</i> (IU/liều)	Ít nhất 30 IU/liều	98,5120 IU/liều (69,9650-137,247)	NA	96,5482 IU/liều (65,9292-137,687)
Hoạt lực thành phần <i>Tetanus</i> (IU/liều)	Ít nhất 40 IU/liều	139,030 IU/liều (88,2850-208,688)	NA	NA
Hoạt lực thành phần ho gà (IU/liều)	Ít nhất 4 IU/liều	4,6749 IU/liều (2,6492-8,2763)	4,5170 IU/liều (2,4894-8,2672)	3,4899 IU/liều (1,8699*-6,4750)
Hấp phụ Hepatitis-B (%)	Giá trị thực	89,44	83,92	83,00
Hấp phụ thành phần <i>Tetanus</i> (%)	Giá trị thực	59,0	31,0	40,0
Hấp phụ thành phần <i>Diphtheria</i> (%)	Giá trị thực	79,0	72,0	69,0
Kháng nguyên D (DU/0,5 ml)	Type 1= 40 DU / 0.5 ml, Type 2= 8 DU / 0.5 ml & Type 3= 32 DU / 0.5 ml (= 75 % giá trị danh nghĩa được chấp nhận)	Tuân thủ	Tuân thủ	Tuân thủ

NA- Không có sẵn

Ví dụ 2:

Ví dụ này trình bày tóm tắt về các chế phẩm vắc xin kết hợp khác nhau

Bảng 3: Chế phẩm vắc xin kết hợp 1

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	10-25 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	02-10 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	12-16 IOU
4	Kháng nguyên HBs	7-15 µg
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 7-13 µg

6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al^{3+})	Không lớn hơn 0,6 mg
8	2-Phenoxyetanol	2,5 mg
9	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 4: Chế phẩm vắc xin kết hợp 2

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	10-25 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	02-10 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	12-16 IOU
4	Kháng nguyên HBs	7-15 μ g
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 7-13 μ g
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al^{3+})	Không lớn hơn 0,6 mg
8	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 5: Chế phẩm vắc xin kết hợp 3

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	10 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	02 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	12 IOU
4	Kháng nguyên HBs	8 μ g
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 8 μ g
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al^{3+})	Không lớn hơn 0,6 mg
8	2-Phenoxyetanol	2,5 mg
9	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 6: Chế phẩm vắc xin kết hợp 4

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	10 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	02 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	12 IOU

4	Kháng nguyên HBs	8 µg
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 8 µg
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al ³⁺)	Không lớn hơn 0,6 mg
8	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 7: Chế phẩm vắc xin kết hợp 5

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	20 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	04 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	14 IOU
4	Kháng nguyên HBs	15 µg
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 10 µg
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al ³⁺)	Không lớn hơn 0,6 mg
8	2-Phenoxyetanol	2,5 mg
9	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 8: Chế phẩm vắc xin kết hợp 6

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	20 Lf
2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	4Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	14 IOU
4	Kháng nguyên HBs	15 µg
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 10 µg
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al ³⁺)	Không lớn hơn 0,6 mg
8	Natri clorua	4,5 mg

Bảng 9: Chế phẩm vắc xin kết hợp 7

Loại số	Thành phần công thức bào chế	Đơn vị kháng nguyên/0,5 ml liều
1	Biến độc tố bạch hầu (D)	25 Lf

2	Biến độc tố <i>Tetanus</i> (T)	10 Lf
3	Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	16 IOU
4	Kháng nguyên HBs	15 µg
5	Kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT	PRP 13 µg
6	IPV Type I (đơn vị kháng nguyên D)	40
	Type II (đơn vị kháng nguyên D)	8
	Type III (đơn vị kháng nguyên D)	32
7	Được hấp phụ trên nhôm photphat (Al ³⁺)	Không lớn hơn 0,6 mg
8	Natri clorua	4,5 mg

Vắc xin có thể chứa lượng nhỏ glutaraldehyde, formaldehyd, neomycin, streptomycin và polymixin B được sử dụng trong quá trình sản xuất.

Ví dụ 3:

Quy trình sản xuất lượng lớn cộng hợp *Haemophilus influenzae* type b

Toàn cảnh các bước của quy trình sản xuất lượng lớn cộng hợp *Haemophilus influenzae* type b được trình bày với sự trợ giúp của 53 bước của quy trình được mô tả ngắn gọn dưới đây:

Bước 1: Bình lắc giai đoạn cấy I (S1):

Lọ đựng hạt virus sống được sử dụng để cấy vào bình lắc giai đoạn cấy, có chứa 0,22 µm môi trường giống được lọc. Bình PETG 125 mL dùng một lần với thể tích làm việc 25 mL được sử dụng. Giai đoạn này được thực hiện trong máy lắc ủ với tốc độ khuấy trộn có kiểm soát (200 ± 50 vòng/phút) và nhiệt độ ($36 \pm 2^\circ\text{C}$). Sau khi đạt được mức độ tăng trưởng vi khuẩn thích hợp ($\text{OD}_{590} \geq 1,0$), việc nuôi cấy được chuyển sang giai đoạn cấy tiếp theo (giai đoạn S2), được mô tả trong bước 2. Nhuộm gram được thực hiện như một biện pháp kiểm soát trong quá trình để đảm bảo độ tinh khiết nuôi cấy (*cocobacilli* gram âm).

Bước 2: Bình lắc giai đoạn cấy II (S2):

Giai đoạn cấy S2 bao gồm 2 bình fernbach L (bình nuôi cấy tam giác) (S2A và S2B) với thể tích làm việc 800 mL. Bình S2A được sử dụng để đo OD_{590} , cho đến khi OD_{590} nằm trong tiêu chuẩn chấp nhận và bình S2B được sử dụng để nuôi cấy ở giai đoạn S3. Cả hai bình được tạo môi trường được khử trùng bằng bộ lọc, giống hệt với giai đoạn cấy S1. Bình giai đoạn S1 được sử dụng để cấy cả bình lắc giai đoạn II.

Giai đoạn này được thực hiện trong máy lắc ủ với tốc độ khuấy trộn có kiểm soát (200 ± 50 vòng/phút) và nhiệt độ ($36 \pm 2^\circ\text{C}$). Sau khi đạt được mức độ tăng trưởng vi khuẩn thích hợp ($\text{OD}_{590} \geq 1,0$), việc nuôi cấy được chuyển sang giai đoạn cấy tiếp theo (giai đoạn S3), được mô tả trong bước 3. Nhuộm gram được thực hiện như một biện pháp kiểm soát trong quá trình để đảm bảo độ tinh khiết nuôi cấy (*cocobacilli* gram âm).

Bước 3: Lên men giai đoạn nuôi cấy III:

Giai đoạn nuôi cấy S3 bao gồm thiết bị lên men 120 lít với thể tích làm việc 35 lít. Thiết bị lên men được tạo mẻ môi trường giống hệt với các giai đoạn nuôi cấy trước. Bình giai đoạn S2 được sử dụng để nuôi cấy trong thiết bị lên men nuôi cấy. Quá trình sinh trưởng được thực hiện ở nhiệt độ ($36 \pm 2^\circ\text{C}$), DO (điểm đặt 10%), khuấy trộn (300-600 vòng/phút), sục khí (1-5 LPM) và áp suất ngược (0,2 bar) trong thiết bị lên men nuôi cấy. Sau khi đạt được mức độ tăng trưởng vi khuẩn thích hợp ($\text{OD}_{590} \geq 1,0$), việc nuôi cấy được chuyển sang giai đoạn sản xuất tiếp theo (giai đoạn S4), được mô tả trong bước 4. Nhuộm gram được thực hiện như một biện pháp kiểm soát trong quá trình để đảm bảo độ tinh khiết nuôi cấy (*cocobacilli* gram âm).

Bước 4: Lên men sản xuất quy mô 1200 lít:

Thiết bị lên men sản xuất 1200 lít có thể tích làm việc 800 lít. Thiết bị lên men được tạo mẻ lên men với các thành phần môi trường cơ bản và khử trùng bằng hơi tại chỗ. Sau đó, các chất bổ sung môi trường khác nhau được thêm vào sau khi đi qua bộ lọc 0,22 μm . Thiết bị lên men được nuôi cấy với canh trường của giai đoạn S3 thu được từ bước 3. Quá trình lên men được thực hiện với nồng độ oxy hòa tan được kiểm soát (20% - điểm đặt), nhiệt độ ($36 \pm 2^\circ\text{C}$), độ pH (7,1-7,4), khuấy trộn (40-400 vòng/phút), sục khí (50 - 300 LPM) và áp suất ngược (0,2 bar). Hai que dinh dưỡng riêng biệt được thêm vào trong quá trình lên men. Quá trình sinh trưởng được theo dõi bằng cách đo OD_{590} ($\text{OD}_{590} \geq 3,5$) và quá trình lên men được coi là hoàn thành sau khi đạt đến giai đoạn ổn định. Trong suốt giai đoạn tăng trưởng và ổn định, sản phẩm polysaccharit được tiết ra và tích lũy trong môi trường nuôi cấy. Nhuộm gram được thực

hiện như một biện pháp kiểm soát trong quá trình để đảm bảo độ tinh khiết nuôi cấy (*cocobacilli* gram âm).

Bước 5: Xử lý Formalin:

Việc giảm vi sinh vật tạp nhiễm đạt được trong bước này bằng cách sử dụng tác nhân hóa học (formalin). Bổ sung formalin 0,1% vào và nước dùng lên men được ủ trong 2 giờ ít nhất ở 37°C. Sau khi xử lý formalin, bình được làm lạnh nhanh đến <15°C. Việc bổ sung formalin được xác nhận để đạt được việc giảm tạp nhiễm vi sinh vật. Điều này được xác minh bằng các tấm nuôi cấy sau giai đoạn nuôi cấy. Nước dùng đã giảm tạp nhiễm vi sinh vật đã sẵn sàng để thu hoạch như được mô tả trong bước 6.

Bước 6: Thu hoạch ly tâm liên tục:

Ly tâm liên tục được sử dụng như là một bước thu hoạch cơ bản. Bước này được thực hiện để tách polysaccharit chứa nước lên men khỏi sinh khối đã bắt hoạt. Máy ly tâm liên tục được sử dụng với mục tiêu loại bỏ > 90% sinh khối, được đo bằng mức giảm OD590. Ly tâm được vận hành ở mức xấp xỉ 15000 g và ở tốc độ dòng chất lỏng 200-500 lít/giờ. Phần nổi sau ly tâm được xử lý thêm như mô tả trong bước 7.

Bước 7: Lọc sâu 50LP:

Phần nổi sau ly tâm được đưa qua bộ lọc sâu 50LP để loại bỏ vật liệu thô như mảnh vụn tế bào. Bước này cho phép sản phẩm đi qua dịch lọc và phù hợp với bộ lọc sâu bổ sung, như được mô tả trong bước 8.

Bước 8: Lọc sâu 90LP:

Dịch lọc từ bộ lọc sâu 50LP tiếp tục được đưa qua bộ lọc sâu 90LP (định mức danh nghĩa 0,22 μm) để loại bỏ thêm bất kỳ vật liệu không hòa tan nào mà có thể không được giữ lại bởi bộ lọc sâu trước đó. Bước này đảm bảo rằng dịch lọc về cơ bản không có mảnh vụn tế bào và có thể đi qua bộ lọc 0,22 μm một cách chắc chắn. Bước lọc tiếp theo được mô tả trong bước 9.

Bước 9 và 10. Lọc 0,22 μm :

Dịch lọc từ bộ lọc sâu 90LP tiếp tục được đưa qua bộ lọc 0,22 μm , và dịch lọc được thu thập trong thùng giữ.

Bước 11 và 12. Cô đặc và lọc màng 100kD:

Bước này được thực hiện để loại bỏ các thành phần môi trường và tạp chất trọng lượng phân tử nhỏ. Ngoài ra, bước cô đặc được thực hiện để giảm thể tích làm việc. Màng lọc trọng lượng phân tử 100 kD được chọn vì trọng lượng phân tử của polysaccharit Hib (PRP) là ≥ 500 kD. Nước lên men được cô đặc đến khoảng 10 lần và sau đó được lọc màng cho thể tích ít nhất 5 bằng cách sử dụng bộ đệm PBS 0,01 M (pH 7,2). Sản phẩm thu được ở dạng sản phẩm cô đặc được gọi là PRP thô và được xử lý thêm như được mô tả trong bước 13. Nước đã cô đặc được chuyển đến khu vực DSP thông qua cổng chuyển qua bộ lọc 0,22 μm để đảm bảo rằng không có vi khuẩn nào được chuyển đến khu vực DSP.

Bước 13: Kết tủa CTAB:

CTAB (Cetyl-trimethyl ammonium Bromide) là một chất tẩy cation, được sử dụng để kết tủa polysaccharit. CTAB bao gồm một vùng ưa nước cũng như một phần kỵ nước và kết tủa protein, axit nucleic và polysaccharit. PRP thô thu được từ bước 12 được kết tủa ở nồng độ CTAB 1% và ủ trong hơn 2 giờ. Việc thu hoạch các viên kết tủa CTAB (pellet) được mô tả trong bước 14.

Bước 14, 15, và 16: Ly tâm viên kết tủa CTAB, thu gom và lưu trữ:

Trong SEZ-3, FF, viên kết tủa CTAB được ly tâm bằng máy ly tâm liên tục ở tốc độ 15000 vòng/phút. Các viên kết tủa CTAB được thu hoạch, cân, chia mẫu và lưu trữ ở ≤ -20 °C để tiếp tục xử lý. Đây là bước giữ đầu tiên trong quy trình.

Bước 17 và 18. Rã đông và hòa tan CTAB dạng sệt:

CTAB dạng sệt đông đá được rã đông ở nhiệt độ phòng. Các viên kết tủa đã rã đông được hòa tan trong dung dịch NaCl 5,85%. Việc hòa tan được thực hiện trong bể khuấy và sản phẩm polysaccharit được tan trong pha nước. Bể chứa một số vật liệu không hòa tan, mà đến từ protein kết tủa và axit nucleic. Huyền phù này được xử lý thêm như mô tả trong bước 19.

Bước 19: Ly tâm:

Vật liệu thu được từ bước 18 được ly tâm ở 2-8°C, 5000-6500 vòng/phút trong 20-30 phút để loại bỏ vật liệu không hòa tan. Phần nổi sau ly tâm được gom lại và xử lý thêm như mô tả trong bước 20.

Bước 20: Kết tủa cồn 72%:

Cồn 72% được sử dụng để kết tủa PRP. Cồn 96% được sử dụng để tạo ra nồng độ cồn 72% đối với phần nổi sau ly tâm thu được ở bước 19. Bước kết tủa này được thực hiện ở nhiệt độ 2-8°C qua đêm. Phần kết tủa được thu hoạch như mô tả trong bước 21.

Bước 21 và 22. Ly tâm và hòa tan viên kết tủa:

Sản phẩm kết tủa bằng cồn 72% được thu bằng cách ly tâm ở 2-8°C, 5000-6500 vòng/phút trong 20-30 phút. Viên kết tủa thu được được hòa tan trong W.F.I. cho đến khi nhìn được bằng mắt một cách rõ ràng. Quy trình xử lý tiếp theo của viên kết tủa được hòa tan được mô tả trong bước 23.

Bước 23: Kết tủa bằng DOC và cồn 32%:

Đối với vật liệu thu được từ bước 22, natri acetat 6% và natri deoxycholate (DOC) 1% được thêm vào. Cồn 96% được sử dụng để tạo ra cồn nồng độ 32% cuối cùng. Cả DOC và cồn 32% đều dẫn đến sự kết tủa của tạp chất protein, đồng thời cho phép polysacarit ở trong pha lỏng. Bước kết tủa này được thực hiện ở nhiệt độ 2-8°C qua đêm (ít nhất là 8 hrs).

Bước 24: Ly tâm:

Vật liệu thu được từ bước 23 được ly tâm ở 2-8°C, 5000-6500 vòng/phút trong 20-30 phút để loại bỏ kết tủa. Phần nổi sau ly tâm được gom lại và xử lý thêm như mô tả trong bước 25.

Bước 25: Lọc sâu và lọc cacbon:

Dung dịch nổi sau ly tâm thu được ở bước 24 chứa PRP hòa tan và được lọc sâu sau đó là lọc cacbon để loại bỏ axit nucleic và chất màu. Việc loại bỏ axit nucleic được theo dõi bằng cách đo độ hấp thụ không liên tục ở 260nm (A_{260}). Sau khi đạt

được mục tiêu A_{260} , dung dịch được lọc qua bộ lọc 0,22 μ m và dung dịch được lọc này tiếp tục được xử lý như mô tả trong bước 26.

Bước 26: Kết tủa còn 64%:

Vật liệu được lọc thu được ở bước 25 được kết tủa thêm bằng cồn 96% ở nồng độ cồn cuối cùng là 64%. Bước kết tủa này được thực hiện ở nhiệt độ 2-8°C qua đêm. Phần kết tủa thu được được thu hoạch bằng cách ly tâm và được xử lý thêm như mô tả trong bước 27.

Bước 27: Thu viên kết tủa và hòa tan:

Dịch nổi được gạn và loại bỏ để thu các viên kết tủa. Các viên kết tủa được hòa tan trong W.F.I. ở nhiệt độ phòng.

Bước 28: Cô đặc và lọc màng 300 KD:

Dung dịch viên kết tủa đã hòa tan được cô đặc sử dụng màng NMWCO 300 kD. Dung dịch này còn được lọc thêm không ít hơn 8 lần bằng W.F.I. Sản phẩm cô đặc thu được được xử lý thêm như mô tả trong bước 29.

Bước 29 và 30. Lọc 0,22 μ m và lưu trữ PRP tinh khiết:

Sản phẩm cô đặc UF 300 kD được cho đi qua bộ lọc 0,22 μ m như bước làm sạch để giảm thiểu vi sinh vật tạp nhiễm. PRP tinh khiết thu được được sắp xếp lại và được lưu trữ ở $\leq -20^{\circ}\text{C}$ cho đến khi sử dụng tiếp như mô tả trong bước 31. Mẫu PRP tinh khiết được gửi đi phân tích Q.C..

Bước 31: Rã đông và gom lại:

Dựa trên kích thước mẻ vắc xin cộng hợp, lượng polysacarit tự nhiên thích hợp thu được từ bước 30 được rã đông. Vật liệu được gom được thử nghiệm hàm lượng PRP, mà cần cho bước xử lý tiếp theo như được mô tả trong bước 32.

Bước 32: Cô đặc 100 kD:

Polysacarit tinh khiết gom được được yêu cầu phải có nồng độ tối thiểu (8-12 mg/mL) để xử lý tiếp. Nếu nồng độ polysacarit gom được nằm dưới mức mục tiêu, dung dịch polysacarit gom được được cô đặc bằng cách sử dụng màng UF NMWCO

100 kD. Mẫu được rút ra sau khi cô đặc để đảm bảo đạt được nồng độ tối thiểu cho các bước tiếp theo (bước 33).

Bước 33: Phản ứng khử polyme kiềm:

Polysacarit đã cô đặc (tương đương 74g/110g) thu được từ bước 32 được khử polyme trong điều kiện kiềm nhẹ bằng cách sử dụng đệm cacbonat-bicacbonat. Sau khi đạt được kích thước polysacarit mục tiêu, polysacarit bị khử polyme được kích hoạt như mô tả trong bước 34.

Bước 34: Kích hoạt polysacarit:

Polysacarit khử polyme thu được ở bước 33 được kích hoạt bằng Cyanogen Bromide. Bước kích hoạt này được thực hiện trong môi trường nitơ. Cyanogen bromide là hóa chất có độc tính cao và được thao tác thích hợp trong khi xử lý hóa chất này.

Bước 35: Liên kết đính kèm:

Dung dịch dihydrazide axit adipic (ADH) mới điều chế được bổ sung trong vòng 6-10 phút vào hỗn hợp phản ứng thu được từ bước 34. Phản ứng được thực hiện trong ít nhất 16 giờ ở nhiệt độ 2-10°C. Vai trò của liên kết ADH là cung cấp các nhóm amin trong polysacarit cần thiết cho phản ứng cộng hợp.

Bước 36: Cô đặc và lọc màng:

Hỗn hợp phản ứng thu được từ bước 35 được cô đặc và lọc màng thể tích theo thể tích bằng nước muối đệm photphat (PBS) sử dụng màng UF NMWCO 10 kD để loại bỏ ADH tự do. Việc loại bỏ ADH được theo dõi trên HPLC và quá trình lọc màng được tiếp tục cho đến khi mức ADH tự do đạt dưới 5%. Sản phẩm cô đặc thu được được lọc thêm với bộ đệm MES-NaCl ít nhất 5X. Sản phẩm thu được được cô đặc thêm để đạt được nồng độ ít nhất là 20 mg/mL. PRP được xử lý cô đặc này được giữ ở nhiệt độ 2 - 8°C cho đến khi sử dụng tiếp như được mô tả trong bước 37.

Bước 37 và 38. Lọc 0,22 µm và lưu trữ PRP tinh khiết:

Sản phẩm cô đặc thu được từ bước 36 được chuyển qua bộ lọc 0,22µm, đóng vai trò như một bước làm sạch. Điều này cũng để đảm bảo rằng mức tạp nhiễm vi sinh vật

được kiểm soát trong quy trình, được thực hiện trong khu vực cấp C. Polysacarit đã hoạt hóa được lọc được gom, lấy mẫu, chia mẫu và bảo quản ở 2-8°C cho đến khi xử lý thêm. Mẫu được lấy từ nhóm polysacarit đã xử lý để phân tích, mà có kích thước phân tử PRP (kD), hàm lượng PRP và mức độ kích hoạt PRP. Quá trình xử lý tiếp theo của PRP đã xử lý được mô tả trong bước 40.

Bước 39: Cô đặc và lọc màng 10 KD TT:

Phản ứng cộng hợp đòi hỏi hai thành phần đó là polysacarit đã xử lý và protein mang (TT). Protein mang được cô đặc và được lọc màng với đệm MES-NaCl sử dụng màng UF NMWCO 10 kD. Protein mang đã được lọc này sau đó được cô đặc thêm đến nồng độ ít nhất là 20 mg/mL sử dụng cùng một màng.

Bước 40: Cộng hợp:

Phản ứng cộng hợp đòi hỏi hai thành phần đó là polysacarit đã xử lý và protein mang (TT). Thành phần polysacarit được kích hoạt thu được từ bước 38. Protein mang thu được từ bước 39. Hai thành phần này được trộn với lượng thích hợp theo tỷ lệ PRP: TT = 1:1 (trọng lượng/trọng lượng) dưới điều kiện khuấy EDC. Phản ứng cộng hợp được theo dõi trên HPLC và được tiếp tục cho đến khi đạt được sự chuyển đổi protein $\geq 85\%$ (dựa trên sự chuyển đổi protein tự do thành cộng hợp).

Bước 41: Làm nguội:

Sau khi phản ứng cộng hợp đã tiến hành đạt các tiêu chí chấp nhận về chuyển đổi (bước 40), phản ứng được kết thúc bằng cách làm nguội. Phản ứng cộng hợp được làm nguội bằng cách sử dụng dung dịch đệm EDTA. Phản ứng cộng hợp này được xử lý thêm như mô tả trong bước 42.

Bước 42: Lọc 30SP và 0,22 μm :

Sản phẩm cộng hợp thu được từ bước 41 được lọc qua bộ lọc 30 SP sau đó là lọc 0,22 μm . Điều này đảm bảo loại bỏ bất kỳ thành phần lớn nào. Sản phẩm cộng hợp đã lọc được xử lý thêm như mô tả trong bước 43.

Bước 43: Siêu lọc và lọc màng 300 KD:

Hỗn hợp phản ứng cộng hợp thu được từ bước 42 được lọc với nước muối 0,05% sử dụng màng UF NMWCO 300 kD. Việc lọc màng được thực hiện để loại bỏ các chất phản ứng cộng hợp và thành phần không phản ứng. Sản phẩm cô đặc thu được được xử lý thêm như mô tả trong bước 44.

Bước 44 và 45: Lọc 0,22 μm và lưu trữ sản phẩm cộng hợp thô:

Sản phẩm cô đặc thu được từ bước 43 được chuyển qua bộ lọc 0,22m, đóng vai trò như một bước làm sạch. Điều này cũng để đảm bảo rằng mức tạp nhiễm vi sinh vật được kiểm soát trong quy trình, được thực hiện trong khu vực cấp C. Sản phẩm cộng hợp thô đã lọc được gom, lấy mẫu và bảo quản ở 2-8°C cho đến khi xử lý thêm. Quy trình xử lý tiếp theo sản phẩm cộng hợp thô được mô tả trong bước 46.

Bước 46: Pha loãng sản phẩm cộng hợp thô:

Sản phẩm cộng hợp thô từ bước 45 được pha loãng với W.F.I. đến nồng độ mục tiêu là $4 \pm 1 \text{ mg/mL}$, nếu cần và được xử lý thêm bằng các bước kết tủa được mô tả trong bước 47.

Bước 47: Kết tủa amoni sunfat:

Hỗn hợp phản ứng cộng hợp đã pha loãng được xử lý thêm để loại bỏ PRP tự do bằng cách sử dụng amoni sunfat (dung dịch gốc 50% w/v). Bước kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ dưới 15°C trong điều kiện khuấy. Bước kết tủa dẫn sản phẩm cộng hợp trong sản phẩm kết tủa và để lại PRP tự do trong phần nổi. Sau khi thêm amoni sunfat, huyền phù thu được được bảo quản ở nhiệt độ dưới 15°C mà không khuấy ít nhất trong 12 giờ

Bước 48: Thu viên kết tủa và hòa tan:

Huyền phù thu được từ bước 47 được ly tâm ở khoảng 7000 g tại nhiệt độ 2-8°C trong 40 ± 10 phút. Phần nổi được loại bỏ bằng cách gạn và viên kết tủa thu được được hòa tan trong nước muối-Tris.

Bước 49: Lọc màng 300 kD:

Dung dịch thu được từ bước 48 được lọc qua bộ lọc sâu 30 SP và được lọc màng với nước muối-Tris 20 mM sử dụng màng NMWCO 300 kD.

Bước 50: Tinh sạch sắc ký GPC:

Dung dịch thu được từ bước 49 được nạp vào cột GPC khoảng 70 lít có chứa gel hạt polymer hydroxylated methacrylic hoyopearl HW-65F cho bước sắc ký loại trừ theo kích thước. Việc sử dụng sắc ký GPC cho sản phẩm cộng hợp đã xử lý (sau amoni sunfat) làm giảm mức PRP tự do trong vật liệu thu được. Cột được rửa giải bằng Tris 20 mM, NaCl 0,9% và các phân đoạn được gom dựa vào A_{280} . Các phân đoạn phù hợp dựa trên các tiêu chí chấp nhận liên quan đến PRP tự do, tỷ lệ và kích thước phân tử được gom lại và sản phẩm gom được xử lý thêm, như được mô tả trong Bước 51.

Bước 51: Lọc màng 300 kD:

Nước giải hấp phụ sản phẩm cộng hợp gom được từ bước 50 được lọc với Tris 20 mM sử dụng màng UF NMWCO 300 kD. Thể tích sản phẩm cô đặc này được đặt mục tiêu sao cho hàm lượng PRP trong đó xấp xỉ 1 mg/mL.

Bước 52 và 53. Lọc 0,22 μ m:

Sản phẩm cộng hợp số lượng lớn thu được từ bước 51 được lọc qua bộ lọc 0,22 μ m dưới môi trường cấp A để đảm bảo vô trùng. Bộ lọc 0,22m được kiểm tra độ nguyên vẹn. Mẫu từ sản phẩm cộng hợp số lượng lớn đã lọc được gửi đi phân tích việc hoàn thành Q.C.. Sản phẩm cộng hợp đã lọc được dán nhãn là "Sản phẩm cộng hợp số lượng lớn Hib vô trùng" và được lưu trữ ở 2-8°C. Sản phẩm cộng hợp số lượng lớn sẽ được lưu trữ ở nhiệt độ 2-8°C trong tối đa 3 tháng và sau đó nếu không sử dụng, nó có thể được lưu trữ ở nhiệt độ -70 ° C trong tổng thời gian lên tới 1 năm.

Các thông số về chất lượng của kháng nguyên cộng hợp Hib PRP-TT thu được như sau:

Hàm lượng PRP (μ g/0,5ml): 8,1

Tỷ lệ (PRP:TT): 0,5

PRP tự do (%): 4,8%

PMW (kD): 983

Avg MW (kD) 752

Ví dụ 4:

Phương pháp bất hoạt kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP):

Tối ưu hóa phương pháp bất hoạt được thực hiện sau khi thực hiện các thử nghiệm khác nhau, bao gồm bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 phút với sự có mặt của formaldehyd, 56°C trong 15 phút với sự có mặt của formaldehyd, 56°C trong 10 phút với sự có mặt của hymine, 56°C trong 15 phút với sự có mặt của hymine và chỉ bằng nhiệt ở 56 ° C trong 30 phút. Không có sự khác biệt đáng kể về hoạt lực đã được quan sát với các phương pháp này. Trong số các phương pháp này, bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 phút với sự có mặt của formaldehyd được chọn vì khối lượng tế bào ho gà được sản xuất bằng phương pháp này đồng nhất hơn so với các phương pháp khác được đề cập ở trên.

Quy trình sản xuất kháng nguyên wP bất hoạt bao gồm các bước sau:

- a). bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 đến 15 phút trong sự có mặt của formaldehyd của các chủng *Bordetella pertussis* 134
- b). bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 đến 15 phút trong sự có mặt của formaldehyd của các chủng *Bordetella pertussis* 509
- b). bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 đến 15 phút trong sự có mặt của formaldehyd của các chủng *Bordetella pertussis* 25525 và 6229
- b). bất hoạt ở nhiệt độ 56°C trong 10 đến 15 phút trong sự có mặt của formaldehyd của các chủng *Bordetella pertussis* 6229
- d). sau đó trộn các chủng *Bordetella pertussis* đã bất hoạt 134, 509, 25525 và 6229 với tỉ lệ 1:1:0,25:0,25.
- e). tùy ý được hấp phụ lên trên tá chất có nguồn gốc từ nhôm

Quy trình này không có thimerosal và kháng nguyên ho gà toàn tế bào bất hoạt vẫn không vón cục và đồng nhất do đó dẫn đến giảm khả năng gây phản ứng liên hệ miễn dịch và mang lại hoạt lực tốt hơn trong thời gian dài hơn.

Ví dụ 5: Quy trình sản xuất virus bại liệt bất hoạt (IPV)

Virus bại liệt có thể được nuôi cấy theo phương pháp sau:

- dòng tế bào CCL81-VERO (thận khỉ) đã được sử dụng làm tế bào chủ để nuôi cấy virus bại liệt tức là các chủng sabin và salk.

- Sau khi lây nhiễm các tế bào chủ với chủng virus bại liệt mong muốn và ủ trong 72 giờ, môi trường chứa virus và mảnh vụn tế bào được gom lại và thu trong một vật chứa.

- Dịch lọc được lọc theo cách lọc dòng tiếp tuyến với băng 100KDa; lọc bằng cách sử dụng đệm photphat và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion.

- Trước khi dùng cho bệnh nhân, virus phải được bất hoạt bằng các phương pháp bất hoạt thích hợp.

Bất hoạt bằng formalin bao gồm các bước sau:

- a) Virus đã tinh sạch được gom đã được thay đổi đệm từ đệm photphat sang đệm tris trong phạm vi (30 đến 50mM) có độ pH trong khoảng từ 7 đến 7,5,

- b) Môi trường M-199 chứa glycine (5gm/l) đã được thêm vào hỗn hợp trên

- c) Formaldehyd nồng độ 0,025% đã được thêm vào và sau đó được đảo trộn,

- d) Hỗn hợp sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 đến 13 ngày ở điều kiện khuấy liên tục khối virus trên máy khuấy từ.

- e) Hỗn hợp sau khi ủ được đưa qua hệ thống TFF trung gian ((100 KDa, 0,1 m²) ở ngày 7 và cuối cùng lọc sau khi bất hoạt

- f) Sau đó khối đã lọc được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C

- g) thực hiện phản ứng ELISA D-Ag để xác định đơn vị D-Ag

Ví dụ 6:

Ví dụ này trình bày tóm tắt về quy trình sản xuất chế phẩm vắc xin kết hợp bao gồm D, T, wP, HBsAg, cộng hợp Hib PRP-TT và IPV:

1. Quy trình bào chế thành phần I:

- a). chuyển nhôm photphat vào vật chứa/bình

- b). bổ sung biến độc tố bạch hầu
 - c). điều chỉnh độ pH về 4,5 đến 5,5 bằng axit axetic/natri hydroxit
 - d). Đợi cho ổn định
 - e). điều chỉnh độ pH về 5,5 đến 6,5 bằng natri hydroxit/natri cacbonat
 - f). Đợi cho ổn định
2. Quy trình bào chế thành phần I:
- a). chuyển nhôm photphat vào vật chứa/bình
 - b). bổ sung biến độc tố uốn ván
 - c). điều chỉnh độ pH về 4,5 đến 5,5 bằng axit axetic/natri hydroxit
 - d). Đợi cho ổn định
 - e). điều chỉnh độ pH về 5,5 đến 6,5 bằng natri hydroxit/natri cacbonat
 - f). Đợi cho ổn định
3. Quy trình bào chế thành phần III:
- a). chuyển nhôm photphat vào vật chứa/bình
 - b). bổ sung kháng nguyên bề mặt Hepatitis B
 - c). điều chỉnh độ pH về 4,5 đến 5,5 bằng axit axetic/natri hydroxit
 - d). Đợi cho ổn định
 - e). điều chỉnh độ pH về 5,5 đến 6,5 bằng natri hydroxit/natri cacbonat
 - f). Đợi cho ổn định
4. Trộn thành phần I trong thành phần II và khuấy trộn tại nhiệt độ phòng.
5. Kháng nguyên wP bất hoạt đã được bổ sung vào hỗn hợp trên, sau đó khuấy trộn ở nhiệt độ phòng.
6. Thành phần III đã được bổ sung vào hỗn hợp thu được trong bước 5 ở nhiệt độ phòng.

7. Sản phẩm cộng hợp Hib PRP đã được bổ sung vào hỗn hợp thu được trong bước 6 ở nhiệt độ 6 – 16°C.

8. Kháng nguyên IPV đã được bổ sung vào hỗn hợp thu được trong bước 6 ở nhiệt độ 6 – 16°C.

9. 2-Phenoxyetanol đã được bổ sung vào hỗn hợp thu được trong bước 7 ở nhiệt độ 6 – 16°C.

10. Kiểm tra độ pH, nếu cần điều chỉnh về pH 6,0 đến 7,0 bằng natri hydroxit/natri cacbonat

11. NaCl đã được bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước 10, sau đó khuấy trong 3 giờ.

Ví dụ 7:

Các nghiên cứu về độc tính của vắc xin 6 thành phần

Các nghiên cứu độc tính sau đây đã được thực hiện với vắc xin DTwP-HepB-IPV-Hib theo kế hoạch nghiên cứu tuân thủ theo Schedule ‘Y’ và các hướng dẫn của WHO về đánh giá các vắc xin phi lâm sàng và theo nguyên tắc thực hành phòng thí nghiệm tốt OECD.

1. Nghiên cứu độc tính liều đơn ở chuột Sprague Dawley bằng đường tiêm dưới da

Tổng cộng có 20 con chuột đực và 20 con chuột cái trong độ tuổi 5-6 tuần khi bắt đầu điều trị được chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm. Mỗi nhóm gồm 5 chuột đực và 5 chuột cái. Việc sẵn sàng sử dụng giả dược, tá chất, vắc xin đơn liều và vắc xin đa liều DTwP-HepB-IPV-Hib được tiêm qua đường dưới da. Chuột được quan sát trong 14 ngày sau tiêm.

2. Nghiên cứu độc tính liều lặp lại ở chuột Sprague Dawley bằng đường tiêm dưới da

Tổng cộng có 100 con chuột đực và 100 con cái được phân bổ ngẫu nhiên vào các nhóm chính và thu hồi. Việc sẵn sàng sử dụng kiểm soát giả dược, kiểm soát tá chất, vắc xin đơn liều và vắc xin đa liều DTwP-HepB-IPV-Hib được tiêm chậm bằng

cách tiêm bắp sâu vào các ngày 1, 29, 57 và 85. Động vật trong nhóm thu hồi không được xử lý và quan sát trong 28 ngày.

3. Nghiên cứu độc tính liều đơn ở thỏ trắng New Zealand bằng đường tiêm dưới da

Tổng cộng có 16 con chuột đực và 16 con cái được chia ngẫu nhiên vào các nhóm. Việc sẵn sàng sử dụng giả dược, tá chất, vắc xin đơn liều và vắc xin đa liều DTwP-HepB-IPV-Hib được tiêm qua đường dưới da vào mỗi con của nhóm tương ứng. Các con thỏ được tiêm liều đơn dưới da và quan sát trong 15 ngày.

4. Nghiên cứu độc tính liều lặp lại ở thỏ trắng New Zealand bằng đường tiêm dưới da

Tổng cộng có 40 con chuột đực và 40 con cái được phân bổ ngẫu nhiên vào các nhóm chính và thu hồi. Việc sẵn sàng sử dụng kiểm soát giả dược, kiểm soát tá chất, vắc xin đơn liều và vắc xin đa liều DTwP-HepB-IPV-Hib khác nhau được tiêm chậm bằng cách tiêm bắp sâu vào các ngày 1, 29, 57 và 85. Động vật trong nhóm thu hồi không được xử lý và quan sát trong 28 ngày.

Dựa trên các kết quả, người ta đã kết luận rằng vắc xin sáu thành phần đơn liều và đa liều [Bạch hầu, uốn ván, ho gà (toàn tế bào), viêm gan-B, bại liệt (bất hoạt) và vắc xin cộng hợp *Haemophilus influenzae* type b (đã hấp phụ)] không được tạo ra bất kỳ tác dụng phụ toàn thân nào ở chuột Sprague-Dawley và thỏ trắng New Zealand khi liều đơn dành cho người (0,5 ml) được sử dụng bằng đường tiêm dưới da hoặc trong tiêm bắp sâu trong các điều kiện thử nghiệm được sử dụng. Các phản ứng viêm tại chỗ tiêm cục bộ và phát hiện đáp ứng miễn dịch được quan sát trong các nhóm được xử lý vắc xin được mong đợi và thường được quan sát trong các nghiên cứu độc tính với việc sử dụng vắc xin có tá chất nhôm. Do đó, mục thử nghiệm 'DTwP-HepB-IPV- Hib Vaccine, ở liều cao nhất 0,5 ml/con (liều cho người) được coi là không có mức độ hiệu quả bất lợi được quan sát (No Observed Adverse Effect Level-NOAEL), trong điều kiện thử nghiệm và liều lượng sử dụng.

Ví dụ 8:

Bảng 10: Bảng này cung cấp so sánh về phần trăm hấp phụ của các kháng nguyên riêng lẻ, hoạt lực, hàm lượng PRP tự do giữa vắc xin kết hợp của SIIPL và Easy Six (Panacea):

	Vắc xin kết hợp của SIIPL	Vắc xin kết hợp Panacea Easy-Six TM
Phần trăm hấp phụ 'D' (%)	79,0	38,0
Phần trăm hấp phụ 'T' (%)	59,0	30
Phần trăm hấp phụ 'HBsAg' (%)	95,44	Lớn hơn 95,0
Hoạt lực 'D' (IU/liều)	98,5120	Lớn hơn 40
Hoạt lực 'T' (IU/liều)	139,030	Lớn hơn 50
Hoạt lực in-vitro 'HBsAg' (µg/ml)	35,490 (34,210-36,818)	23,167
Hoạt lực in-vivo 'HBsAg' (R/P)	1,07 (0,74-1,57)	0,71 (0,42-1,13)
Hoạt lực 'wP' (IU/liều)	4,6749 (2,6492-8,2763)	3,2221 (1,8032-5,7706)
HIB (tổng PRP) µg/0,5ml	8,1	13,20
HIB (PRP tự do) (%)	4,8	18,45
Formaldehyd tự do (%W/V)	0,0013	0,0011
Hàm lượng 2-Phenoxyetanol (mg/0,5ml)	2,71	3,3
Hàm lượng nhôm tổng số (mg/0,5ml)	0,2863	0,6034
Kháng nguyên 'IPV' D (DU/0,5ml)	Type-I=39,046 Type-II=7,280 Type III=33,058	Type-I=43,504 Type-II=8,056 Type III=39,840

D = kháng nguyên biến độc tố bạch hầu

T = kháng nguyên biến độc tố uốn ván

wP = kháng nguyên ho gà toàn tế bào

HBsAg = kháng nguyên bề mặt *Hepatitis B*

IPV = kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt

Ads. (%) = Phần trăm hấp phụ của kháng nguyên lên trên muối nhôm (Al³⁺)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch, trong đó mỗi 0,5 ml chế phẩm bao gồm:
 - (i) biến độc tố bạch hầu, (D) nằm trong khoảng từ 10 Lf đến 25 Lf, được hấp phụ trên muối nhôm có tỷ lệ hấp phụ ít nhất là 50%;
 - (ii) biến độc tố uốn ván, (T) nằm trong khoảng từ 2 Lf đến 10 Lf, được hấp phụ trên muối nhôm có tỷ lệ hấp phụ ít nhất là 40%;
 - (iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào bất hoạt (wP) chứa các chủng Bordetella ho gà bất hoạt 134, 509, 25525 và 6229 với tỷ lệ 1:1:0,25:0,25, trong khoảng từ 12 IOU đến 16 IOU;
 - (iv) kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B, (HBsAg) nằm trong khoảng từ 7 µg đến 15 µg, được hấp phụ trên muối nhôm có tỷ lệ hấp phụ ít nhất là 70%;
 - (v) sacarit thuộc vỏ ngoài của *Haemophilus influenzae* type b được cộng hợp với biến độc tố uốn ván như một protein mang sử dụng CNBr làm tác nhân xyanua hóa, trong khoảng từ 7 µg đến 13 µg;
 - (vi) kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt, (IPV) tương ứng chứa kháng nguyên IPV tuýp (type) 1 trong khoảng từ 1 - 50 DU, type 2 trong khoảng từ 1 - 20 DU hoặc type 3 trong khoảng từ 1 - 50 DU;
 - (vii) hàm lượng nhôm tổng số (Al³⁺) dưới dạng tá dược photphat nhôm trong khoảng từ 0,1 mg đến 0,5 mg
 - (viii) 2-phenoxyetanol làm chất bảo quản với hàm lượng từ 1 mg đến 3 mg; và
 - (ix) môi trường pha loãng hoặc đệm trong khoảng 0,5 % đến 1,5% NaCltrong đó chế phẩm là vắc xin kết hợp dạng hoàn toàn lỏng.
2. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó các kháng nguyên IPV là các chủng Salk được chọn từ nhóm gồm Mahoney type 1, MEF type 2 và Saukett type 3 hoặc các chủng Sabin được chọn từ nhóm gồm type 1, type 2 và type 3.

3. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hib là polysacarit polyribosylribitol photphat (polyribosylribitol phosphase - PRP) Hib được cộng hợp với protein mang sử dụng hóa học cộng hợp xyanua hóa hoặc hóa học cộng hợp amin hóa khử, trong đó chất xyanua hóa đã nêu được chọn từ xyanogen bromit, 1-xyano-4-dimetylaminopyridini tetrafloroborat (CDAP) 1-xyano-4-pyrrolidinopyridini tetrafloroborat (CPPT), 1-xyanoimidazole cụ thể (1-CI), 1-xyanobenzotriazole (1-CBT) hoặc 2-xyanopyridazin-3(2H)one (2-CPO).

4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên ho gà toàn tế bào bị bất hoạt, kháng nguyên Hib và kháng nguyên virus bại liệt bất hoạt về cơ bản không được hấp phụ lên trên bất kỳ tá chất nào.

5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 10 Lf trên mỗi 0,5 ml đến 25 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 2 Lf trên mỗi 0,5 ml đến 10 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 12 IOU trên mỗi 0,5 ml đến 16 IOU trên mỗi 0,5 ml; HBsAg với lượng nằm trong khoảng từ 7 µg trên mỗi 0,5 ml đến 15 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hib với lượng nằm trong khoảng 7 µg trên mỗi 0,5 ml đến 13 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên IPV lần lượt, Salk type 1 với lượng nằm trong khoảng từ 1 - 50 DU, Salk Type 2 với lượng nằm trong khoảng 1 - 20 DU hoặc Salk type 3 với lượng nằm trong khoảng 1 - 50 DU, trên mỗi 0,5 ml; nhôm photphat với lượng nằm trong khoảng 0,1 mg trên mỗi 0,5 ml đến 2,5 mg trên mỗi 0,5 ml; 2-phenoxyetanol với lượng nằm trong khoảng 1 mg trên mỗi 0,5 ml đến 6 mg trên mỗi 0,5 ml; natri clorua với lượng nằm trong khoảng 0,5% đến 1,5%.

6. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 10 Lf trên mỗi 0,5 ml đến 25 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 2 Lf trên mỗi 0,5 ml đến 10 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 12 IOU trên mỗi 0,5 ml đến 16 IOU trên mỗi 0,5 ml; HBsAg với lượng nằm trong khoảng từ 7 µg trên mỗi 0,5 ml đến 15 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hib với lượng nằm trong khoảng 7 µg trên mỗi 0,5 ml đến 13 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên IPV lần lượt,

Sabin type 1 với lượng nằm trong khoảng từ 1 - 50 DU, Sabin Type 2 với lượng nằm trong khoảng 1 - 20 DU hoặc Sabin type 3 với lượng nằm trong khoảng 1 - 50 DU, trên mỗi 0,5 ml; nhôm photphat với lượng nằm trong khoảng 0,1 mg trên mỗi 0,5 ml đến 2,5 mg trên mỗi 0,5 ml; 2-phenoxyetanol với lượng nằm trong khoảng 1 mg trên mỗi 0,5 ml đến 6 mg trên mỗi 0,5 ml; natri clorua với lượng nằm trong khoảng 0,5% đến 1,5%.

7. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 10 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên T với lượng khoảng 2 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên wP với lượng khoảng 12 IOU trên mỗi 0,5 ml; HBsAg với lượng khoảng 8 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hib với lượng khoảng 8 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên IPV lần lượt, Salk type 1 với lượng khoảng 40 DU, Salk Type 2 với lượng khoảng 8 DU hoặc Salk type 3 với lượng khoảng 32 DU, trên mỗi 0,5 ml; nhôm photphat với lượng khoảng 1,25 mg trên mỗi 0,5 ml ; 2-phenoxyetanol với lượng khoảng 2,5 mg trên mỗi 0,5 ml; natri clorua với lượng khoảng 0,9%.

8. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 20 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên T với lượng khoảng 4 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên wP với lượng khoảng 14 IOU trên mỗi 0,5 ml; HBsAg với lượng khoảng 15 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hib với lượng khoảng 10 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên IPV lần lượt, Salk type 1 với lượng khoảng 40 DU, Salk Type 2 với lượng khoảng 8 DU hoặc Salk type 3 với lượng khoảng 32 DU, trên mỗi 0,5 ml; nhôm photphat với lượng khoảng 1,25 mg trên mỗi 0,5 ml ; 2-phenoxyetanol với lượng khoảng 2,5 mg trên mỗi 0,5 ml; natri clorua với lượng khoảng 0,9%.

9. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 25 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên T với lượng khoảng 10 Lf trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên wP với lượng khoảng 16 IOU trên mỗi 0,5 ml; HBsAg với lượng khoảng 15 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên Hib với lượng khoảng 13 µg trên mỗi 0,5 ml; kháng nguyên IPV lần lượt, Salk type 1 với lượng khoảng 40 DU, Salk type 2 với lượng khoảng 8 DU hoặc Salk type 3 với lượng

khoảng 32 DU, trên mỗi 0,5 ml; nhôm photphat với lượng khoảng 1,25 mg trên mỗi 0,5 ml ; 2-phenoxyetanol với lượng khoảng 2,5 mg trên mỗi 0,5 ml; natri clorua với lượng khoảng 0,9%.