



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

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

(11)



1-0049420

(51)^{2023.01} A61K 39/116; A61K 39/08; A61K 39/10; A61K 39/102; A61K 39/13; A61P 31/20; A61K 39/295; A61K 39/39; A61K 9/08; A61P 31/04; A61P 31/14; A61P 31/16; A61K 39/05; A61K 39/29 (13) B

(21) 1-2023-08029

(22) 19/04/2022

(86) PCT/JP2022/018211 19/04/2022

(87) WO 2022/224966 27/10/2022

(30) 2021-070897 20/04/2021 JP

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/10/2024 439SC

(73) KM BIOLOGICS CO., LTD. (JP)

1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 8608568, Japan

(72) YAMASHITA, Shun (JP); SHIRAI, Tatsuya (JP); DAIMON, Kazuhiro (JP); MINODA, Tomohiro (JP); AKASAKI, Shinji (JP); ISHIKAWA, Kanae (JP); IWATA, Haruna (JP).

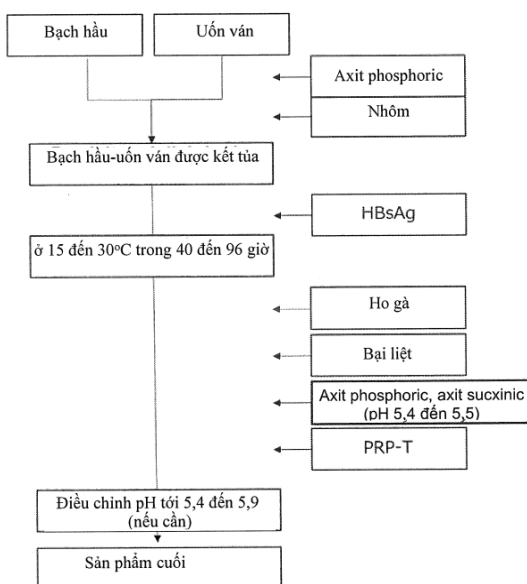
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM DẠNG LÔNG ỔN ĐỊNH CỦA VACCIN KẾT HỢP SÁU LOẠI VÀ CHẾ PHẨM DẠNG LÔNG ỔN ĐỊNH CỦA VACCIN KẾT HỢP SÁU LOẠI ĐƯỢC SẢN XUẤT BỞI PHƯƠNG PHÁP NÀY

(21) 1-2023-08029

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng lỏng của vaccin kết hợp sáu loại chứa DPT-IPV-Hib-HBs, trong đó kháng nguyên HBs được hấp phụ và duy trì ổn định vào chất phụ trợ nhôm, và PRP làm kháng nguyên Hib được liên kết và duy trì ổn định với protein mang. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại chống lại bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB), phương pháp này bao gồm các bước sau đây: (1) trộn giải độc tố bạch hầu (D) và giải độc tố uốn ván (T) với chất phụ trợ nhôm để tạo ra chất phụ trợ DT; (2) trộn kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs) với chất phụ trợ DT thu được trong bước (1) để tạo ra chất phụ trợ DT-HBs; (3) trộn kháng nguyên ho gà (P) với chất phụ trợ DT-HBs thu được trong bước (2) để tạo ra chất phụ trợ DPT-HBs; (4) trộn virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV) với chất phụ trợ DPT-HBs thu được trong bước (3) để tạo ra chất phụ trợ DPT-IPV-HBs; (5) bổ sung chất đệm succinat phosphat vào chất phụ trợ DPT-IPV-HBs thu được trong bước (4), và sau đó bổ sung PRP (thể liên hợp PRP-T) làm kháng nguyên Hib để tạo ra hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T; và (6) điều chỉnh pH của hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T thu được trong bước (5) tới 5,4 đến 5,9.

[FIG. 1]



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin được sử dụng để tiêm chủng cho trẻ em, và đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại để bảo vệ chống lại bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cho đến nay, các loại vaccin khác nhau cho trẻ em đã được đưa ra thị trường. Ngoài vaccin bất hoạt chống lại bệnh ho gà, bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván (DPT), vaccin kết hợp phòng bệnh sởi-rubella, vaccin phòng bệnh viêm gan B (HepB), vaccin phòng bệnh quai bị, và vaccin phòng bệnh thủy đậu, vaccin chống lại *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), vaccin bất hoạt phòng bệnh bại liệt (IPV), vaccin liên hợp phế cầu khuẩn, và vaccin chống lại rotavirut đã được tiêm chủng, và cụ thể, lịch tiêm chủng ở trẻ nữ nhi là cực kỳ dày đặc.

Trong những năm gần đây, vaccin kết hợp có thể đồng thời thu được khả năng bảo vệ chống lại nhiều virut, vi khuẩn, và tương tự đã được yêu cầu đối với vaccin cho trẻ em. Vaccin kết hợp là rất hiệu quả để làm giảm gánh nặng đối với người nhận và cải thiện tỷ lệ tiêm chủng bằng cách làm giảm đến mức tối thiểu số lần gây miễn dịch cần sử dụng.

Ở Nhật Bản, để làm vaccin kết hợp trên cơ sở vaccin phòng bệnh ho gà, bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván (DPT), Quattrovac (nhãn hiệu đã đăng ký) (KM Biologics Co., Ltd.), TETRABIK (nhãn hiệu đã đăng ký) (The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University), và Squarekids (nhãn hiệu đã đăng ký) (Daiichi Sankyo Company, Limited), là các sản phẩm thu được bằng cách trộn vaccin bất hoạt phòng bệnh bại liệt với DPT, đã được đưa ra thị trường. Các vaccin

kết hợp bốn loại này là các chế phẩm dạng lỏng trong đó kháng nguyên được bất hoạt bằng formaldehyt được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm. Quattrovac và TETRABIK thu được bằng cách làm bất hoạt chủng Sabin là chủng giảm độc lực của virus gây bệnh bại liệt, trong khi Squarekids thu được bằng cách làm bất hoạt chủng kiểu dại (độc hại) (chủng Salk). Trong vacxin dùng cho trẻ em, chất phụ trợ nhôm được sử dụng do nó ít có khả năng gây ra các phản ứng phụ, và nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat là đã biết.

Ngoài ra, vacxin kết hợp năm loại thu được bằng cách bổ sung kháng nguyên Hib (Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP)) cho vacxin Hib vào vacxin kết hợp bốn loại này đang được phát triển. Đối với chế phẩm dạng lỏng của vacxin kết hợp năm loại bao gồm DPT-IPV-Hib, việc duy trì sự liên kết của PRP được liên hợp với protein mang, tức là, ngăn nó tách ra là một vấn đề kỹ thuật, và phương pháp sản xuất để giải quyết vấn đề này được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 1. Phương pháp sản xuất cụ thể không được mô tả trong ví dụ 6 của tài liệu này, nhưng chi tiết được mô tả trong tài liệu phi sáng chế 1. Trước hết, kháng nguyên ho gà (P) được tinh chế và bất hoạt bằng formalin. Tiếp theo, giải độc tố bạch hầu (D) được hấp phụ trên gel nhôm, và theo cách riêng rẽ, giải độc tố uốn ván (T) được hấp phụ trên gel nhôm. Tiếp theo, virus gây bệnh bại liệt được tinh chế và bất hoạt bằng formalin (IPV). Cuối cùng, hỗn hợp của chúng là chất phụ trợ DPT-IPV, và bằng cách bổ sung thêm PRP được liên hợp với giải độc tố uốn ván (T) (thể liên hợp PRP-T), vacxin kết hợp năm loại bao gồm DPT-IPV-Hib có thể được điều chế (tài liệu sáng chế 1, tài liệu phi sáng chế 1).

Trên thế giới, để làm vacxin kết hợp sáu loại bao gồm DPT-IPV-Hib-HBs thu được bằng cách bổ sung thêm kháng nguyên bề mặt bệnh viêm gan B (HBs) cho vacxin phòng bệnh viêm gan B vào vacxin kết hợp năm loại, Infanrix-Hexa (GlaxoSmithKline) dưới dạng chế phẩm dạng kit, và Hexamine/Hexyon (Sanofi) và Vaxelis (Sanofi-MSD) dưới dạng chế phẩm dạng lỏng được phê duyệt. Infanrix-Hexa là chế phẩm dạng kit bao gồm dung dịch trong đó DPT-IPV-HBs bất hoạt bằng formaldehyt được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm hydroxit và sản phẩm sấy khô nhiệt độ thấp trong đó PRP làm kháng nguyên Hib được hấp phụ vào chất phụ trợ

nhôm phosphat. Mặt khác, Hexacima/Hexyon và Vaxelis là các chế phẩm dạng lỏng trong đó kháng nguyên bất hoạt bằng formaldehyt hoặc glutaraldehyt được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm hydroxit.

Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ vaccin kết hợp sáu loại dạng lỏng chứa DPT-IPV-Hib-HBs (các kháng nguyên này được hấp phụ trên muối nhôm). Tài liệu sáng chế 2 cũng mô tả rằng độ chuẩn kháng thể của Hib liên hợp với protein uốn ván có xu hướng mất tính sinh miễn dịch của nó theo thời gian khi PRP được hấp phụ vào muối nhôm. Để giải quyết vấn đề này, tài liệu sáng chế 2 cũng mô tả rằng bằng cách bổ sung anion, cụ thể là ion phosphat, ion carbonat hoặc ion xitrat, kháng nguyên Hib (PRP) có thể được ngăn không bị tách ra khỏi nhôm hydroxit oxit, và tính sinh miễn dịch của nó được duy trì. Tài liệu sáng chế 3 mô tả điều này. Mặt khác, tài liệu sáng chế 4 mô tả rằng việc bổ sung anion làm giải hấp kháng nguyên HBs khi kháng nguyên HBs được hấp phụ vào nhôm hydroxit oxit.

Tài liệu sáng chế 4 bộc lộ phương pháp điều chế vaccin kết hợp sáu loại dạng lỏng chứa nhôm hydroxit oxit, kháng nguyên HBs, và kháng nguyên Hib được liên hợp với protein mang, trong đó kháng nguyên HBs được hấp phụ vào nhôm hydroxit oxit, nhưng kháng nguyên Hib không được hấp phụ. Phương pháp điều chế vaccin kết hợp dạng lỏng được bộc lộ trong tài liệu sáng chế 4 là phương pháp điều chế bao gồm trước hết hấp phụ kháng nguyên HBs vào nhôm hydroxit oxit để thu được phức chất kháng nguyên HBs/nhôm hydroxit oxit, và sau đó trộn phức chất kháng nguyên HBs/nhôm hydroxit oxit này với kháng nguyên Hib với sự có mặt của axit amin cation ở nồng độ ít nhất 100 mg/l và ion phosphat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 35 đến 45 mmol/l. Trong các ví dụ của tài liệu sáng chế 4, đã mô tả rằng tỷ lệ hấp phụ của kháng nguyên HBs với gel nhôm là 95 đến 98% ở thời điểm điều chế, tỷ lệ hấp phụ của kháng nguyên HBs trong thử nghiệm độ ổn định bảo quản ở 5°C chỉ giảm tới 88 đến 91% ở thời điểm 9 tháng và 78 đến 86% ở thời điểm 22 tháng, và lượng không hấp phụ của PRP vào gel nhôm là 20,0 đến 22,6 µg/ml ở thời điểm điều chế, và lượng không hấp phụ của PRP trong thử nghiệm độ ổn định bảo quản ở 5°C là 23 đến 27,0 µg/ml ở thời điểm 9 tháng và 19,9 đến 23,9 µg/ml ở thời điểm 22 tháng, nên không có sự thay đổi đáng kể.

Các tài liệu đã biết

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 2018/074296 A

Tài liệu sáng chế 2: WO 1999/013906 A

Tài liệu sáng chế 3: WO 1996/037222 A

Tài liệu sáng chế 4: JP-A-2017-203043

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Package insert of Quattrovac (nhãn hiệu đã đăng ký)

Tài liệu phi sáng chế 2: Vaccine 12 (8) (1994) 700-706

Tài liệu phi sáng chế 3: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (6) (2000) 1087-1091

Tài liệu phi sáng chế 4: Journal of Microbiology and Biotechnology (2003), 13 (3), 469-472

Tài liệu phi sáng chế 5: Catalogue of Automated Enzyme Immunoassay System AIA-360

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Đối với chế phẩm dạng lỏng của vaccin kết hợp sáu loại bao gồm DPT-IPV-Hib-HBs, việc duy trì sự hấp phụ của kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm và ngăn sự tách ra của PRP làm kháng nguyên Hib khỏi protein mang là các vấn đề kỹ thuật.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm dạng lỏng của vaccin kết hợp sáu loại chứa DPT-IPV-Hib-HBs, trong đó kháng nguyên HBs được hấp phụ và duy trì ổn định với chất phụ trợ nhôm, và PRP làm kháng nguyên Hib được liên kết và duy trì ổn định với protein mang.

Giải pháp cho vấn đề

Theo kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết các vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng kháng nguyên HBs được hấp phụ và duy trì ổn định với chất phụ trợ nhôm và PRP được liên kết và duy trì ổn định bằng cách tối ưu hóa nồng độ bổ sung cuối của axit phosphoric và pH, bằng cách đó hoàn thành sáng chế.

Do đó, sáng chế bao gồm các đối tượng sau đây.

[1] Phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại chống lại bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB), phương pháp này bao gồm các bước sau đây:

(1) trộn giải độc tố bạch hầu (D) và giải độc tố uốn ván (T) với chất phụ trợ nhôm để tạo ra chất phụ trợ DT;

(2) trộn kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs) với chất phụ trợ DT thu được trong bước (1) để tạo ra chất phụ trợ DT-HBs;

(3) trộn kháng nguyên ho gà (P) với chất phụ trợ DT-HBs thu được trong bước (2) để tạo ra chất phụ trợ DPT-HBs;

(4) trộn virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV) với chất phụ trợ DPT-HBs thu được trong bước (3) để tạo ra chất phụ trợ DPT-IPV-HBs;

(5) bổ sung chất đệm succinat phosphat vào chất phụ trợ DPT-IPV-HBs thu được trong bước (4), và sau đó bổ sung PRP (thể liên hợp PRP-T) làm kháng nguyên Hib để tạo ra hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T; và

(6) điều chỉnh pH của hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T thu được trong bước (5) tới 5,4 đến 5,9.

[2] Phương pháp theo mục [1], trong đó chất phụ trợ nhôm là gel nhôm phosphat.

[3] Phương pháp theo mục [1] hoặc [2], trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung nằm trong khoảng từ 200 đến 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$.

[4] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó trong bước (5), chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

[5] Phương pháp theo mục [3] hoặc [4], trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 200 $\mu\text{g}/\text{liều}$, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

[6] Phương pháp theo mục [3] hoặc [4], trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 300 $\mu\text{g}/\text{liều}$, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 3 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

[7] Phương pháp theo mục [3] hoặc [4], trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 6 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

[8] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó tỷ lệ hấp phụ của kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm là bằng hoặc lớn hơn 99%, và hàm lượng PRP tự do của Hib là nhỏ hơn 20%.

[9] Chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại được tạo ra bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8].

Các hiệu quả của sáng chế

Theo phương pháp của sáng chế, có thể thu được chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại có tỷ lệ hấp phụ kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do của Hib được liên kết với protein mang là nhỏ hơn 20%. Chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra độ chuẩn kháng thể (khả năng sinh miễn dịch) đủ chống lại sáu vi khuẩn hoặc virus cần chủng ngừa.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ sơ lược thể hiện sơ đồ của phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án được ưu tiên của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án sau đây.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại chống lại bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB), có thể tạo ra chế phẩm vaccin dạng lỏng ổn định có tỷ lệ hấp phụ kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do của Hib được liên kết với protein mang là nhỏ hơn 20%, phương pháp này bao gồm các bước sau đây:

- (1) trộn giải độc tố bạch hầu (D) và giải độc tố uốn ván (T) với chất phụ trợ nhôm để tạo ra chất phụ trợ DT;
- (2) trộn kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs) với chất phụ trợ DT thu được trong bước (1) để tạo ra chất phụ trợ DT-HBs;
- (3) trộn kháng nguyên ho gà (P) với chất phụ trợ DT-HBs thu được trong bước (2) để tạo ra chất phụ trợ DPT-HBs;
- (4) trộn virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV) với chất phụ trợ DPT-HBs thu được trong bước (3) để tạo ra chất phụ trợ DPT-IPV-HBs;
- (5) bổ sung chất đệm succinat phosphat vào chất phụ trợ DPT-IPV-HBs thu được trong bước (4), và sau đó bổ sung PRP (thể liên hợp PRP-T) làm kháng nguyên Hib để tạo ra hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T; và
- (6) điều chỉnh pH của hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T thu được trong bước (5) tới 5,4 đến 5,9.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là sử dụng gel nhôm phosphat làm chất phụ trợ nhôm. Để làm chất phụ trợ nhôm, nhôm hydroxit (đồng nghĩa với nhôm hydroxit oxit) và tương tự cũng là đã biết ngoài nhôm phosphat, nhưng tốt hơn là sử dụng gel nhôm phosphat để thu được chế phẩm vaccin dạng lỏng ổn định có tỷ lệ hấp phụ kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do của kháng nguyên Hib liên kết với protein

mang là nhỏ hơn 20%. Ngoài ra, lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 200 đến 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$, nhưng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, tỷ lệ hấp phụ của thể liên hợp PRP-T liên kết với protein mang với gel nhôm phosphat tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn 30%.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, để làm các kháng nguyên của vacxin kết hợp sáu loại đối với bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB), giải độc tố bạch hầu (D), giải độc tố uốn ván (T), kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs), kháng nguyên ho gà (P), virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV), và PRP làm kháng nguyên Hib được sử dụng, nhưng các kháng nguyên bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng. Để làm PRP làm kháng nguyên Hib, ví dụ, thể liên hợp PRP-T có thể được sử dụng.

Bước (1):

Trong bước (1), giải độc tố bạch hầu (D) và giải độc tố uốn ván (T) được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm để tạo ra chất phụ trợ DT. Để làm chất phụ trợ nhôm, tốt hơn là sử dụng gel nhôm phosphat như được mô tả ở trên. Giải độc tố uốn ván cần có độ tinh khiết lớn hơn 1000 Lf (Giới hạn keo tụ)/mg PN theo tiêu chuẩn của WHO. Ngoài ra, tiêu chuẩn của vacxin liên hợp Hib theo dược điển Châu Âu (European Pharmacopoeia, EP) là $> 1500 \text{ Lf/mg PN}$. Để làm phương pháp tinh chế giải độc tố uốn ván, phương pháp kết tủa amoni sulfat, kết tủa axit tricloaxetic, sắc ký cột (sắc ký lọc gel, sắc ký ái lực), tách muối, thẩm tách, và tương tự được sử dụng.

Bước (2):

Trong bước (2), kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs) được trộn với chất phụ trợ DT thu được trong bước (1), và hỗn hợp này được để ở 15 đến 30°C trong 40 đến 96 giờ để tạo ra chất phụ trợ DT-HBs.

Bước (3):

Trong bước (3), kháng nguyên ho gà (P) được trộn với chất phụ trợ DT-HBs thu được trong bước (2) để tạo ra chất phụ trợ DPT-HBs.

Bước (4):

Trong bước (4), virus gây bệnh bại liệt bất hoạt (IPV) được trộn với chất phụ trợ DPT-HBs thu được trong bước (3) để tạo ra chất phụ trợ DPT-IPV-HBs.

Bước (5):

Trong bước (5), chất đệm succinat phosphat được bổ sung vào chất phụ trợ DPT-IPV-HBs thu được trong bước (4), và sau đó PRP làm kháng nguyên Hib, ví dụ, thể liên hợp PRP-T được bổ sung để tạo ra hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T. Chất đệm succinat phosphat được bổ sung trong bước (5) để điều chỉnh nồng độ bổ sung cuối của axit phosphoric theo lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung. Tức là, chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối. Ví dụ, khi lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 200 µg/liều, chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối. Khi lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 300 µg/liều, chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 3 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối. Khi lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 400 µg/liều, chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 6 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

Theo sáng chế, để làm PRP làm kháng nguyên Hib, thể liên hợp PRP trong đó PRP và protein mang được liên kết có thể được sử dụng. Đã biết rằng kháng thể chống lại PRP, đây là polysacarit vỏ bọc của Hib, là hiệu quả trong việc bảo vệ chống lại sự nhiễm Hib, nhưng vacxin Hib chỉ dựa trên thành phần PRP là không phụ thuộc vào tế bào T, và do đó có tác dụng không đủ đối với trẻ nhũ nhi dưới 18 tháng tuổi có hệ miễn dịch chưa trưởng thành. Do đó, vacxin liên hợp trong đó protein mang được liên hợp (liên kết) với PRP làm cho nó phụ thuộc tế bào T đã được phát triển và được sử dụng cho trẻ nhũ nhi.

Vaccine liên hợp trong đó polysaccharit như PRP được liên kết với protein mang là đã biết. Thử liên hợp PRP có thể được điều chế bằng các kỹ thuật liên kết đã biết. Ví dụ, PRP có thể được liên kết bằng liên kết thioete. Trong phương pháp liên kết này, PRP được hoạt hóa bằng 1-cyano-4-(dimethylamino)pyridin tetrafloroborat (CDAP) để tạo thành este xyanat. PRP được hoạt hóa này có thể được liên kết với nhóm amino của protein mang theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm đệm. Tốt hơn nữa, este xyanat được liên kết với hexandiamin, và polysaccharit được tạo dẫn xuất amino được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng hóa học nối khác loại liên quan đến việc tạo ra liên kết thioete. Ngoài phương pháp nêu trên, thử liên hợp cũng có thể được điều chế bằng phương pháp amin hóa khử. Một phương pháp khác nữa bao gồm phương pháp trong đó polysaccharit được hoạt hóa bằng xyanogen bromua (CNBr) được tạo dẫn xuất bằng dihydrazit của axit adipic (ADH) được liên kết với protein mang bằng cách ngưng tụ carbodiimite. Để làm PRP được sử dụng ở đây, như được mô tả trong tài liệu sáng chế 1, PRP có trọng lượng phân tử thấp hơn so với PRP tự nhiên có thể được sử dụng.

Protein mang bao gồm giải độc tố uốn ván, giải độc tố ho gà, giải độc tố bạch hầu, biến thể di truyền của giải độc tố bạch hầu CRM197, kháng nguyên *Haemophilus influenzae* không tạo vỏ bọc D, protein màng ngoài (OMP) của nhóm *Neisseria* gây viêm màng não B, và tương tự. Protein mang điển hình của thử liên hợp PRP là giải độc tố uốn ván. Khi giải độc tố uốn ván được sử dụng làm protein mang, nó được sử dụng ở độ tinh khiết bằng hoặc lớn hơn 1000 Lf/mg PN theo tiêu chuẩn của WHO. Trong phương pháp theo sáng chế, độ tinh khiết của giải độc tố uốn ván tốt hơn là cao hơn, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2500 đến 3500 Lf/mg PN. Độ tinh khiết này tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2900 đến 3300 Lf/mg PN.

Bước (6):

Trong bước (6), khi độ pH của hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thử liên hợp PRP-T thu được trong bước (5) không nằm trong khoảng từ 5,4 đến 5,9, chất điều chỉnh pH được bổ sung để điều chỉnh độ pH tới 5,4 đến 5,9. Để thu được chế phẩm vaccine dạng lỏng ổn định có tỷ lệ hấp phụ kháng nguyên HBs với

chất phụ trợ nhôm bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do của kháng nguyên Hib liên kết với protein mang là nhỏ hơn 20%, độ pH của sản phẩm cuối cần nằm trong khoảng từ 5,4 đến 5,9. Khi độ pH của sản phẩm cuối không nằm trong khoảng nêu trên, hàm lượng PRP tự do mong muốn của Hib không thể thu được.

Hàm lượng PRP tự do có thể được xác định bằng các phương pháp được mô tả trong các tài liệu phi sáng chế 2 đến 4 và tài liệu sáng chế 4, và tương tự. Hàm lượng PRP tự do theo sáng chế được xác định bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 3 của tài liệu sáng chế 1. Ngoài ra, sự hấp phụ của kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm có thể được thực hiện bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu sáng chế 4 và tài liệu phi sáng chế 5, và tương tự. Lượng kháng nguyên HBs được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm theo sáng chế được tính bằng cách trừ hàm lượng của kháng nguyên HBs trong dịch nổi bề mặt khỏi tổng hàm lượng của kháng nguyên HBs. Tổng hàm lượng của kháng nguyên HBs được xác định bằng cách hòa tan chất phụ trợ nhôm bằng chất tạo chelat như axit xitric và sử dụng hệ thống thử nghiệm miễn dịch enzym tự động AIA-360 của Tosoh Corporation và kit kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B của Tosoh Corporation. Ngoài ra, hàm lượng của kháng nguyên HBs trong dịch nổi bề mặt được xác định bằng cách thực hiện ly tâm, thu hồi dịch nổi bề mặt chứa kháng nguyên HBs không hấp phụ, và sử dụng thiết bị phân tích thử nghiệm miễn dịch enzym tự động của Tosoh Corporation và HBsAg của kit kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B của Tosoh Corporation. Thử nghiệm bảo quản trong thời gian dài khi độ ổn định được nghiên cứu được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ bằng $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ hoặc 10°C hoặc thấp hơn để tránh đóng băng. Theo cách khác, độ ổn định có thể được đánh giá theo cách gia tốc dưới điều kiện nhiệt độ cao hơn.

Phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại theo sáng chế được thực hiện bằng các bước (1) đến (6) như được mô tả ở trên, nhưng cũng có thể được áp dụng cho trường hợp sản xuất vacxin kết hợp năm loại thu được bằng cách bổ sung thể liên hợp PRP vào hỗn hợp thu được bằng cách bổ sung virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (Salk-IPV) vào vacxin kết hợp bốn loại DTP-IPV (vacxin kết hợp phòng bệnh ho gà-bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván-vi rút gây bệnh bại liệt được bất hoạt (chủng Sabin) được kết tủa và tinh chế; ví dụ, “Quattrovac

(nhãn hiệu đã đăng ký)” được sản xuất bởi KM Biologics Co., Ltd.) hoặc vaccin kết hợp phòng bệnh ho gà-bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa và tinh chế (KM Biologics Co., Ltd.).

Trong phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại theo sáng chế, điều kiện thành phần của chế phẩm dạng lỏng ổn định là như sau.

Gel nhôm: nồng độ nhôm nằm trong khoảng từ 200 đến 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$

HBs: 5 đến 10 $\mu\text{g}/\text{liều}$

pH: 5,4 đến 6,2

Lượng bổ sung cuối của axit phosphoric: được điều chỉnh theo lượng nhôm

Lượng nhôm bằng 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$: 6 đến 8 mM

Lượng nhôm bằng 300 $\mu\text{g}/\text{liều}$: 3 đến 6 mM

Lượng nhôm bằng 200 $\mu\text{g}/\text{liều}$: 2 đến 6 mM

(tăng 1,5mM vào nồng độ nêu trên khi IPV là chủng Sabin)

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin hỗn hợp sáu loại, thu được bằng phương pháp điều chế chế phẩm dạng lỏng ổn định của vaccin kết hợp sáu loại theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa vào các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ so sánh 1

<Điều chế vaccin kết hợp sáu loại bằng cách sử dụng gel nhôm phosphat (1)>

PRP được liên hợp với giải độc tố uốn ván bằng phương pháp của tài liệu sáng chế 1 được bổ sung vào hỗn hợp thu được bằng cách bổ sung virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV; chủng Salk) vào vaccin kết hợp bốn loại DTP-IPV (vaccin kết hợp phòng bệnh ho gà-bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván-virus gây bệnh bại liệt bất hoạt

(chủng Sabin) được kết tủa và tinh chế; “Quattrovac (nhãn hiệu đã đăng ký)” được sản xuất bởi KM Biologics Co., Ltd.) hoặc vaccin kết hợp phòng bệnh ho gà-bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa và tinh chế (được sản xuất bởi KM Biologics Co., Ltd.) để điều chế vaccin kết hợp năm loại. Chất phụ trợ nhôm phosphat được sử dụng làm chất phụ trợ. Kháng nguyên HBs được bổ sung vào vaccin kết hợp năm loại thu được để thu được vaccin kết hợp sáu loại bao gồm DPT-IPV-Hib-HBs. Theo kết quả kiểm tra tỷ lệ hấp phụ HBs của vaccin kết hợp sáu loại thu được, tỷ lệ này được phát hiện là nhỏ hơn 10%, và kháng nguyên HBs không được hấp phụ vào chất phụ trợ.

Ví dụ so sánh 2

<Điều chế vaccin kết hợp sáu loại bằng cách sử dụng gel nhôm phosphat (2)>

Vaccin kết hợp năm loại được điều chế theo cách giống như trong Ví dụ so sánh 1. Vaccin kết hợp năm loại thu được này được trộn với vaccin HBs trong đó kháng nguyên HBs được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm phosphat để thu được vaccin kết hợp sáu loại bao gồm DPT-IPV-Hib-HBs. Theo kết quả kiểm tra tỷ lệ hấp phụ HBs của kháng nguyên HBs vào chất phụ trợ và hàm lượng PRP tự do của vaccin kết hợp sáu loại thu được, tỷ lệ hấp phụ HBs của kháng nguyên HBs vào chất phụ trợ được cải thiện đến bằng hoặc lớn hơn 96%, nhưng vẫn là không đủ, và hàm lượng PRP tự do cũng tăng đến bằng hoặc lớn hơn 25%.

Ví dụ so sánh 3

<Điều chế vaccin kết hợp sáu loại bằng cách sử dụng gel nhôm phosphat>

Vaccin kết hợp năm loại được điều chế theo cách giống như trong Ví dụ so sánh 1. Vaccin kết hợp năm loại thu được này được trộn với vaccin HBs trong đó kháng nguyên HBs được hấp phụ vào chất phụ trợ nhôm phosphat để thu được vaccin kết hợp sáu loại bao gồm DPT-IPV-Hib-HBs. Ở thời điểm này, hàm lượng nhôm phosphat được điều chỉnh đến 300 µg/liều, và nồng độ bổ sung cuối của axit phosphoric được điều chỉnh đến 2 mmol/l. Theo kết quả kiểm tra tỷ lệ hấp phụ HBs của kháng nguyên HBs vào chất phụ trợ và hàm lượng PRP tự do của vaccin kết hợp

sáu loại thu được, tỷ lệ hấp phụ HBs được cải thiện đến bằng hoặc lớn hơn 99%, nhưng hàm lượng PRP tự do được tăng đến bằng hoặc lớn hơn 60%.

Ví dụ 1

<Điều chế chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại>

Sơ đồ sản xuất của phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại theo sáng chế được thể hiện trên Fig.1. Chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại được tạo ra như sau với hàm lượng nhôm phosphat bằng 300 µg/liều.

Hấp phụ giải độc tố bạch hầu, giải độc tố uốn ván vào gel nhôm phosphat:

Giải độc tố bạch hầu và giải độc tố uốn ván (giải độc tố bạch hầu: 600 Lf/ml, giải độc tố uốn ván: 31,2 Lf/ml, 1/4 lượng điều chế được) được trộn với gel nhôm phosphat (nồng độ cuối 1,8 mg/ml) và được hấp phụ. Sản phẩm được hấp phụ này được sử dụng làm vacxin kết hợp phòng bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa.

Hấp phụ dung dịch gốc HBs vào vacxin kết hợp phòng bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa:

25 đến 50 µg/ml kháng nguyên HBs (1/5 của lượng vacxin kết hợp phòng bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa) được bổ sung vào vacxin kết hợp phòng bệnh bạch hầu-bệnh uốn ván được kết tủa, và hỗn hợp này được để yên ở 15 đến 30°C trong 40 giờ đến 96 giờ để hấp phụ HBs.

Điều chế sản phẩm cuối:

Sản phẩm nêu trên được bổ sung kháng nguyên ho gà được tinh chế (1/3 lượng của sản phẩm cuối), khối hóa trị ba của vacxin phòng bệnh bại liệt (sau đây, vacxin phòng bệnh bại liệt; typ 1: typ 2: typ 3 = 30: 1000: 1000 DU (D-đơn vị kháng nguyên)/ml, 1/10 lượng của sản phẩm cuối), chất đệm succinat phosphat (pH 5,5, nồng độ bổ sung của axit phosphoric là tương đương với 4,5 mmol/l tính theo nồng độ cuối; và là tương đương với 6,0 mmol/l khi Sabin IPV được sử dụng), và được chất Hib (sau đây là thể liên hợp PRP-T: PRP được liên hợp với giải độc tố uốn ván (T) bằng phương pháp nêu trong tài liệu sáng chế 1), và độ pH được khẳng định là

nằm trong khoảng từ 5,4 đến 5,9. Khi độ pH nằm ngoài khoảng này, độ pH được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit để nằm trong khoảng này. Ngoài ra, theo kết quả phân tích sản phẩm cuối, tỷ lệ hấp phụ của thể liên hợp PRP-T với gel nhôm phosphat là bằng hoặc nhỏ hơn 30%.

Thành phần của chế phẩm vaccin kết hợp sáu loại dạng lỏng (DPT-IPV-Hib-HBs) thu được ở thời điểm này được thể hiện trong bảng 1.

[Bảng 1]

Mục đích bào chế	Thành phần	Lượng (0,5 ml)
Thành phần hoạt tính	Phân đoạn kháng nguyên bảo vệ bệnh ho gà	bằng hoặc lớn hơn 4 đơn vị
Thành phần hoạt tính	Giải độc tố bạch hầu	bằng hoặc nhỏ hơn 16,7 Lf
Thành phần hoạt tính	Giải độc tố uốn ván	bằng hoặc nhỏ hơn 6,7 Lf
Thành phần hoạt tính	Virut gây bệnh bại liệt được bất hoạt typ 1 (đối với chủng Sabin)**	1,5 DU
Thành phần hoạt tính	Virut gây bệnh bại liệt được bất hoạt typ 2 (đối với chủng Sabin)**	50 DU
Thành phần hoạt tính	Virut gây bệnh bại liệt được bất hoạt typ 3 (đối với chủng Sabin)**	50 DU
Thành phần hoạt tính	Giải độc tố uốn ván được liên hợp polysacarit của <i>Haemophilus influenzae</i> typ b (theo lượng polysacarit)	10 µg
Thành phần hoạt tính	Kháng nguyên HBs	5 đến 10 µg
Chất làm đẳng trương	Natri clorua	2,38 mg
Chất làm đẳng trương	Natri hydro phosphat***	0,83 mg

Chất làm đẳng trương	Natri dihydro phosphat****	1,40 mg
Chất làm đẳng trương	Axit succinic	0,26 mg
Chất làm đẳng trương	Dinatri succinat hexahydrat	2,11 mg
Chất làm ổn định	Glucosa	0,33 mg
Chất làm ổn định	L-Lysin hydroclorua	bằng hoặc nhỏ hơn 0,05 mg
Chất làm bất hoạt	Formalin (tính theo formaldehyt)	bằng hoặc nhỏ hơn 0,1 mg
Chất tăng cường miễn dịch*	Nhôm clorua	bằng hoặc nhỏ hơn 3,5 mg
Chất tăng cường miễn dịch*	Natri hydroxit	bằng hoặc nhỏ hơn 1,6 mg
Chất làm ổn định	Môi trường 199 (không chứa Ca, Mg, phosphat, đỏ phenol)	0,9 mg
Chất điều chỉnh pH	Axit clohydric	lượng vừa đủ

(Ghi chú)

*vật liệu của gel nhôm

**Đối với Salk IPV, typ 1: typ 2: typ 3 là 40: 4: 32 (đơn vị: DU/0,5 ml).

***Dinatri hydro phosphat dodecahydrat

****Natri dihydro phosphat dihydrat

Ví dụ 2

<Sự ảnh hưởng của pH đến hàm lượng PRP tự do>

Đối với chế phẩm vaccin kết hợp sáu loại dạng lỏng (DPT-IPV-Hib-HBs) thu được trong ví dụ 1, sự ảnh hưởng của pH đến hàm lượng PRP tự do được kiểm tra. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2. Hàm lượng nhôm phosphat là 300 µg/liều. Như đã rõ từ các kết quả được thể hiện trong bảng 2, khi độ pH nằm ngoài khoảng 5,4 đến 6,2 ở 37°C sau 2 tuần, hàm lượng PRP tự do tăng lên, nên đã gợi ý rằng sự tách ra được thúc đẩy.

[Bảng 2]

Mẫu	pH	Hàm lượng PRP tự do		
		Ngay sau khi điều chế (%)	37°C – sau 2 tuần (%)	37°C – sau 4 tuần (%)
DPT-IPV (Sabin) -Hib-HBs	5,0	6,7	34,9	44,3
	5,2	6,8	22,3	29,2
	<u>5,4</u>	<u>6,3</u>	<u>19,5</u>	<u>24,5</u>
	<u>5,6</u>	<u>6,6</u>	<u>15,6</u>	<u>22,1</u>
	<u>5,8</u>	<u>6,6</u>	<u>15,6</u>	<u>22,3</u>
	<u>6,0</u>	<u>6,7</u>	<u>16,9</u>	<u>23,5</u>
	<u>5,7</u>	<u>4,8</u>	<u>13,9</u>	<u>21,2</u>
	<u>6,2</u>	<u>5,0</u>	<u>19,4</u>	<u>31,9</u>
	6,3	4,7	23,5	39,0
	6,7	4,8	36,7	57,0
	6,7	4,6	35,5	57,9
	6,6	4,5	31,7	50,3
	7,0	4,9	54,8	75,3

Ví dụ 3

<Sự ảnh hưởng của hàm lượng nhôm và lượng HBs đến hiệu quả ở khi cynomolgus>

Để kiểm tra sự ảnh hưởng của lượng gel nhôm và lượng HBs đến hiệu quả làm vaccin trong phương pháp điều chế chế phẩm vaccin kết hợp sáu loại dạng lỏng (DPT-IPV-Hib-HBs) trong ví dụ 1, chế phẩm vaccin này được sử dụng cho khỉ cynomolgus (nước xuất xứ: Campuchia, con đực 31 đến 35 tháng tuổi, con cái 31 đến 37 tháng tuổi). Máu được lấy ở tuần thứ tư sau khi tiêm chủng, và huyết thanh được thu hồi. Độ chuẩn kháng thể được xác định bằng ELISA hoặc EIA bằng cách sử dụng AIA-360 (nhãn hiệu đã đăng ký: Tosoh Corporation) bằng cách sử dụng mỗi kháng nguyên vaccin được điều chế tự thân từ huyết thanh thu được. Các kết quả này được thể hiện trong các bảng 3 và 4. Trong bảng này, tỷ lệ so với nhóm đối chứng (tiêm chủng đồng thời Quattrovac (nhãn hiệu đã đăng ký: KM Biologics Co., Ltd.), Bimmugen (nhãn hiệu đã đăng ký: KM Biologics Co., Ltd.), và ActHIB (nhãn hiệu đã đăng ký: Sanofi Pasteur)) được tiêm hỗn hợp của các thuốc được phê duyệt được thể hiện.

Trong chế phẩm có lượng nhôm bằng 100 $\mu\text{g}/\text{liều}$ và lượng HBs bằng 5 $\mu\text{g}/\text{liều}$, độ chuẩn kháng thể là cao hơn hoặc bằng với nhóm đối chứng sau khi sử dụng lần đầu, nhưng có giá trị thấp bằng khoảng 0,2 sau khi sử dụng bổ sung. Mặt khác, với lượng nhôm bằng hoặc lớn hơn 200 $\mu\text{g}/\text{liều}$, tỷ lệ so với nhóm đối chứng có giá trị bằng hoặc lớn hơn 1 sau khi tiêm bổ sung trong tất cả các liều của HBs. Do các độ chuẩn kháng thể khác với HBs đều bằng hoặc cao hơn so với độ chuẩn kháng thể của nhóm đối chứng, chỉ mẫu Số 3 trong bảng 3 được thể hiện trong bảng 4.

[Bảng 3]

Số	Lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Lượng HBs ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Độ chuẩn kháng thể kháng HBs sau khi sử dụng lần đầu (tỷ lệ so với nhóm đối chứng)	Độ chuẩn kháng thể kháng HBs sau khi sử dụng bổ sung (tỷ lệ so với nhóm đối chứng)
1	100	5	1,59	0,23

2	400	10	5,80	4,58
3	300	10	3,62	1,95
4	300	5	4,12	1,76
5	200	10	4,61	1,36
6	200	5	3,40	1,29

[Bảng 4]

Kháng nguyên	Độ chuẩn kháng thể sau khi sử dụng lần đầu (tỷ lệ so với nhóm đối chứng)	Độ chuẩn kháng thể sau khi sử dụng tăng cường (tỷ lệ so với nhóm đối chứng)
Bệnh bạch hầu	1,30	0,93
Bệnh uốn ván	1,18	1,28
Bệnh ho gà, PT	2,35	2,71
Bệnh ho gà, FHA	1,39	1,34
Virut gây bệnh bại liệt typ 1 (chủng Sabin)	1,19	0,95
Virut gây bệnh bại liệt typ 2 (chủng Sabin)	1,27	1,04
Virut gây bệnh bại liệt typ 3 (chủng Sabin)	1,29	1,04
Hib	4,47	2,95

Ví dụ 4

<Nghiên cứu độ ổn định của chế phẩm dạng lỏng kết hợp sáu loại>

Để nghiên cứu độ ổn định của chế phẩm dạng lỏng kết hợp sáu loại được tạo ra trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng Salk IPV, sự ảnh hưởng của nồng độ bổ sung của axit phosphoric trong dung dịch chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) đến việc duy

trì sự hấp phụ của HBs và ngăn chặn sự tách ra của PRP được kiểm tra. Các kết quả này được thể hiện trong các bảng 5, 6, và 7 đối với lượng nhôm bằng 400 µg/liều, 300 µg/liều, và 200 µg/liều, tương ứng. Nồng độ axit phosphoric được thể hiện ở đây là lượng bổ sung ở nồng độ cuối. Khi Sabin IPV được sử dụng, nồng độ bổ sung của axit phosphoric được tăng 1,5 mmol/l.

Hàm lượng PRP tự do của các mẫu sau khi bảo quản ở 37°C trong 2 tuần và tỷ lệ hấp phụ của HBs được kiểm tra. Kết quả là điều kiện để tỷ lệ hấp phụ HBs bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do nhỏ hơn 20% là lượng axit phosphoric được bổ sung nằm trong khoảng từ 5 đến 8 mmol/l khi lượng nhôm là 400 µg/liều, lượng axit phosphoric được bổ sung nằm trong khoảng từ 3 đến 6 mmol/l khi lượng nhôm là 300 µg/liều, và lượng axit phosphoric được bổ sung nằm trong khoảng từ 2 đến 6 mmol/l khi lượng nhôm là 200 µg/liều.

[Bảng 5]

Số	Lượng nhôm (µg/liều)	Lượng bổ sung của axit phosphoric (mmol/l)	Tỷ lệ hấp phụ của HBs (%)		Hàm lượng PRP tự do (%)	
			0 tuần	2 tuần	0 tuần	2 tuần
1	400	4	99,8	99,7	4,6	20,0
2		<u>5</u>	<u>99,7</u>	<u>99,6</u>	<u>3,7</u>	<u>19,7</u>
3		<u>6</u>	<u>99,7</u>	<u>99,7</u>	<u>3,7</u>	<u>15,3</u>
4		<u>7</u>	<u>99,7</u>	<u>99,6</u>	<u>3,8</u>	<u>13,4</u>
5		<u>8</u>	<u>99,7</u>	<u>99,6</u>	<u>3,8</u>	<u>12,9</u>
6		9	99,7	96,9	3,7	12,4
7		10	99,8	95,2	4,5	15,7

[Bảng 6]

Số	Lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Lượng bổ sung của axit phosphoric (mmol/l)	Tỷ lệ hấp phụ của HBs (%)		Hàm lượng PRP tự do (%)	
			0 tuần	2 tuần	0 tuần	2 tuần
1	300	2	99,9	99,9	5,3	31,4
2		<u>3</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>5,5</u>	<u>17,8</u>
3		<u>4</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>5,3</u>	<u>17,5</u>
4		<u>5</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>5,4</u>	<u>16,5</u>
5		<u>6</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>5,1</u>	<u>15,9</u>
6		7	99,7	98,9	4,8	14,9
7		10	99,7	96,7	4,4	14,4

[Bảng 7]

Số	Lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Lượng bổ sung của axit phosphoric (mmol/l)	Tỷ lệ hấp phụ của HBs (%)		Hàm lượng PRP tự do (%)	
			0 tuần	2 tuần	0 tuần	2 tuần
1	200	1	99,9	99,9	5,3	31,6
2		<u>2</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>4,8</u>	<u>19,0</u>
3		<u>3</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>4,9</u>	<u>14,9</u>
4		<u>4</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>4,7</u>	<u>14,6</u>
5		<u>5</u>	<u>99,9</u>	<u>99,9</u>	<u>5,0</u>	<u>14,5</u>
6		<u>6</u>	<u>99,9</u>	<u>99,7</u>	<u>4,6</u>	<u>14,1</u>

Ví dụ 5

<Sự thay đổi theo thời gian của tỷ lệ hấp phụ của HBs và tỷ lệ hàm lượng PRP tự do của chế phẩm dạng lỏng kết hợp sáu loại>

Đối với chế phẩm dạng lỏng kết hợp sáu loại thu được trong ví dụ 1, sự thay đổi của tỷ lệ hấp phụ của HBs và sự thay đổi của hàm lượng PRP tự do trong quá trình bảo quản ở $5 \pm 3^\circ\text{C}$ được thể hiện trong bảng 8 và bảng 9 tương ứng. Như đã rõ từ các kết quả được thể hiện trong bảng 8 và bảng 9, đã phát hiện được rằng chế phẩm dạng lỏng kết hợp sáu loại được tạo ra theo phương pháp của sáng chế là chế phẩm vacxin dạng lỏng ổn định, có tỷ lệ hấp phụ của kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm bằng hoặc lớn hơn 99% và hàm lượng PRP tự do của Hib là nhỏ hơn 20% ngay cả sau khi bảo quản ở $5 \pm 3^\circ\text{C}$ trong 24 tháng.

[Bảng 8]

Số	Lượng nhôm ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Lượng HBs ($\mu\text{g}/\text{liều}$)	Tỷ lệ hấp phụ của HBs (%)							
			Ở thời điểm bắt đầu bảo quản	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng
1	400	10	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	-	-
2	300	10	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
3	300	5	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8
4	200	10	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
5	200	5	99,8	99,9	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8

Thử nghiệm đối với mẫu Số 1 được kết thúc ở thời điểm 9 tháng.

[Bảng 9]

Số	Lượng nhôm (μg /liều)	Lượng HBs (μg /liều)	Hàm lượng PRP tự do (%)							
			Ở thời điểm bắt đầu bảo quản	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	24 tháng
1	400	10	5,9	5,9	7,1	5,6	6,7	8,1	-	-
2	300	10	3,5	4,1	4,8	4,2	6,3	6,3	5,7	8,3
3	300	5	3,6	4,5	4,5	4,3	6,3	5,9	5,5	8,3
4	200	10	3,2	3,5	4,4	4,2	5,9	5,9	4,4	8,5
5	200	5	3,6	3,6	4,6	4,3	6,3	6,1	4,2	8,3

Thử nghiệm đối với mẫu Số 1 được kết thúc ở 9 tháng.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Sáng chế là hữu ích trong lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là trong lĩnh vực vacxin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại chống lại bệnh bạch hầu, bệnh ho gà, bệnh uốn ván, bệnh bại liệt, *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), và bệnh viêm gan B (HepB), phương pháp này bao gồm các bước sau đây:

(1) trộn giải độc tố bạch hầu (D) và giải độc tố uốn ván (T) với chất phụ trợ nhôm để tạo ra chất phụ trợ DT;

(2) trộn kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBs) với chất phụ trợ DT thu được trong bước (1) để tạo ra chất phụ trợ DT-HBs;

(3) trộn kháng nguyên ho gà (P) với chất phụ trợ DT-HBs thu được trong bước (2) để tạo ra chất phụ trợ DPT-HBs;

(4) trộn virus gây bệnh bại liệt được bất hoạt (IPV) với chất phụ trợ DPT-HBs thu được trong bước (3) để tạo ra chất phụ trợ DPT-IPV-HBs;

(5) bổ sung chất đệm succinat phosphat vào chất phụ trợ DPT-IPV-HBs thu được trong bước (4), và sau đó bổ sung PRP (thể liên hợp PRP-T) làm kháng nguyên Hib để tạo ra hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T; và

(6) điều chỉnh pH của hỗn hợp của chất phụ trợ DPT-IPV-Hib-HBs và thể liên hợp PRP-T thu được trong bước (5) tới 5,4 đến 5,9, trong đó chất phụ trợ nhôm là gel nhôm phosphat.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung nằm trong khoảng từ 200 đến 400 $\mu\text{g}/\text{liều}$.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong bước (5), chất đệm succinat phosphat (pH 5,5) được bổ sung sao cho nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung bằng 200 µg/liều, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 2 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 300 µg/liều, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 3 đến 6 mmol/l tính theo nồng độ cuối.
6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó lượng chất phụ trợ nhôm được bổ sung là 400 µg/liều, và nồng độ bổ sung của axit phosphoric nằm trong khoảng từ 6 đến 8 mmol/l tính theo nồng độ cuối.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ hấp phụ của kháng nguyên HBs với chất phụ trợ nhôm là bằng hoặc lớn hơn 99%, và hàm lượng PRP tự do của Hib là nhỏ hơn 20%.
8. Chế phẩm dạng lỏng ổn định của vacxin kết hợp sáu loại được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

1/1

[FIG. 1]

