



(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)



1-0052032

(51)⁷ A61K 39/12; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2019-00898

(22) 03/08/2017

(86) PCT/US2017/045375 03/08/2017

(87) WO2018/027075 08/02/2018

(30) 62/370,611 03/08/2016 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 27/05/2019 374A

(73) TAKEDA VACCINES, INC. (US)

75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, United States of America

(72) LIVENGOD, Jill, Ann (US); STRANGE, Linda, Marie (US); ERB, Steven, Michael (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM ỔN ĐỊNH FLAVIVIRUS BẰNG HỖN
HỢP PHỐI CHẾ CẢI TIẾN

(21) 1-2019-00898

(57) Các phương án trong bản mô tả đề cập đến chế phẩm và phương pháp để làm ổn định flavivirus. Theo các phương án nhất định, chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây liên quan đến việc làm ổn định các flavivirus sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực (chẳng hạn các flavivirus sống nguyên vẹn). Các phương án khác liên quan đến chế phẩm và phương pháp làm giảm sự thoái biến của các flavivirus sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực. Các phương án khác đề cập đến các hỗn hợp phối chế cải tiến để kéo dài sự ổn định của các flavivirus sống đã được làm giảm độc lực hoặc chưa được làm giảm độc lực trong quá trình sản xuất, bảo quản, bảo quản tích cực và vận chuyển. Các phương án khác nữa đề cập đến việc sử dụng chế phẩm được bộc lộ ở đây trong các kit để dùng cho các ứng dụng và phương pháp vận chuyển.

Sự giảm hiệu lực sau 5 tuần ở 25°C

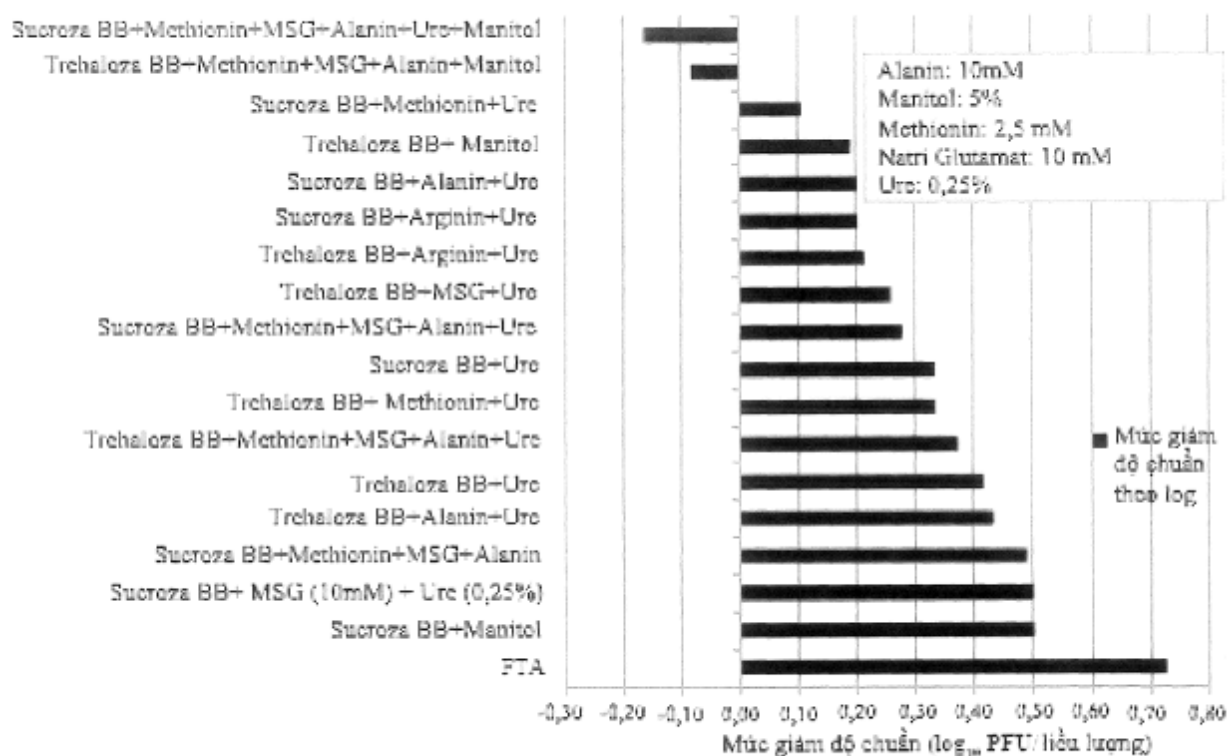


FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Các phương án trong bản mô tả này đề cập đến chế phẩm và phương pháp để làm ổn định flavivirus. Theo các phương án nhất định, chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây liên quan đến việc làm ổn định các flavivirus sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực (chẳng hạn các flavivirus sống nguyên vẹn). Các phương án khác liên quan đến chế phẩm và phương pháp làm giảm sự thoái biến của các flavivirus sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực. Các phương án khác đề cập đến các hỗn hợp phối chế cải tiến để kéo dài sự ổn định của các flavivirus sống đã được làm giảm độc lực hoặc chưa được làm giảm độc lực trong quá trình sản xuất, bảo quản, bảo quản tích cực, vận chuyển và phân phối. Các phương án khác nữa đề cập đến việc sử dụng chế phẩm được bộc lộ ở đây trong các kit cho các ứng dụng có thể vận chuyển được và các phương pháp sử dụng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vắcxin và hỗn hợp phối chế vắcxin được chỉ ra là quan trọng để bảo vệ người và động vật khỏi ảnh hưởng bất lợi của nhiều loại bệnh, như những bệnh gây ra bởi virus. Một trong số những kỹ thuật phòng bệnh thành công nhất đối với vắcxin từ virus là gây miễn dịch cho động vật hoặc người bằng chủng virus đã được làm yếu hoặc làm giảm độc lực (“virus sống đã được làm giảm độc lực”). Các chủng virus đã được làm giảm độc lực một cách thích hợp mà là một phần của chế phẩm sinh miễn dịch có khả năng sao chép hạn chế sau khi gây miễn dịch, và do vậy, không gây ra bệnh. Tuy nhiên, sự sao chép virus hạn chế của virus đã được làm giảm độc lực là đủ để biểu hiện toàn bộ kho các kháng nguyên virus và tạo ra các đáp ứng miễn dịch tiềm năng và kéo dài đối với virus này. Vì vậy, ngay khi tiếp xúc sau đó với chủng virus gây bệnh, đối tượng đã được gây miễn dịch có khả năng phát triển bệnh là giảm. Các vắcxin virus sống đã được làm giảm độc lực này là các vắcxin hữu hiệu nhất được sử dụng trong sức khỏe cộng đồng.

Để các vắc xin virus sống đã được giảm độc lực có hiệu quả, chúng cần phải có khả năng sao chép sau khi gây miễn dịch, và bản thân các virus phải được bảo vệ khỏi sự thoái biến trong quá trình bào chế cũng như vận chuyển trước khi dùng cho đối tượng, ví dụ để đảm bảo rằng nồng độ liều lượng đúng được vận chuyển đến đối tượng này. Một số vắc xin nhạy cảm đối với các thái cực nhiệt độ; hoặc quá nhiệt hoặc làm lạnh đột ngột có thể làm vô hoạt vắc xin. Việc duy trì “chuỗi lạnh” này trong suốt quá trình phân phối là đặc biệt khó khăn ở những nước đang phát triển. Vì vậy, vẫn cần cải tiến độ ổn định của cả virus sống đã được làm giảm độc lực hiện có và mới được phát triển và virus sống để cải thiện việc sản xuất vắc xin, cũng như là, vận chuyển và phân phối hỗn hợp phối chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các phương án trong bản mô tả này đề cập đến chế phẩm và phương pháp để làm ổn định flavivirus sống. Theo các phương án nhất định, chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây liên quan đến việc làm ổn định flavivirus nguyên vẹn sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực. Các phương án khác liên quan đến chế phẩm và phương pháp làm giảm sự thoái biến của các flavivirus sống, đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực. Các phương án khác nữa đề cập đến các hỗn hợp phối chế cải tiến để kéo dài sự ổn định của các flavivirus sống đã được làm giảm độc lực hoặc chưa được làm giảm độc lực trong quá trình sản xuất (*chẳng hạn* vắc xin hoặc chất trị liệu chống virus), bảo quản, vận chuyển và sử dụng cho đối tượng. Các phương án khác nữa đề cập đến việc sử dụng chế phẩm hoặc hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây trong các kit cho các ứng dụng và các phương pháp có thể vận chuyển được.

Các phương án trong bản mô tả này đề cập đến các chế phẩm để làm ổn định các virus sống mà có thể bao gồm một hoặc nhiều flavivirus sống, một hoặc nhiều tá nhân hydrat cacbon, và một hoặc nhiều axit amin hoặc các muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó. Theo các phương án này, hỗn hợp phối chế sử dụng ở đây giúp ổn định flavivirus sống. Theo các phương án khác, chế phẩm để dùng trong bản mô tả này làm ổn định flavivirus sống để dùng trong thương mại.

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hỗn hợp phối chế để làm ổn định flavivirus. Flavivirus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus sốt xuất huyết, virus West Nile, virus gây viêm não do tíc gây ra, virus gây sốt vàng da, virus gây viêm não Nhật Bản, virus Kunjin, virus gây viêm não St. Louis, virus gây viêm não Murray Valley, virus Zika, hoặc virus bất kỳ có liên quan của nó.

Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể còn bao gồm chất đệm. Theo các phương án này, chất đệm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS), đệm TRIS, đệm HEPES hoặc các đệm tương tự. Theo các phương án này, chất đệm có thể bao gồm ít nhất một muối natri clorua (NaCl), mononatri và/hoặc dinatri phosphat (Na_2HPO_4), kali clorua (KCl), và kali phosphat (KH_2PO_4). Theo một số phương án, chất đệm của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm natri clorua (NaCl) có nồng độ từ khoảng 10,0 mM đến khoảng 200,0 mM. Theo các phương án khác, các hỗn hợp phối chế để làm ổn định các flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực không chứa magie clorua (MgCl_2).

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân protein. Theo các phương án này, một hoặc nhiều tác nhân protein có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin, gelatin và/hoặc dextran. Ví dụ, albumin có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin tái tổ hợp, albumin tự nhiên, albumin huyết thanh người (HSA) hoặc tác nhân tương tự albumin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân protein trong chế phẩm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin huyết thanh bất kỳ, albumin huyết thanh người (HSA), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA), huyết thanh từ động vật có vú tương ứng bất kỳ, gelatin, dextran, polyme polyol, hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án này, một hoặc nhiều tác nhân protein trong hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm albumin, như albumin huyết thanh người hoặc albumin tái tổ hợp có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v). Theo một phương án, hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm albumin huyết thanh người (HSA) có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v).

Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trehaloza (chẳng hạn D-trehaloza dehydrat), galactoza, fructoza, lactoza, sucroza, chitosan, manitol hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án này, nồng độ của một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon có thể từ khoảng 0,5% đến khoảng 15,0% (w/v). Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm trehaloza và/hoặc sucroza. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm manitol kết hợp với ít nhất một trong số trehaloza và sucroza. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong chế phẩm có thể bao gồm manitol kết hợp với cả trehaloza và sucroza. Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây không bao gồm sorbitol. Theo các phương án khác, một số hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây không chứa poloxamer 407 hoặc poloxamer khác.

Theo một số phương án, ví dụ, các phương án theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00010], một hoặc nhiều axit amin trong hỗn hợp phối chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alanin, arginin, methionin, hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin có thể bao gồm dẫn xuất axit amin hoặc muối của nó. Theo các phương án khác nữa, dẫn xuất axit amin có thể bao gồm mono natri glutamat (mono natri glutamat - MSG) hoặc kali glutamat. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó có mặt trong hỗn hợp phối chế ở nồng độ từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 150,0 mM.

Theo một số phương án, như các phương án theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00011], các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều osmolyte. Theo các phương án này, một hoặc nhiều osmolyte có thể bao gồm ure (ví dụ carbamit) hoặc các chất có thể thay thế khác, ví dụ, caprolactam, PEG 400 hoặc PEG 600. Theo các phương án này, nồng độ của một hoặc nhiều osmolyte (chẳng hạn ure) có thể là từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v).

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm sucroza và/hoặc trehaloza trong chất đệm và ure. Theo các phương án khác, hỗn hợp phối chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều axit amin. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin có thể bao gồm ít nhất một trong số alanin và methionin. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế này có thể còn bao gồm ít nhất một trong số manitol và MSG. Theo các phương án nhất định, hỗn hợp phối chế có thể bao gồm trehaloza và manitol trong chất đệm không chứa ure hoặc axit amin. Theo các phương án này, chất đệm này có thể bao gồm PBS (hoặc TRIS, HEPES hoặc chất đệm thích hợp khác), NaCl và albumin chẳng (chẳng hạn, HSA).

Theo một số phương án, như các phương án nêu trong đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00013], hỗn hợp phối chế có thể bao gồm chất đệm bazơ, sucroza, albumin, manitol, alanin, methionin, MSG và/hoặc ure theo tổ hợp bất kỳ. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế nhất định có thể bao gồm HSA tái tổ hợp có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v), sucroza có nồng độ từ khoảng 1,0% đến khoảng 15,0% (w/v), manitol có nồng độ từ khoảng 0,1% đến khoảng 15,0% (w/v), alanin có nồng độ từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 100 mM, methionin có nồng độ từ khoảng 1,0 mM đến 5,0 mM, MSG có nồng độ từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 50,0 mM, và ure có nồng độ từ khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v).

Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được dự tính ở đây có thể bao gồm albumin hoặc HSA tái tổ hợp, trehaloza và/hoặc sucroza trong chất đệm bazơ, manitol, alanin, methionin, MSG và ure.

Theo một số phương án, như các phương án nêu ở đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00015], nồng độ HSA tái tổ hợp có thể là khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v), nồng độ trehaloza có thể là khoảng 1,0% đến khoảng 10,0% (w/v), nồng độ sucroza có thể là khoảng 1,0% đến khoảng 15,0% (w/v), nồng độ manitol có thể là khoảng 0,1% đến khoảng 15,0% (w/v), alanin có thể là khoảng 0,5 mM đến khoảng 100 mM, nồng độ methionin có thể là khoảng 1,0 mM đến 5,0 mM, nồng độ MSG có thể là khoảng 5,0 mM đến khoảng 100,0 mM, và nồng độ ure có thể là khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v).

Theo một số phương án, như các phương án nêu ở đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00016], các hỗn hợp phối chế có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza, alanin và urea. Theo các phương án khác, nồng độ HSA tái tổ hợp có thể là khoảng 0,01% đến khoảng 0,2%, nồng độ sucroza có thể là khoảng 1,0% đến khoảng 15,0% (w/v), alanin có thể là khoảng 0,5 mM đến khoảng 100 mM, và nồng độ ure có thể là khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v). Theo các phương án nhất định nêu trong đoạn [00017], sucroza có thể được thay bằng trehaloza ở nồng độ từ khoảng 1,0% đến khoảng 10% (w/v).

Theo một số phương án, việc làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống có thể bao gồm làm giảm sự tổn hại hoặc làm giảm sự thoái biến của một hoặc nhiều flavivirus sống bằng cách làm lạnh đông, làm đông khô, ở nhiệt độ lạnh, ở nhiệt độ trong phòng và ở khoảng 25°C, so với chế phẩm không chứa một hoặc nhiều chất này. Theo một số phương án, việc làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống như được dự tính ở đây có thể bao gồm việc đạt được sự giảm tổn hại hoặc thoái biến 10%, 20%, 30%, 40% hoặc 50% hoặc nhiều hơn đối với flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực.

Theo một số phương án, phương pháp được bộc lộ ở đây có thể bao gồm bước khử nước một phần hoặc toàn bộ hỗn hợp phối chế mà bao gồm flavivirus sống này. Theo các phương án khác, phương pháp này có thể bao gồm bước khử nước một phần hoặc toàn bộ hỗn hợp phối chế mà bao gồm các flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực trước khi dùng cho đối tượng ở dạng một phần của chế phẩm miễn dịch (*chẳng hạn* chế phẩm vắc xin). Theo các phương án khác nữa, phương pháp này có thể bao gồm làm lạnh đông chế phẩm chứa flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực được bộc lộ ở đây.

Các phương án khác đề cập đến kit để làm ổn định các flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực. Theo các phương án này, kit có thể bao gồm chế phẩm hoặc hỗn hợp phối chế bất kỳ được bộc lộ ở đây và ít nhất một đồ chứa.

Các phương án nhất định liên quan đến chế phẩm chứa flavivirus sống đã được giảm độc lực được bộc lộ ở đây và các phương pháp nhằm sản xuất chế phẩm miễn

dịch (chẳng hạn vắc xin) có khả năng làm giảm hoặc ngăn ngừa sự khởi phát của tình trạng bệnh như sự nhiễm flavivirus hoặc bệnh do một hoặc nhiều flavivirus gây ra. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều flavivirus sống đã được giảm độc lực có thể là một phần của dược phẩm mà có thể bao gồm tá dược hoặc chất mang dược dụng. Theo các phương án này, dược phẩm có thể được dùng cho đối tượng để giảm sự khởi phát của tình trạng bệnh do sự nhiễm flavivirus khi được dùng cho đối tượng, và/hoặc được bào chế để dùng cho đối tượng. Đối tượng có thể là động vật có vú, ví dụ, động vật đã được thuần hóa, vật nuôi cảnh, vật nuôi, động vật khác hoặc đối tượng người (chẳng hạn người trưởng thành, thanh thiếu niên hoặc trẻ em).

Theo một số phương án, chế phẩm có thể bao gồm HSA tái tổ hợp hoặc HSA, sucroza, methionin và urea. Theo các phương án này, HSA tái tổ hợp hoặc HSA có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v), sucroza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 10,0% (w/v), methionin có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 5,0 mM, và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v). Theo các phương án khác, hỗn hợp phối chế chứa HSA tái tổ hợp hoặc HSA, sucroza, methionin và ure có thể còn bao gồm một hoặc nhiều trong số alanin ở nồng độ từ khoảng 5,0 mM đến khoảng 25,0 mM, manitol ở nồng độ từ khoảng 1,0% đến khoảng 15% (w/v) và mono natri glutamat (MSG) ở nồng độ từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 20,0 mM. Theo các phương án nhất định, chế phẩm nêu ở đoạn [00022] có thể trong chất đệm bazơ sucroza được bộc lộ ở đây. Theo các phương án khác nữa, sucroza có thể được thay bằng trehaloza trong các chế phẩm nêu ở đoạn [00022] này.

Theo các phương án khác, chế phẩm có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza và/hoặc trehaloza, arginin và urea. Theo các phương án này, HSA tái tổ hợp hoặc HSA có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v), sucroza và/hoặc trehaloza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 10,0% (w/v), arginin có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 50,0 mM, và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v).

Theo một số phương án, chế phẩm có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza và/hoặc trehaloza, MSG (mono natri glutamat) và ure. Theo các phương án này, HSA tái tổ hợp hoặc HSA có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 2,0% (w/v), sucroza và/hoặc trehaloza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 10,0% (w/v), MSG có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 20,0 mM và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v).

Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây có thể bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực với hỗn hợp phối chế bao gồm một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon và một hoặc nhiều axit amin hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó. Theo các phương pháp này, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực khỏi bị thoái biến. Các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có khả năng làm ổn định ví dụ typ huyết thanh hoặc chủng flavivirus bất kỳ. Theo các phương án nhất định, flavivirus bao gồm virus có vỏ bọc, ví dụ, virus sốt xuất huyết (chẳng hạn các typ huyết thanh 1-4), virus gây sốt vàng da, virus West Nile và virus Zika.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ dưới đây tạo thành một phần của bản mô tả sáng chế và được đưa vào nhằm minh họa thêm về các khía cạnh nhất định của một số phương án được bộc lộ ở đây. Các phương án nhất định có thể được hiểu rõ hơn bằng cách tham chiếu đến một hoặc nhiều trong số các hình vẽ này kết hợp với phần mô tả chi tiết được thể hiện ở đây.

Fig. 1 là biểu đồ tần số được nêu làm ví dụ minh họa dữ liệu thu được từ các thí nghiệm được tiến hành trong khi phân tích độ ổn định của flavivirus sống trong các hỗn hợp phối chế khác nhau, theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 2 là đồ thị đường được nêu làm ví dụ minh họa dữ liệu thu được từ các thí nghiệm được tiến hành trong khi phân tích độ ổn định của flavivirus sống trong các

hỗn hợp phối chế khác nhau, trước khi đông khô, sau khi đông khô, và sau khi đông khô và bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) trong khoảng 5 tuần, theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 3A và 3B là các đồ thị được nêu làm ví dụ thể hiện dữ liệu từ các thí nghiệm bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế khác nhau để kiểm tra độ ổn định của flavivirus sống sau khi phơi sáng ở nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) trong 5 tuần sau khi đông khô, sự giảm hiệu lực theo log (3A) và tổng sự giảm hiệu lực theo log (3B) ở cả liều lượng được chất lớn (liều lượng BDS) là 50% (tam giác đặc) và liều lượng hiện thời (liều lượng CTM) (hình vuông đặc), theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 4A và 4B là các đồ thị được nêu làm ví dụ biểu thị dữ liệu từ các thí nghiệm bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế khác nhau để kiểm tra độ ổn định của flavivirus sống sau khi phơi sáng ở nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) trong 5 tuần sau khi đông khô, sự giảm hiệu lực theo log (4A) và tổng sự giảm hiệu lực theo log (4B) ở cả BDS 50% (tam giác đặc) và CTM (hình vuông đặc), theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 5A và 5B là các đồ thị được nêu làm ví dụ biểu thị dữ liệu từ các thí nghiệm bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế khác nhau để kiểm tra độ ổn định của flavivirus sống sau khi phơi sáng ở nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) trong 5 tuần sau khi đông khô, sự giảm hiệu lực theo log (5A) và tổng sự giảm hiệu lực theo log (5B) ở cả BDS 50% (tam giác đặc) và CTM (hình vuông đặc), theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 6A và 6B là các đồ thị được nêu làm ví dụ biểu thị dữ liệu từ các thí nghiệm bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế khác nhau để kiểm tra độ ổn định của flavivirus sống sau khi phơi sáng ở nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) trong 5 tuần sau khi đông khô, sự giảm hiệu lực theo log (6A) và tổng sự giảm hiệu lực theo log (6B) ở cả BDS 50% (tam giác đặc) và CTM (hình vuông đặc), theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 7A-7D là đồ thị đường được nêu làm ví dụ minh họa ảnh hưởng của các tá dược riêng lẻ (trong chất đệm bazơ chứa trehaloza) đối với hiệu lực virus của flavivirus ở cả dạng lỏng và dạng đông khô, theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 8A-8B là đồ thị đường được nêu làm ví dụ minh họa ảnh hưởng của các tá dược riêng lẻ (trong chất đệm bazơ chứa sucroza) đối với hiệu lực virus của flavivirus ở cả dạng lỏng và dạng đông khô, sự giảm độ ổn định (**8A**) và sự giảm hiệu lực theo log khi ở dạng đông khô (**8B**) theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 9A-9B là đồ thị đường được nêu làm ví dụ minh họa ảnh hưởng của các tá dược riêng lẻ và tổ hợp tá dược (trong chất đệm bazơ chứa sucroza) đối với hiệu lực virus của flavivirus ở cả dạng lỏng và dạng đông khô, sự giảm hiệu lực theo log khi ở dạng đông khô (**9A**) và sự giảm độ ổn định (**9B**) theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 10A-10B là các đồ thị đường được nêu làm ví dụ biểu thị dữ liệu từ việc sàng lọc dựa trên ảnh hưởng của các tác nhân, các hydrat cacbon khác nhau (chẳng hạn trehaloza và sucroza) và manitol (trong chất đệm bazơ) đến độ ổn định flaviviral và sự giảm hiệu lực theo log, theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 11A-11B là bản tóm tắt được nêu làm ví dụ về các bộ dữ liệu sàng lọc tá dược dựa trên sự tổn hao hiệu lực flavivirus, theo một phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 12A-12C là các đồ thị đường được nêu làm ví dụ minh họa thiết kế Definitive Screening Design (DSD) của các thí nghiệm phối chế đối với flavivirus được bào chế đối với độ chuẩn trong dạng lỏng, đông khô (được bảo quản ở -80°C) và độ ổn định tổng thể (**12A**) và chiều hướng ổn định (**12B**) của các mẫu để vận chuyển (hỗn hợp phối chế đông khô được bảo quản ở 25°C) và sự giảm log trong các điều kiện thử nghiệm khác nhau (**12C**), theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 13A-13C là đồ thị dạng đường được nêu làm ví dụ thể hiện các typ huyết thanh của flavivirus (trong chế phẩm miễn dịch tứ giá) đối với thiết kế hỗn hợp phối chế, về bề ngoài của mẫu và giảm độ chuẩn virus, theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 14A-14D là đồ thị đường được nêu làm ví dụ thể hiện các flavivirus khác nhau (chẳng hạn virus sốt xuất huyết-1, -2, -3 và -4) ở dạng các hỗn hợp phối chế sinh miễn dịch đã được làm đông khô được bảo quản ở nhiệt độ lạnh (chẳng hạn 4°C) trong khoảng 39 tuần, theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Fig. 15A-15B là các đồ thị đường được nêu làm ví dụ biểu thị dữ liệu từ việc sàng lọc dựa trên ảnh hưởng của các tổ hợp tá dược khác nhau đến hiệu lực của flavivirus, sự giảm hiệu lực theo log khi ở dạng đông khô (**15A**) và sự giảm độ ổn định theo log (**15B**), theo một số phương án được bộc lộ ở đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phân định nghĩa

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “một” có thể có nghĩa một hoặc nhiều hơn một khoản mục, thành phần hoặc yếu tố.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “khoảng” có thể có nghĩa lên tới và bao gồm cộng hoặc trừ năm phần trăm, ví dụ, khoảng 100 mM có thể có nghĩa 95 mM và lên tới 105 mM.

Như được sử dụng trong bản mô tả này “TDV” dùng để chỉ các virus sốt xuất huyết được nêu làm ví dụ (chẳng hạn typ huyết thanh virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực, TDV-1, thể khả virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết, thể khả virus sốt xuất huyết với bộ khung virus sốt xuất huyết-2 (chẳng hạn virus sốt xuất huyết-2 PDK-53 hoặc dạng cải biến của nó với độ tương đồng ít nhất 95% với PDK-53, v.v.).

Như được sử dụng trong bản mô tả này “DMEM” có thể có nghĩa là môi trường thiết yếu tối thiểu được cải biến của Dulbecco.

Như được sử dụng trong bản mô tả này “PBS” có thể có nghĩa là dung dịch nước muối đệm phosphat (Phosphate Buffered Saline).

Như được sử dụng trong bản mô tả này “FBS” có thể có nghĩa là huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum).

Như được sử dụng trong bản mô tả này “HSA” có thể có nghĩa albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin).

Như được sử dụng trong bản mô tả này “Lyo” có thể có nghĩa được đông khô hoặc được khử nước tùy thuộc vào trạng thái của đối tượng ám chỉ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, mô tả “đối tượng” hoặc “các đối tượng” có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật có vú như người (chẳng hạn người trưởng thành, thanh thiếu niên, trẻ em hoặc trẻ sơ sinh) hoặc các động vật có vú, động vật đã thuần hóa hoặc hoang dã, chẳng hạn chó, mèo, các thú cưng nuôi trong nhà khác (*chẳng hạn*, chuột hamster, chuột lang, chuột nhắt, chuột cống), chồn sương, thỏ, lợn, dê, ngựa, gia súc, các vật nuôi khác, sóc chó, loài gặm nhấm hoang dã, hoặc các động vật vườn thú.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “thể khảm virus,” “virus khảm,” “thể khảm flavivirus” và “flavivirus khảm” có thể có nghĩa thể khảm có ít nhất 2 virus khác nhau được thể hiện trong một cấu trúc ví dụ cấu trúc của thể khảm flavivirus có 2 flavivirus khác nhau được thể hiện bởi việc bao hàm các yếu tố không cấu trúc và yếu tố cấu trúc từ mỗi flavivirus. Ví dụ về thể khảm flavivirus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus sốt xuất huyết, virus West Nile, virus gây viêm não Nhật Bản, virus gây viêm não St. Louis, virus gây viêm não do tíc gây ra, virus gây sốt vàng da, virus Zika và tổ hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, thể khảm virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết, virus sốt xuất huyết-Zika, hoặc thể khảm virus sốt vàng da/virus sốt xuất huyết được dự tính.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể khảm virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết” có thể có nghĩa ít nhất hai typ huyết thanh virus sốt xuất huyết khác nhau tạo thành thể khảm virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “thể khảm axit nucleic” có thể có nghĩa cấu trúc theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic từ ít nhất hai virus khác

nhau ví dụ, flavivirus khảm hoặc thể khảm virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết được bộc lộ ở đây có thể là thể khảm axit nucleic.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “flavivirus sống” có thể có nghĩa flavivirus sống kiểu đại (*chẳng hạn* để dùng trong sản xuất flavivirus sống đã được giảm độc lực). “Flavivirus sống đã được giảm độc lực” có thể có nghĩa flavivirus sống mang đột biến, thể khảm flavivirus hoặc các flavivirus khác được chọn lọc các tính trạng mà ở đó virus này có khả năng lây nhiễm giảm hoặc không có khả năng lây nhiễm và sự lan rộng giảm hoặc không thể truyền nhiễm từ một vật chủ sang một vật chủ khác (*chẳng hạn* qua muỗi) và được sử dụng trong sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch và trong đó các tính trạng khác có thể bao gồm tính độc giảm, độ an toàn tăng, hiệu lực tăng hoặc sự sinh trưởng được cải thiện, v.v..

Trong phần sau đây, ví dụ về các chế phẩm và phương pháp khác nhau được mô tả để cụ thể hóa các phương án khác nhau. Chuyên gia trong lĩnh vực tương ứng hiểu rõ rằng việc thực hiện các phương án khác nhau không đòi hỏi việc sử dụng tất cả hoặc thậm chí là một vài chi tiết cụ thể được nêu ra ở đây, mà thay vào đó nồng độ, thời gian và các chi tiết cụ thể khác có thể được cải biến nhờ thí nghiệm thông thường. Theo một số phương án, các phương pháp hoặc thành phần đã biết không được bao hàm trong phần mô tả.

Theo các phương án nhất định, độ ổn định của flavivirus sống để dùng trong hỗn hợp phối chế sinh miễn dịch hoặc hỗn hợp phối chế vắc xin đã được nghiên cứu trong các hỗn hợp phối chế khác nhau được bộc lộ ở đây. Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế mà gia tăng độ ổn định của flavivirus để làm giảm sự giảm độ chuẩn của các hỗn hợp phối chế flavivirus sống ở dạng lỏng, đã được làm đông lạnh, đã được làm đông khô, được làm đông khô một phần và được hydrat hóa lại đã được đề xuất.

Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hỗn hợp phối chế để làm ổn định flavivirus. Flavivirus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus sốt xuất huyết, virus West Nile, virus gây viêm não do tíc gây ra, virus gây sốt vàng da, virus gây viêm não Nhật

Bản, virus Kunjin, virus gây viêm não St. Louis, virus gây viêm não Murray Valley, virus Zika, hoặc virus bất kỳ có liên quan của nó.

Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chất đệm. Theo các phương án này, chất đệm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch muối đệm phosphat (PBS), Histidin, TRIS, axit 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]etansulfonic (HEPES) hoặc chất đệm tương tự. Theo các phương án này, chất đệm có thể bao gồm muối của natri clorua (NaCl), mononatri và/hoặc dinatri phosphat (Na_2HPO_4), kali clorua (KCl), và kali phosphat (KH_2PO_4) hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, chất đệm của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm NaCl, mononatri và/hoặc dinatri phosphat (Na_2HPO_4), kali clorua (KCl), và kali phosphat (KH_2PO_4) hoặc tổ hợp của chúng có nồng độ từ khoảng 10,0 mM đến khoảng 200,0 mM; hoặc từ khoảng 10 mM đến khoảng 150 mM; hoặc từ khoảng 15 mM đến khoảng 75 mM hoặc từ khoảng 15mM đến khoảng 50 mM. Theo các phương án khác, các hỗn hợp phối chế để làm ổn định flavivirus sống không chứa magie clorua (MgCl_2).

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân protein. Theo các phương án này, một hoặc nhiều tác nhân protein có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin, gelatin và/hoặc dextran. Ví dụ, albumin có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin tái tổ hợp, albumin tự nhiên, albumin huyết thanh người (HSA) hoặc tác nhân tương tự albumin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân protein trong chế phẩm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin huyết thanh bất kỳ, albumin huyết thanh người (HSA), albumin huyết thanh bò (BSA), huyết thanh từ động vật có vú tương ứng bất kỳ, gelatin, dextran, polyme polyol, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều tác nhân protein trong hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm albumin, như albumin huyết thanh người hoặc albumin tái tổ hợp, có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v); hoặc từ khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v); hoặc 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v); hoặc 0,075% đến 0,2% (w/v); hoặc 0,1% đến 0,3% (w/v). Theo các phương án này, hỗn

hợp phối chế bất kỳ được bộc lộ ở đây có thể bao gồm albumin huyết thanh người (HSA) có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0%.

Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trehaloza, galactoza, fructoza, lactoza, sucroza, chitosan, manitol hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án này, nồng độ của một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon có thể từ khoảng 0,5% đến khoảng 15,0% (w/v); hoặc từ khoảng 1,0% đến khoảng 10% hoặc từ khoảng 5,0% đến khoảng 8,0%. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong chế phẩm có thể bao gồm trehaloza và/hoặc sucroza. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong chế phẩm có thể bao gồm manitol kết hợp với ít nhất một trong số trehaloza và sucroza. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon trong chế phẩm có thể bao gồm manitol kết hợp với cả trehaloza và sucroza. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có nồng độ hydrat cacbon bằng 10% (w/v) hoặc nhỏ hơn. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có nồng độ hydrat cacbon nhỏ hơn 10% (w/v). Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây không bao gồm sorbitol. Theo các phương án khác, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây không chứa poloxamer 407 hoặc poloxamer khác.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin trong hỗn hợp phối chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alanin, arginin, methionin, hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin có thể bao gồm dẫn xuất axit amin hoặc muối của nó. Theo các phương án khác nữa, dẫn xuất axit amin có thể bao gồm mono natri glutamat (mono natri glutamat - MSG) hoặc kali glutamat. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó có mặt trong hỗn hợp phối chế ở nồng độ từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 150,0 mM; hoặc khoảng 0,5 mM đến 100 mM; hoặc khoảng 1 mM đến khoảng 50 mM hoặc khoảng 1,0 mM đến khoảng 15,0 mM hoặc khoảng 2,5 mM đến 10 mM.

Theo một số phương án, như các phương án nêu ở đoạn bất kỳ trong số các đoạn [0004]-[00011] và các đoạn [00056]-[00061], các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều osmolyte. Theo các phương án này, một hoặc nhiều osmolyte có thể bao gồm ure (ví dụ carbamit) hoặc các chất có thể thay thế khác, ví dụ, caprolactam, PEG 400 hoặc PEG 600. Theo các phương án này, nồng độ của một hoặc nhiều osmolyte có thể là từ khoảng 0,01% đến khoảng 1,0% (w/v); hoặc khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v); hoặc khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v) hoặc khoảng 0,075% đến khoảng 0,4% (w/v) hoặc khoảng 0,125% (w/v).

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể còn bao gồm, sucroza hoặc trehaloza, một hoặc nhiều axit amin và ure. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế này có thể còn bao gồm ít nhất một trong số manitol, MSG và ure. Theo các phương án nhất định, hỗn hợp phối chế có thể bao gồm trehaloza trong chất đệm thích hợp và manitol trong chất đệm. Theo các phương án này, chất đệm có thể bao gồm PBS hoặc TRIS hoặc HEPES hoặc chất đệm thích hợp khác, NaCl và albumin (chẳng hạn, HSA). Theo các phương án nhất định, chất đệm là PBS hoặc HEPES. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin có thể bao gồm alanin và/hoặc methionin. Theo các phương án khác, hỗn hợp phối chế có thể bao gồm sucroza trong chất đệm thích hợp và ure.

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế flavivirus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều flavivirus sống, chất đệm, một hoặc nhiều axit amin, và một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon. Ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch và hỗn hợp phối chế vắc xin được bộc lộ ở đây có thể bao gồm các dung dịch đệm có nồng độ khoảng 1,0 đến 30,0 mM dung dịch đệm phosphat, khoảng 1,0 đến 30,0 dung dịch đệm HEPES, khoảng 1,0 đến 30,0 dung dịch đệm Histidin, khoảng 1,0 đến 30,0 dung dịch đệm Tris, cùng hoặc không cùng với muối và trehaloza, sucroza hoặc tổ hợp của trehaloza và sucroza. Các chế phẩm sinh miễn dịch hoặc hỗn hợp phối chế vắc xin được nêu làm ví dụ khác có thể bao gồm khoảng 1,0 đến 30,0 mM dung dịch muối đệm phosphat (PBS) với khoảng 10,0 đến khoảng 100 mM natri clorua ở độ pH khoảng 7,2, xem bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Hỗn hợp phối chế được nêu làm ví dụ của chế phẩm sinh miễn dịch

Số	Đường	Đệm	NaCl
1	Trehaloza (10%)+0,1%HSA	10 mM dung dịch đệm phosphat (pH:7,2)	-
2		10 mM dung dịch đệm phosphat (pH:7,2)	50mM
3		10 mM dung dịch đệm HEPES (pH:7,2)	-
4		10 mM dung dịch đệm HEPES (pH:7,2)	50mM
5		10 mM dung dịch đệm Histidin (pH:7,2)	-
6		10 mM dung dịch đệm Histidin (pH:7,2)	50mM
7		10 mM dung dịch đệm Tris (pH:7,2)	-
8		10 mM dung dịch đệm Tris (pH:7,2)	50mM
9	sucroza (10%)+0,1% HSA	10 mM dung dịch đệm phosphat (pH:7,2)	-
10		10 mM dung dịch đệm phosphat (pH:7,2)	50mM
11		10 mM dung dịch đệm HEPES (pH:7,2)	-
12		10 mM dung dịch đệm HEPES (pH:7,2)	50mM
13		10 mM dung dịch đệm Histidin (pH:7,2)	-
14		10 mM dung dịch đệm Histidin (pH:7,2)	50mM
15		10 mM dung dịch đệm Tris (pH:7,2)	-
16		10 mM dung dịch đệm Tris (pH:7,2)	50mM
17	Hỗn hợp phối chế đối	10 mM dung dịch đệm phosphat	137mM

	chứng, tham chiếu (15% trehaloza +0,1%HSA+ % Pluronic F127®)	(pH:7,4)	
--	--	----------	--

Theo các phương án khác, hỗn hợp phối chế có thể bao gồm chất đệm bazơ, sucroza, albumin, manitol, alanin, methionin, MSG và/hoặc ure theo tổ hợp bất kỳ. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế nhất định có thể bao gồm HSA tái tổ hợp có nồng độ từ khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v) hoặc khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v), nồng độ sucroza có nồng độ từ khoảng 1,0% đến khoảng 15% (w/v) hoặc nhỏ hơn 10% (w/v), manitol có nồng độ từ khoảng 0,5% đến khoảng 15,0% (w/v), alanin có nồng độ từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 100 mM hoặc khoảng 5,0 mM đến khoảng 50 mM, methionin có nồng độ từ khoảng 1,0 mM đến 5,0 mM hoặc khoảng 1,5 mM đến khoảng 3,0 mM, MSG có nồng độ từ khoảng 5,0 mM đến khoảng 100,0 mM hoặc khoảng 5,0 mM đến khoảng 25 mM, và ure có nồng độ từ khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v) hoặc khoảng 0,1% đến khoảng 0,5% (w/v).

Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được dự tính ở đây có thể bao gồm albumin hoặc HSA tái tổ hợp, trehaloza, manitol, alanin, methionin, MSG và ure. Theo các phương án này, nồng độ HSA tái tổ hợp có thể là khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v) hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 1,0%, nồng độ trehaloza có thể là khoảng 1,0% đến khoảng 15,0% (w/v) hoặc khoảng 2,5% đến nhỏ hơn 10%, nồng độ manitol có thể là khoảng 0,1% đến khoảng 10,0% (w/v), alanin có thể là khoảng 1,0 mM đến khoảng 50 mM hoặc khoảng 5 mM đến khoảng 25 mM, nồng độ methionin có thể là khoảng 0,05 mM đến khoảng 5,0 mM hoặc khoảng 0,1 mM đến khoảng 4,0 mM, nồng độ MSG có thể là khoảng 1,0 mM đến khoảng 50,0 mM hoặc khoảng 5,0 mM đến khoảng 25,0 mM, và nồng độ ure có thể là khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v) hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 0,3% (w/v).

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza, alanin và ure. Theo các phương án khác, nồng độ HSA tái tổ hợp có thể là khoảng 0,01% đến khoảng 2,0% (w/v) hoặc khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v), nồng độ sucroza có thể là khoảng 1,0% đến khoảng 10% hoặc khoảng 5%, nồng độ alanin có thể là khoảng 1,0 mM đến khoảng 50 mM, và nồng độ

ure có thể là khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v) hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 0,3% (w/v).

Theo một số phương án, việc làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống có thể bao gồm làm giảm sự tổn hại hoặc làm giảm sự thoái biến của một hoặc nhiều flavivirus sống bằng cách làm lạnh đông, làm đông khô, ở nhiệt độ lạnh, ở nhiệt độ trong phòng và ở khoảng 25°C, so với chế phẩm không chứa một hoặc nhiều chất này. Theo một số phương án, việc làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống như được dự tính ở đây có thể bao gồm việc đạt được sự giảm tổn hại 10% , 20%, 30%, 40% hoặc 50% hoặc nhiều hơn của flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực khi được bào chế bởi các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây.

Theo một số phương án, phương pháp được bộc lộ ở đây có thể bao gồm bước khử nước một phần hoặc toàn bộ hỗn hợp phối chế mà bao gồm flavivirus sống này. Theo các phương án khác, phương pháp này có thể bao gồm bước khử nước một phần hoặc toàn bộ hỗn hợp phối chế mà bao gồm các flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực trước khi dùng cho đối tượng ở dạng một phần của chế phẩm miễn dịch (*chẳng hạn* chế phẩm vắc xin). Theo các phương án khác nữa, phương pháp này có thể bao gồm làm lạnh đông chế phẩm chứa flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực được bộc lộ ở đây.

Các phương án nhất định được bộc lộ ở đây liên quan đến chế phẩm chứa flavivirus sống đã được giảm độc lực và các phương pháp nhằm sản xuất chế phẩm miễn dịch (*chẳng hạn* vắc xin) có khả năng làm giảm hoặc ngăn ngừa sự khởi phát của tình trạng bệnh như sự nhiễm flavivirus hoặc bệnh do một hoặc nhiều flavivirus được dự tính ở đây gây ra. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều flavivirus sống đã được giảm độc lực có thể là một phần của dược phẩm mà có thể bao gồm tá dược hoặc chất mang dược dụng. Theo các phương án này, dược phẩm có thể được dùng cho đối tượng để giảm sự khởi phát của tình trạng bệnh do sự nhiễm flavivirus khi được dùng cho đối tượng, và/hoặc được bào chế để dùng cho đối tượng. Đối tượng có thể là động vật có vú, ví dụ, động vật đã được thuần hóa, vật nuôi cảnh, vật nuôi, động

vật khác hoặc đối tượng người (chẳng hạn người trưởng thành, thanh thiếu niên hoặc trẻ em).

Theo một số phương án, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể bao gồm HSA tái tổ hợp hoặc HSA, sucroza, methionin và ure. Theo các phương án này, HSA tái tổ hợp có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v), sucroza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 10,0% (w/v), methionin có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 5,0 mM, và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v). Theo các phương án khác, hỗn hợp phối chế chứa HSA tái tổ hợp hoặc HSA, sucroza, methionin và ure có thể còn bao gồm một hoặc nhiều trong số alanin ở nồng độ từ khoảng 5,0 mM đến khoảng 25,0 mM, manitol ở nồng độ từ khoảng 1,0% đến khoảng 15% (w/v) và mono natri glutamat (MSG) ở nồng độ từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 20,0 mM. Theo các phương án nhất định, chế phẩm nêu ở đoạn [00071] có thể trong chất đệm bazơ sucroza được bộc lộ ở đây.

Theo các phương án khác, chế phẩm có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza và/hoặc trehaloza, arginin và ure. Theo các phương án này, HSA hoặc HSA tái tổ hợp có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 1,0% (w/v), sucroza và/hoặc trehaloza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 10,0% (w/v), arginin có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 50,0 mM, và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v) hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 0,3% (w/v).

Theo một số phương án, chế phẩm có thể bao gồm HSA tái tổ hợp, sucroza và/hoặc trehaloza, mono natri glutamat (MSG - monosodium glutamate) và ure. Theo các phương án này, HSA hoặc HSA tái tổ hợp có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,5% (w/v), sucroza và/hoặc trehaloza có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% đến khoảng 15,0% (w/v) hoặc nhỏ hơn 10% (w/v), MSG có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 mM đến khoảng 20,0 mM và ure có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (w/v) hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 0,3% (w/v).

Theo một số phương án, chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây có thể bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực với hỗn hợp phối chế bao gồm một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon và một hoặc nhiều axit amin hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó. Theo các phương pháp này, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực khỏi bị thoái biến. Các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có khả năng làm ổn định ví dụ typ huyết thanh hoặc chủng flavivirus bất kỳ. Theo các phương án nhất định, flavivirus bao gồm virus có vỏ bọc, ví dụ, virus sốt xuất huyết (chẳng hạn các typ huyết thanh 1-4), virus gây sốt vàng da, virus West Nile và virus Zika.

Theo các phương án khác, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể bao gồm flavivirus trong chất đệm, ure và một hoặc nhiều axit amin mà có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alanin, arginin, methionin hoặc tổ hợp của chúng, và một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon mà có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ít nhất một trong số sucroza, trehaloza và/hoặc manitol. Các chế phẩm nhất định được bộc lộ ở đây cũng có thể bao gồm muối hoặc dung dịch muối. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế flavivirus này có thể được sử dụng để bảo quản flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực ở dạng lỏng, lạnh đông hoặc đông khô ở khoảng -80°C đến khoảng 40°C hoặc lớn hơn mà không làm giảm đáng kể độ chuẩn virus trong chế phẩm. Ví dụ, bảo quản trong thời gian dài ở 4°C và 25°C có thể đạt được bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây. Theo các phương án nhất định, chế phẩm được dự tính ở đây có thể được loại nước và/hoặc hydrat hóa một phần hoặc hoàn toàn. Theo các phương án này, việc bảo quản các hỗn hợp phối chế chứa flavivirus được bộc lộ ở đây trong thời gian dài có thể bao gồm bảo quản tăng cường các hỗn hợp phối chế dạng đông khô và vận chuyển hoặc bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong các khoảng thời gian dài, lớn hơn 5 tuần.

Theo một số phương án, flavivirus sống được dự tính ở đây được hưởng lợi từ chế phẩm và các hỗn hợp phối chế theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus sốt xuất huyết, virus West Nile, virus gây viêm não do tíc gây ra, virus gây sốt vàng da, virus gây viêm não Nhật Bản, virus Kunjin, virus gây viêm não St. Louis,

virut gây viêm não Murray Valley, virut Zika, hoặc flavivirus bất kỳ có liên quan của chúng. Theo các phương án này, flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực để dùng trong vắc xin có thể được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau trong đó các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây làm tăng độ ổn định của hỗn hợp phối chế này bằng cách, ví dụ, làm giảm sự thoái biến của flavivirus như làm giảm sự giảm độ chuẩn của flaviviruses trong hỗn hợp phối chế này. Vì vậy, việc sử dụng các hỗn hợp phối chế này để bảo quản flavivirus tạo ra các giải pháp đối với việc sản xuất hiệu quả, vận chuyển và phân phối các liều lượng flavivirus đã biết ở dạng chế phẩm sinh miễn dịch với chi phí và thời gian sản xuất giảm. Các hỗn hợp phối chế đã nêu cho phép phân phối chế phẩm miễn dịch chứa flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực một cách chính xác hơn đến bệnh nhân cần hỗn hợp phối chế này.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp bào chế chế phẩm vắc xin hữu ích để dùng cho đối tượng cần đến nó. Theo các phương án nhất định, chế phẩm sinh miễn dịch chống lại sự nhiễm flavivirus hoặc các biến chứng của nó được đề xuất. Ví dụ, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để sản xuất vắc xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch nhằm cải thiện các điều kiện bảo quản và làm giảm sự thoái biến của flavivirus. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều hoặc cả bốn typ huyết thanh virut sốt xuất huyết có thể được sản xuất thành một chế phẩm miễn dịch được bộc lộ ở đây để giảm sự thoái biến của flavivirus hoặc duy trì độ chuẩn virut để phân phối một cách chính xác hơn một lượng đã biết của flavivirus cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, khi được kết hợp, chế phẩm sinh miễn dịch có thể bao gồm chế phẩm vắc xin đa giá (chẳng hạn, nhị giá, tam giá và tứ giá) để có được sự bảo vệ đồng thời một cách chính xác hơn đối với sự nhiễm nhiều hơn một loài hoặc chủng flavivirus. Theo một số phương án, flaviviruses có thể bao gồm flavivirus sống và/hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực. Theo các phương án khác, nhiều hơn một typ huyết thanh hoặc chủng của một flavivirus hoặc các flavivirus khác nhau hoặc các thể khảm có thể được kết hợp trong một chế phẩm miễn dịch. Theo các phương án này, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể làm ổn định hỗn hợp phối chế để phân phối một cách chính xác hơn chế phẩm sinh miễn dịch chống lại flavivirus mà ở đó khả năng sống sót của flavivirus

sống trong quá trình vận chuyển và bảo quản được cải thiện.

Trong chế phẩm nhất định, flavivirus sống đã được giảm độc lực có thể bao gồm các axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều protein từ 2 hoặc nhiều hơn 2 flavivirus khác nhau như thể khảm. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch và các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều typ huyết thanh virus sốt xuất huyết được kể đến như là TDV-1 (ví dụ virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 1, thể khảm virus sốt xuất huyết 1/2), TDV-2 (ví dụ virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 2, virus sốt xuất huyết-2 sống được giảm độc lực được cải biến), TDV-3 (ví dụ virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3, thể khảm virus sốt xuất huyết 3/2), và TDV-4 (ví dụ virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 4, thể khảm virus sốt xuất huyết 4/2), và tổ hợp của chúng. Dự tính rằng cấu trúc virus sốt xuất huyết bất kỳ (chẳng hạn thể khảm flavivirus bất kỳ) hoặc virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực có thể được làm ổn định bằng các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, thể khảm virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực được đề xuất ở đây có thể chứa các gen protein không cấu trúc của một virus sốt xuất huyết (chẳng hạn virus sốt xuất huyết-2), hoặc thể tương đương của nó, và một hoặc nhiều gen protein cấu trúc hoặc phần sinh miễn dịch của nó của ít nhất một flavivirus thứ hai (chẳng hạn virus sốt vàng da, typ huyết thanh virus sốt xuất huyết khác, virus Zika). Ví dụ, các phương án nhất định liên quan đến virus sốt xuất huyết-virus sốt xuất huyết, virus sốt xuất huyết-virus sốt vàng da, virus sốt xuất huyết-Zika, virus sốt xuất huyết-West Nile, virus sốt xuất huyết-JEV hoặc các thể khảm flavivirus khác như các hỗn hợp phối chế đơn giá, nhị giá, tam giá hoặc tứ giá đối với một hoặc nhiều flavivirus.

Một số phương án liên quan đến các phương pháp làm giảm sự bất hoạt của flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kết hợp một hoặc nhiều flavivirus với chế phẩm có khả năng làm giảm sự bất hoạt của flaviviruses được bộc lộ ở đây, trong đó chế phẩm này làm giảm sự bất hoạt của flavivirus này. Theo các phương án này, flavivirus sống có thể bao gồm các flavivirus cụ thể, như các flavivirus có đặc tính tương tự như các flavivirus có vỏ bọc như các typ huyết thanh virus sốt xuất huyết, các flavivirus khác có thiết kế protein thành phần di truyền, cấu trúc và không cấu trúc tương tự và/hoặc cấu trúc bậc hai

hoặc cấu trúc tương tự với flavivirus như virus sốt xuất huyết, virus Zika và virus gây sốt vàng da. Ví dụ, các hỗn hợp phối chế này có khả năng làm giảm sự thoái biến của flavivirus trong các quá trình cụ thể như capsid hóa, sản xuất, vận chuyển và sử dụng chế phẩm miễn dịch đã được bào chế cho đối tượng, v.v.. Các flavivirus có một số đặc điểm chung như kích cỡ chung (40–65 nm), tính đối xứng (nucleocapsid hai mươi mặt có vỏ bọc), axit nucleic (ARN chuỗi đơn, mạch dương gồm khoảng 10.000–11.000 bazơ). Dự tính rằng flavivirus bất kỳ hoặc virus có vỏ bọc ARN có thể được làm ổn định bằng chế phẩm được bộc lộ ở đây.

Theo các phương án nhất định, flavivirus sống được giảm độc lực hoặc thể khảm flavivirus được dự tính ở đây có thể được bào chế thành dược phẩm trong đó dược phẩm này có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với các chất trị liệu khác, và/hoặc có thể được sử dụng để điều chế chế phẩm vắc xin để dùng cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm virus sốt xuất huyết đơn giá, nhị giá, tam giá hoặc tứ giá có thể được bào chế thành dược phẩm bằng cách sử dụng chế phẩm được bộc lộ ở đây để làm giảm sự thoái biến của hỗn hợp phối chế, ví dụ, trong quá trình vận chuyển. Theo các phương án này, flavivirus có thể được làm đông khô trong hỗn hợp phối chế bất kỳ được bộc lộ ở đây và được vận chuyển ở nhiệt độ trong phòng mà không làm giảm đáng kể độ chuẩn (Xem phần ví dụ đối với một số hỗn hợp phối chế và phương pháp được nêu làm ví dụ).

Các phương án ở đây liên quan đến phương pháp và chế phẩm để làm giảm hoặc ngăn ngừa sự thoái biến và/hoặc sự bất hoạt của flavivirus sống đã được giảm độc lực. Theo các phương án này, các chế phẩm nhất định có thể bao gồm tổ hợp các thành phần làm giảm sự thoái biến và/hoặc sự bất hoạt của flavivirus sống và/hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực. Các phương án khác ở đây liên quan đến tổ hợp gồm các tác nhân có khả năng tăng cường độ ổn định của các flavivirus này. Các chế phẩm và phương pháp khác nữa trong bản mô tả này đề cập đến việc làm giảm yêu cầu đối với việc bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn (*chẳng hạn*, bảo quản lạnh hoặc bảo quản lạnh đông) trong khi gia tăng thời hạn sử dụng của các flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực chứa nước và/hoặc đã được hoàn nguyên.

Theo các phương án này, một hoặc nhiều flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực có thể được kết hợp với một hoặc nhiều axit amin và một hoặc nhiều hydrat cacbon. Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế flavivirus được bộc lộ ở đây bao gồm ít nhất ba thành phần: chất đệm trên cơ sở PBS hoặc chất đệm khác và ure. Theo các phương án khác, muối có thể được bổ sung vào các chế phẩm này để tăng cường khả năng đệm hoặc đặc tính khác của hỗn hợp phối chế.

Theo các phương án nhất định, tác nhân hydrat cacbon được dự tính để dùng trong chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sucroza, fructoza, galactoza, trehaloza, manitol hoặc các hydrat cacbon tương tự của chúng. Theo các phương án khác, axit amin hoặc các dẫn xuất của nó được dự tính để dùng trong chế phẩm và các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alanin, arginin, methionin, glutamat, mono natri glutamat (MSG) hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó. Theo các phương án khác nữa, các tác nhân protein để dùng trong chế phẩm và các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin huyết thanh, albumin huyết thanh người (HSA), dạng tái tổ hợp của albumin, albumin huyết thanh bò (BSA), huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum - FBS), gelatin, dextran, polyme polyol, hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tác nhân protein này chứa albumin với nồng độ từ khoảng 0,05% đến khoảng 2,0% của chế phẩm miễn dịch cụ thể.

Theo các phương án nhất định, các hỗn hợp phối chế và chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chất đệm bazơ là dung dịch muối đệm phosphat (PBS), với ít nhất một trong số natri clorua (NaCl), mononatri và/hoặc dinatri phosphat (Na_2HPO_4). Theo một số phương án, chất đệm bazơ cũng có thể bao gồm kali clorua (KCl) và/hoặc kali phosphat (KH_2PO_4). Theo các phương án khác, chất đệm ví dụ, chất đệm bazơ, có thể bao gồm natri clorua ở nồng độ từ khoảng 10,0 mM đến khoảng 200,0 mM. Dự tính rằng MgCl_2 không được bao hàm trong bất kỳ hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây do nó thể hiện ảnh hưởng bất lợi đến độ ổn định của flavivirus sống.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để làm đông khô và/hoặc hydrat hóa lại flavivirus sống hoặc sống đã được giảm

độc lực; vận chuyển các flavivirus ở các nhiệt độ khác nhau từ lạnh đông đến nhiệt độ trong phòng và các đặc tính bảo quản khác với độ ổn định được cải thiện. Chế phẩm được dự tính ở đây có thể làm tăng sự ổn định và/hoặc làm giảm sự bất hoạt và/hoặc sự thoái biến của flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau, trong quá trình xử lý và tinh chế, trong quá trình vận chuyển và phân phối và trong các chu trình làm lạnh đông-tan giá.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể được loại nước hoặc hydrat hóa một phần hoặc hoàn toàn. Ngoài ra, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng trong và sau khi đông khô chế phẩm chứa flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực (xem ví dụ, bảng 2 dưới đây). Theo các phương án này, chế phẩm có thể được loại nước 20% hoặc nhiều hơn, 30% hoặc nhiều hơn, 40% hoặc nhiều hơn, 50% hoặc nhiều hơn, 60% hoặc nhiều hơn, 70% hoặc nhiều hơn, 80% hoặc nhiều hơn, 90% hoặc nhiều hơn, hoặc 95% hoặc nhiều hơn. Chế phẩm được mô tả ở đây có khả năng làm gia tăng thời hạn sử dụng của chế phẩm flavivirus chứa nước hoặc được hydrat hóa lại. Theo các phương án này, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể làm gia tăng độ ổn định của flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực ở khoảng nhiệt độ rộng như nhiệt độ trong phòng, nhiệt độ dưới không, nhiệt độ cao (chẳng hạn, từ -80°C đến 40°C và cao hơn) trong các điều kiện đông khô hoặc lỏng/lạnh đông. Theo các phương án khác, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể làm gia tăng độ ổn định của flavivirus sống hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực lên 2 lần, 4 lần, 10 lần hoặc nhiều hơn so với chế phẩm flavivirus sống được giảm độc lực mà không được bào chế trong ít nhất một thành phần chất đệm bazo (chẳng hạn, chất đệm trên cơ sở PBS, TRIS, HEPES hoặc Histidin v.v.), một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon, và một hoặc nhiều axit amin.

Bảng 2: Các thông số đông khô được nêu làm ví dụ của các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây

	Lạnh đông			Làm khô sơ cấp/thứ cấp		Cuối cùng
Bước	1	2	3	1	2	1
Nhiệt độ trên kệ ($^{\circ}\text{C}$)	-45	-45	-45	-37	+25	4

Tốc độ tăng (°C/phút)	-	1,7	-	0,1	0,1	1,0
Thời gian (phút)	-	120	120	2400	360	GIỮ
Chân không (mT)	-	-	50	50	50	50

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được dự tính ở đây có thể làm giảm sự bất hoạt và/hoặc sự thoái biến của flavivirus sống đã được hydrat hóa trong lớn hơn 24 giờ ở các nhiệt độ khác nhau (chẳng hạn, khoảng 20°C đến khoảng 25°C hoặc thậm chí lên đến 40°C) hoặc ở nhiệt độ lạnh (chẳng hạn, khoảng 0° đến khoảng 10° C hoặc lên tới 20°C). Theo một số phương án, chế phẩm được bọc lộ ở đây có thể duy trì độ ổn định đối với 90% flaviviruses hoặc lớn hơn trong 24 giờ hoặc nhiều hơn. Ngoài ra, các hỗn hợp phối chế và chế phẩm được dự tính ở đây có thể làm giảm sự bất hoạt của flavivirus đã được hydrat hóa trong suốt ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6 chu trình lạnh đông-tan giá và nhiều hơn. Các chế phẩm và phương pháp khác liên quan đến các hỗn hợp phối chế và chế phẩm có khả năng làm giảm sự bất hoạt của flavivirus sống đã được hydrat hóa hoặc flavivirus sống đã được giảm độc lực đã được hydrat hóa trong khoảng 24 giờ đến khoảng 26 tuần hoặc lâu hơn ở nhiệt độ lạnh (chẳng hạn, khoảng 0° đến khoảng 10°C).

Các phương pháp khác nữa liên quan đến việc sử dụng các hỗn hợp phối chế và chế phẩm để làm giảm 50% hoặc nhiều hơn sự giảm độ chuẩn flavivirus, ví dụ, sau khi đông khô và/hoặc sau một khoảng thời gian nhất định và/hoặc sau khi tiếp xúc với nhiệt độ nhất định. Theo các phương án nhất định, phương pháp được bọc lộ ở đây đề xuất các hỗn hợp phối chế và chế phẩm có khả năng làm giảm sự giảm độ chuẩn của flavivirus trong một khoảng thời gian 5, hoặc 6, hoặc 7 tuần hoặc nhiều hơn, sau khi đông khô và tiếp xúc ở nhiệt độ 25°C, so với chế phẩm hoặc hỗn hợp phối chế không chứa các hỗn hợp phối chế được bọc lộ ở đây.

Theo các khía cạnh nhất định, các hỗn hợp phối chế có thể bao gồm gelatin hoặc dextran được thủy phân làm tác nhân protein thay cho albumin huyết thanh. Tuy nhiên, trong các hỗn hợp phối chế nhất định, gelatin có thể bị loại trừ do một số lý do bao gồm thực tế là đây là một sản phẩm từ động vật. Các lý do khác là gelatin có thể gây ra phản ứng dị ứng ở trẻ em và người trưởng thành được gây miễn dịch và có thể gây ra các trường hợp bất lợi liên quan đến vắc xin. Ngoài ra, gelatin có thể có nguồn

gốc từ xương bò hoặc lợn và nguyên liệu từ xương sống. Các nguồn này có thể bao gồm các chất lạ và do đó cần quan tâm đến độ an toàn. Ngoài ra, albumin có thể được thu nhận từ người, quy trình này cũng có nguy cơ đưa vào những chất lạ không an toàn. Vì vậy, các chế phẩm nhất định liên quan đến việc sử dụng các chất khác ngoài các sản phẩm phụ từ động vật mà cũng có tác dụng làm ổn định đối với các flavivirus sống đã được làm giảm độc lực hoặc chưa được làm giảm độc lực được dự tính. Theo các phương án nhất định, albumin tái tổ hợp có thể được sử dụng trong các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây để làm giảm các ảnh hưởng bất lợi của các albumin khác.

Chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể tạo ra sự bảo vệ gia tăng đối với flavivirus sống khỏi, ví dụ, sự lạnh đông và/hoặc tan giá, và/hoặc nhiệt độ cao. Theo các phương án nhất định, chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể làm ổn định, làm giảm sự hư hỏng và/hoặc ngăn ngừa sự bất hoạt của các sản phẩm virus sống được giảm độc lực đã được khử nước ở điều kiện nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn, khoảng 25°C). Theo các phương án khác, các hỗn hợp phối chế và chế phẩm được dự tính ở đây có thể làm ổn định, làm giảm sự hư hỏng và/hoặc ngăn ngừa sự bất hoạt của sản phẩm virus sống được giảm độc lực chứa nước ở khoảng 25°C hoặc lên tới hoặc khoảng 40°C. Chế phẩm và phương pháp được bộc lộ ở đây có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc bảo quản, phân bố, phân phối và sử dụng vắc xin chứa virus ở các vùng phát triển và chậm phát triển.

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng chế phẩm hoặc hỗn hợp bào chế trong bản mô tả này đề cập đến virus chưa được giảm độc lực hoặc đã được giảm độc lực theo phương pháp bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, cấy chuyển dịch nuôi cấy tế bào, tái sắp xếp vật liệu di truyền, kết hợp các thể đột biến vào các dòng lây nhiễm, kỹ thuật di truyền ngược, cài xen, khuyết đoạn, thao tác ADN hoặc ARN tái tổ hợp khác. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng các phương án khác đề cập đến virus mà được thiết kế để biểu hiện các protein hoặc ARN flavivirus bất kỳ khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các flavivirus tái tổ hợp. Các virus như vậy có thể được dùng làm vắc xin cho các bệnh lây nhiễm, vắc xin để điều trị các tình trạng bệnh ung thư, hoặc virus để đưa vào các protein biểu hiện hoặc ARN (*chẳng hạn*, trị

liệu gen, trị liệu đối nghĩa, trị liệu ribozym hoặc trị liệu ARN ức chế nhỏ) để điều trị các rối loạn.

Dược phẩm

Một số phương án ở đây đề cập đến dược phẩm chứa flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực ở dạng chứa nước hoặc được đông khô. Dựa trên bản mô tả, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng các hỗn hợp phối chế cải thiện độ ổn định của virus (chẳng hạn đối với nhiệt độ) và ngăn ngừa sự bất hoạt do quá trình lạnh đông-tan giá của dược phẩm được bộc lộ ở đây có thể cải thiện các sản phẩm như sản phẩm lỏng, bột, khô lạnh hoặc đông khô và có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Sau khi hoàn nguyên, các hỗn hợp phối chế vắc xin và chế phẩm sinh miễn dịch đã được làm ổn định này có thể được dùng theo các đường dùng khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở dùng trong da, dùng dưới da, dùng trong cơ, dùng trong mũi, bằng cách xông hít, dùng qua phổi hoặc dùng qua đường miệng. Theo các phương án khác, dụng cụ phân phối để phân phối dược phẩm bất kỳ được bộc lộ ở đây được dự tính. Theo các phương án này, nhiều dụng cụ để phân phối vắc xin là đã biết trong lĩnh vực, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xyranh và kim tiêm, dùng kim tiêm hai nhánh, dùng miếng dán hoặc bơm trong da, phân phối qua vòi phun không kim tiêm trong da (trong da, v.v.), phân phối dạng hạt trong da, hoặc phân phối dạng bột nhờ sol khí.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể được mô tả điển hình bao gồm chất đệm sinh lý dụng. Chuyên gia trong lĩnh vực nhận ra rằng chất đệm trên cơ sở PBS, chất đệm trên cơ sở TRIS, chất đệm trên cơ sở HEPES, chất đệm trên cơ sở Histindin và hệ chất đệm được nhận thấy là có tác dụng làm ổn định bất ngờ đối với các hỗn hợp phối chế và chế phẩm Flavivirus được bộc lộ ở đây. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực nhận ra rằng việc điều chỉnh nồng độ muối đến gần với mức sinh lý (chẳng hạn, dung dịch muối đẳng trương hoặc hàm lượng muối tổng 0,15 M) có thể là tối ưu để sử dụng chế phẩm ngoài đường tiêu hóa để ngăn ngừa sự tổn hại tế bào và/hoặc đau tại vị trí tiêm. Chuyên gia trong lĩnh vực cũng sẽ nhận ra rằng khi nồng độ cacbon hydrat gia tăng, nồng độ muối có thể được giảm để duy trì độ thẩm thấu

tương đương và tính thẩm thấu của hỗn hợp phối chế. Theo các phương án nhất định, môi trường đệm với độ pH lớn hơn 6,0 đến độ pH khoảng 10 được dự tính. Theo các phương án khác, môi trường đệm với độ pH lớn hơn 6,8 đến độ pH khoảng 8,0 được dự tính. Theo các phương án khác nữa, môi trường đệm với độ pH lớn hơn 7,0 đến khoảng 7,5 được dự tính.

Các phương án trong bản mô tả này đề xuất việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch và hỗn hợp phối chế vacxin để dùng cho các đối tượng ở dạng tương thích về mặt sinh học thích hợp để dùng được phẩm *in vivo*. “Dạng tương thích về mặt sinh học thích hợp để dùng *in vivo*” dùng để chỉ dạng hoạt chất (*chẳng hạn*, chế phẩm chứa flavivirus sống đã được giảm độc lực) để dùng trong đó tác dụng trị liệu của hoạt chất lớn hơn tác dụng gây độc bất kỳ của hoạt chất này. Việc dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của chế phẩm trị liệu được định nghĩa là lượng hữu hiệu, ở các liều dùng và trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Chẳng hạn, lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của một hợp chất có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng của hỗn hợp phối chế gây ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Phác đồ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng trị liệu tối ưu.

Hoạt chất, như vắc xin, có thể được dùng cho đối tượng trong chất mang hoặc chất pha loãng thích hợp, mà nó được dùng đồng thời với hoạt chất này. Thuật ngữ “chất mang được dùng” như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định bao gồm các chất pha loãng như nước muối và các dung dịch đệm chứa nước. Các hoạt chất cũng có thể được dùng theo đường ngoài tiêu hóa hoặc theo đường trong màng bụng. Dược phẩm thích hợp để tiêm có thể được dùng theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Chẳng hạn, dung dịch nước vô trùng (có thể hòa tan trong nước) hoặc thể phân tán và bột vô trùng để điều chế ngay lập tức dung dịch tiêm vô trùng hoặc thể phân tán có thể được sử dụng. Trong tất cả các trường hợp, chế phẩm và các hỗn hợp phối chế có thể là vô trùng và có thể được lỏng hóa đến mức mà có thể được đui ra một cách dễ dàng từ xyranh.

Trong các điều kiện bảo quản và sử dụng thông thường, các chế phẩm này có thể chứa chất bảo quản để ngăn chặn sự sinh trưởng của các vi sinh vật. Chế phẩm và các hỗn hợp phối chế có thể còn được xử lý để ngăn ngừa khỏi sự lây nhiễm của các vi sinh vật như vi khuẩn và nấm mốc. Dung dịch tiêm vô khuẩn có thể được bào chế bằng cách cho một lượng hợp chất có hoạt tính kết hợp với dung môi thích hợp hoặc với một hoặc tổ hợp của các thành phần được liệt kê ở trên, nếu cần, sau đó khử trùng.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm và các hỗn hợp phối chế ở các dạng lỏng (dung dịch) có thể được dùng theo cách tương thích với hỗn hợp phối chế dạng liều và với lượng sao cho có hiệu quả trị liệu. Theo các phương án này, các hỗn hợp phối chế được dùng một cách dễ dàng ở các dạng liều khác nhau, như các loại dung dịch tiêm được mô tả ở trên. Dự tính rằng các viên nang giải phóng chậm, các vi hạt giải phóng theo thời gian, và các dạng tương tự cũng có thể được sử dụng để phân phối chế phẩm trong bản mô tả này. Các dung dịch nước cụ thể này cơ bản thích hợp để dùng theo đường tĩnh mạch, trong cơ, dưới da và trong phúc mạc. Theo một số phương án, các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể được dùng trước, trong và/hoặc sau khi tiếp xúc với flavivirus trong bản mô tả.

Phương pháp phân tích

Theo các phương án nhất định, phương pháp xác định tá dược giúp cải thiện độ ổn định của một hoặc nhiều virus sống có thể bao gồm bước tạo ra bộ dữ liệu độ ổn định virus theo thử nghiệm; xây dựng mô hình thống kê thăm dò bằng cách thực hiện hồi quy đơn biến và phương pháp phân tích dữ liệu đa biến đối với bộ dữ liệu về độ ổn định này; xác định ít nhất một tá dược, trong đó ít nhất một tá dược làm tăng độ ổn định của một hoặc nhiều virus sống. Theo các phương pháp này, các tá dược xác định được và lượng của ít nhất một tá dược có thể được kết hợp vào mô hình sàng lọc cuối cùng (definitive screening designs – SDS). Theo các phương pháp khác, nồng độ tá dược tối ưu có thể được xác định đối với ít nhất một tá dược, trong đó nồng độ tá dược tối ưu này làm giảm mức giảm hiệu lực virus so với các virus không chứa ít nhất một tá dược này. Theo các phương án khác, bộ dữ liệu độ ổn định theo thử nghiệm có thể được lập mô hình bằng cách sử dụng công cụ hồi quy từng bước sẵn có trong JPM

11.2.0 dự định để dùng cho các phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methos - RSM). Theo các phương án này, một hoặc nhiều virus sống có thể bao gồm flavivirus.

Các phương pháp khác để xác định các điều kiện tối ưu để làm ổn định flavivirus có thể bao gồm đánh giá các tá dược mà bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trehaloza, galactoza, fructoza, sucroza, chitosan, sorbitol, mannitol, albumin huyết thanh, albumin huyết thanh người (HAS), albumin huyết thanh bò (BSA), huyết thanh bào thai bò (FBS), gelatin, dextran, polyme polyol, alanine, arginin, methionin, MSG, và ure. Các phương pháp này được dự định sử dụng để nhận biết các hỗn hợp phối chế ổn định đối với virus bất kỳ hoặc hỗn hợp phối chế virus sống được giảm độc lực.

Các bộ kit

Các phương án khác được bộc lộ ở đây liên quan đến bộ kit để sử dụng với chế phẩm và phương pháp như được bộc lộ ở đây. Chế phẩm và các hỗn hợp phối chế virus sống đã được làm giảm độc lực có thể được đề xuất trong kit để dùng trong nghiên cứu khoa học hoặc để phân phối và/hoặc sử dụng để phân phối cho đối tượng. Theo các phương án này, bộ kit có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồ chứa thích hợp, chế phẩm chứa flavivirus sống hoặc sống đã được giảm độc lực, bao gồm flavivirus sống đã được giảm độc lực, và một hoặc nhiều chất bổ trợ như các tác nhân chống virus khác, các tác nhân chống nấm hoặc chống vi khuẩn.

Theo các phương án khác, kit có thể còn bao gồm chế phẩm đã được chia nhỏ một cách thích hợp để dùng cho đối tượng cần chủng ngừa hoặc điều trị, khi thích hợp. Ngoài ra, chế phẩm và các hỗn hợp phối chế được bộc lộ ở đây có thể được khử nước một phần hoặc hoàn toàn hoặc có thể chứa nước. Kit được dự tính ở đây có thể được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ lạnh như được bộc lộ ở đây, tùy thuộc vào hỗn hợp phối chế cụ thể.

Theo các phương án khác, kit có thể thường bao gồm ít nhất một lọ nhỏ, ống nghiệm, bình thót cổ, chai, xyranh hoặc đồ chứa khác, mà trong đó chế phẩm có thể được đưa vào, và được chia thành các phần nhỏ một cách thích hợp. Khi một hợp

phần hỗ trợ được đề xuất, kit cũng có thể thường chứa một hoặc nhiều đồ chứa hỗ trợ mà tác nhân hoặc hợp phần này có thể được chứa trong đó. Kit theo sáng chế cũng có thể chứa một chế phẩm và (các) chất phản ứng khác bất kỳ trong các đồ chứa để bán ở quy mô thương mại. Các đồ chứa này có thể bao gồm các đồ chứa bằng nhựa được đúc phun hoặc đúc thổi mà các lọ nhỏ mong muốn được giữ trong đó (chẳng hạn, chế phẩm sinh miễn dịch hoặc chế phẩm vắc xin).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được bao hàm để biểu thị các phương án nhất định được đưa ra trong sáng chế. Người có kỹ năng trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, các kỹ thuật được bộc lộ trong phần ví dụ tiếp theo dưới đây đại diện cho các kỹ thuật được phát hiện để thực hiện tốt trong thực tiễn được bộc lộ ở đây, và vì vậy có thể được xem như tạo thành các phương thức được ưu tiên để thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, với sự bộc lộ này, người có kỹ năng trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể mà chúng được bộc lộ và vẫn thu được kết quả tương tự hoặc giống hệt mà không đi trệch ra khỏi tinh thần và phạm vi được nêu ở đây.

Ví dụ 1

Sàng lọc chất đệm

Theo các phương pháp nhất định được nêu làm ví dụ, chế phẩm lỏng và chế phẩm đông khô thích hợp để thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng và sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vắc xin chứa flavivirus được nhận biết. Các thí nghiệm nhất định được thực hiện để nhận biết ban đầu các chất đệm và tá dược được coi là thích hợp để dùng trong các nghiên cứu tiếp theo về độ ổn định. Các chất đệm được thử nghiệm bao gồm chất đệm trên cơ sở HEPES, PBS và TRIS. Các tá dược được thử nghiệm bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, như trehaloza, galactoza, fructoza, sorbitol, lactoza, sucroza, chitosan hoặc tổ hợp của chúng. Các tá dược được thử nghiệm khác bao gồm các tác nhân protein khác nhau, albumin huyết thanh, albumin huyết thanh người (HSA), HSA tái tổ hợp, albumin huyết thanh bò (BSA), huyết thanh bào thai bò (FBS), gelatin, dextran, polyme polyol, hoặc tổ hợp của chúng. Các

tá được khác nữa được sàng lọc bao gồm các axit amin khác nhau hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó, như alanin, arginin, glutamat (chẳng hạn mono natri glutamat (MSG)) methionin, hoặc tổ hợp của chúng. Các thành phần khác được sử dụng trong các thử nghiệm ban đầu này bao gồm các polyol/polyme khác nhau (*chẳng hạn*, manitol, gelatin, dextran), osmolyte (*chẳng hạn*, ure), muối (*chẳng hạn*, magie clorua, natri clorua), và các tác nhân tạo chelat (*chẳng hạn*, EDTA).

Theo một số phương pháp được nêu làm ví dụ, virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực được sử dụng làm các flavivirus được nêu làm ví dụ trong các chế phẩm khác nhau để thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Chế phẩm để dùng cho các phương pháp này được đề xuất trong bản mô tả. Theo một thí nghiệm được nêu làm ví dụ, lượng định trước của chế phẩm sinh miễn dịch chứa virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực được sử dụng. Theo một thí nghiệm khác được nêu làm ví dụ, chế phẩm miễn dịch chứa typ huyết thanh 3 của virus sốt xuất huyết sống được giảm độc lực được sử dụng. Lưu ý rằng typ huyết thanh này có thể được xem là kém ổn định nhất và khả năng sinh miễn dịch kém nhất và do đó được sử dụng để phát triển các chế phẩm ổn định mà có thể được sử dụng với các typ huyết thanh khác của virus sốt xuất huyết ngoài typ huyết thanh mà kém ổn định. Dự tính rằng flavivirus đã được giảm độc lực hoặc chưa được giảm độc lực bất kỳ có thể được sử dụng trong các chế phẩm được nêu làm ví dụ này để gia tăng độ ổn định của flaviviruses và làm giảm sự thoái biến.

Ví dụ 2

Sàng lọc các hỗn hợp phối chế ổn định

Trong một số hỗn hợp phối chế flavivirus được bộc lộ ở đây, gelatin đã thủy phân có thể được sử dụng để làm nguồn protein thay cho albumin huyết thanh. Tuy nhiên, gelatin, mặc dù làm ổn định virus sống đã được làm giảm độc lực, có thể gây ra các phản ứng dị ứng khi được dùng cho đối tượng và đôi khi có thể gây ra các trường hợp bất lợi liên quan đến vắc xin. Chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể bao gồm tổ hợp các thành phần mà tạo ra kết quả tương đương trong việc làm giảm giá trị của flavivirus sống đã được giảm độc lực trong khi tạo ra các hỗn hợp phối chế có các

phản ứng dị ứng giảm khi được dùng cho đối tượng. Ví dụ, polyol có thể được sử dụng làm nguồn tác nhân protein bổ trợ hoặc thay thế trong các hỗn hợp phối chế chứa flavivirus được bộc lộ ở đây. Trong một số ví dụ, các hỗn hợp phối chế không chứa albumin hoặc gelatin mà có thể có độ ổn định bằng hoặc có thể tạo ra độ ổn định flavivirus sống đã được giảm độc lực gia tăng được tạo ra. Các hỗn hợp phối chế này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dịch cô đặc của các chất khác nhau như chất đệm trên cơ sở PBS, một hoặc nhiều tác nhân hydrat cacbon, một hoặc nhiều axit amin, một hoặc nhiều tác nhân protein, và/hoặc một hoặc nhiều muối.

Độ ổn định của chế phẩm sinh miễn dịch flavivirus sống được giảm độc lực được kiểm tra dưới dạng hàm số của mức giảm hiệu lực khi sử dụng các hỗn hợp phối chế làm ổn định khác nhau (*chẳng hạn*, giảm độ chuẩn hoặc Log_{10} PFU/liều). Các mẫu virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3 (TDV-3) được làm đông khô và sau đó được tiếp xúc với 25°C trong khoảng thời gian năm tuần. Sự giảm hiệu lực, hoặc sự giảm về mức giảm độ chuẩn trong khoảng thời gian này, được đánh giá đối với các hỗn hợp phối chế khác nhau, như được minh họa trên Fig. 1. Một chất đệm bazơ được sử dụng là PBS với 50mM NaCl, 0,1% HSA, và 10% hydrat cacbon. Alanin có mặt ở nồng độ 10mM, methionin có mặt ở 2,5mM, MSG có mặt ở 10mM, manitol có mặt ở 5%, và ure có mặt ở 0,25%. Hỗn hợp phối chế đã được phát triển trước đây bao gồm F-127, trehaloza, và albumin (FTA, hỗn hợp phối chế đối chứng dương tính) được dùng làm mẫu tham chiếu. Như đã chứng minh, các hỗn hợp phối chế khác nhau được minh họa trên Fig. 2 làm giảm sự giảm hiệu lực nhiều hơn cả mẫu tham chiếu (mà đã được chứng minh trước đây là cải thiện độ ổn định của flavivirus), và vì vậy, tạo ra các phương pháp cải thiện để làm ổn định vắc xin flavivirus.

Việc quan sát hiệu lực virus trước/sau khi đông khô và trong quá trình bảo quản tăng cường độ ổn định của các mẫu flavivirus đã được làm đông khô (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) được minh họa trong bảng 3 dưới đây. Đối với mỗi hỗn hợp phối chế, sự giảm hiệu lực virus theo log_{10} do đông khô được tính bằng cách lấy độ chuẩn ban đầu trừ đi độ chuẩn của mẫu virus đã được làm đông khô được bảo quản ở -80°C (mẫu đối chứng lỏng đã lạnh đông được bảo quản ở -80°C). Ngoài ra, đối với mỗi hỗn hợp phối chế, sự giảm hiệu lực theo log_{10} trong khoảng thời

gian ổn định tăng cường được tính bằng cách lấy độ chuẩn của hỗn hợp phối chế được bảo quản ở -80°C ở 5 tuần trừ đi độ chuẩn sau bảo quản của hỗn hợp phối chế ở 25°C .

Hầu hết các hỗn hợp phối chế thể hiện hiệu suất đông khô cải thiện trong quá trình đông khô so với mẫu đối chứng tham chiếu dương tính, FTA. Nghiên cứu độ ổn định sau 5 tuần ở 25°C , quan sát thấy xu hướng sau đối với độ ổn định của virus. Theo một ví dụ, các hỗn hợp phối chế chứa flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) chứa trehaloza/sucroza riêng rẽ ở nồng độ cao (10%), sự giảm hiệu lực virus theo thứ tự sau: 10% đường + 0,1% HSA > 10% đường + 0,1% HSA + Met + MSG + Ala > 10% đường + 0,1% HSA + Ure. Theo một ví dụ khác, các hỗn hợp phối chế flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) chứa tổ hợp gồm trehaloza/sucroza ở nồng độ thấp (1%) và manitol (4%), sự giảm hiệu lực virus theo thứ tự sau: 1% đường + 4% manitol + 0,1% HSA > 1% đường + 4% manitol + 0,1% HSA + ure > 1% đường + 4% manitol + 0,1% HSA + Met + MSG + Ala. Ở các hỗn hợp phối chế flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) chỉ chứa manitol, sự giảm hiệu lực virus theo thứ tự sau: 5% manitol + 0,1% HSA > 5% manitol + 0,1% HSA + ure > 5% manitol + 0,1% HSA + Met + MSG + Ala.

Bảng 3: Hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trước đông khô, sau đông khô và sau khi làm ổn định

Số (Tương ứng với bảng 14)	Mẫu	dạng lỏng	SD	-80°C	SD	25°C	SD	Mức giảm theo log ở dạng đông khô	Mức giảm độ ổn định theo log (5W)	Tổng mức giảm theo log
1	1% trehaloza+0,1% HSA+4%manitol+ Met +MSG+Ala	4,54	0,07	4,31	0,10	4,25	0,05	0,23	0,06	0,29
5	10% sucroza+0,1% HSA+Urea	5,06	0,12	4,82	0,03	4,38	0,09	0,24	0,44	0,68
3	1% sucroza+0,1% HSA+4%manitol+ Met + MSG+Ala	4,63	0,05	4,48	0,07	3,99	0,10	0,15	0,49	0,64
2	10% trehaloza+0,1% HSA+Urea	4,71	0,08	4,68	0,08	4,17	0,07	0,03	0,51	0,54
10	5%manitol+0,1% HSA+Met+MSG+Ala	4,57	0,11	4,12	0,01	3,42	0,07	0,45	0,70	1,15

6	1% sucroza+0,1% HSA+ 4% manitol	4,66	0,13	4,58	0,15	3,87	0,12	0,08	0,71	0,79
4	1% trehaloza+0,1% HSA+4% manitol +Ure	4,22	0,05	4,32	0,10	3,57	0,07	-0,1	0,75	0,65
13	10% trehaloza+0,1% HSA	5,04	0,08	4,53	0,06	3,78	0,10	0,51	0,75	1,26
9	1% sucroza+0,1% HSA+4% manitol+Ure	4,77	0,04	4,56	0,07	3,78	0,10	0,21	0,78	0,99
8	10% sucroza+0,1% HSA	5,02	0,06	4,84	0,08	4,05	0,11	0,18	0,79	0,97
14	Hỗn hợp phối chế tham chiếu đối chứng	5,03	0,04	4,57	0,04	3,76	0,04	0,56	0,81	1,37
12	10% sucroza+0,1% HSA+Met+MSG+Ala	5,20	0,23	4,85	0,11	4,00	0,08	0,35	0,85	1,2
7	1% trehaloza+0,1% HSA+ 4%manitol	4,55	0,12	4,52	0,14	3,65	0,15	0,03	0,87	0,9
11	10% trehaloza+0,1% HSA+Met+MSG+Ala	4,90	0,04	4,60	0,04	3,72	0,03	0,30	0,88	1,18
15	5% manitol+0,1% HSA+Ure	3,62	0,13	3,84	0,02	0,00	n/a	-0,22	3,84	3,62
16	5% manitol+0,1% HSA	4,01	0,14	4,08	0,08	0,00	n/a	-0,07	4,08	4,01

Ví dụ 3

Định hình dự đoán

Với tư cách là một phương pháp bổ sung để đánh giá hiệu quả của các hỗn hợp phối chế khác nhau lên sự ổn định của vắc xin flavivirus, phương pháp định hình dự đoán có thể được sử dụng như là một phương thức để lựa chọn ra các tá dược khác nhau trong hỗn hợp phối chế và/hoặc nhận biết các tá dược mà hiệu quả hơn các tá dược khác. Ảnh hưởng của các tá dược khác nhau được kiểm tra bằng cách sử dụng phương pháp định hình, (dữ liệu không chỉ ra) sau khi đông khô, năm tuần sau khi đông khô, và năm tuần sau khi đông khô và tiếp xúc ở 25°C. Dữ liệu thu được từ dự đoán định hình được so sánh với giá trị mong muốn, được sử dụng làm nguyên tắc để xác định sự duy trì tốt nhất hiệu lực virus sau khi đông khô và sau khi tiếp xúc ở 25°C trong 5 tuần. Sucroza và trehaloza được nhận thấy là có thể thay thế cho nhau bằng cách sử dụng các phương pháp định hình dự đoán này. Tương tác tích cực được quan sát giữa các tá dược mà có thể tạo ra profile độ ổn định flavivirus gia tăng sau khi đông khô và ủ ở 25°C trong 5 tuần (dữ liệu không được chỉ ra).

Ví dụ 4

Nghiên cứu độ ổn định đông khô

Để đánh giá ảnh hưởng của các tá dược khác nhau đến độ ổn định của vắc xin virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3, các hỗn hợp phối chế của vắc xin flavivirus mẫu (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) được làm đông khô và được tiếp xúc ở 25°C trong 5 tuần, như được minh họa trên Fig. 2 (cũng xem bảng 4 dưới đây). Độ chuẩn thu được trước khi đông khô hoặc trước đông khô (cột màu đen đặc trong mỗi bộ ba, cột ở bên trái của mỗi thử nghiệm), sau khi đông khô hoặc sau đông khô (cột màu xám nhạt đặc trong mỗi bộ ba, cột ở giữa mỗi thử nghiệm), và sau khi đông khô và tiếp xúc ở 25°C trong 5 tuần (cột màu xám trung bình và đặc ở bên phải của mỗi thử nghiệm; hai lọ riêng biệt được chuẩn độ theo bộ ba). Hỗn hợp phối chế tham chiếu đối chứng mà bao gồm F-127, trehaloza, và albumin (FTA) được sử dụng để đánh giá các đặc tính của hỗn hợp phối chế cải tiến tiềm năng.

Quan sát thấy sự cải thiện đáng kể về mặt thống kê đối với sự duy trì hiệu lực virus sau khi ủ ở 25°C trong 5 tuần. Tổ hợp gồm các tá dược này thể hiện khả năng chịu đựng tốt hơn đối với điều kiện stress do nhiệt độ ở trạng thái rắn theo thời gian so với hỗn hợp phối chế tham chiếu/đối chứng.

Bảng 4: Chế phẩm được nêu làm ví dụ chứa các hỗn hợp phối chế flavivirus đông khô khác nhau (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3). Tất cả các hỗn hợp phối chế trong bảng này được điều chế trong 10mM dung dịch đệm natri phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2.

Hỗn hợp phối chế số (tương ứng với Fig. 2)	Thành phần				
	trehaloza %	manitol (%)	Ala (mM)	HSA (%)	ure (%)
1	10	1	20	0,3	0
2	10	1	10	0	0,250
3	1	1	0	0,3	0,125
4	1	1	20	0,1	0,250
5	10	5	0	0,1	0,000
6	10	3	0	0,3	0,250
7	5,5	3	10	0,1	0,125
8	1	5	0	0	0,250

9	5,5	5	20	0,3	0,250
10	1	3	20	0	0,000
11	10	5	20	0	0,125
12	5,5	1	0	0	0,000
13	1	5	10	0,3	0,000
14	Mẫu đối chứng, tham chiếu (15% trehaloza+0,1% HSA+1% Pluronic F127®)				

Ví dụ 5

Nghiên cứu độ ổn định mô hình với trehaloza và HSA

Ảnh hưởng tiềm năng của hai tá dược, trehaloza và HSA, được đánh giá về khả năng làm ổn định các hỗn hợp phối chế để dùng tiếp theo trong sàng lọc cuối cùng. Ảnh hưởng của nồng độ 0,3% (w/v) HSA và 5% (w/v) trehaloza đến độ ổn định của flavivirus sống đã được giảm độc lực được nêu làm ví dụ sau khi đông khô trạng thái rắn được đánh giá (dữ liệu không được chỉ ra). Các thí nghiệm này chứng tỏ rằng các hỗn hợp phối chế ổn định hữu hiệu có thể bao gồm nồng độ trehaloza thấp hơn, 5% (w/v) và HSA ở 0,3% (w/v), như được chỉ ra trong bảng 5 dưới đây. Ngoài ra, lưu ý rằng manitol và ure cũng được phân tích về khả năng làm ổn định các virut sống đã được làm giảm độc lực như flavivirus và đã được chứng minh là có ảnh hưởng có lợi đối với sự ổn định flavivirus.

Bảng 5: Thành phần được nêu làm ví dụ của các hỗn hợp phối chế flavivirus đông khô khác nhau (*chẳng hạn* virut sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3)

Mong muốn tối đa	
Thành phần	Nồng độ hòa tan
Manitol	3,0% (w/v)
Trehaloza	5,0% (w/v)
Ure	0,125% (w/v)
HSA	0,3% (w/v)

Ví dụ 6

Sàng lọc các hỗn hợp phối chế ổn định tam giá được nêu làm ví dụ

Dữ liệu thu được đối với các hỗn hợp phối chế làm ổn định dùng cho flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) (trên đây) có thể được áp dụng cho các typ huyết thanh virus sốt xuất huyết khác, bao gồm như một phần của các hỗn hợp phối chế virus sốt xuất huyết tứ giá. Hai liều mục tiêu khác nhau được đánh giá đối với mỗi typ huyết thanh virus sốt xuất huyết (TDV-1, TDV-2, TDV-3 và TDV-4) được minh họa trên Fig. 3 đến Fig. 6, 50% BDS (hình tam giác) và CTM (hình vuông). Hỗn hợp phối chế đích với liều lớn chứa khoảng 50% được chất với liều lớn (bulk drug substance - BDS) đối với mỗi typ huyết thanh virus sốt xuất huyết, và hỗn hợp phối chế đích liều lượng hiện thời bao gồm khoảng 2,5% được chất liều lớn đối với mỗi typ huyết thanh virus sốt xuất huyết (còn được đề cập đến như là liều hiện thời (Current Dose hoặc CD). Cả hỗn hợp phối chế liều lớn và liều hiện thời cũng bao gồm manitol (3,0% (w/v)), trehaloza (5% (w/v)), và ure (0,125% (w/v)). Bảng 6 dưới đây liệt kê các hỗn hợp phối chế được sử dụng để đánh giá độ ổn định virus ở dạng tứ giá.

Bảng 6: Hỗn hợp phối chế vắc xin virus sốt xuất huyết tứ giá được nêu làm ví dụ

Hỗn hợp phối chế CD Số TT	Thành phần	Nồng độ tá dược cuối cùng sau khi phối chế với BDS						
		PF 127 (%)	HSA tự nhiên (%)	rHSA (%)	Trehaloza (%)	Manitol (%)	Ure (%)	Dextran (%)
CD dạng 1	Manitol(3%)+Trehaloza (5%)+Ure(0,125%)+Dextran (1%) (dextran thấp)	0,02	0,002		5	3	0,125	1
CD dạng 2	Manitol(3%)+Trehaloza (5%)+Ure(0,125%)+Dextran (5%) (dextran cao)	0,02	0,002		5	3	0,125	5
CD dạng 3	Manitol(3%)+Trehaloza (5%)+Ure(0,125%)+HSA tái tổ hợp(0,3%)	0,02	0,002	0,3	5	3	0,125	
CD dạng 4	Manitol(3%)+Trehaloza (5%)+ Ure(0,125%)+	0,02	0,3		5	3	0,125	

	HSA tự nhiên(0,3%)							
FTA_CD	FTA	1	0,1		15			
Dạng 5 50%BDS	Manitol(3%)+Trehaloza (7,5%)+Ure(0,125%)+D extran (1%) (dextran thấp)	0,5	0,05		7,5	3	0,125	1
Dạng 6 50%BDS	Manitol(3%)+Trehaloza (7,5%)+Ure(0,125%)+D extran (5%) (dextran cao)	0,5	0,05		7,5	3	0,125	5
Dạng 7 50%BDS	Manitol(3%)+Trehaloza (7,5%)+Ure(0,125%)+ HSA tái tổ hợp(0,3%)	0,5	0,05	0,3	7,5	3	0,125	
Dạng 8 50%BDS	Manitol(3%)+Trehaloza (7,5%)+Ure(0,125%)+ HSA tự nhiên(0,3%)	0,5	0,3		7,5	3	0,125	
CON_5 0%BDS	Tham chiếu/đối chứng	1	0,1		15			

Độ chuẩn virus đích đối với các hỗn hợp phối chế virus sốt xuất huyết tứ giá được minh họa dưới đây trong bảng 7.

Bảng 7: Độ chuẩn virus đích đối với hỗn hợp phối chế vaccine virus sốt xuất huyết tứ giá

	Độ chuẩn đích ở liều lượng hiện thời (CD) PFU/liều lượng	Độ chuẩn đích ở 50% BDS (50%BDS) PFU/liều lượng
TDV-1	2,00E+04	5,09E+05
TDV-2	5,00E+03	1,27E+05
TDV-3	1,00E+05	2,54E+06
TDV-4	3,00E+05	8,03E+06

Như được minh họa trên Các Fig. từ 3A đến 3B đến các Fig. từ 6A đến 6B, các tá dược được thử nghiệm là dextran ở 1% (w/v) và 5% (w/v) (như là tá dược thay thế cho HSA), HSA tái tổ hợp ở 0,3% (w/v), và HSA tự nhiên ở 0,3% (w/v), cùng với hỗn hợp phối chế tham chiếu dương tính FTA. Ảnh hưởng của mỗi tá dược được đánh giá sau khi tiếp xúc ở 25°C trong 5 tuần sau khi đông khô (các Fig. 3A, 4A, 5A và 6A) và sau khi giảm tổng thể (các Fig. 3B, 4B, 5B và 6B), mà là tổng mức giảm hiệu lực sau khi đông khô (lông thành rắn) và mức giảm hiệu lực sau khi tiếp xúc ở 25°C trong 5 tuần. Thông thường, mức giảm độ chuẩn càng thấp và mức chồng lặp giữa các liều càng lớn, tác dụng làm ổn định của tá dược càng lớn.

Ví dụ 7

Nghiên cứu độ ổn định mô hình với trehaloza và HSA

Dựa trên dữ liệu nêu trên có liên quan đến nồng độ của trehaloza và HSA, các nghiên cứu mô hình được sử dụng để đánh giá lại không gian thiết kế đối với các hỗn hợp phối chế ổn định Flavivirus (dữ liệu không được chỉ ra). Dữ liệu mô hình kiểm tra ảnh hưởng của các nồng độ 0,2% HSA và 5% trehaloza đến độ ổn định của flavivirus sống đã được giảm độc lực sau khi đông khô được nêu làm ví dụ, theo một phương án được bộc lộ ở đây, chỉ ra rằng các hỗn hợp phối chế ổn định có thể bao gồm trehaloza ở 5% và HSA ở 0,2% (dữ liệu không được chỉ ra).

Ví dụ 8

Ảnh hưởng của các tác nhân khác nhau đến tính nguyên vẹn của bánh hỗn hợp phối chế và độ ổn định của virus

Các hỗn hợp phối chế khác nhau được đánh giá ở các nồng độ khác nhau và trong tổ hợp với các hỗn hợp phối chế đã được làm đông khô về khả năng của chúng đối với việc cải thiện độ ổn định virus sốt xuất huyết (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3) cũng như là tạo bánh khô lạnh với vẻ bề ngoài thích hợp và tính nguyên vẹn vật lý thích hợp để dùng cho nhiều mục đích dự định. Như được mô tả ở đây, bánh đã được làm đông khô được đánh giá theo thang điểm chủ quan từ 1 đến 3, ở đó 1 = tồi, 2 = bình thường, và 3 = tốt. Bánh với điểm đánh giá là 1 được biểu lộ là

có sự gãy vụn về mặt cấu trúc ở phạm vi rộng, tan chảy ở đáy và các mặt bên, co đáng kể và rút vào từ tất cả các phía, và/hoặc có sự xuất hiện của những hạt nhỏ. Bánh với điểm bằng 2 có sự co một phần và sự rút vào từ các phía, sự tan chảy vừa phải ở đáy, và/hoặc các vết rạn hoặc nứt lớn chạy suốt chiều dọc và chiều ngang bánh. Bánh với điểm bằng 3 là đẹp để làm dược phẩm, tỏ ra là chắc, cấu trúc bánh (hầu hết là có màu trắng, tùy thuộc vào tá dược kết hợp) với bề mặt thường nhẵn và không hoặc có rất ít sự co hoặc rút của bánh từ đỉnh của bánh hoặc các phía của lọ. Ảnh hưởng của các tỷ lệ hydrat cacbon khác nhau như đường và manitol đối với tính nguyên vẹn của bánh được kiểm tra bằng cách sử dụng các hỗn hợp phối chế giả dược. Tỷ lệ đường/manitol tối ưu được lựa chọn để nghiên cứu ảnh hưởng của đường/manitol (chẳng hạn của trehaloza hoặc sucroza đối với manitol) đến độ ổn định của virus đối với sự đông khô và độ ổn định của virus đã được làm đông khô. Trong ví dụ này, thí nghiệm này được thực hiện với dược chất liều lớn đã được bào chế với virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3 (chẳng hạn TDV3).

Danh sách các hỗn hợp phối chế giả dược được nêu làm ví dụ được đánh giá được chỉ ra trong bảng 8 dưới đây. Dựa trên kết quả của việc sàng lọc các hỗn hợp phối chế giả dược, ba tỷ lệ đường/manitol khác nhau được lựa chọn để sàng lọc độ ổn định của virus: đường (10% (w/v)) dùng một mình; tỷ lệ đường/manitol bằng 1:4; và manitol dùng một mình (5% (w/v)). Các tá dược làm ổn định (ure và axit amin) giống với các nghiên cứu trước đây cũng được đánh giá trong tổ hợp với các tỷ lệ đường/manitol khác nhau.

Bảng 8: Các hỗn hợp phối chế đường/manitol được đánh giá trong nghiên cứu độ ổn định khi đông khô và nghiên cứu đóng bánh

Hỗn hợp phối chế đường/manitol số	Đường	Đường (w/v) (%)	Manitol (w/v) (%)
1	Trehaloza	1,0	4,0
2	Trehaloza	2,0	4,0
3	Trehaloza	2,0	3,0
4	Trehaloza	10,0	0
5	Sacaroza	1,0	4,0

6	Sacaroza	2,0	4,0
7	Sacaroza	2,0	3,0
8	Sacaroza	10,0	0
9	Không đường	0	5,0

Tất cả các hỗn hợp phối chế được bào chế trong 10 mM dung dịch đệm natri phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2 và 0,1% (w/v) HSA. Danh sách các hỗn hợp phối chế chứa virus mà được đánh giá như một phần của nghiên cứu này được đưa ra trong bảng 9.

Bảng 9: Các hỗn hợp phối chế được đánh giá về sự đông khô virus sốt xuất huyết (virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3) và các nghiên cứu gia tăng độ ổn định

Hỗn hợp phối chế số (Tương ứng với bảng 3)	Thành phần
1	10% Trehaloza +0,1%HSA
2	10% Trehaloza +0,1%HSA+0,25% Ure
3	10% Trehaloza +0,1%HSA+ 10mM MSG+10mM Alanin+ 2,5mM Methionin
4	10% Sucroza+0,1%HSA
5	10% Sucroza+0,1%HSA+0,25% Ure
6	10% Sucroza+0,1%HSA+10mM MSG+10mM Alanin+ 2,5mM Methionin
7	1% Trehaloza+ 4% Manitol +0,1%HSA
8	1% Trehaloza+ 4% Manitol +0,1%HSA+0,25% Ure
9	1%Trehaloza+4%Manitol+0,1%HSA+10mMMSG+10mM Alanin+ 2,5mM Methionin
10	1% Sucroza+ 4% Manitol +0,1%HSA
11	1% Sucroza+ 4% Manitol +0,1%HSA+0,25% Ure
12	1% Sucroza+4%Manitol+0,1%HSA+ 10mM MSG+10mM Alanin+ 2,5mM Methionin
13	5% Manitol +0,1%HSA

14	5% Manitol +0,1%HSA+0,25% Ure
15	5% Manitol +0,1%HSA+ 10mM MSG+10mM Alanin+ 2,5mM Methionin
16	FTA(15%Trehaloza+0,1%HSA+1%PF127)

Theo các phương pháp nhất định, ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ lệ giữa đường (*chẳng hạn*, trehaloza và/hoặc sucroza) và manitol đến vẻ bề ngoài của bánh của các mẫu đông khô và sau đó là ảnh hưởng đến độ ổn định của flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết) được đánh giá. Theo một phương pháp, để đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ giữa đường và manitol đến tính nguyên vẹn và vẻ bề ngoài của bánh, các hỗn hợp phối chế giả được điều chế và được làm đông khô. Sau khi đông khô, tính nguyên vẹn vật lý và vẻ bề ngoài của sản phẩm dạng bánh được đánh giá (dữ liệu không được chỉ ra). Tính nguyên vẹn của bánh tỏ ra là tốt khi dùng một mình manitol, tỷ lệ giữa đường và manitol là 1:4 và 2:4, tuy nhiên, quan sát thấy sự vụn một phần đối với các hỗn hợp phối chế được điều chế với tỷ lệ giữa đường và manitol bằng khoảng 2:3. Không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về tính nguyên vẹn của bánh giữa các hỗn hợp phối chế trehaloza và sucroza. Khi đường được dùng một mình, tính nguyên vẹn của bánh không xuất hiện và điều này cũng được quan sát khi sử dụng manitol một mình. Dựa trên các nhận xét về tính nguyên vẹn của bánh trong nghiên cứu được nêu làm ví dụ này, các tổ hợp sau đây được lựa chọn để nghiên cứu độ ổn định của virus: đường riêng rẽ, đường và manitol ở tỷ lệ 1:4, và manitol riêng rẽ.

Theo một ví dụ, chế phẩm flavivirus (virus sốt xuất huyết typ huyết thanh 3) với tỷ lệ lựa chọn giữa đường và manitol được điều chế kết hợp với hỗn hợp axit amin hoặc ure làm các tá được bổ sung (xem bảng 8). Sau khi đông khô, tính nguyên vẹn vật lý của bánh được đánh giá (dữ liệu không được chỉ ra). Ở các ví dụ về các hỗn hợp phối chế chỉ chứa đường, tính đồng nhất của bánh tương tự với các hỗn hợp phối chế FTA đối chứng. Các hỗn hợp phối chế chứa manitol riêng rẽ và đường và manitol với tỷ lệ 1:4 tạo thành bánh với vẻ bề ngoài chấp nhận được và tính đồng nhất vật lý tốt. Việc bổ sung ure hoặc hỗn hợp axit amin không ảnh hưởng đáng kể đến tính đồng nhất của bánh. Các hỗn hợp phối chế này đã được chứng minh là hữu hiệu để dùng làm hỗn hợp được để dùng trong các hỗn hợp phối chế sinh miễn dịch.

Ví dụ 9

Kết hợp sàng lọc bán thực nghiệm và thiết kế thí nghiệm (design of experiments - DoE)

Để tiếp cận thực nghiệm sự phát triển hỗn hợp phối chế của vắc xin virus sống tiềm năng với độ ổn định được cải thiện, lý tưởng là xác định được nguyên nhân và cơ chế thoái biến virus và sau đó thiết kế các hỗn hợp phối chế để giảm thiểu sự cố. Mặc dù cách tiếp cận này đã được biểu thị với một số vắc xin virus, nó tập trung chủ yếu vào các hỗn hợp phối chế lỏng và không phải là các hỗn hợp phối chế đông khô. Cách tiếp cận thực tế hơn thường được đòi hỏi bao gồm các nghiên cứu sàng lọc tá dược truyền thống, tiếp cận chất lượng bằng thiết kế (QbD) (bao gồm tích hợp hệ thống kiểm soát nguy cơ và kiến thức khoa học trước đó với thiết kế thí nghiệm, DoE), hoặc tổ hợp của cả hai cách tiếp cận này. Trong nghiên cứu này, cách tiếp cận kết hợp được thể hiện theo kiểu từng bước bằng cách sử dụng vắc xin virus sốt xuất huyết sống đã được giảm độc lực tiềm năng làm vắc xin virus sống kiểu mẫu. Để nhận biết các hỗn hợp phối chế đạt được sản phẩm đích, profile của vắc xin virus sống đa giá được đông khô được dùng ngoài đường tiêu hóa được thử nghiệm với việc bảo quản trong thời gian đủ dài ở 2-8°C. Trước tiên, việc sàng lọc bán thực nghiệm được thực hiện để nhận biết các chất ổn định virus, sau đó đánh giá cụ thể hơn “nhóm” các tá dược làm ổn định đúng đầu bằng cách sử dụng và thăm dò các phương pháp phân tích dữ liệu mà đóng vai trò hướng dẫn thiết kế mô hình thống kê dự báo bởi DoE. Sử dụng từng bước cách tiếp cận kết hợp tạo ra cơ sở cho cách tiếp cận hệ thống theo giai đoạn để phát triển hỗn hợp phối chế vắc xin virus sống trong quá trình phát triển sản phẩm ở giai đoạn sớm.

Sàng lọc sơ bộ tá dược dựa trên độ ổn định Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3)

Sàng lọc sơ bộ nhận biết số tá dược làm ổn định tiềm năng, đối với việc duy trì hiệu lực virus trong quá trình đông khô và độ ổn định gia tăng, đồng thời có được tính nguyên vẹn vật lý của bánh đã khô sau khi làm lạnh. (Xem các Fig. 7 và 8). Để sàng lọc tá dược ban đầu, các hỗn hợp phối chế flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết

typ huyết thanh-3, TDV-3) được điều chế trong chất đệm bazơ chứa trehaloza hoặc sucroza trong 10 mM dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2. Như đã chỉ ra trên đây, các chất đệm khác cũng được đánh giá, bao gồm HEPES, Tris, và histidin (cùng và không cùng với NaCl). Không quan sát thấy sự khác biệt nào về độ ổn định khi bảo quản của các chất đệm nêu trên; Tuy nhiên, flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) dường như có độ ổn định cộng hợp khi NaCl được bao hàm (dữ liệu không được chỉ ra). Các hỗn hợp phối chế flavivirus đã đông khô (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) được điều chế bằng cách sử dụng các tá dược khác nhau từ các loại chất phụ gia dược dụng đã biết khác. Các hỗn hợp phối chế flavivirus đã đông khô (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) được điều chế bằng cách sử dụng các tá dược khác nhau (xem bảng 12). Các chất phụ gia này được chọn lọc dựa trên sự phối hợp giữa kinh nghiệm, tìm tòi tài liệu về thành phần hỗn hợp phối chế chứa vắc xin virus sống (đã được bán trên thị trường và nghiên cứu) và cơ sở khoa học. Hình dạng bên ngoài bánh của mẫu đã đông khô được đánh giá (Bảng 10 và 11) dựa trên hệ thống phân loại (1-3, trong đó 1 là profile bánh tồi nhất và 3 là profile bánh tốt nhất theo quan sát và các đặc tính vật lý).

Các Fig. 7A-7D và Bảng 10 mô tả các hỗn hợp phối chế Flavivirus đã đông khô (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) và độ chuẩn virus trước và sau đông khô đối với các chất ổn định khác nhau trong chất đệm bazơ trehaloza. Sự giảm độ chuẩn virus được tính sau khi đông khô (các Fig. 7A-7D) và hình dạng bên ngoài bánh của các mẫu đã đông khô cũng được đánh giá (Bảng 10) dựa trên hệ thống phân loại bằng mắt thường (như đã mô tả ở trên). Các kết quả này chứng tỏ rằng nhiều tá dược có khả năng làm ổn định flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình đông khô (trong chất đệm bazơ) bao gồm ure, EDTA, polyol, protein, polyme và axit amin, mà dẫn đến sự giảm độ chuẩn <0,2 log. Các tá dược nhất định không bảo vệ vi khuẩn trong quá trình đông khô khi dùng một cách riêng rẽ (chẳng hạn $MgCl_2$ và poloxamer 407) trong khi các tá dược khác (sorbitol) có thể làm ổn định virus trong quá trình đông khô, nhưng không tạo ra cấu trúc bánh đẹp và bị loại ra khỏi phân tích tiếp theo. Vì vậy, các tác nhân này

không được sử dụng trong các hỗn hợp phối chế đã được bộc lộ ở đây. Quan sát thấy xu hướng tương tự đối với tá dược khi sucroza thay cho trehaloza trong chất đệm bazo (các Fig. 8A-8B).

Trong ví dụ này, Fig. 7A minh họa độ chuẩn virus của flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong các mẫu trước và sau đông khô và Fig. 7B minh họa sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Độ chuẩn virus được đưa ra dưới dạng $\log_{10}\text{pfu}/0,5\text{ml}$. * thể hiện độ chuẩn dưới LOD. Chất đệm bazo của các ví dụ này chứa 10% trehaloza trong 10 mM dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2. Đối với các thí nghiệm được nêu làm ví dụ này, trong đó trehaloza được thay bằng sucroza, Fig. 8A minh họa sự giảm độ chuẩn virus của flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Độ chuẩn virus được đưa ra dưới dạng $\log_{10}\text{ pfu/ml}$.

Các tá dược tiềm năng cụ thể từ các thí nghiệm được nêu làm ví dụ được minh họa trên Fig. 7A & 8A được đánh giá tiếp khả năng làm ổn định flavivirus của chúng (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) thông qua độ ổn định tích cực trong thời gian ngắn ở 25 °C trong 2 tuần. Hiệu lực virus, như được xác định bởi độ chuẩn virus trong thử nghiệm vết tan, và sự giảm độ chuẩn virus theo thời gian (được biểu hiện ở dạng sự giảm độ chuẩn theo $\log_{10}$), được minh họa trên Fig. 7C và 7D và Fig. 8B đối với các hỗn hợp phối chế chất đệm bazo chứa trehaloza và sucroza, tương ứng. Fig. 7C minh họa độ chuẩn virus của flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong các mẫu đã đông khô sau khi nghiên cứu độ ổn định tích cực, và Fig. 7D minh họa sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau 2 tuần ở nhiệt độ trong phòng ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Fig. 8B minh họa sự giảm độ chuẩn virus của flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi các mẫu đã đông khô được bảo quản trong 5 tuần ở nhiệt độ trong phòng ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Các kết quả này mô tả rằng các hỗn hợp phối chế chứa HSA, ure, alanin, methionin, MSG, manitol, hoặc gelatin thể hiện xu hướng tương tự đối với cả các hỗn hợp phối chế bazo và thể hiện sự ổn định virus được cải thiện trong

quá trình bảo quản ở 25 °C. Các kết quả này chỉ ra rằng HSA, ure, alanin, methionin, MSG, và manitol là các chất ổn định flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) và được chọn để sàng lọc tiếp bằng cách sử dụng cùng một hỗn hợp phối chế chất đệm bazơ trehaloza/- sucroza.

Bảng 10: Phân loại tính nguyên vẹn của bánh bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế đông khô trên cơ sở hình dạng bên ngoài khi quan sát bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế flavivirus đông khô (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) chứa trehaloza (như được minh họa trên Fig. 7A-7D) (như được mô tả cụ thể ở trên, 1–3, trong đó 1 là loại tồi nhất và 3 là loại tốt nhất).

Hỗn hợp phối chế đông khô	Hình dạng bên ngoài thông thường của bánh
MgCl ₂	1
Sorbitol	2
Manitol	2
Polysorbat 80	2
Lactoza	3
Sacaroza	3
HSA	3
Ure	3
Alanin	3
EDTA	3
Methionin	3
Gelatin	3
MSG	3
Dextran 40	3
Chất tham chiếu, poloxamer 407	3

Bảng 11: Phân loại tính nguyên vẹn của bánh bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế đông khô trên cơ sở hình dạng bên ngoài khi nhìn bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3,

TDV-3) đông khô chứa sucroza (như được minh họa trên Fig. 8A-8B) (như được mô tả cụ thể ở trên, 1–3, trong đó 1 có hình dạng bên ngoài bánh và các thuộc tính vật lý tồi nhất và 3 có hình dạng bên ngoài bánh và các thuộc tính vật lý tốt nhất).

Hỗn hợp phối chế đông khô	Hình dạng bên ngoài thông thường của bánh
Manitol	1
Sorbitol	1
MgCl ₂	1
Alanin	2
Ure	2
HSA	3
Lactoza	3
Trehaloza	3
MSG	3
Methionin	3
EDTA	3
PS80	3
Gelatin	3
Dextran 40	3
PF127	3

Các kết quả này chứng tỏ rằng nhiều tá dược được liệt kê trong bảng 12 có khả năng làm ổn định flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình đông khô (trong chất đệm bazơ) bao gồm ure, EDTA, polyol, protein, polyme và axit amin, mà dẫn đến sự giảm độ chuẩn <0,2 log. Các phụ gia MgCl₂ và poloxamer 407 có khả năng làm ổn định virus riêng rẽ ở mức thấp nhất trong quá trình đông khô với mức giảm riêng rẽ >2 log (tuy nhiên, poloxamer 407 có tác dụng làm ổn định theo cách hiệp đồng với sự có mặt của các tá dược khác; xem cụ thể hơn dưới đây). Các tá dược nhất định (chẳng hạn, MgCl₂ và poloxamer 407) không bảo vệ riêng rẽ trong quá trình đông khô trong khi những tá dược khác (chẳng hạn, sorbitol) có thể làm ổn định virus trong quá trình đông khô. Xu hướng tá dược tương tự được quan sát khi sucroza thay thế trehaloza trong chất đệm bazơ (Fig. 8).

Bảng 12: Danh sách tóm tắt các tá dược được sàng lọc dựa trên khả năng làm ổn định virus Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình đông khô và bảo quản tích cực cũng như khả năng tạo thành bánh đông khô phù hợp để làm dược phẩm. Các tá dược được đánh giá với sự có mặt của các chất đệm bazơ khác nhau chứa các chất phụ gia bổ sung như được mô tả trong phần văn bản.

Loại	Tá dược
Protein/Polyme	Albumin huyết thanh người và rHSA
	(0,1, 0,3, và 2%)
	Gelatin (3,0%)
	Dextran 40 (1-10%)
Đường	Sucroza (1-10%)
	D-trehaloza dihydrat (1-15%)
	Lactoza (4%)
Các polyol	Sorbitol (3,0%)
	Manitol (1, 3, 5%)
Các chất hoạt diện	Polysorbate80 (0,05%) PF127
	(1,0%)
Các axit amin	Mononatri l-glutamat (10 mM)
	Methionin (2,5 mM)
	Alanin (10 mM)
	Arginin (10 mM)
Osmolyte	Ure (0,125 và 0,25%)
Muối	Magie clorua (100mM)
Tác nhân tạo chelat	EDTA (1mM)

Một số tá dược tiềm năng được nêu làm ví dụ được đánh giá tiếp khả năng của chúng trong việc làm ổn định flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) thông qua độ ổn định bảo quản tích cực trong thời gian ngắn ở 25°C trong 2 tuần. Hiệu lực virus như được xác định bởi độ chuẩn virus trong thử nghiệm vết tan, và sự giảm độ chuẩn virus theo thời gian (được biểu thị ở dạng sự giảm độ ổn định theo log₁₀), được chỉ ra trên các Fig 7C và 7D đối với các hỗn hợp phối chế chất

đệm bazơ chứa trehaloza, và trên các Fig 8A và 8B đối với các hỗn hợp phối chế chất đệm bazơ chứa sucroza. Các hỗn hợp phối chế chứa, ví dụ, HSA, ure, alanin, methionin, MSG, manitol, và/hoặc gelatin thể hiện xu hướng tương tự ở tất cả hỗn hợp phối chế bazơ này và thể hiện độ ổn định virus được cải thiện trong quá trình bảo quản ở 25°C. Bất ngờ là, dextran thể hiện độ ổn định cực tốt với chất đệm bazơ trehaloza nhưng không thể hiện độ ổn định cực tốt với chất đệm bazơ sucroza. Mặc dù polysorbate 80 và lactoza thể hiện khả năng bảo vệ đông khô tốt, các tá dược này không có khả năng làm ổn định flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình bảo quản ở trạng thái khô ở 25°C. Tóm lại, HSA, ure, alanin, methionin, MSG, và manitol được xác định là các chất ổn định flavivirus tiềm năng (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) và được chọn để sàng lọc tiếp bằng cách sử dụng cùng hỗn hợp phối chế chất đệm bazơ trehaloza/sucroza.

Sàng lọc tổ hợp tá dược dựa trên độ ổn định Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3)

Ảnh hưởng của việc kết hợp các tá dược đứng đầu ở các nồng độ khác nhau đến độ chuẩn flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trước và sau khi đông khô và độ ổn định tích cực được đánh giá. Tham khảo Fig. 9 và Fig. 15, chất đệm bazơ chứa 10% trehaloza trong 10 mM dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2, và 0,1% HSA. Fig. 9A và 15A minh họa sự giảm độ chuẩn flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô; và Fig. 9B và Fig. 15B minh họa sự giảm độ chuẩn virus của flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi các mẫu đã đông khô được bảo quản trong 5 tuần ở nhiệt độ trong phòng (~25°C). Trên các hình này, dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Độ chuẩn virus được đưa ra dưới dạng $\log_{10}$ pfu/ml.

Đối với các nghiên cứu này, HSA (ở 0,1 và 0,2% w/v) được bổ sung vào các hỗn hợp phối chế bazơ do trong các phương pháp nhất định liên quan đến sàng lọc ban đầu chỉ ra rằng HSA có chức năng như chất bảo vệ đông khô hữu hiệu (các Fig. 9 và 15). Quan sát thấy sự giảm (sự giảm <0,2 log) độ chuẩn flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt

xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau đông khô ở cả hai nồng độ HSA trong các hỗn hợp phối chế bazơ chứa 10% sucroza hoặc trehaloza, tương ứng (các Fig. 9A và 15A). Vì vậy, các hỗn hợp phối chế chất đệm bazơ sau đó được điều chế chứa dung dịch đệm phosphat, NaCl, 10% đường (trehaloza hoặc sucroza) với 0,1% HSA và các tá dược bổ sung đã chỉ ra. Hầu hết các tổ hợp tá dược trong các hỗn hợp phối chế bazơ này thể hiện độ ổn định virus được cải thiện ở cả mẫu sau đông khô và mẫu ổn định tích cực (các Fig. 9 và 15). Bảo vệ đông khô tối đa được chứng minh bằng cách sử dụng tổ hợp gồm axit amin và ure được bổ sung trong các hỗn hợp phối chế bazơ. Sau 5 tuần ở 25°C, một trong các hỗn hợp phối chế bazơ này với manitol và ure được bổ sung, cùng hoặc không cùng với axit amin như alanin, arginin, MSG và methionin thể hiện độ ổn định virus được cải thiện (các Fig. 9 và 15). Việc gia tăng nồng độ đường trong các hỗn hợp phối chế bazơ đến 15% đường như không tạo ra lợi ích bổ sung bất kỳ đối với việc bảo vệ độ chuẩn virus.

Bảng 13: Phân loại tính nguyên vẹn của bánh bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế đông khô trên cơ sở hình dạng bên ngoài khi nhìn bằng mắt thường đối với các hỗn hợp phối chế Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) đông khô (như được thấy trên Fig. 9A-9B) (như được mô tả cụ thể ở trên, 1–3, trong đó 1 có hình dạng bên ngoài bánh và các thuộc tính vật lý tồi nhất và 3 có hình dạng bên ngoài bánh và các thuộc tính vật lý tốt nhất).

Hỗn hợp phối chế đông khô	Hình dạng bên ngoài thông thường của bánh
Met + MSG + Ala + ure + Mann	2
15% Tre + 0,1% HSA	2
Met	2
Mann	3
10% Tre + 2% HSA	3
10% Tre + 0,1% HSA	3
Met + MSG + Ala + Urea	3
MSG	3
Ala	3
Ure	3

Met + MSG + Ala	3
Met + MSG	3
Met + Ala	3
MSG + Ala	3
Met + Urea	3
MSG + Urea	3
Ala + Urea	3
Arg	3
Arg + Urea	3

Các thí nghiệm sàng lọc cuối cùng nghiên cứu ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ lệ giữa đường và manitol đến hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) và tính nguyên vẹn của bánh đã đông khô. Xem các hỗn hợp phối chế với thành phần cụ thể trong bảng 9 và trên các Fig 10 A đến 10B. Fig. 10A minh họa sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô, và Fig. 10B minh họa sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi các mẫu đã đông khô được bảo quản trong 5 tuần ở nhiệt độ trong phòng (~25°C). Chất đệm bazơ chứa 10 mM dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2, và 0,1% HSA. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Độ chuẩn virus được đưa ra dưới dạng log₁₀ pfu/ml. * N/A dưới LOD.

Các hỗn hợp phối chế Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) với tỷ lệ chọn lọc giữa đường và manitol được bào chế kết hợp với hỗn hợp axit amin hoặc ure làm các tá được bổ sung trong chất đệm bazơ (Bảng 9). Hầu hết các hỗn hợp phối chế (được tìm thấy trong các bảng 3 & 9) biểu hiện hiệu suất độ chuẩn virus được cải thiện sau khi đông khô (Bảng 3). Việc bổ sung ure cho thấy khả năng làm ổn định virus được cải thiện, so với hỗn hợp axit amin, trong chất đệm bazơ chứa sucroza hoặc trehaloza sau khi bảo quản ở 25°C trong 5 tuần (các bảng 3 & 9, hỗn hợp phối chế 5 và 6; Fig. 10A). Thú vị là, khi manitol được bổ sung vào các hỗn hợp phối chế bazơ, hỗn hợp axit amin biểu hiện tiềm năng làm ổn định virus

gia tăng so với ure (Bảng 3 & 9, hỗn hợp phối chế 9 và 10; Fig. 10A). Tuy nhiên, các hỗn hợp phối chế nhất định (*chẳng hạn*, 13, 14, và 15) chỉ chứa manitol có ảnh hưởng đến độ ổn định virus bất kể là bổ sung ure hay hỗn hợp axit amin. Những nhận xét này chứng tỏ ảnh hưởng quan trọng của đường vô định hình đến độ ổn định virus, và các thí nghiệm này cũng chứng tỏ tương tác giữa đường và manitol là những tá dược quan trọng đối với việc làm ổn định flavivirus. Để nghiên cứu tiếp ảnh hưởng của những tá dược làm ổn định đầy hứa hẹn này đối với các flavivirus (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình lạnh khô và bảo quản tích cực, việc thiết kế một cách hợp lý phương pháp thí nghiệm được sử dụng như đã mô tả dưới đây.

Thiết kế thí nghiệm

Tham khảo Fig 11, minh họa bộ dữ liệu về sự giảm hiệu lực virus toàn diện đối với mỗi hỗn hợp phối chế được phân tích trong các nghiên cứu sàng lọc. Dữ liệu được phân theo nhóm thành 3 giai đoạn sàng lọc được biểu thị bởi các nhóm sàng lọc 1, 2, và 3 trùng khớp với dữ liệu được thể hiện trên các Fig 8-10, và Fig 15. Dữ liệu này minh họa độ chuẩn tính bằng $\log_{10}$ pfu/0,5 mL đối với các mẫu lỏng (trước đông khô), sau đông khô, và ổn định 5 tuần ở 25°C. Fig. 11A và 11B minh họa việc nhận biết các giá trị có nghĩa thống kê mà tạo ra sự bảo vệ khỏi thử thách sấy thăng hoa và nhiệt (sự giảm hiệu lực khi đông khô tính theo Log_{10} (Fig. 11A) và sự giảm theo $\log_{10}$ khi bảo quản 5 tuần ở 25°C (Fig. 11B)). Dữ liệu được lập mô hình bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy từng bước để xác định giá trị nào có tiềm năng ảnh hưởng có nghĩa khi quan sát thống kê. Ngoài việc sử dụng Bayesian Information stopping Criterion để đồng quy về mô hình thích hợp nhất, các giá trị tương tác và ảnh hưởng chính được xem là có nghĩa nếu giá trị xác suất của chúng $< 0,05$. Mức độ phù hợp của mô hình thích hợp cũng được đánh giá bằng cách sử dụng các giá trị R^2 .

Việc sàng lọc bán thực nghiệm tá dược và các hỗn hợp phối chế tạo ra bộ dữ liệu lớn về các giá trị hiệu lực virus ở trạng thái lỏng được làm lạnh (trước khi đông khô), sau khi đông khô, và ổn định tích cực (5 tuần ở 25°C) trong 85 hỗn hợp phối chế flavivirus được bào chế riêng rẽ (*chẳng hạn* virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3,

TDV-3) (dữ liệu không được chỉ ra). Phân tích bộ dữ liệu toàn diện bằng mắt thường nhận thấy, với mỗi thí nghiệm sàng lọc liên tiếp, ngoài hình dạng bên ngoài bánh được cải thiện, còn có sự gia tăng về khả năng duy trì hiệu lực flaviviruses (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) đối với mỗi điều kiện. Việc thay đổi nồng độ tá được và tổ hợp của chúng trong suốt quá trình sàng lọc giúp thu thập được bộ dữ liệu xuất phát từ kinh nghiệm mà có thể được sử dụng bằng cách dùng mô hình hồi quy nhằm xây dựng mô hình thống kê thăm dò.

Để xác định tá được (hoặc giá trị) nào góp phần hoặc tương tác riêng rẽ có ảnh hưởng đến sự giảm hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3), bộ dữ liệu được lập mô hình bằng cách sử dụng công cụ hồi quy từng bước sẵn có trong JMP 11.2,0 dự định để dùng cho phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Phân tích hồi quy sử dụng Bayesian Information Stopping Criterion tối thiểu để đạt được mô hình tốt nhất và các giá trị và tương tác mà không thể hiện ý nghĩa (thống kê xác suất $< 0,05$) được loại trừ. Mô hình phù hợp với các giá trị R^2 bằng 0,44 và 0,73 được xác định sự giảm hiệu lực đông khô theo $\log_{10}$ và sự giảm hiệu lực theo $\log_{10}$ sau khi bảo quản trong 5 tuần ở 25°C , tương ứng (các Fig. 11A và 11B). Các tá được bao gồm HSA, ure, manitol, và đường sucroza và trehaloza được xác định là có nghĩa thống kê đối với việc hạn chế sự giảm hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô (dữ liệu không được chỉ ra). Các bộ tá được tương tự được chứng minh là bảo vệ khỏi sự giảm hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình ổn định nhờ bảo quản tích cực. Các chất phụ gia nhất định: ure, manitol, và HSA thể hiện ý nghĩa của mỗi chất phụ gia đơn lẻ trong khi tổ hợp gồm trehaloza hoặc sucroza với ure, và trehaloza với manitol được xác định là có sự tương tác có nghĩa giữa hai chất này. Axit amin, alanin, methionin, và MSG được bao hàm trong mô hình do chúng dường như tạo ra tác dụng ổn định trong suốt giai đoạn sàng lọc, nhưng trong phân tích này thể hiện là không có nghĩa thống kê. Bằng cách sử dụng các mô hình thăm dò này như hướng dẫn, các chất phụ gia HSA, ure, manitol và trehaloza hoặc sucroza được chọn làm các chất phụ gia tiềm năng đầy hứa hẹn cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 14: Thiết kế hỗn hợp phối chế DOE

Hỗn hợp phối chế DOE Số	Thành phần				
	trehaloza %	manitol (%)	Ala (mM)	HSA (%)	ure (%)
1	10	1	20	0,3	0
2	10	1	10	0	0,250
3	1	1	0	0,3	0,125
4	1	1	20	0,1	0,250
5	10	5	0	0,1	0,000
6	10	3	0	0,3	0,250
7	5,5	3	10	0,1	0,125
8	1	5	0	0	0,250
9	5,5	5	20	0,3	0,250
10	1	3	20	0	0,000
11	10	5	20	0	0,125
12	5,5	1	0	0	0,000
13	1	5	10	0,3	0,000

Tham khảo bảng 14 và Fig. 12, bảng và các Fig đề xuất như sau: Bảng 14: Thiết kế hỗn hợp phối chế DOE Fig. 12A: Độ chuẩn Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong mẫu lỏng, đông khô (được bảo quản ở -80°C) và các mẫu ổn định (các hỗn hợp phối chế đông khô được bảo quản ở 25°C, 5 tuần), Fig. 12B: Sự giảm độ chuẩn Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trong quá trình đông khô và ổn định 5 tuần ở 25°C. Tất cả các hỗn hợp phối chế chứa 10 mM natri phosphat, 30 mM NaCl, pH 7,2 làm chất đệm được nêu làm ví dụ. Fig. 12C là đồ thị ước lượng theo nhóm được tạo ra bằng cách phân tích dữ liệu DSD có sử dụng phương pháp hồi quy xuôi từng bước và bộ quy tắc dừng để giảm thiểu Akaike's Information Criterion (AICc) đã hiệu chỉnh bằng cách sử dụng JMP 11.2.0. Ảnh hưởng chủ yếu và các thông số tương tác được coi là có nghĩa nếu giá trị xác suất của chúng $< 0,05$. Mức độ phù hợp của mô hình thích hợp cũng được đánh giá bằng cách sử dụng các giá trị R^2 .

Nhóm tá được đứng đầu thu được và hàm lượng của nó được xác định bằng phương pháp hồi quy đơn biến thăm dò và phân tích dữ liệu đa biến được tích hợp vào thiết kế sàng lọc cuối cùng (definitive screening design - DSD) (Bảng 14) để xác nhận tầm quan trọng của việc thiết kế ảnh hưởng đến độ ổn định và ảnh hưởng đến việc thăm dò khoảng nồng độ tối ưu đối với mỗi tá được. Mặc dù biểu hiện tác động thống kê tương tự, trehaloza được chọn thay vì sucroza do tương tác bổ sung của nó được xác định bằng phân tích mô hình thăm dò. Mặc dù alanin không được nhận thấy là có ý nghĩa, nó được bao hàm trong DSD như một axit amin điển hình, mà có mặt trong hầu hết các hỗn hợp phối chế triển vọng trong quá trình sàng lọc. Việc lựa chọn khoảng nồng độ tá được được đưa ra bởi profile dự báo mô hình bề mặt đáp ứng (dữ liệu không được chỉ ra) và DSD được xây dựng bằng cách sử dụng nền tảng Design of Experiments trong JMP 11.2.0 và tạo ra 13 hỗn hợp phối chế riêng rẽ để đánh giá. Flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) được bổ sung vào mỗi hỗn hợp phối chế được chỉ ra trong bảng 14, được làm đông khô, và được thử thách ở 25°C trong 5 tuần. Thiết kế Definitive Screening Design (DSD) của các thí nghiệm các hỗn hợp phối chế đối với mỗi flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) và độ chuẩn trong mẫu lỏng, được đông khô (được bảo quản ở 80°C) và các mẫu ổn định (các hỗn hợp phối chế đông khô được bảo quản ở 25°C) được minh họa. Ảnh hưởng chủ yếu và các thông số tương tác được coi là có nghĩa nếu giá trị xác suất của chúng $<0,05$. Đường màu xanh da trời thể hiện ngưỡng giá trị p và cột cắt ngang qua đường này thể hiện ảnh hưởng đáng kể. Mức độ phù hợp của mô hình thích hợp cũng được đánh giá bằng cách sử dụng các giá trị R^2 . * N/A dưới LOD. Chi tiết về hỗn hợp phối chế là như sau: F1: 10%Tre + 1%Mann + Ala(20 mM) + 0,3% HSA; F2: 10%Tre + 1%Mann + Ala(10 mM) + 0,25%U; F3: 1%Tre + 1%Mann + 0,3%HSA + 0,125%U; F4: 1%Tre + 1%Mann + Ala(20 mM) + 0,1%HSA + 0,25%U; F5: 10%Tre + 5%Mann + 0,1%HSA; F6: 10%Tre + 3%Mann + 0,3%HSA + 0,25%U; F7: 5,5%Tre + 3%Mann + Ala(10 mM) + 0,1%HSA + 0,125%U; F8: 1%Tre + 5%Mann + 0,250%U; F9: 5,5%Tre + 5%Mann + Ala (20 mM) + 0,3%HSA + 0,25%U; F10: 1%Tre + 3%Mann + Ala(20 mM); F11: 10%Tre + 5%Mann + Ala(20 mM) + 0,125%U; F12: 5,5%Tre + 1%Mann; F13: 1%Tre + 5%Mann + Ala (10 mM) + 0,3%HSA. Mann, manitol; Tre, trehaloza dihydrat; HSA, albumin huyết thanh

người; Ala, alanin; và U, ure.

Các mẫu lỏng đã làm lạnh (trước đông khô), sau đông khô (thời điểm 0), và các mẫu ổn định trong 5 tuần được xác định hiệu lực virus bằng thử nghiệm vết tan (các Fig. 12A và 12B). Bộ dữ liệu được tạo ra bởi DSD được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy xuôi từng bước và bộ quy tắc dừng để giảm thiểu Akaike's Information Criterion (AICc) đã hiệu chỉnh trong JMP 11.2.0. Phương pháp hồi quy từng bước này xác định giá trị có nghĩa nhất và cũng giải thích không gian thiết kế đối với mỗi tá dược được thử nghiệm (Fig. 12C). Mô hình khớp với các giá trị R^2 bằng 0,79, 0,89, và 0,99 đối với mỗi đáp ứng, bao gồm giảm hiệu lực toàn bộ theo log10. Phân tích mức giảm hiệu lực virus đã nhấn mạnh rằng nồng độ trehaloza và HSA từ trung bình đến cao làm ổn định đáng kể sự giảm hiệu lực khi phối hợp với manitol ở các nồng độ từ thấp đến trung bình và ure ở các nồng độ từ trung bình đến cao. Lưu ý rằng alanin không thể hiện ảnh hưởng có nghĩa thống kê (không được nhận biết bởi mô hình).

Profile đường mức thể hiện không gian thiết kế tối ưu đối với mô hình bề mặt đáp ứng Definitive Screen Design đối với cả 2 yếu tố, trehaloza và HSA, với manitol và ure có các giá trị kết hợp cố định là 3% và 0,125%, tương ứng, được tạo ra bằng cách sử dụng JMP 11.2.0. Sử dụng profile dự báo của JMP (dữ liệu không được chỉ ra). Profile đường mức được tạo ra từ các mô hình DSD dự báo đối với mỗi đáp ứng xác định nồng độ tá dược tối ưu mà bảo vệ khỏi sự giảm hiệu lực virus là: 5% trehaloza, 3% manitol, 0,3% HSA, và 0,125% ure.

Đánh giá tổ hợp tá dược dùng cho dạng liều vắc xin virus sốt xuất huyết tam giá

Bảng 15: Thiết kế hỗn hợp phối chế bằng cách sử dụng DOE

Hỗn hợp phối chế DOE số	Thành phần
Hỗn hợp phối chế_1	Manitol (3%) + Trehaloza (5%) + Ure (0,125%) + Dextran (1% (dextran thấp))
Hỗn hợp phối chế_2	Manitol (3%) + Trehaloza (5%) + Ure (0,125%) + Dextran (5%) (dextran cao)

Hỗn hợp phối chế_3	Manitol (3%) + Trehaloza (5%) + Ure (0,125%) + HSA tái tổ hợp (0,3%)
Hỗn hợp phối chế_4	Manitol (3%) + Trehaloza (5%) + Ure (0,125%) + HSA tự nhiên (0,3%)

Tham khảo bảng 15 và Fig. 13, các ô đề xuất như sau: Bảng 15: Thiết kế hỗn hợp phối chế bằng cách sử dụng DOE, (Fig. 13A: Sự giảm độ chuẩn của hỗn hợp phối chế tứ giá: TDV typ huyết thanh 1-4 (hỗn hợp phối chế sinh miễn dịch) sau khi đông khô, Fig. 13B: Mức giảm độ chuẩn của TDV typ huyết thanh 1-4 (trong hỗn hợp phối chế vắc xin tứ giá) sau khi các mẫu đã đông khô được bảo quản ở 25°C trong 5 tuần, Fig. 13C: Tổng mức giảm độ chuẩn virus của TDV typ huyết thanh 1-4 sau khi đông khô và bảo quản ở 25°C trong 5 tuần. Tất cả các hỗn hợp phối chế DOE cũng chứa 10 mM natri phosphat, 30 mM NaCl, pH 7,2 * không được tính (dưới LLOD).

Các hỗn hợp phối chế DOE tứ giá (TDV-1, -2, -3, -4) được điều chế bằng cách thay đổi nồng độ của dextran (các hỗn hợp phối chế DOE 1 & 2), rHSA (hỗn hợp phối chế DOE 3), và nHSA (hỗn hợp phối chế DOE 4) trong hỗn hợp phối chế bazơ chứa trehaloza, manitol, dung dịch đệm phosphat và NaCl (bảng 15). Các hỗn hợp phối chế DOE được đánh giá và phân loại theo tính nguyên vẹn bánh đã đông khô (dữ liệu không được chỉ ra) và sự giảm độ chuẩn virus phối hợp theo log₁₀ (Fig. 13B) sau khi đông khô và ổn định tích cực. Các hỗn hợp phối chế DOE chứa rHSA hoặc nHSA thể hiện hiệu lực virus được cải thiện so với các hỗn hợp phối chế chứa dextran. Các hỗn hợp phối chế DOE chứa rHSA thể hiện khả năng phục hồi hiệu lực virus cao nhất đối với tất cả các typ huyết thanh có mức giảm <0,3 log đối với TDV-2 đến TDV-4 và mức giảm 0,5 log đối với TDV-1 (Fig. 13B). Tuy nhiên, quan sát thấy sự vỡ vụn bánh một phần đối với các hỗn hợp phối chế chứa HSA (dữ liệu không được chỉ ra). Thử ví là, các hỗn hợp phối chế DOE chứa dextran đẹp hơn nhiều về hình dạng vật lý bên ngoài của bánh, nhưng không có khả năng duy trì hiệu lực virus sau khi đông khô (Fig. 13B).

Nghiên cứu độ ổn định thời gian thực của hỗn hợp phối chế vắc xin sốt xuất huyết tứ giá

Ngoài nghiên cứu độ ổn định tích cực với TDV tứ giá ở 25°C, nghiên cứu độ ổn định ở 4°C được đề xướng để tạo ra độ ổn định theo thời gian thực ở nhiệt độ bảo quản đích trong thời gian dài. Mỗi hỗn hợp phối chế DOE được bảo quản ở 4°C trong thời gian lên tới 39 tuần kèm theo xác định hiệu lực virus ở thời điểm 0, 5, 13, và 39 tuần. Tham khảo Fig. 14, các hỗn hợp phối chế DOE 1-4, chứa 5% trehaloza, 3% manitol, 0,125% ure, trong 10 mM natri phosphat với 30 mM NaCl pH 7,2 và các chất phụ gia sau: 1% dextran (Fig. 14A), 5% dextran (Fig. 14B), 0,3% HSA tái tổ hợp (Fig. 14C), hoặc 0,3% HSA tự nhiên (Fig. 14D). Các mẫu đã đông khô được bảo quản ở 4°C và được hoàn nguyên để xác định hiệu lực virus ở 0, 5, 13, và 39 tuần. Vùng đánh dấu là khoảng tin cậy trên và dưới 95% được xác định trên JMP 11.2.0. Bảng tích hợp ở mỗi đồ thị chứa dữ liệu độ chuẩn tính theo Log₁₀ pfu/0,5 mL đối với mỗi typ huyết thanh đối với độ chuẩn mẫu lỏng (trước đông khô), tại thời điểm 0 (sau đông khô (T0)), và độ chuẩn dự báo ở 78 tuần (Pred. 78 wks). (Lưu ý: độ chuẩn dự báo được xác định bằng cách sử dụng công cụ Adapt2 Version 3.4.1 được phát triển bởi PRISM Training and Consultancy Limited, UK).

Tất cả các hỗn hợp phối chế TDV tứ giá tiềm năng đều thể hiện sự giảm hiệu lực virus từ tối thiểu đến không giảm đối với tất cả các typ huyết thanh sau 39 tuần ở 4°C (các Fig. 14A-14D). Sự gia tăng rõ rệt về hiệu lực virus theo thời gian có thể được giải thích là không có sự giảm hiệu lực sai số thí nghiệm (dựa trên nhận xét nội bộ). Độ chuẩn virus theo thời gian được thể hiện theo trục dọc được dự đoán bằng cách ngoại suy từ đường thích hợp nhất ở 78 tuần (2x điểm dữ liệu thời gian thực cuối cùng) (các Fig. 14A-14D) và chứng tỏ sự giảm tối thiểu hiệu lực virus được dự đoán theo thời gian. Tuy nhiên, các hỗn hợp phối chế chứa dextran dường như làm giảm đáng kể độ chuẩn virus sau khi đông khô, so với các hỗn hợp phối chế chứa HSA, khiến cho tổng mức giảm thực về hiệu lực của các hỗn hợp phối chế chứa dextran cao hơn HSA. Dữ liệu thời gian thực gợi ý rằng các hỗn hợp phối chế tiềm năng đã được xác định và tối ưu có profile độ ổn định ở trạng thái rắn mong muốn ở nhiệt độ bảo quản đích.

Bảng 16: Hình dạng bên ngoài bánh của mẫu đã đông khô được đánh giá (Fig. 15A-15B) dựa trên hệ thống phân loại bằng mắt thường (1–3, trong đó 1 là tồi nhất và 3 là tốt nhất).

Hỗn hợp phối chế đông khô	Hình dạng bên ngoài thông thường của bánh
Met + MSG + Ala + ure + Mann	3
Met + MSG + Ala + Ure	3
MSG + Ala	3
Met + Ure	3
MSG + Ure	3
Ala + Ure	3
15% Suc + 0,1% HSA	3
10% Suc + 2,0% HSA	3
10% Suc + 0,1% HSA	3
Met	3
MSG	3
Ala	3
Ure	3
Mann	3
Met + MSG + Ala	3
Met + MSG	3
Met + Ala	3
Arg	3
Arg + Ure	3

Trong các thí nghiệm nhất định, ảnh hưởng của việc phối hợp các tá dược đứng đầu ở các nồng độ khác nhau đối với độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) trước và sau khi đông khô và làm ổn định tích cực được đánh giá. Trong các nghiên cứu này, HSA (ở 0,1 và 0,2% w/v) được bổ sung vào các hỗn hợp phối chế bazơ được mô tả trên đây do kết quả sàng lọc ban đầu chỉ ra HSA đóng vai trò như chất bảo vệ đông khô hữu hiệu (Fig. 15). Fig. 15 biểu lộ kết quả từ quá trình sàng lọc dựa trên ảnh hưởng của các tổ hợp tá dược khác nhau (trong chất đệm bazơ chứa trehaloza) đến hiệu lực virus của flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất

huyết typ huyết thanh-3, TDV-3). Chất đệm bazơ chứa 10% trehaloza trong 10 mM dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl, pH 7,2. Kết quả chỉ ra sự giảm độ chuẩn flavivirus (Fig 15A) (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi đông khô, (Fig. 15B) sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) sau khi các mẫu đã đông khô được bảo quản trong 5 tuần ở nhiệt độ trong phòng ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Độ chuẩn virus được đưa ra dưới dạng $\log_{10}$ pfu/ml.

Như được minh họa trên Fig. 15, quan sát thấy sự giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) $< 0,2$ log sau khi đông khô ở cả hai nồng độ HSA trong các hỗn hợp phối chế bazơ chứa 10% sucroza hoặc trehaloza, tương ứng (Fig. 15A). Vì vậy, các hỗn hợp phối chế chất đệm bazơ sau đó được điều chế chứa dung dịch đệm phosphat, NaCl, 10% đường (trehaloza hoặc sucroza) với 0,1% HSA và các tá dược bổ sung đã chỉ ra. Hầu hết các tổ hợp tá dược trong các hỗn hợp phối chế bazơ này thể hiện độ ổn định virus được cải thiện ở cả mẫu sau đông khô và mẫu ổn định tích cực (các Fig. 15A-15B). Bảo vệ đông khô tối đa được chứng minh bằng cách sử dụng tổ hợp gồm axit amin và ure được bổ sung trong các hỗn hợp phối chế bazơ. Sau 5 tuần ở 25°C , các hỗn hợp phối chế bazơ với manitol và ure được bổ sung, cùng hoặc không cùng với axit amin như alanin, arginin, MSG và methionin có độ ổn định virus được cải thiện ở mức độ lớn (các Fig. 15A-15B). Việc gia tăng nồng độ đường trong các hỗn hợp phối chế bazơ đến 15% đường như không tạo ra lợi ích bổ sung bất kỳ đối với việc bảo vệ độ chuẩn virus.

Việc duy trì hiệu lực virus trong vắc xin chứa virus sống đã được giảm độc lực là cần thiết để gây chủng ngừa thành công trong suốt thời hạn sử dụng của sản phẩm, mà điều này, phụ thuộc phần lớn vào thành phần của hỗn hợp phối chế và loại của dạng bào chế cuối cùng (*chẳng hạn*., chất lỏng hay đông khô). Do quá trình đông khô liên quan đến các ứng suất đóng băng và hút ẩm, các tá dược riêng lẻ thường không đủ để làm ổn định virus và vì vậy tổ hợp các chất phụ gia thường được đòi hỏi để bảo vệ khỏi các cơ chế phân hủy khác. Các đường như sucroza hoặc trehaloza, đường như rất quan trọng trong các hỗn hợp phối chế đông khô này để bảo vệ đông khô độ chuẩn flavivirus và đối với vắc xin virus sống khác. Ví dụ, trehaloza kết hợp

với gelatin đã chứng tỏ là giúp cho vắc xin quai bị sống được giảm độc lực có độ ổn định tốt hơn so với tổ hợp gồm sucroza và sorbitol. Ngược lại, sucroza và lactalbumin tạo ra sự bảo vệ nhiệt đối với vắc xin bệnh dịch tả loài nhai lại nhỏ (*peste des petits ruminants* - PPR) sống được giảm độc lực tốt hơn so với chỉ một mình trehaloza.

Trong các phương pháp nhất định được nêu làm ví dụ, ảnh hưởng của cả sucroza và trehaloza được nghiên cứu một cách hệ thống kết hợp với các tá dược khác đối với độ ổn định của flaviviruses (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3). Các hỗn hợp phối chế chứa ure, EDTA, polyol, protein, polyme và axit amin thể hiện khả năng phục hồi virus ở mức cao sau đông khô với mức giảm độ chuẩn flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) $<0,2$ log không phụ thuộc vào loại đường (trehaloza hay sucroza). Trong số các tá dược nghiên cứu, quan sát thấy sự giảm hiệu lực virus đáng kể sau khi đông khô với các hỗn hợp phối chế chứa $MgCl_2$ và poloxamer 407 so với các hỗn hợp phối chế khác. $MgCl_2$ đã được biết rõ về khả năng làm ổn định poliovirus của nó; Tuy nhiên, phương pháp này có những ảnh hưởng bất lợi đối với sự ổn định flavivirus. Tác dụng làm ổn định của $MgCl_2$ có thể phụ thuộc virus.

Khi các tá dược đứng đầu của các phương pháp này được nhận biết, tổ hợp tá dược chọn lọc được kiểm tra khả năng duy trì hiệu lực flavivirus (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3). Các hỗn hợp phối chế chứa các tổ hợp axit amin nhất định cũng như là ure thể hiện sự bảo vệ đông khô flavivirus một cách đáng kể và có thể quan sát được, và khi kết hợp tiếp với manitol, tạo ra độ ổn định hiệu lực virus cao nhất sau khi bảo quản ở 25°C trong 5 tuần. Mặc dù không mong muốn bị giới hạn ở hỗn hợp phối chế chính xác bất kỳ, ure dường như có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tính nguyên vẹn/độ ổn định flavivirus trong quá trình khử nước. Việc bổ sung axit amin làm cải thiện độ ổn định của các protein khác nhau trong các hỗn hợp phối chế chứa sucroza trong quá trình bảo quản và có thể đóng vai trò tiềm năng trong việc làm ổn định nhờ sự hydrat hóa ưu tiên và/hoặc sức căng bề mặt dung môi gia tăng. Manitol cũng thể hiện tác dụng làm ổn định được cải thiện đối với flavivirus.

Một cách tiếp cận được áp dụng để thiết kế hỗn hợp phối chế của các vắc xin thử nghiệm flavivirus sống đã được làm đông khô là kết hợp thí nghiệm bán thực nghiệm và phân tích dữ liệu thăm dò nâng cao. Danh sách ban đầu của các tá được dùng trong dược phẩm để kiểm tra trong phương pháp này được giảm xuống 18 chất phụ gia bằng cách sử dụng cơ sở khoa học dựa trên xem xét các tài liệu, kinh nghiệm trong lĩnh vực dược phẩm và xem xét profile sản phẩm đích cuối cùng (xem bảng 9). Việc sàng lọc theo kinh nghiệm tổ hợp tá được tạo ra bộ dữ liệu lịch sử mà được thẩm tra bởi phương pháp phân tích đa biến và trực quan hóa để tạo ra các biểu đồ thăm dò từ các mô hình ban đầu hướng dẫn chọn lọc các tá được chủ chốt, khoảng hiệu lực của chúng, cũng như các tương tác tá được đối với tác dụng làm ổn định virus của chúng. Việc xây dựng một bộ dữ liệu thử nghiệm ngay từ đầu thay cho thiết kế các thử nghiệm sàng lọc đa biến tránh cho việc bổ sung các tá được mà không có tác dụng và/hoặc tránh cho việc sử dụng các khoảng nồng độ tá được không thích hợp trong nghiên cứu đã được thiết kế.

Việc xây dựng bộ dữ liệu ổn định virus thử nghiệm, thực hiện phân tích dữ liệu thăm dò và khớp dữ liệu theo cách hồi tố vào mô hình hồi quy ‘ban đầu’ không phải là không có những hạn chế của nó. Đây là lý do tại sao các mô hình được tạo ra ở giai đoạn này được mô tả như là thăm dò (các Fig. 11A và 11B) trong đó chúng giúp hướng dẫn thí nghiệm được thiết kế theo cách thống kê đường như tạo ra các mô hình dự đoán tin cậy hơn (DSD; bảng 15). Bộ dữ liệu lịch sử không được thiết kế thống kê do việc lập mô hình dự báo rõ ràng có thể chứa các điểm dữ liệu không thiết yếu, các số đo đáp ứng không nhất quán, và/hoặc dữ liệu số đo đối với các thông số đáp ứng là chưa hoàn thiện. Các loại kết quả bộ dữ liệu phụ thuộc vào phương pháp này không chắc chắn góp phần tạo ra mô hình thống kê chính xác và đáng tin cậy. Điều này được minh họa bởi giá trị R^2 thấp đối với mô hình phù hợp sự giảm độ chuẩn theo $\log_{10}$ sau khi đông khô (Fig. 11A). Điều này một phần có thể là do khó khăn trong việc lập mô hình khoảng cách giữa hai nồng độ HSA được thử nghiệm (0,1% và 2%), điều này khiến cho ý nghĩa của tương tác HSA*HSA tăng vọt một cách không tự nhiên (Fig. 12A), vì vậy việc nhận biết các điều kiện đường cong có thể bị sai. Việc hiểu rõ hơn về mặt khoa học về việc bộ dữ liệu có khả năng sử dụng hợp lý phương pháp phân

tích dữ liệu thăm dò và các mô hình thống kê ban đầu làm hướng dẫn để lựa chọn tá được và các nồng độ của chúng.

Việc lựa chọn các tá được đứng đầu và nồng độ hoạt động tiềm năng của chúng là thiết yếu để tạo ra và tối đa hóa hiệu quả mô hình dự đoán bắt nguồn từ thí nghiệm đã thiết kế. Ví dụ về dữ liệu đáp ứng trong các mô hình sàng lọc DSD (Fig.12C), và nhận biết việc bố trí và khoảng mong muốn nhất nhờ profile dự đoán trong JMP tạo ra biểu đồ đường nét (dữ liệu không được chỉ ra) có khả năng minh họa và lập sơ đồ khoảng thiết kế của hỗn hợp phối chế tùy chọn để làm ổn định Flavivirus đã đông khô (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3). DSD nhận biết tương tác có nghĩa giữa trehalosa và HSA, phát hiện các đặc tính làm ổn định này độc lập với alanin, và có khả năng xác nhận các nồng độ tối ưu của manitol và ure. Mô hình DSD cực kỳ phù hợp với các giá trị R^2 cao mang lại sự tin tưởng về độ tin cậy của mô hình cho phép lựa chọn lần cuối cùng các hỗn hợp phối chế đứng đầu.

Các mô hình được giải thích là dự đoán và thay đổi khi hỗn hợp phối chế đông khô đứng đầu được điều chế chứa flavivirus (chẳng hạn hỗn hợp tứ giá gồm TDV-1, -2, -3, và -4) và được thử thách ở các nghiên cứu ổn định tích cực (25°C trong 5 tuần) và nghiên cứu độ ổn định thời gian thực (4°C trong 39 tuần). Như được dự đoán bởi mô hình DSD, nhận thấy sự giảm hạn chế về hiệu lực virus sau khi đông khô và bảo quản ở 25°C ở các hỗn hợp phối chế 3 và 4. Mặc dù sự giảm hiệu lực tăng lên sau khi đông khô đối với các hỗn hợp phối chế chứa dextran, cả bốn hỗn hợp phối chế được dự đoán duy trì mức giảm hiệu lực từ tối thiểu đến không giảm trong quá trình bảo quản ở trạng thái rắn đối với tất cả các typ huyết thanh ở 4°C trong thời gian lên đến 78 tuần (2x thời điểm ổn định cuối cùng), vì vậy, chứng tỏ rằng các hỗn hợp phối chế đông khô thử nghiệm được nhận biết khả năng làm ổn định flavivirus đơn giá (chẳng hạn virus sốt xuất huyết typ huyết thanh-3, TDV-3) ở 25°C là ổn định đối với cả bốn typ huyết thanh virus sốt xuất huyết. Gần đây, nhiều nhà sản xuất vắc xin mong muốn thay thế HSA có nguồn gốc từ người bằng rHSA để tránh các nguy cơ tiềm năng có liên quan đến các sản phẩm có nguồn gốc từ người. Việc thay thế dextran và rHSA cho HSA tự nhiên nhằm đạt được mong muốn này.

Nghiên cứu này đưa ra một trường hợp nghiên cứu về tính hiệu quả bằng cách sử dụng kết hợp việc sàng lọc thực nghiệm với phương pháp phân tích mô hình thống kê để nhận biết và xác nhận các nhân tố chủ yếu (và nồng độ tối ưu của chúng) để ổn định và phát triển hỗn hợp phối chế của vắc xin virus sống đông khô tham gia thử nghiệm. Phương thức kết hợp để phát triển hỗn hợp phối chế của vắc xin virus sống đông khô không những có thể giúp tiết kiệm cả tiền bạc và thời gian, mà còn cho phép xây dựng gói dữ liệu ổn định virus gia tăng mà có thể trợ giúp cho quá trình tương tự và những nỗ lực nhằm phát triển hỗn hợp phối chế cũng như đệ trình đến các cơ quan quản lý mà đề xuất cách tiếp cận chất lượng theo thiết kế để phát triển sản phẩm vắc xin.

Nguyên liệu và phương pháp

Theo một phương pháp được nêu làm ví dụ, giống gốc virus sốt xuất huyết đã lạnh đông (chẳng hạn giống gốc TDV-3: $\sim 7.30 \times 10^7$ pfu/mL) (ví dụ, trong lô phương pháp số: DMV013-3 được sử dụng) trong chất đệm FTA (1% Pluronic F127® (F) poloxamer 407, 15% trehalose (T), và 0,1% HSA (A) trong chất đệm PBS, pH 7,4) được bảo quản ở -80°C . Giống gốc được làm tan giá trong chậu nước 37°C và được chia thành các phần phân ước (100 μL trong các ống 1,5 mL). Các phần phân ước được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng. Theo các phương pháp nhất định, các phần phân ước có thể được làm lạnh đông và tan giá nhiều hơn một lần. Ví dụ, lịch sử nhiệt của các phần phân ước này bằng hai chu trình lạnh đông tan giá. Giống gốc virus sốt xuất huyết đã được làm lạnh đông được làm tan giá và được trộn bằng cách xoay nhẹ. Các mẫu được điều chế trong các chất đệm sau đây: 10 mM Tris (pH 7,2), 10 mM histidin (pH 7,2), 10 mM HEPES (pH 7,2), 10 mM natri phosphat (pH 7,2), tất cả đều cùng và không cùng với 50 mM NaCl, cũng như là 10 mM phosphat với 137 mM NaCl (PBS). Tất cả các dung dịch gốc của tá được được điều chế trong các chất đệm tương ứng của chúng và độ pH được điều chỉnh đến 7,2 hoặc 7,4. Để điều chế các hỗn hợp phối chế virus nhất định, giống gốc virus được trộn với chất đệm phối chế để đạt được nồng độ virus cuối bằng khoảng 2×10^5 pfu/mL.

Theo một ví dụ, sáu trăm năm mươi microlit (650 μ L) mỗi hỗn hợp phối chế virus sốt xuất huyết (chẳng hạn hỗn hợp phối chế virus sốt xuất huyết tứ giá) sau đó được phân thành các phần phân ước vào các lọ 2 mL, và các lọ này được làm đông khô hoặc được bảo quản ở -80°C để dùng làm mẫu đối chứng trước đông khô. Chu trình đông khô vừa phải được sử dụng để đảm bảo rằng các hỗn hợp phối chế cần đánh giá được làm lạnh khô một cách thích hợp. Tất cả các mẫu được nạp vào thiết bị làm lạnh sơ bộ đến -45°C . Các cặp nhiệt điện được đặt trong các lọ đối chứng/giả được tham chiếu (chẳng hạn FTA). Các cặp nhiệt điện được đặt trong kệ theo cách sau đây: một cặp ở giữa, một cặp ở trước, hai cặp ở sau. Khi chu trình hoàn tất, khoang được nạp lại với nitơ cho đến khi áp suất khoang đạt 77, 33 kPa (580 Torr) và các lọ được nút chặt. Khoang được để đạt đến áp suất khí quyển (101,32 kPa (760 Torr)). Lúc này, van xả được mở và khay chứa các lọ đông khô đã được nút được lấy ra. Sau đó, tất cả các lọ này được bịt kín. Sau đó, các lọ đã lạnh khô được đánh giá bằng mắt thường và được chụp ảnh với máy ảnh kỹ thuật số (8-megapixel) để ghi lại hình dạng bên ngoài và cấu trúc của bánh. Sau đó, các hỗn hợp phối chế chứa virus đông khô được bảo quản ở -80°C .

Tất cả các mẫu giả được và mẫu virus được điều chế trong chất đệm bazơ chứa 10 mM natri phosphat (pH 7,2) với 30 mM NaCl và 0,1% HSA. FTA được điều chế trong 10 mM PBS (dung dịch muối đệm phosphat với 137 mM NaCl (pH 7,4)). Tất cả các dung dịch gốc chứa tá được điều chế trong các chất đệm tương ứng của chúng và độ pH được điều chỉnh đến từ khoảng 7,0 đến khoảng 8,0 hoặc khoảng 7,2 đến khoảng 7,4. Cả hai mẫu virus trước và sau đông khô đều được đánh giá hiệu lực bằng cách sử dụng phương pháp vi chuẩn độ IFA. Nghiên cứu độ ổn định đối với virus đã lựa chọn và các hỗn hợp phối chế đông khô được thực hiện ở khoảng nhiệt độ trong phòng (chẳng hạn 25°C) (bốn lọ) trong năm tuần. Các mẫu được bảo quản ở -80°C (bốn lọ) trong năm tuần được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Theo một ví dụ khác, giống gốc virus sốt xuất huyết đã lạnh đông (chẳng hạn virus TDV-1, TDV-2, và TDV-4) trong dung dịch đệm phosphat, 15% trehaloza, 1% poloxamer 407 (F127[®]) và 0,1% HSA- được cung cấp và bảo quản lạnh đông ở -80°C cho đến khi sử dụng tiếp theo. Sucroza và trehaloza được mua từ Pfanstiehl

Laboratories (Waukegan, Illinois). L-arginin, methionin, natri L-glutamat, EDTA, dextran 40, magie clorua, manitol, sorbitol, gelatin được mua từ Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). Mẫu poloxamer 407 (F127®) nhận được từ BASF. Các muối để điều chế chất đệm, polysorbate 80, ure được mua từ Fisher Scientific and Acros. Albumin huyết thanh người được mua từ Octapharma và HSA tái tổ hợp (rHSA) nhận được từ Novazymes.

Theo các ví dụ khác, độ chuẩn virus được xác định bằng thử nghiệm vết tan sử dụng phương pháp vi chuẩn độ 96 lỗ. Tóm lại, lớp đơn tế bào Vero bám dính được gây nhiễm với dịch pha loãng chứa virus đơn giá hoặc tứ giá, sau đó bổ sung một lớp phủ nhót. Tiếp theo, các đĩa được ủ ở 37°C trong 2 hoặc 3 ngày tùy thuộc vào typ huyết thanh, sau đó được rửa và cố định để nhuộm. Việc nhuộm được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu typ huyết thanh. Thử nghiệm này có phạm vi biến làm việc $\pm 0,34, 0,17, 0,19$, và $0,19 \log_{10} \text{ pfu}/0,5 \text{ mL}$ (liều lượng) đối với các typ huyết thanh từ 1 đến 4, tương ứng như được xác định bởi phương pháp kiểm soát xu hướng. Mỗi mẫu được đo làm ba lần và kết quả được báo cáo dưới dạng giá trị trung bình của các giá trị.

Phối chế và đông khô virus. Các dung dịch của mỗi tá được với lượng lớn được điều chế trong dung dịch đệm phosphat chứa 30 mM NaCl và độ pH được điều chỉnh đến 7,2. Những lượng mong muốn của tá được trộn với dung dịch đệm phosphat với 30 mM NaCl để thu được nồng độ cuối và sau đó lượng thích hợp giống gốc virus được bổ sung vào để đạt được $2 \times 10^5 \text{ pfu/ml}$. Tất cả các bước bào chế virus được thực hiện trong tủ an toàn sinh học loại II (Labconco, Kansas City, MO).

Theo các phương pháp nhất định, khoảng 650 μL hỗn hợp phối chế vắc xin virus được phân phối trong các lọ vô trùng 2mL và được đậy kín một phần bằng nút cao su vô trùng. Chu trình đông khô vừa phải với việc tăng nhiệt độ dần từ -45 đến 25°C ở áp suất 0,667 Pa (50 mTorr) trong suốt chu trình 2 ngày được sử dụng để tạo ra các hỗn hợp phối chế đông khô. Các mẫu được nạp vào FTS Lyo Star II (SP Scientific) mà có vỏ được làm lạnh sơ bộ ở -45°C . Sau bước lạnh đông ở -45°C trong 2 h và giảm dần đến áp suất 0,667 Pa (50 mTorr) (khoảng 2 giờ), nhiệt độ được tăng đến -

37°C với tốc độ tăng nhiệt là 0,1°C /phút. Ở cuối của bước làm khô sơ bộ, nhiệt độ được tăng dần đến 25°C với tốc độ tăng nhiệt là 0,1°C /phút và tiếp tục làm khô trong 6 giờ. Sau khi hoàn tất bước làm khô thứ hai, vỏ được làm lạnh đến 4°C và giữ ở 4°C cho đến khi chu trình hoàn tất (xem bảng 2 để biết cụ thể hơn). Ngay khi chu trình hoàn tất, các lọ được nạp lại với nitơ và được đậy nút trong điều kiện chân không (77,33 kPa (580,000 Torr)) trước khi được lấy ra khỏi khoang, và sau đó được bịt kín chặt bằng nắp nhôm. Chu trình đông khô được giám sát bằng cách đặt các cặp nhiệt điện ở giữa đáy của ít nhất ba ống giả được mỗi mẻ và sử dụng phép đo áp suất so sánh (pirani so với áp kế điện dung).

Thử nghiệm độ ổn định nhiệt của các hỗn hợp phối chế virus đông khô. Hỗn hợp phối chế vắc xin đông khô đã được lựa chọn được bảo quản ở 4°C trong tủ lạnh và ở 25°C trong khoang ổn định. Sau một khoảng thời gian được chỉ ra, các lọ được lấy mẫu và hydrat hóa lại với 0,5 ml nước vô trùng dùng để tiêm. Khả năng nhiễm virus của vắc xin đã hoàn nguyên được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm vi chuẩn độ. Để đánh giá độ ổn định của virus sau đông khô, hiệu quả lây nhiễm của vắc xin đã được hydrat hóa lại được xác định bằng phương pháp vi chuẩn độ. Mức giảm độ chuẩn virus sau đông khô được tính bằng cách lấy độ chuẩn ban đầu (mẫu đối chứng lỏng đã lạnh đông được bảo quản ở -80°C) trừ đi độ chuẩn của mẫu virus đã đông khô được bảo quản ở -80°C. Tương tự, mức giảm hiệu lực virus trong quá trình bảo quản thời gian thực và bảo quản tích cực được xác định bằng cách so sánh khả năng lây nhiễm virus của các mẫu đã ủ với khả năng lây nhiễm của các mẫu sau đông khô mà được bảo quản ở -80°C. Sai số đối với mức giảm được tính toán bằng cách sử dụng phương trình sau $SE(C) = \sqrt{SE(A)^2 + SE(B)^2}$. Đối với mỗi điều kiện, các mẫu được chuẩn độ làm ba lần và độ chuẩn trung bình tính theo log₁₀ được tính toán.

Phân tích thống kê. Phương pháp bề mặt đáp ứng được áp dụng bằng cách sử dụng công cụ hồi quy từng bước và thiết kế sàng lọc tin cậy được tạo ra bằng cách sử dụng nền tảng thiết kế thí nghiệm sẵn có trong profile JMP v11.2.0 (JMP Corporation, Cary, NC).

Xác định chất lượng bánh được phẩm. Bánh đã đông khô được phân loại dựa

trên thang điểm chủ quan từ 1 đến 3, trong đó 1 = tồi, 2 = trung bình, và 3 = tốt. Bánh với điểm đánh giá là 1 được biểu lộ là có sự gãy vụn về mặt cấu trúc ở phạm vi rộng, tan chảy ở đáy và các mặt bên, co đáng kể và rút vào từ tất cả các phía, và/hoặc có sự xuất hiện của những hạt nhỏ. Bánh với điểm bằng 2 có sự co một phần và sự rút vào từ các phía, sự tan chảy vừa phải ở đáy, và/hoặc các vết rạn hoặc nứt lớn chạy suốt chiều dọc và chiều ngang bánh. Bánh với điểm bằng 3 là đẹp để làm được phẩm, tỏ ra là chắc, cấu trúc bánh (hầu hết là có màu trắng, tùy thuộc vào tá dược kết hợp) với bề mặt thường nhẵn và không hoặc có rất ít sự co hoặc rút của bánh từ đỉnh của bánh hoặc các phía của lọ.

Các chữ viết tắt:

CM: Áp kế điện dung

DOE: Thiết kế thí nghiệm

HSA: albumin huyết thanh người

HEPES: axit 2-[4-(2-hydroxyetyl) piperazin-1-yl]etansulfonic

IFA: thử nghiệm miễn dịch tập trung

MSG: mono natri glutamat

NaCl: Natri clorua

PBS: dung dịch muối đệm phosphat

rHSA: albumin tái tổ hợp huyết thanh người

THAM/ Tris: Tris (hydroxymetyl) aminometan

Pfu: đơn vị hình thành vết tan

PF127: Pluronic F-127®, poloxamer 407

Tất cả các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được tạo ra và thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức dựa trên phần bộc lộ hiện tại. Mặc dù chế phẩm và phương pháp đã được mô tả đối với các phương án ưu tiên, chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rõ rằng các biến thể có thể được áp dụng cho các chế phẩm và phương pháp này trong các bước hoặc trình tự của các bước của phương pháp được mô tả ở đây mà không đi trệch khỏi nội dung, tinh thần và phạm vi sáng chế. Cụ thể hơn, các chất nhất định có liên quan cả về mặt hóa học và sinh lý học có thể được thay cho các chất được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được kết quả giống hoặc tương tự. Tất cả các thay thế và cải biến tương tự hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực được cho là thuộc tinh thần, phạm vi và nội dung như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm flavivirus chứa:

một hoặc nhiều flavivirus sống bao gồm virus sốt xuất huyết;

ít nhất một trong số trehaloza và sucroza;

ure;

tác nhân protein bao gồm albumin huyết thanh người (human serum albumin – HSA);

arginin; và

ít nhất một muối bao gồm natri clorua (NaCl), natri phosphat (Na_2HPO_4), kali clorua (KCl) hoặc kali phosphat (KH_2PO_4);

trong đó chế phẩm này làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống bao gồm virus sốt xuất huyết;

trong đó virus sốt xuất huyết bao gồm bốn typ huyết thanh sốt xuất huyết ở dạng thể khảm virus sốt xuất huyết 1/2, virus sốt xuất huyết-2 sống giảm độc lực được cải biến, thể khảm virus sốt xuất huyết 3/2, và thể khảm virus sốt xuất huyết 4/2, trong đó virus sốt xuất huyết-2 như bộ khung của thể khảm virus sốt xuất huyết 1/2, thể khảm virus sốt xuất huyết 3/2 và thể khảm virus sốt xuất huyết 4/2 là chủng virus sốt xuất huyết-2 PDK-53.

2. Chế phẩm flavivirus theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất đệm bazơ, chất đệm bazơ này chứa dung dịch muối đệm phosphat (PBS), dung dịch đệm HEPES, dung dịch đệm Histidin hoặc dung dịch đệm Tris.

3. Chế phẩm flavivirus theo điểm 1 trong đó ít nhất một muối bao gồm NaCl ở nồng độ từ 10 mM đến 200 mM.

4. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm này chứa manitol.

5. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó.
6. Chế phẩm flavivirus theo điểm 5, trong đó một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó bao gồm methionin, alanin hoặc tổ hợp của chúng.
7. Chế phẩm flavivirus theo điểm 5, trong đó một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó bao gồm mono natri glutamat (monosodium glutamate - MSG).
8. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó tác nhân protein còn bao gồm dextran, polyme polyol hoặc gelatin.
9. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó một hoặc nhiều flavivirus sống bao gồm flavivirus sống đã được giảm độc lực.
10. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó chế phẩm này không chứa magie clorua ($MgCl_2$).
11. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 10, trong đó tác nhân protein có nồng độ từ 0,05% đến 1,0% (w/v).
12. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó trehaloza và sucroza hoặc tổ hợp gồm trehaloza và sucroza có mặt trong chế phẩm ở khoảng nồng độ từ 5,0% đến 15,0% (w/v).
13. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó trehaloza và sucroza hoặc tổ hợp gồm trehaloza và sucroza có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nhỏ hơn 10,0% (w/v).

14. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7 và các điểm từ 8 đến 13 khi phụ thuộc vào điểm 5, trong đó một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit có mặt trong chế phẩm ở khoảng nồng độ từ 1,0 mM đến 25,0 mM.

15. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó nồng độ ure trong chế phẩm là từ 0,01% đến 1,0% (w/v).

16. Chế phẩm flavivirus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó nồng độ HSA là từ 0,05% đến 0,5% (w/v); trong đó nồng độ của sucroza, trehaloza hoặc tổ hợp gồm sucroza và trehaloza là từ 5,0% đến 15,0% (w/v); trong đó nồng độ arginin là từ 1,0 mM đến khoảng 20,0 mM; và trong đó nồng độ ure là từ 0,1% đến 0,3% (w/v).

17. Phương pháp làm ổn định flavivirus sống, phương pháp này bao gồm:

kết hợp một hoặc nhiều flavivirus sống bao gồm virus sốt xuất huyết với một chế phẩm chứa:

ít nhất một trong số trehaloza và sucroza;

ure;

albumin huyết thanh người (HSA);

arginin; và

ít nhất một muối bao gồm natri clorua (NaCl), natri phosphat (Na_2HPO_4), kali clorua (KCl) hoặc kali phosphat (KH_2PO_4);

trong đó chế phẩm này làm ổn định một hoặc nhiều flavivirus sống bao gồm virus sốt xuất huyết;

trong đó virus sốt xuất huyết bao gồm bốn typ huyết thanh virus sốt xuất huyết ở dạng thể khảm virus sốt xuất huyết 1/2, virus sốt xuất huyết-2 sống giảm độc lực được cải biến, thể khảm virus sốt xuất huyết 3/2, và thể khảm virus sốt xuất huyết 4/2, trong đó virus sốt xuất huyết-2 như là bộ khung của thể khảm virus sốt xuất huyết 1/2, thể khảm virus sốt xuất huyết 3/2 và thể khảm virus sốt xuất huyết 4/2 là chủng virus sốt xuất huyết-2 PDK-53.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chế phẩm flavivirus được đông khô.
19. Phương pháp theo điểm 17 hoặc 18, trong đó chế phẩm flavivirus đã được đông khô được bảo quản ở 25°C trong khoảng thời gian dài.
20. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, còn bao gồm bước khử nước một phần hoặc toàn bộ chế phẩm trước khi sử dụng chế phẩm cho đối tượng như một phần của chế phẩm miễn dịch.
21. Phương pháp theo điểm 17, còn bao gồm chất đệm.
22. Phương pháp theo điểm 17, còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân protein được chọn từ nhóm gồm gelatin, dextran, polyme polyol, hoặc tổ hợp của chúng.
23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 22, còn bao gồm một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó một hoặc nhiều axit amin hoặc các dẫn xuất của nó hoặc muối, este hoặc dẫn xuất amit của nó được chọn từ nhóm gồm alanin, methionin, MSG hoặc tổ hợp của chúng.
25. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 24, trong đó ure có mặt trong chế phẩm ở khoảng nồng độ từ 0,01% đến 0,5% (w/v).
26. Kit để làm ổn định flavivirus sống, bao gồm:

chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16; và
ít nhất một đồ chứa.

1/18

Sự giảm hiệu lực sau 5 tuần ở 25°C

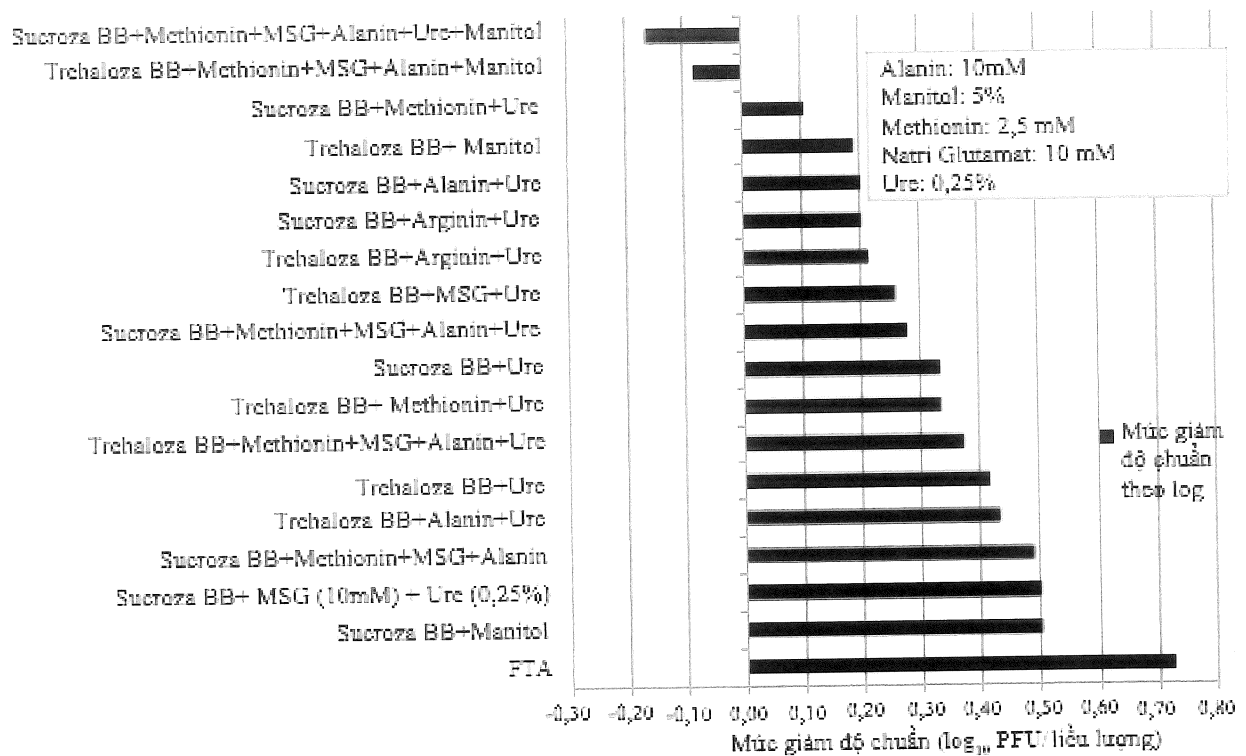
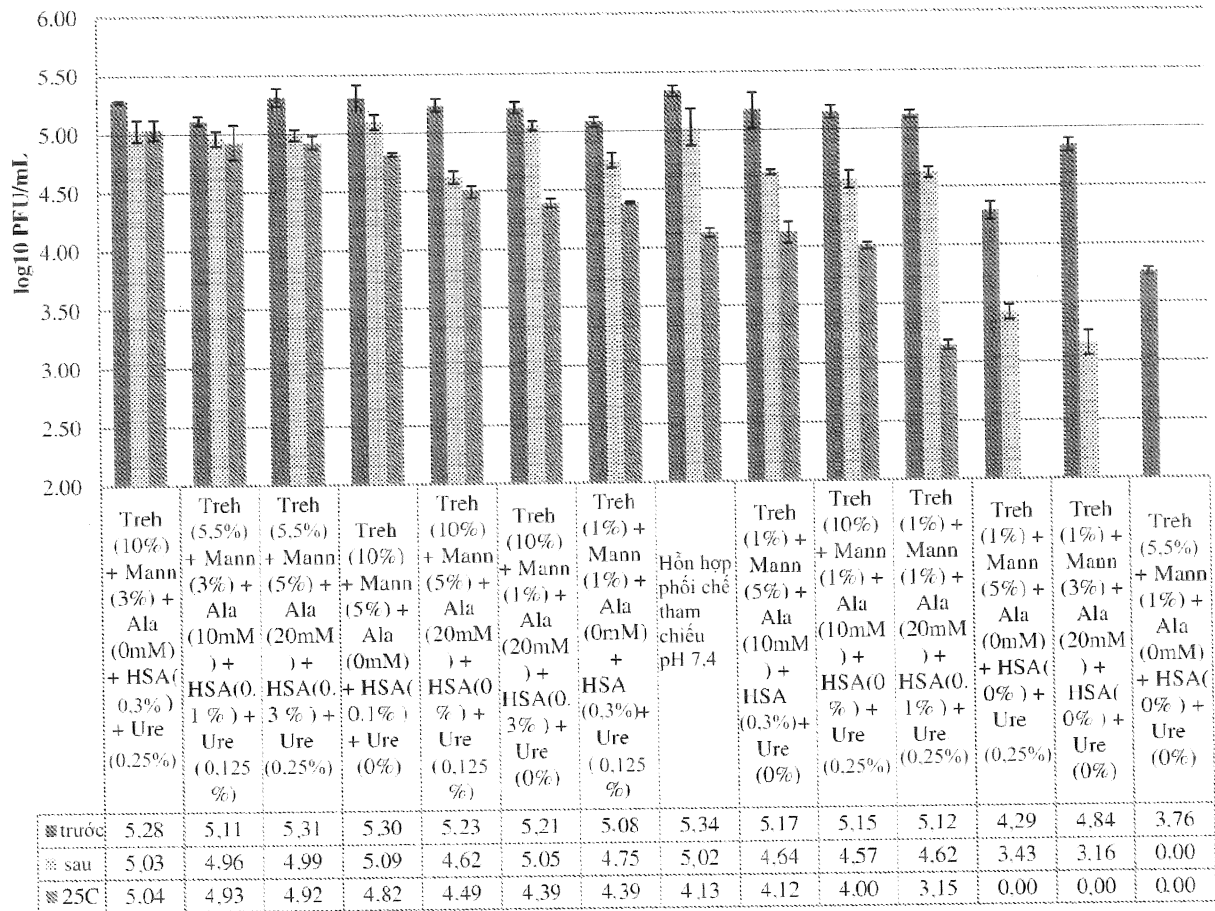


FIG. 1

2/18



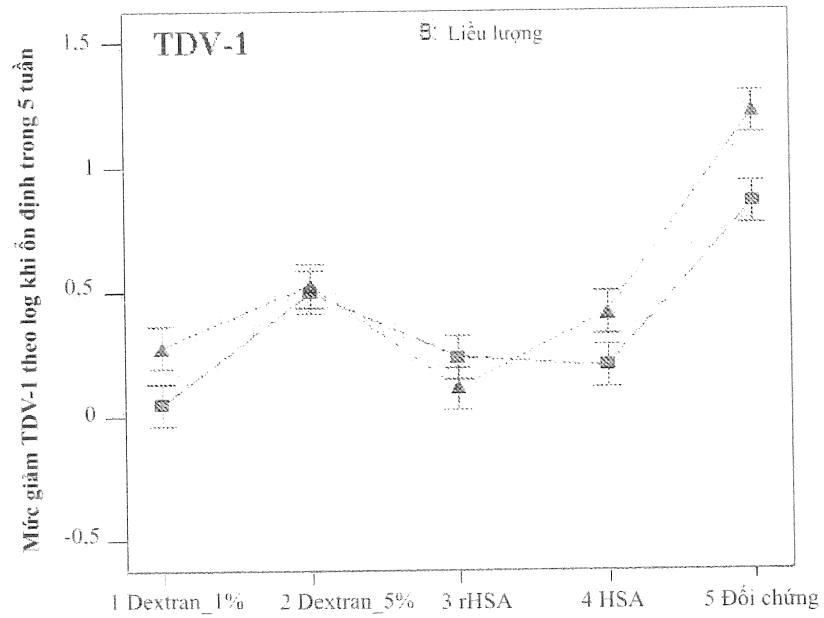
6	7	9	5	11	1	3	14	13	2	4	8	10	12
---	---	---	---	----	---	---	----	----	---	---	---	----	----

Hỗn hợp phối chế số (Bảng 4)

FIG. 2

3/18

3A



3B

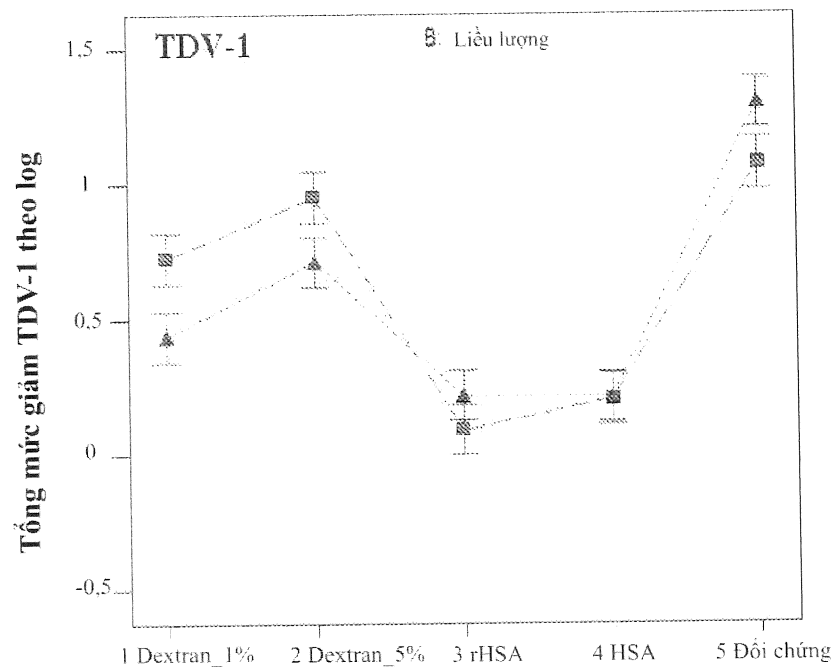
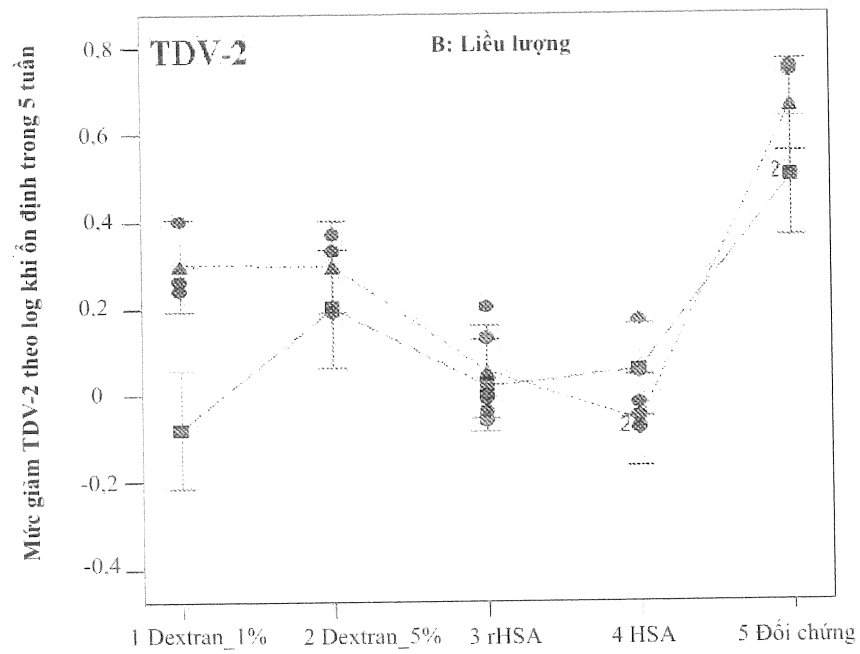


FIG. 3A-3B

4/18

4A



A: Hỗn hợp phổi chế

4B

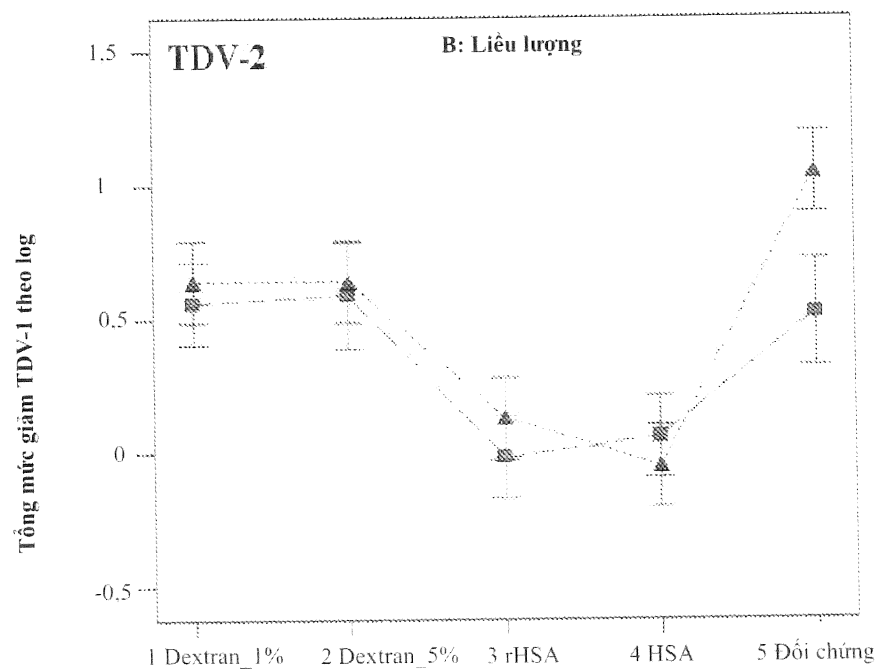
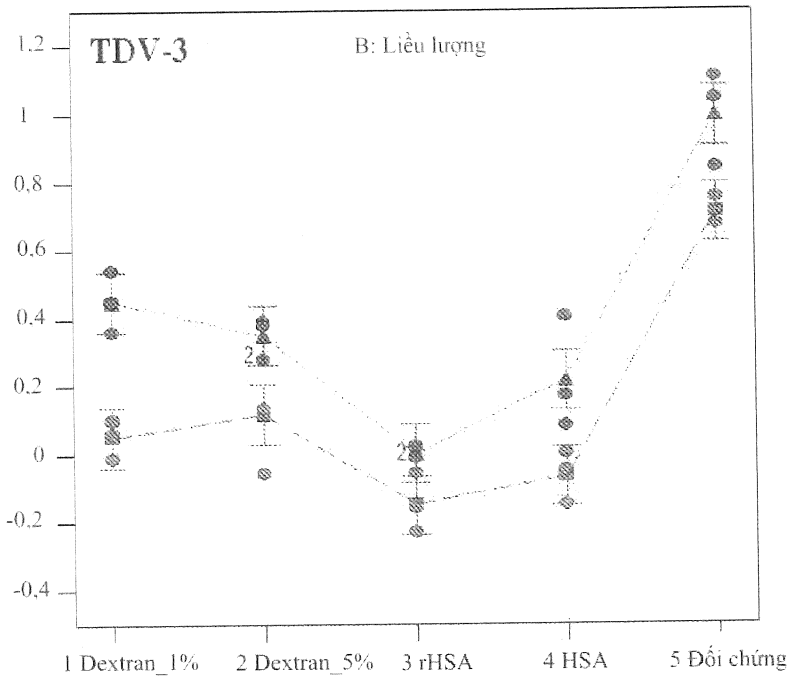


FIG. 4A-4B

5/18

5A

Mức giảm TDV-3 theo log khi ổn định trong 5 tuần



A: Hỗn hợp phổi chế

5B

Tổng mức giảm TDV-3 theo log

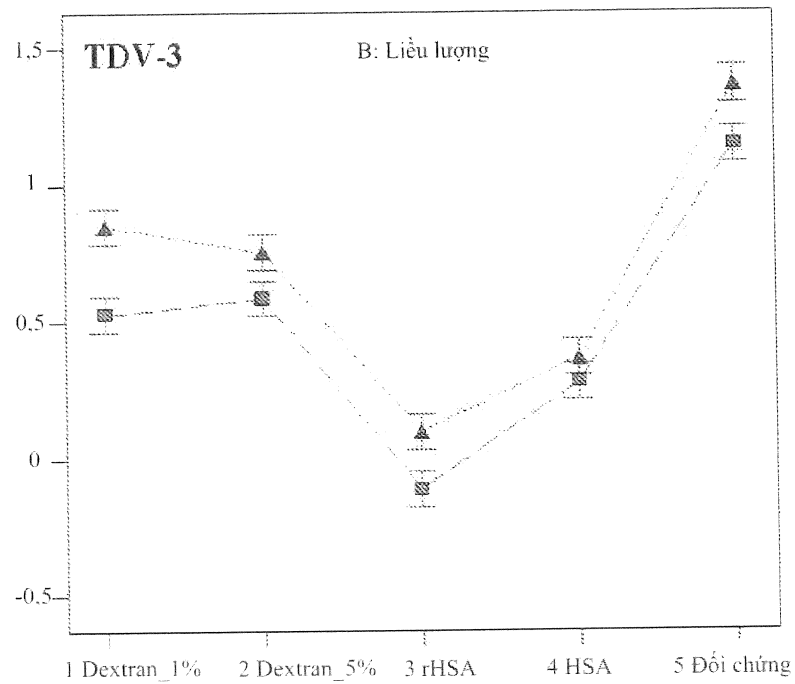
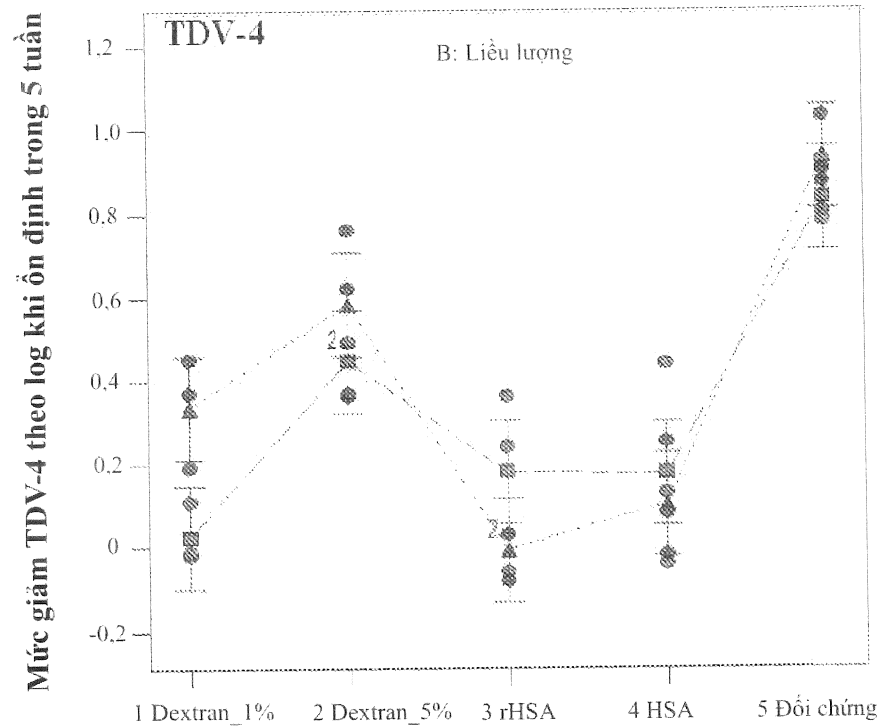


FIG. 5A-5B

6/18

6A



6B

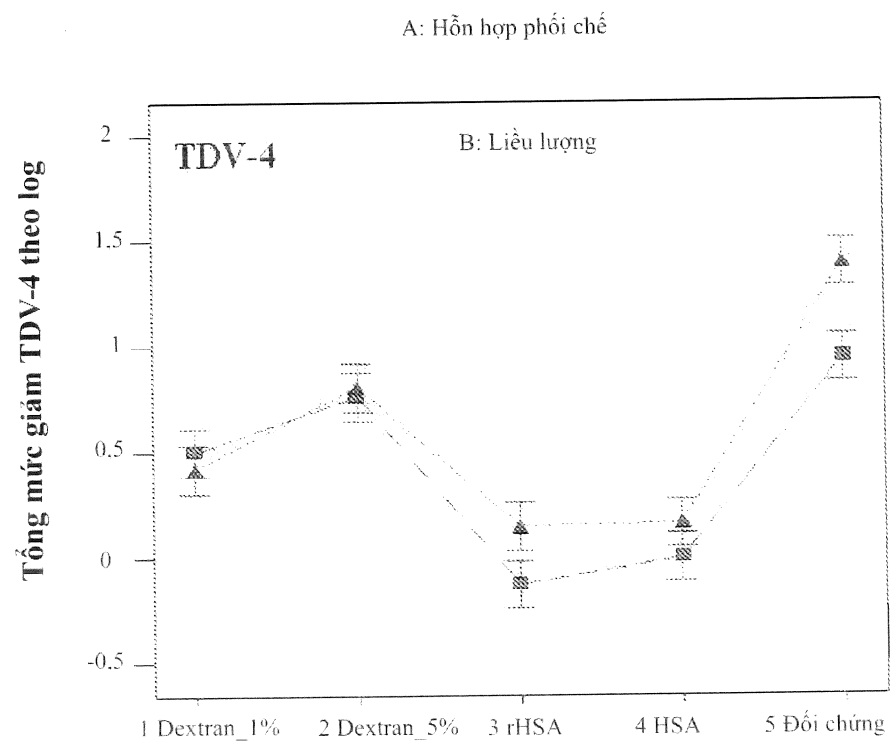
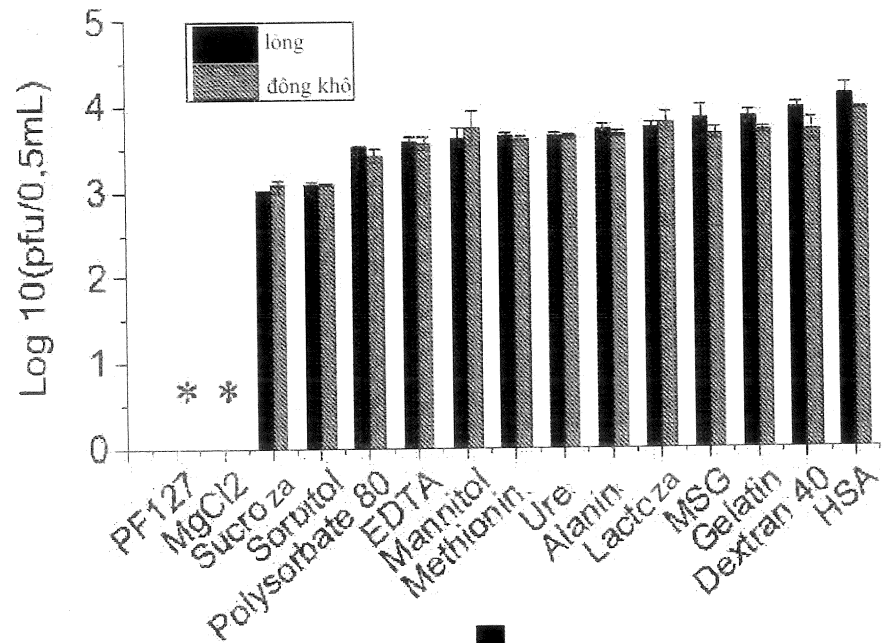


FIG. 6A-6B

7/18

7A



7B

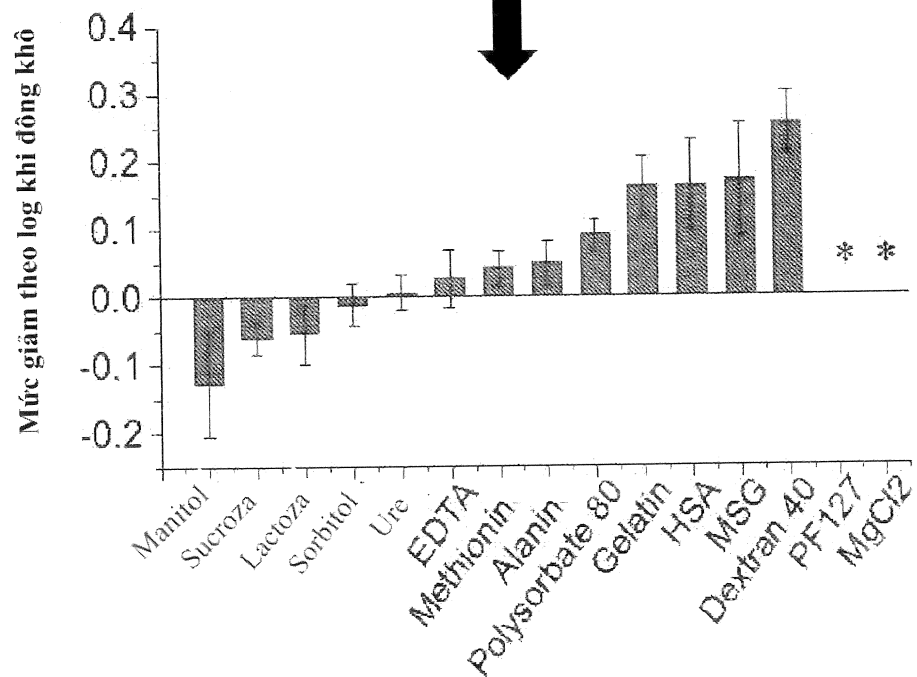


FIG. 7A-7B

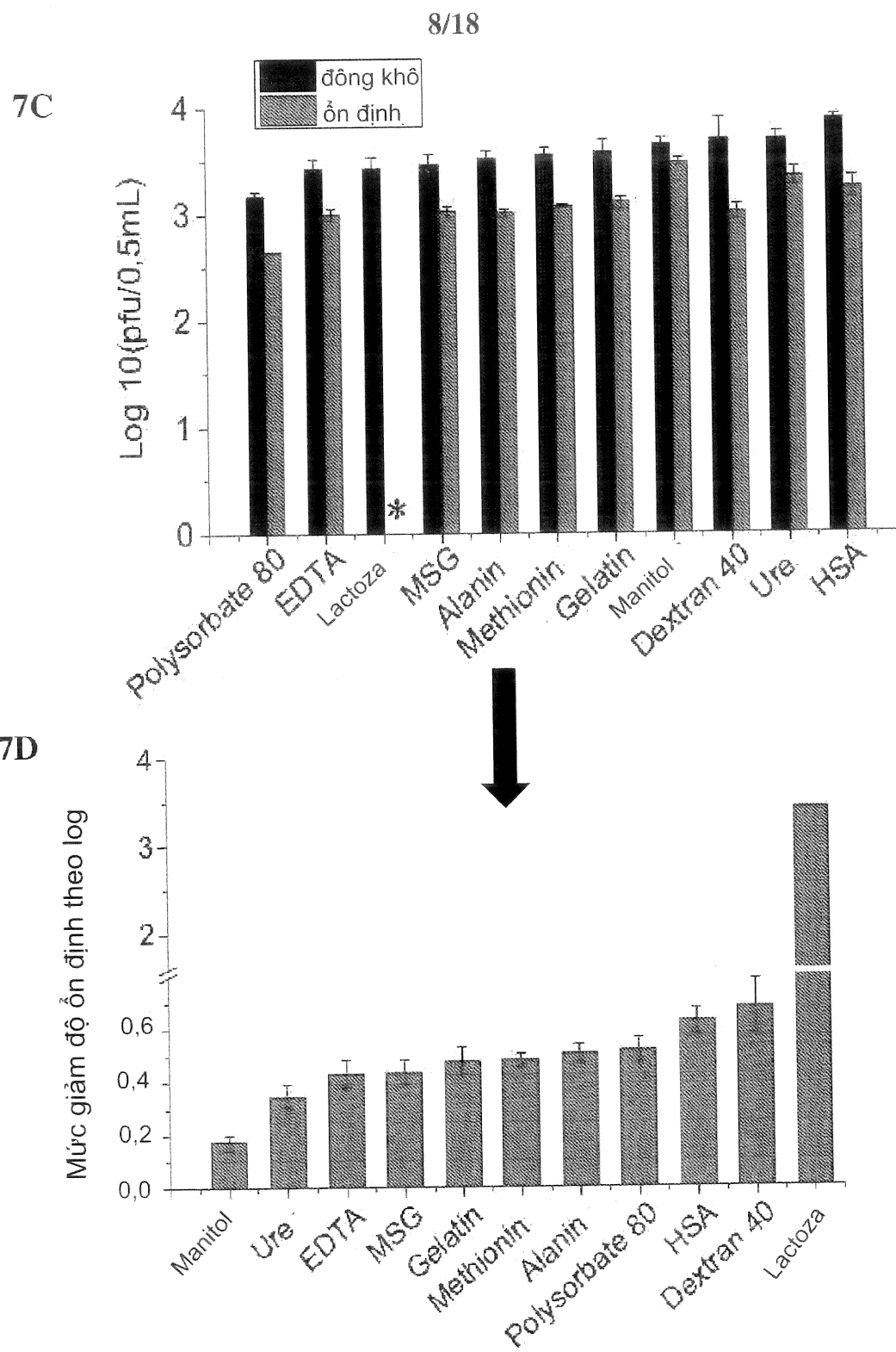
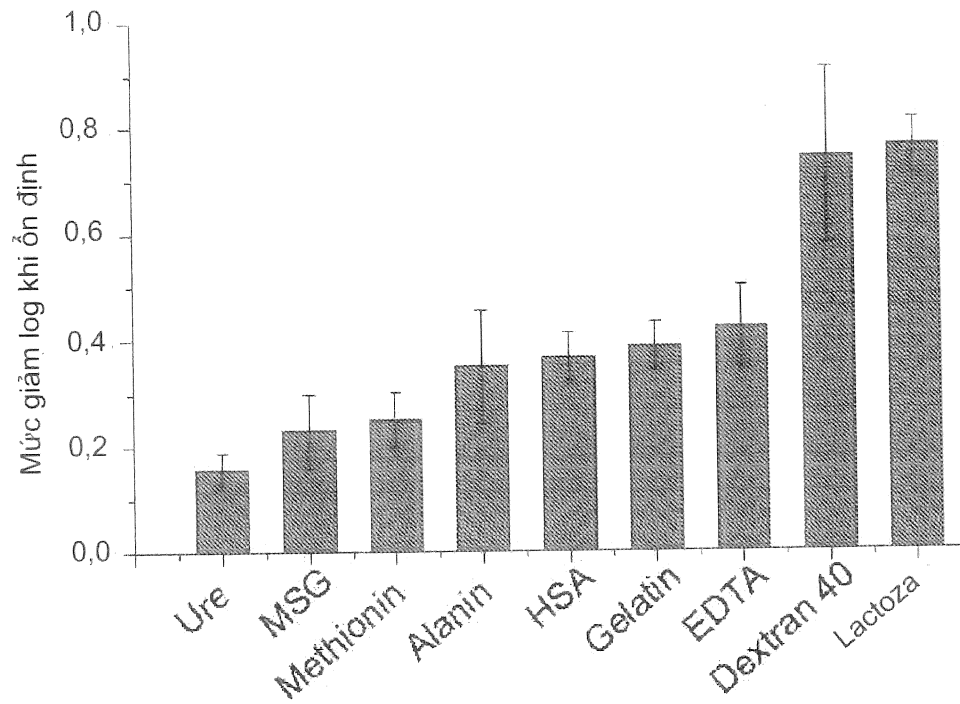


FIG. 7C-7D

9/18

8A



8B

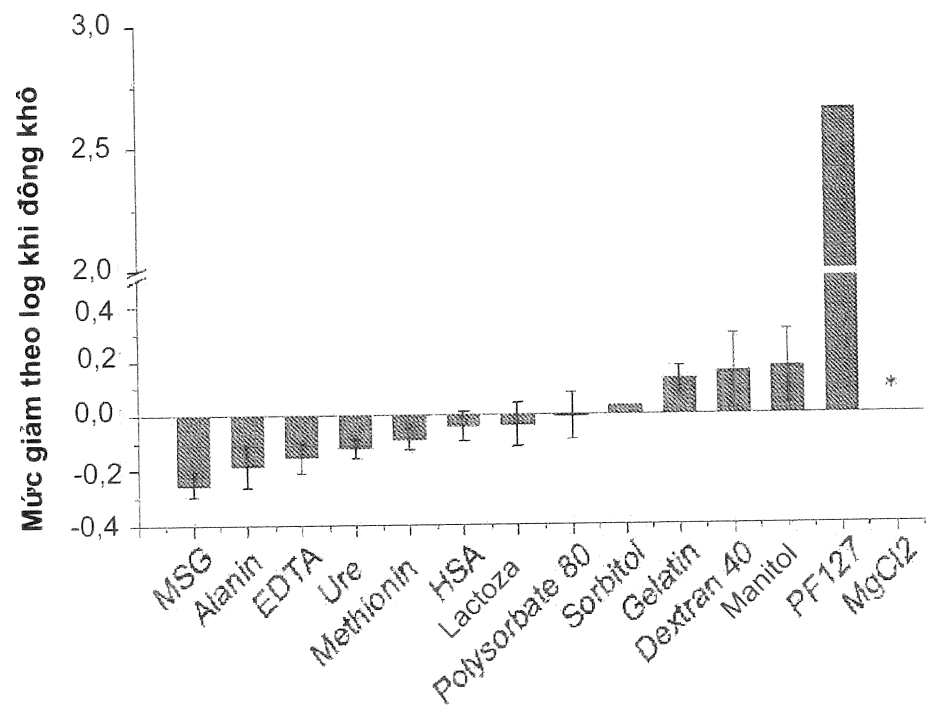
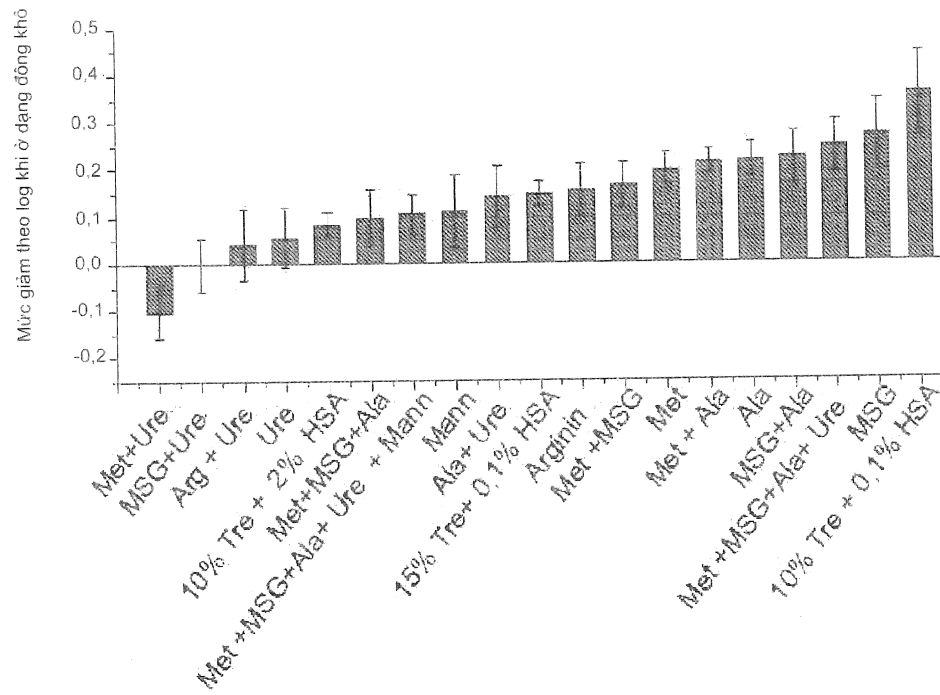


FIG. 8A-8B

10/18

9A



9B

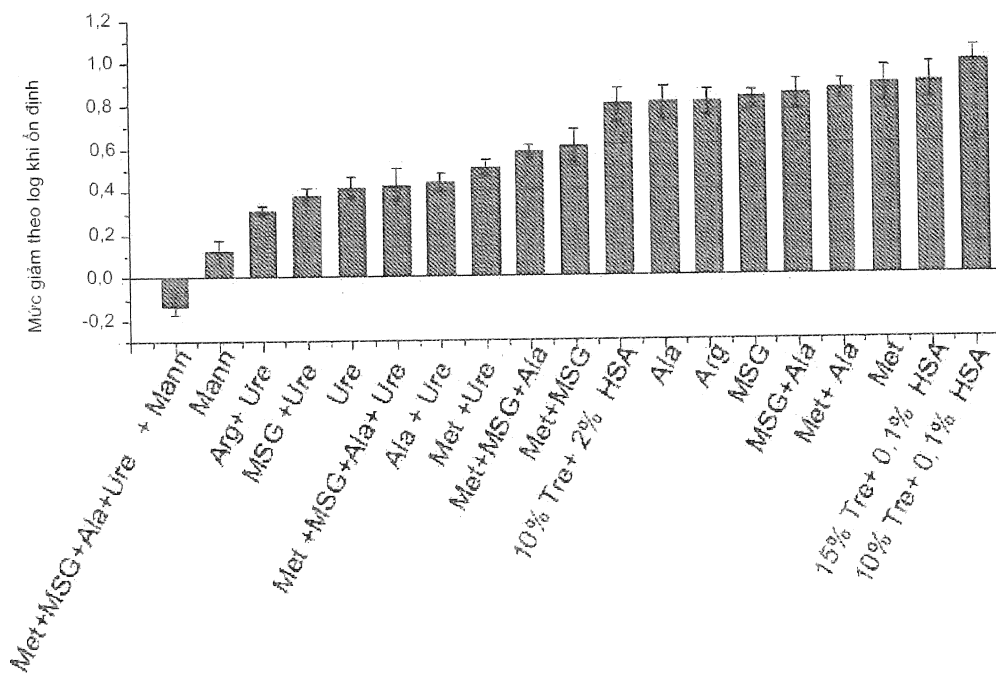
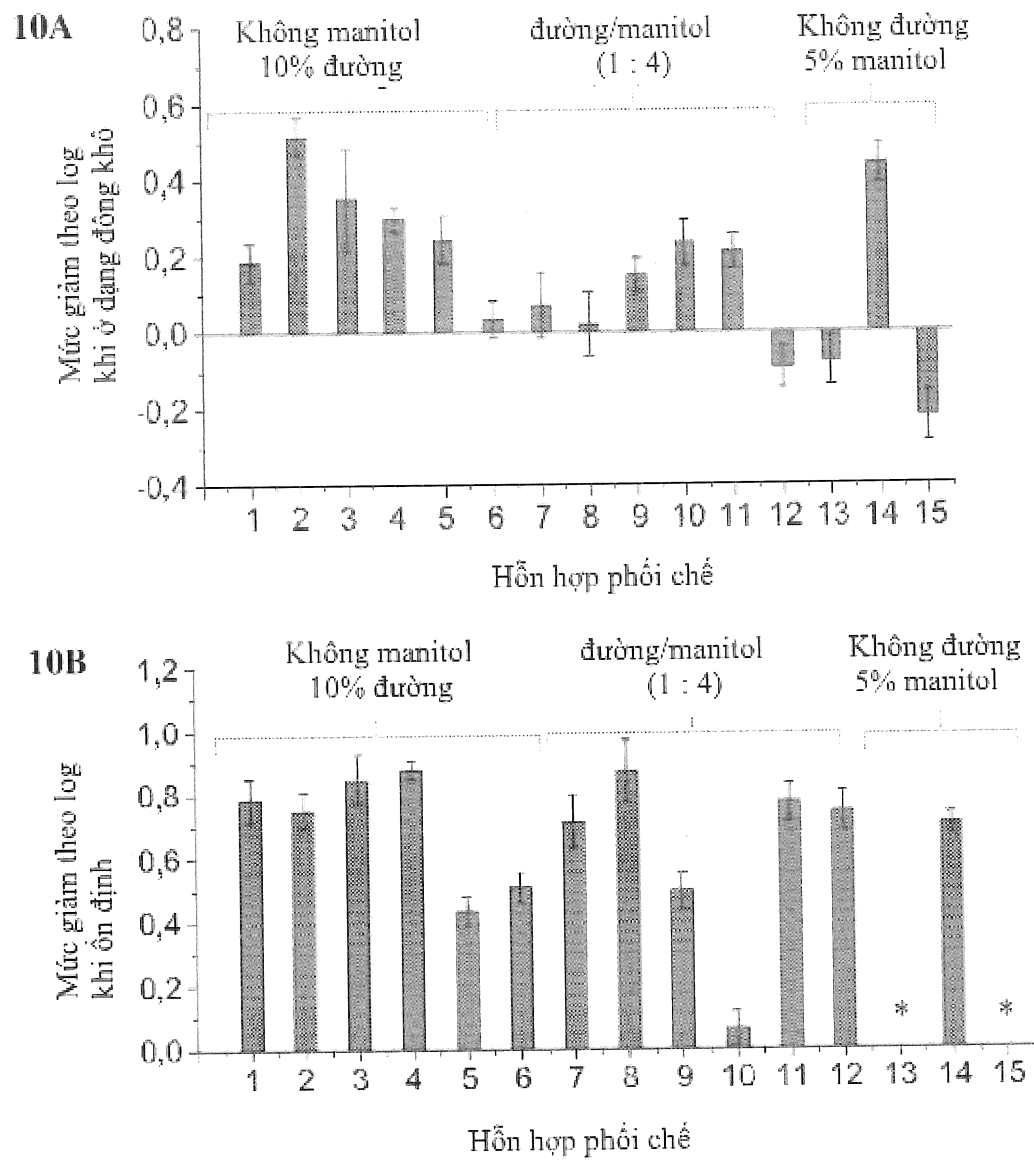


FIG. 9A-9B

11/18



Các FIG. 10A - 10B

12/18

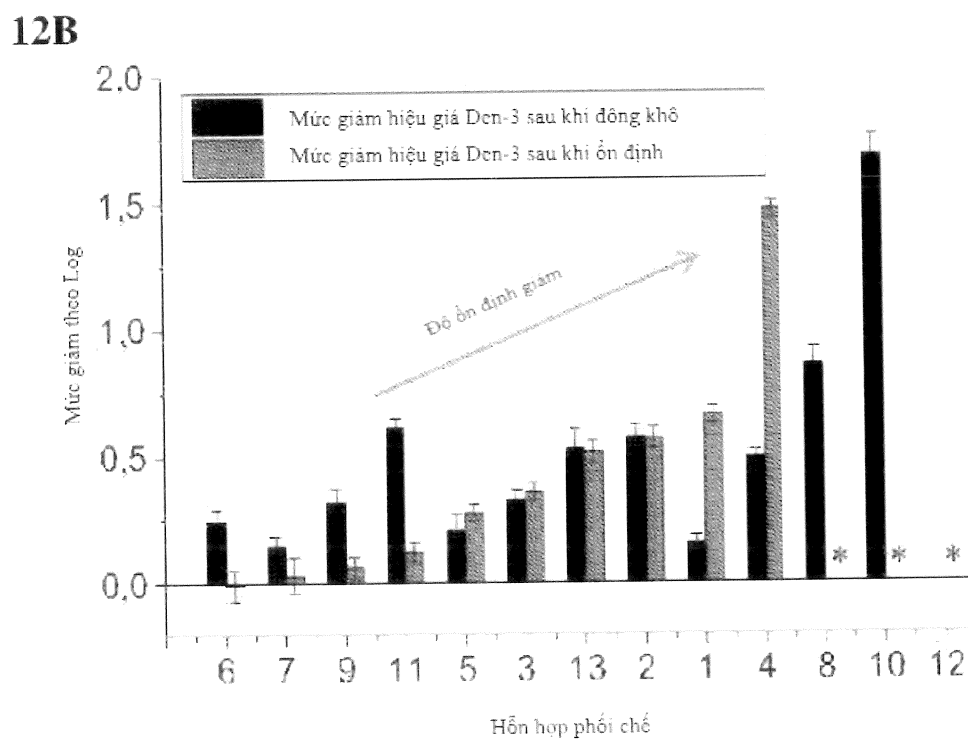
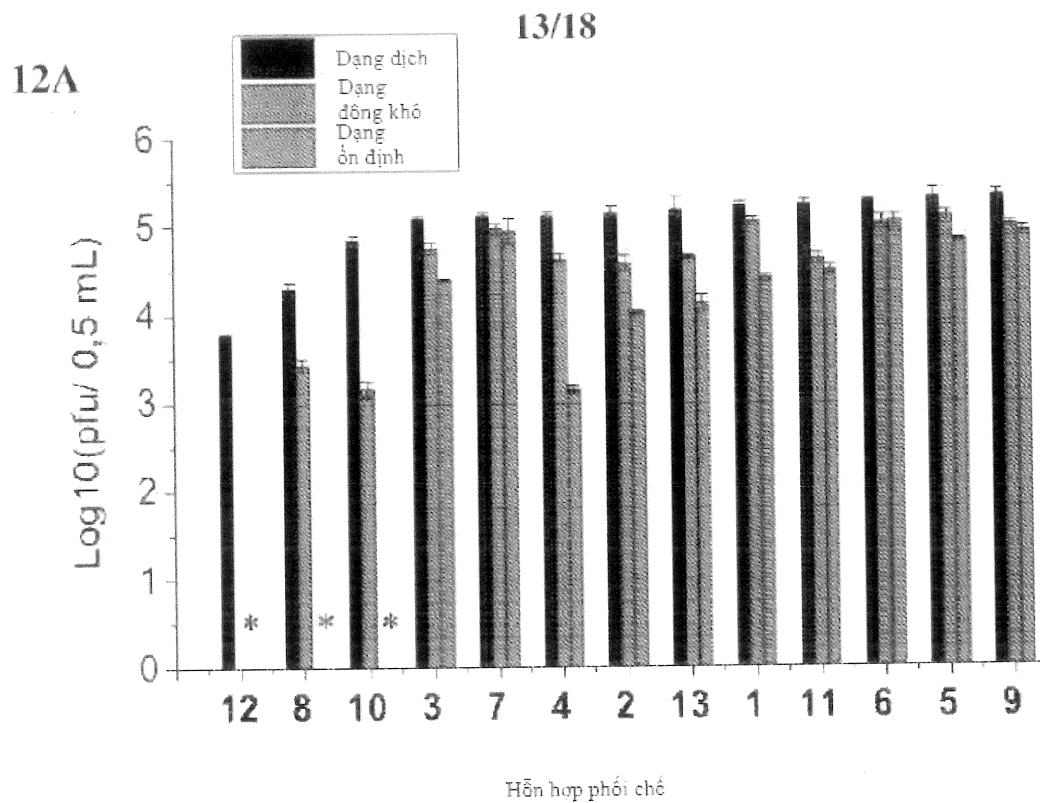
11A

Thuật ngữ	Sai số chuẩn	Tỷ lệ t	Xác suất > t
(HSA (%)-0,18986 * (HSA (%)-0,18986	0,204587	-4,18	0,0001*
HSA (%)	0,342905	4,13	0,0001*
Ure (%)	0,136339	-3,59	0,0007*
Sucroza %	0,008072	-3,47	0,0010*
Manitol %	0,07305	2,86	0,0058*
(Manitol (%)-0,85507)*(Manitol (%)-0,85507)	0,022518	2,80	0,0069*
Trehaloza %	0,00811	-2,56	0,0133*
Met (mM)	0,015594	-1,15	0,2546
Ala (mM)	0,003898	0,48	0,6298
MSG (mM)	0,003854	0,25	0,8004

11B

Thuật ngữ	Sai số chuẩn	Tỷ lệ t	Xác suất > t
Ure (%)	0,165159	-7,21	< 0001*
Manitol (%)	0,01342	-5,49	<0001*
Trehaloza %=-4,81818*(Ure (%)-0,07576	0,06008	-3,92	0,0003*
(Trehaloza %=-4,81818)*(Manitol (%)-0,81818	0,003985	-2,95	0,0047
(Sucroza %=-4,51515)*(Ure (%)-0,07576	0,060134	-2,85	0,0062*
HSA (%)	0,438094	2,23	0,0301
(HSA (%)-0,19848)*(HSA (%)-0,19848	0,263223	-2,13	0,0382*
Sucroza %	0,011029	-1,94	0,0584
(Sucroza %=-4,51515)*(Manitol (%)-0,81818	0,004138	-1,80	0,0780
Ala (mM)	0,004622	-1,05	0,2971
Trehaloza %	0,011031	-1,00	0,3208
Met mM)	0,018489	-0,59	0,5555
MSG (mM)	0,004657	-0,33	0,7418

Các FIG. 11A - 11B



Các FIG. 12A - 12B

14/18

12C

Mô hình giảm dạng đông khô theo Log 10			Tổng độ lấp khí: $R^2=0,79$	
Thuật ngữ	Sai số chuẩn	Tỷ lệ t	Xác suất $> t $	
HSA (%) (0,03)	0,18675	-3,04	0,0189*	
Manitol (%) * Ure	0,218268	2,75	0,0285*	
Manitol (%) * HSA (%)	0,215885	2,62	0,0342*	
Ure (0,025)	0,189131	-2,22	0,0615	
Manitol (%) (1,5)	0,189131	-1,28	0,2428	

Mô hình giảm theo Log 5 tuần ở 25°C

Tổng độ lấp khí $R^2=0,89$

Thuật ngữ	Sai số chuẩn	Tỷ lệ t	Xác suất $> t $	
Trehaloza % (1,10)	0,15198	-4,51	0,0020*	
Trehaloza % HSA (%)	0,167607	4,08	0,0035*	
HSA (%) (0,03)	0,149696	-3,63	0,0067*	
Trehaloza % * Trehaloza %	0,315586	3,31	0,0106*	

Mô hình mức giảm tổng cộng
theo Log

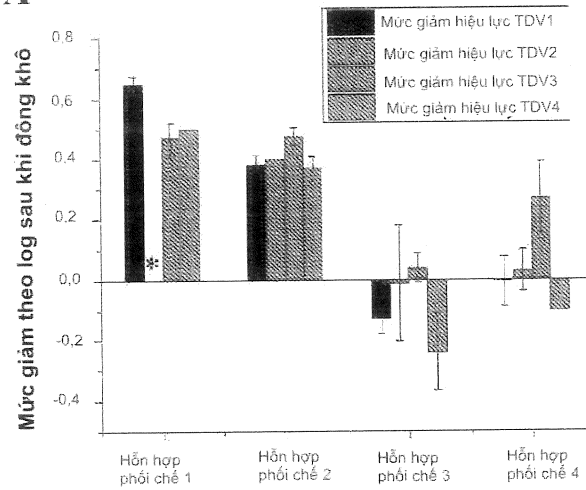
Tổng độ lấp khí $R^2=0,99$

Thuật ngữ	Sai số chuẩn	Tỷ lệ t	Xác suất $> t $	
HSA (%) (0,03)	0,087618	-13,22	<0001*	
Trehaloza % (1,10)	0,087923	-10,21	<0001*	
HSA (%) * HSA (%)	0,210133	6,46	0,0007*	
Trehaloza % * HSA (%)	0,109792	5,88	0,0011*	
Ure (0,025)	0,087923	3,82	0,0067*	
Ure * Ure	0,207974	3,32	0,0160*	

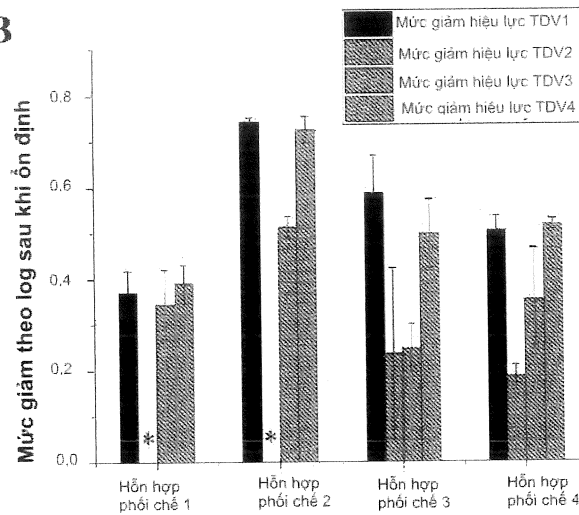
FIG. 12C

13A

15/18



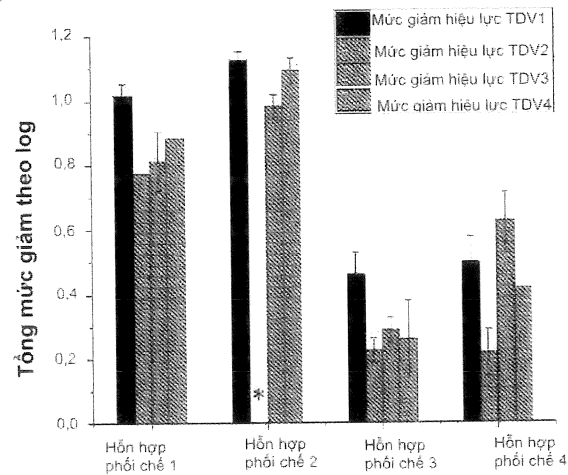
13B



13C

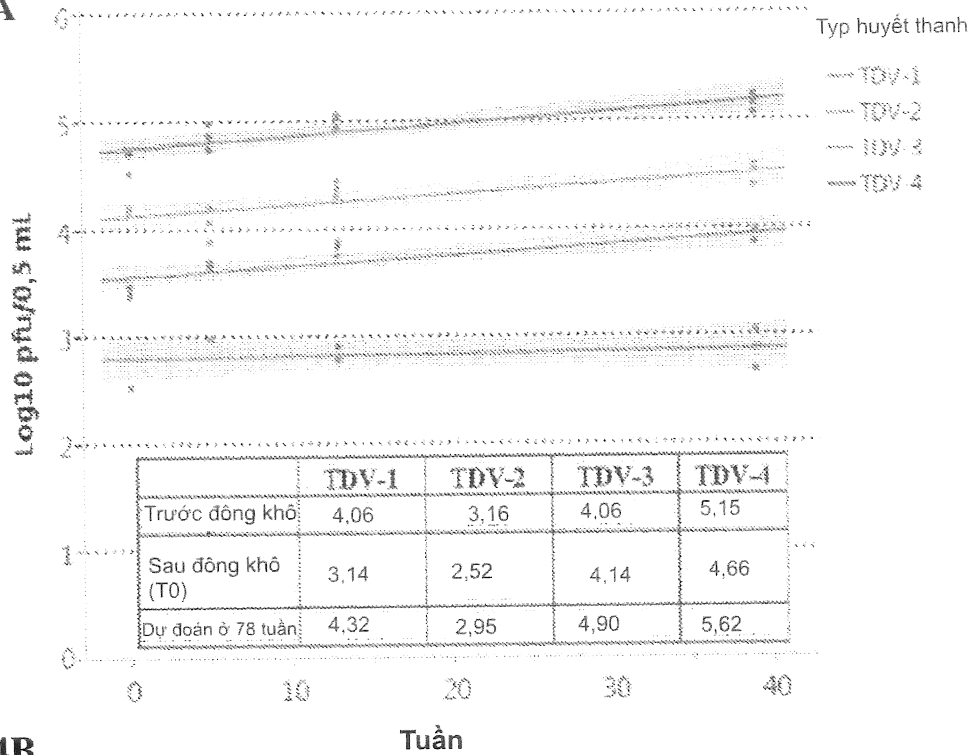
FIG. 13A-13C

(d)



16/18

14A



14B

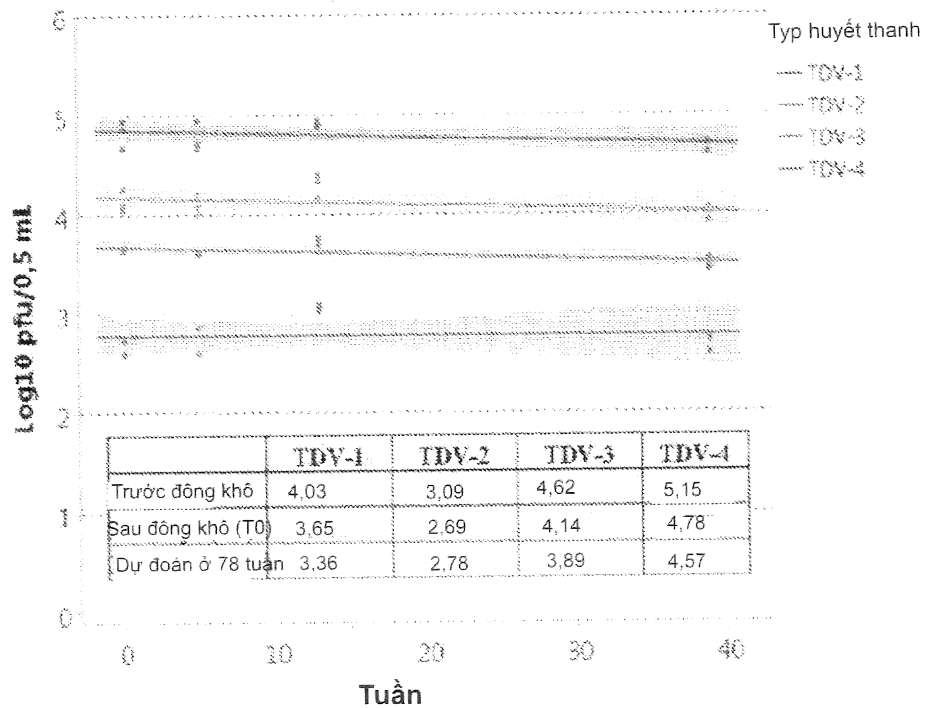
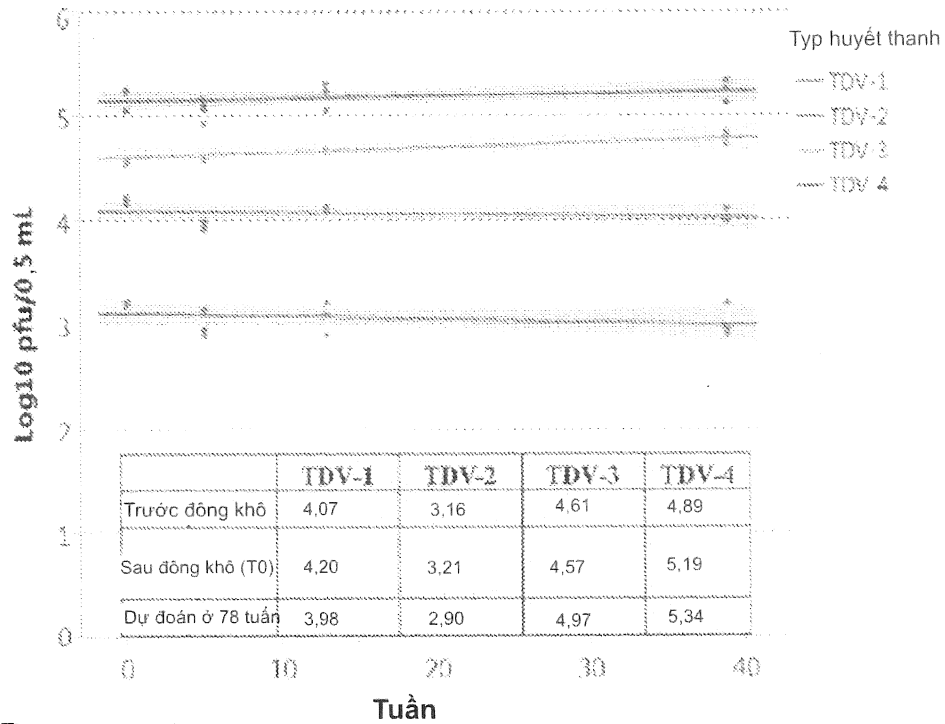


FIG. 14A-14B

17/18

14C



14D

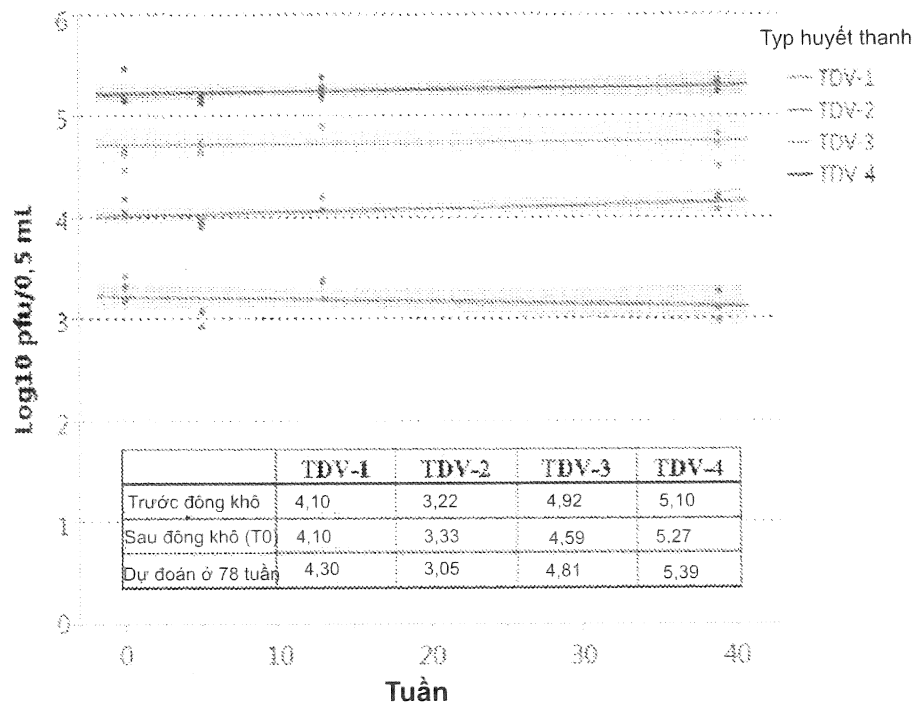
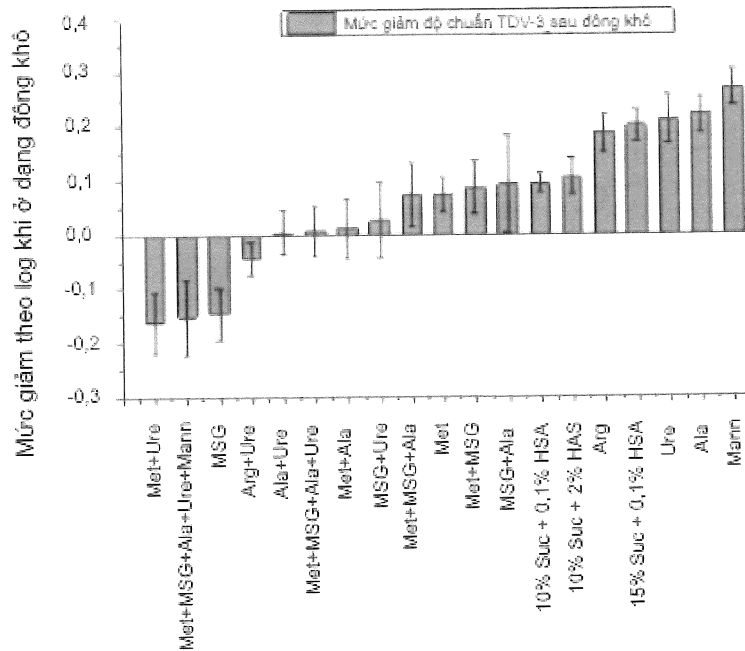


FIG . 14C-14D

18/18

15A



15B

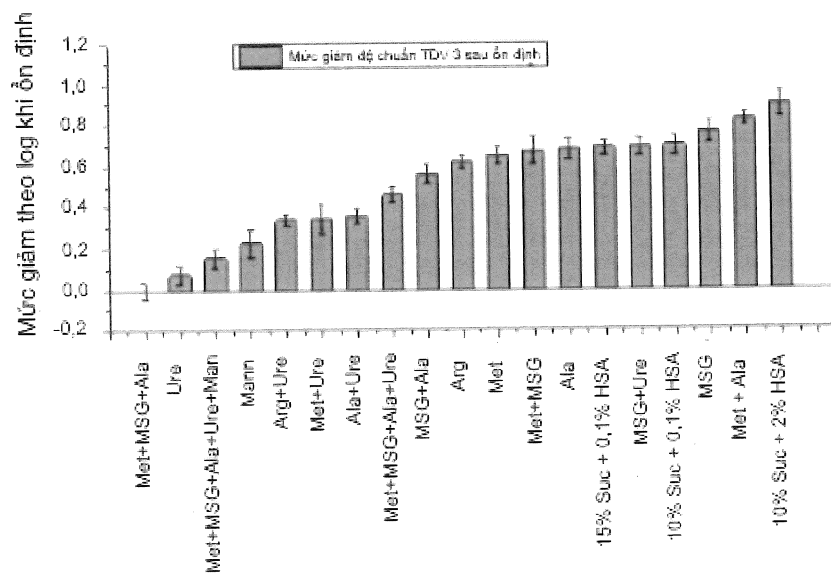


FIG. 15A-15B