



(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) 
1-0020329

(51)⁷ **A61K 39/05, 39/08, 39/10, 39/102**

(13) **B**

(21)	1-2011-01069	(22)	23.10.2009		
(86)	PCT/IN2009/000599	23.10.2009	(87)	WO2010/046934A1	29.04.2010
(30)	2437/Del/2008	24.10.2008	IN		
(45)	25.01.2019	370	(43)	25.06.2012	291
(73)	PANACEA BIOTEC LTD. (IN) B-1 Extn. / A-27, Mohan Co-operative Industrial Estate, Mathura Road, New Delhi - 110 044, India				
(72)	JAIN, Rajesh (IN), SINGH, Sukhjeet (IN), JAMBU, Lavit (IN)				
(74)	Văn phòng Luật sư Tân Hà (VPLS TAN HA)				

(54) **VACXIN KẾT HỢP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp chứa hỗn hợp kháng nguyên để phòng ngừa bệnh thương hàn, uốn ván, ho gà và bại liệt. Vaccin kết hợp theo sáng chế cũng chứa một hoặc nhiều kháng nguyên để phòng ngừa tình trạng lây nhiễm gây ra bởi *Haemophilus influenzae*, virus viêm gan và các tác nhân gây bệnh khác, do đó vaccin này có thể gây miễn dịch đồng thời ở đối tượng chống lại nhiều tác nhân gây bệnh. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa các kháng nguyên nêu trên và phương pháp sản xuất vaccin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp chứa hỗn hợp kháng nguyên để phòng ngừa bệnh thương hàn, uốn ván, ho gà và bại liệt. Vaccin kết hợp theo sáng chế cũng chứa một hoặc nhiều kháng nguyên để phòng ngừa tình trạng lây nhiễm gây ra bởi *Haemophilus influenzae*, virus viêm gan và các tác nhân gây bệnh khác, do đó vaccin này có thể gây miễn dịch đồng thời ở đối tượng chống lại nhiều tác nhân gây bệnh. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa các kháng nguyên nêu trên và phương pháp sản xuất vaccin này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên trong vaccin

Kháng nguyên bạch hầu và uốn ván

Bệnh bạch hầu và bệnh uốn ván là các bệnh nhiễm khuẩn cấp gây ra bởi *Corynebacterium diphtheriae* và *Clostridium tetani*. Độc tố của các vi khuẩn này là nguyên nhân chính gây ra các bệnh tương ứng. Vaccin có khả năng phòng ngừa các vi khuẩn này chứa độc tố đã biến đổi độc tính để làm mất khả năng lây nhiễm của chúng. Các độc tố này được xử lý bằng hóa chất, như formaldehyt hoặc glutaraldehyt để thu được độc tố bạch hầu cải biến (DT) và độc tố uốn ván cải biến (TT). Độc tố bạch hầu đột biến (CRM 197) cũng được sử dụng trong vaccin.

Kháng nguyên ho gà toàn tế bào

Bệnh ho gà gây ra bởi *Bordetella pertussis*. Bệnh này gây ra tình trạng suy nhược nghiêm trọng có thể dẫn đến tử vong. Các vaccin thế hệ đầu để phòng ngừa bệnh này chứa tế bào ho gà toàn phần được xử lý bằng hóa chất, như formaldehyt để tiêu diệt tế bào và bất hoạt độc tố. Các nỗ lực để phát triển vaccin ho gà toàn tế bào bất hoạt được bắt đầu sau khi *B. pertussis* được nuôi cấy tinh khiết vào năm 1906. Vào những năm 1920, Dr. Louis W. Sauer đã phát triển vaccin để phòng ngừa bệnh ho gà. Vào năm 1925, Thorvald Madsen lần đầu tiên thử nghiệm vaccin ho gà toàn tế bào trên quy mô lớn. Vào năm 1942, Pearl Kendrick đã phát triển vaccin kết hợp DTP thế hệ một chứa tế bào ho gà toàn phần, độc tố thương hàn cải biến và độc tố uốn ván cải biến. Vaccin này được gọi là “vaccin ho gà toàn tế bào” có hoạt lực cao.

Vacxin thể hệ sau được gọi là “vacxin thành phần” chứa lượng nhỏ kháng nguyên tinh khiết cao. Nhiều yếu tố độc lực được đề xuất để kết hợp trong “vacxin không tế bào” ít phổ biến hơn vacxin thành phần. Vacxin chỉ chứa PT có hoạt lực bảo vệ một phần, trong khi đó vacxin kết hợp chứa PT và FHA có hoạt lực cao hơn nhưng có hoạt tính gây miễn dịch thấp hơn vacxin chứa wP.

Kháng nguyên bại liệt

Có 2 loại vacxin bại liệt đang lưu hành:

- Vacxin bại liệt sống giảm độc lực (virus được làm yếu, OPV) do Dr. Albert Sabin phát triển vào năm 1961. OPV chứa các chủng Sabin, được dùng qua đường uống.

- Vacxin bại liệt bất hoạt (virus được tiêu diệt, IPV) do Dr. Jonas Salk phát triển vào năm 1955. IPV chứa các chủng Salk, được dùng qua đường tiêm.

Cả vacxin bại liệt sống giảm độc lực (OPV) lẫn vacxin bại liệt bất hoạt (IPV) đều kiểm soát hữu hiệu bệnh bại liệt trên toàn thế giới. Vacxin bại liệt có thể chứa chủng Salk hoặc chủng Sabin. Các chủng Salk bao gồm Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 đã được sử dụng trong vacxin bại liệt. Các chủng Sabin bao gồm chủng Sabin typ 1 và Sabin typ 2.

Kháng nguyên *Haemophilus influenzae* (Hib)

Haemophilus influenzae là cầu khuẩn gram âm thường xuất hiện trong hệ vi sinh vật ở đường hô hấp trên. *Haemophilus influenzae* typ b (Hib b) là nguyên nhân chính gây nhiễm trùng máu và bệnh viêm màng não ở trẻ em và gây bệnh viêm màng não ở trẻ dưới 2 tuổi. *Haemophilus influenzae* bắt đầu được phòng ngừa bằng vacxin polysacarit (polyriboza ribitol phosphat) ở Canada vào năm 1987. Yếu tố độc lực chính của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* là polyribosylribitol phosphat vỏ (PRP). Kháng thể kháng PRP là yếu tố chính tạo ra hoạt tính diệt khuẩn cho huyết thanh và nồng độ kháng thể càng tăng thì nguy cơ bệnh xâm nhiễm càng giảm. PRP là kháng nguyên không phụ thuộc tế bào T, do đó đặc trưng bởi a) gây đáp ứng kháng thể yếu ở trẻ sơ sinh và trẻ dưới 18 tháng tuổi, b) đáp ứng kháng thể thay đổi và yếu hơn đáp ứng kháng thể gây ra bởi kháng nguyên phụ thuộc tế bào T, c) sản sinh globulin miễn dịch M (IgM) với tỷ lệ cao hơn, và d) không gây ra đáp ứng miễn dịch tăng cường.

Vaccin thể hệ đầu chỉ chứa PRP được chứng minh là không có hiệu lực đối với trẻ sơ sinh. Sau đó, vaccin tiếp hợp PRP đã được nỗ lực phát triển, trong đó PRP được tiếp hợp với chất mang protein, như protein ngoài màng của *Neisseria meningitides*, độc tố bạch hầu cải biến, độc tố uốn ván cải biến và độc tố bạch cầu đột biến CRM 197.

Kháng nguyên virus viêm gan (Hep)

Có nhiều chủng virus viêm gan. Bệnh viêm gan B gây ra bởi virus viêm gan B (HBV) lây nhiễm ở gan của động vật họ Người (*Hominoidae*), bao gồm người và gây ra tình trạng viêm gan. Tình trạng viêm gan có thể thay đổi từ thể nhẹ kéo dài vài tuần (cấp tính) sang thể nặng kéo dài (mãn tính) có thể dẫn đến bệnh gan hoặc bệnh ung thư gan. Vaccin phòng ngừa bệnh viêm gan virus chứa một trong số các protein vỏ virus, kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg). Vaccin chứa kháng nguyên Hep B, bao gồm Recombivax HB® và Comvax® do Merck sản xuất, Engerix-B® và Pediarix® do GlaxoSmithKline Biologicals sản xuất đã được FDA chấp thuận.

Kháng nguyên khác

Các kháng nguyên khác được quan tâm bao gồm *Haemophilus influenzae* (typ huyết thanh a, c, d, e, f và các chủng không vỏ), virus viêm gan (các chủng A, C, D, E, F và G), vi khuẩn viêm màng não A, B hoặc C, virus cúm, khuẩn cầu phổi, liên cầu khuẩn, vi khuẩn bệnh than, virus sốt xuất huyết, ký sinh trùng sốt rét, virus sởi, virus quai bị, virus rubella, kháng nguyên phòng lao (BCG), virus viêm não Nhật Bản, virus rota, virus đậu mùa, virus sốt vàng, vi khuẩn thương hàn, virus giời leo, virus thủy đậu và các kháng nguyên khác.

Vaccin kết hợp

Mặc dù vaccin đã được nghiên cứu trong hàng thập kỷ, nhưng các bệnh lây nhiễm vẫn là mối đe dọa đối với loài người. Cần có các vaccin phòng ngừa đồng thời nhiều bệnh để giảm liều, giảm chi phí quản lý và sản xuất và tăng độ tuân thủ của đối tượng bị bệnh. Các vaccin kết hợp này thường được chấp nhận hơn.

Tuy nhiên, có nhiều báo cáo cho thấy hiện tượng cạnh tranh kháng nguyên đã gây khó khăn và trở ngại cho sự phát triển của vaccin chứa nhiều thành phần. Hiện tượng này xuất hiện khi sử dụng nhiều kháng nguyên với nhau thường dẫn đến đáp

ứng miễn dịch với một số kháng nguyên thấp hơn đáp ứng miễn dịch với các kháng nguyên này khi được sử dụng riêng.

Các nghiên cứu trước đây đã tập trung phát triển vaccin chứa nhiều thành phần phòng ngừa các bệnh và tình trạng lây nhiễm khác nhau. Ví dụ về vaccin này bao gồm vaccin kết hợp DTwP chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T) và kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP).

Cần bổ sung các kháng nguyên khác vào vaccin kết hợp nêu trên để phòng ngừa các bệnh gây ra bởi virus viêm gan (Hep), *Haemophilus influenzae* (Hib) và virus bại liệt (IPV). Cũng cần bổ sung các kháng nguyên phòng ngừa các bệnh khác vào vaccin kết hợp nêu trên.

Quintanrix do GlaxoSmithKline Biologicals sản xuất là vaccin kết hợp chứa kháng nguyên DTwP, kháng nguyên Hib, kháng nguyên Hep B và chất bảo quản là thiomersal. Vaccin này bị thu hồi trước khi đưa ra thị trường. ZilbrixTM do GlaxoSmithKline Biologicals sản xuất chứa kháng nguyên DTwP và kháng nguyên Hep B. Zilbrix HibTM do GlaxoSmithKline Biologicals sản xuất chứa kháng nguyên DTwP, kháng nguyên Hep B và kháng nguyên Hib, trong đó Hib được bảo chế trong lọ riêng, không chứa các thành phần kháng nguyên khác.

WO2002005846 (Green Cross Vaccine) đề xuất vaccin kết hợp chứa bốn thành phần bao gồm độc tố bạch hầu cải biến, độc tố uốn ván cải biến, kháng nguyên ho gà toàn tế bào và kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B. WO2002005846 cũng đề cập đến vaccin kết hợp chứa Hep B với DTwP nhưng không có hoạt lực khi kết hợp với các kháng nguyên khác, như Hib hay IPV.

WO2008028957 (GlaxoSmithKline Biologicals) đề cập đến phương pháp sản xuất vaccin chứa IPV liều thấp. Tuy nhiên, WO2008028957 không đề cập đến phương pháp sản xuất vaccin dạng lỏng hoàn toàn chứa kháng nguyên D, kháng nguyên T, kháng nguyên wP, kháng nguyên IPV, kháng nguyên Hib và kháng nguyên Hep trong cùng một lọ duy nhất, trong đó Hib không được hấp thụ đáng kể vào chất bổ trợ bất kỳ.

US 6013264 A của SmithKline Beecham Biologicals đề cập đến vaccin kết hợp chứa HbsAg. US 6013264 A đề cập đến vaccin kết hợp trong đó HbsAg được hấp thụ

vào nhôm phosphat. Tuy nhiên, US 6013264 A không đề cập đến vaccin kết hợp chứa DTwP-IPV và các kháng nguyên khác, như Hib và Hep, ở dạng lỏng.

WO1998000167A1 (Connaught Lab) đề xuất chế phẩm miễn dịch chứa nhiều thành phần để phòng ngừa các bệnh gây ra bởi *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus bại liệt và/hoặc *Haemophilus influenzae*. Thành phần Hib b của vaccin theo WO1998000167A1 là thành phần đông khô cần được hoàn nguyên trước khi trộn với thành phần khác của vaccin. Do đó, WO1998000167A1 không đề cập đến vaccin kết hợp ở dạng lỏng hoàn toàn chứa các thành phần kháng nguyên nêu trên.

Phương pháp đông khô (cũng được gọi là phương pháp sấy lạnh đông) là phương pháp đòi hỏi chi phí cao và cũng gây rất nhiều bất lợi cho protein. Khi thành phần bất kỳ của vaccin được đông khô, thì cần trộn thành phần đông khô này với chất lỏng khác hoặc thành phần dạng lỏng khác của vaccin kết hợp, khi sử dụng. Điều này làm tăng áp lực cho nhân viên pha chế và cũng gây rủi ro do quá trình pha chế thực hiện không tốt. Do đó, bơm tiêm nhiều ngăn được đề xuất, trong đó một ngăn chứa thành phần đông khô và ngăn còn lại chứa thành phần dạng lỏng. Tuy nhiên, toàn bộ các thành phần trong bơm tiêm vẫn phải được trộn với nhau khi sử dụng, do đó không làm giảm chi phí sản xuất cũng như vẫn làm tăng áp lực cho nhân viên pha chế.

Do đó, cần tránh bước đông khô và tạo ra vaccin kết hợp chứa toàn bộ các thành phần với nhau ở dạng lỏng hoàn toàn. Điều này sẽ tạo thuận lợi cho việc sử dụng vaccin, tăng độ tuân thủ của đối tượng bị bệnh và giảm chi phí sản xuất. Do đó, cần bổ sung kháng nguyên Hib vào thành phần dạng lỏng của vaccin để thu được vaccin chứa nhiều thành phần ở dạng lỏng hoàn toàn.

WO2004110480 (Glaxo SmithKline Biologicals) đề cập đến vaccin chứa polysacarit của Hib b. WO2004110480 bộc lộ rằng khó trộn đơn giản các thành phần của vaccin kết hợp do không phải toàn bộ các kháng nguyên đều có thể trộn với nhau một cách hữu hiệu. WO2004110480 cũng bộc lộ rằng nhôm hydroxit trong vaccin DTP và PRP có ảnh hưởng lẫn nhau. Mục đích của WO2004110480 là làm giảm sự ảnh hưởng này trong vaccin kết hợp được bào chế tại chỗ trong đó PRP được hấp thụ trước vào nhôm phosphat. WO2004110480 cũng đề cập đến chế phẩm miễn dịch, vaccin và vaccin kết hợp chứa PRP đã được bảo vệ một phần khỏi sự ảnh hưởng miễn

dịch này. Các tác giả sáng chế của WO2004110480 đã phát hiện thấy rằng mục đích nêu trên có thể đạt được bằng cách kết hợp tá dược polyme dạng đa anion với vaccin chứa PRP.

Tuy nhiên, việc sử dụng polyme dạng đa anion trong chế phẩm vaccin có thể không được mong muốn do làm tăng chi phí sản xuất. Ngoài ra, do sử dụng cho người, nên vaccin chứa càng ít thành phần càng tốt. Việc sử dụng các thành phần bổ sung có nghĩa là bổ sung các chất có thể phản ứng với cơ thể và tạo ra kháng thể. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể với các chất này không được mong muốn.

US 6333036 B1 của Pasteur Merieux Serums đề cập đến chế phẩm vaccin chứa polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae* typ b hoặc polyribosylribitol phosphat có khối lượng phân tử lớn (PRP) được ghép cặp với giải độc tố uốn ván, cũng như với chất bổ trợ chứa nhôm. Các chất bổ trợ chứa nhôm sử dụng trong US 6333036 B1 có điểm đẳng điện nhỏ hơn khoảng 7,2. Tuy nhiên, US 6333036 B1 không đề cập đến vaccin kết hợp chứa DTwP-IPV cùng với các kháng nguyên khác, như Hib và Hep, ở dạng lỏng hoàn toàn.

Mặc dù, nghiên cứu này đang sản xuất vaccin chứa nhiều thành phần kháng nguyên để phòng ngừa một số bệnh, nhưng theo nghiên cứu này không cần sản xuất vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa kháng nguyên DTwP và kháng nguyên IPV cùng với các kháng nguyên khác, như Hib và Hep. Có các báo cáo trái ngược về đáp ứng kháng thể kháng kháng nguyên cụ thể ở trẻ em được gây miễn dịch bằng cách sử dụng riêng hoặc đồng thời vaccin kết hợp này và vaccin Hib. Có nhiều nguyên nhân dẫn đến các kết quả này bao gồm vaccin không đồng nhất về thành phần kháng nguyên, phương pháp giải độc, chất bổ trợ hoặc chất bảo quản được sử dụng.

Các vaccin kết hợp đã biết hiện nay có thể không có công thức bào chế thích hợp chứa các kháng nguyên thích hợp ở dạng chế phẩm miễn dịch thích hợp để thu được hoạt lực và khả năng gây miễn dịch mong muốn trên người, để phòng ngừa một số bệnh trong cùng liều vaccin. Cần có vaccin chứa nhiều thành phần ở dạng lỏng để phòng ngừa các bệnh lây nhiễm khác nhau, dễ sử dụng và có chi phí thích hợp. Cần có vaccin chứa nhiều thành phần có độ ổn định và hiệu lực cao để phòng ngừa các bệnh gây ra bởi *Corynebacterium diphtheria*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, virus bại liệt, virus viêm gan và *Haemophilus influenzae*. Để vaccin này có hiệu lực, cần

đảm bảo tiêu chuẩn bảo vệ huyết thanh đối với mỗi kháng nguyên trong vaccin. Do đó, cần khắc phục trở ngại và thách thức gây ra bởi sự cạnh tranh và ảnh hưởng lẫn nhau của các kháng nguyên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục hạn chế của vaccin đã biết, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp ở dạng lỏng hoàn toàn để phòng ngừa nhiều bệnh khác nhau.

Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP), kháng nguyên IPV và tùy ý một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên *Haemophilus influenzae* (Hib) và kháng nguyên virus viêm gan (Hep), do đó vaccin này có thể gây miễn dịch đồng thời ở đối tượng chống lại nhiều tác nhân gây bệnh. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa các kháng nguyên nêu trên và phương pháp sản xuất vaccin này.

Sáng chế cũng đề cập đến vaccin kết hợp chứa nhiều thành phần kháng nguyên thích hợp để phòng ngừa, cải thiện và điều trị các giai đoạn bệnh khác nhau đáp ứng tiêu chuẩn bảo vệ huyết thanh đối với mỗi thành phần kháng nguyên nêu trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa nhiều thành phần kháng nguyên thích hợp để phòng ngừa, cải thiện và điều trị các giai đoạn bệnh khác nhau đáp ứng tiêu chuẩn bảo vệ huyết thanh đối với mỗi thành phần kháng nguyên nêu trên.

Ưu điểm của vaccin chứa nhiều thành phần kháng nguyên theo sáng chế là có thể bảo vệ chống lại nhiều bệnh và tình trạng lây nhiễm an toàn và hiệu quả. Vaccin kết hợp theo sáng chế có hoạt tính gây miễn dịch chống lại các bệnh và tình trạng lây nhiễm khác nhau và không ảnh hưởng đến kháng nguyên bất kỳ có trong vaccin. Do đó, liều đơn cũng có thể tạo ra hoạt tính gây miễn dịch chống lại các bệnh và tình trạng lây nhiễm khác nhau, làm tăng độ tuân thủ của đối tượng bị bệnh. Do liều đơn cũng có thể tạo ra hoạt tính gây miễn dịch chống lại nhiều bệnh và tình trạng lây nhiễm khác nhau nên chi phí sản xuất vaccin cũng giảm. Một ưu điểm khác của vaccin kết hợp theo sáng chế là số lần tiêm chủng và liều tiêm cũng giảm trong khi vẫn phòng ngừa

được nhiều bệnh và tình trạng lây nhiễm khác nhau. Theo khía cạnh này, vacxin kết hợp theo sáng chế hữu dụng và đặc biệt có lợi hơn đối với trẻ em là những đối tượng cần được tiêm chủng để thu được hoạt tính gây miễn dịch chống lại nhiều bệnh và tình trạng lây nhiễm. Do đó, sáng chế đề xuất vacxin hữu dụng hơn.

Thuật ngữ

Thuật ngữ “dạng lỏng hoàn toàn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trạng thái của vacxin kết hợp theo sáng chế, trong đó toàn bộ các thành phần của vacxin đều ở dạng lỏng và không thành phần nào của vacxin ở dạng đông khô hoặc dạng bất kỳ khác cần được trộn với các thành phần khác của vacxin trước khi sử dụng cho đối tượng.

Thuật ngữ “chất mang protein” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần protein được tiếp hợp với polysacarit vỏ (Hib) trong vacxin để biến đổi polysacarit không phụ thuộc tế bào T thành kháng nguyên phụ thuộc tế bào T.

Thuật ngữ “chất bổ trợ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần không có tính kháng nguyên trong vacxin để tăng cường đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên trong vacxin và tạo thuận lợi cho kháng nguyên tiếp xúc với hệ miễn dịch bằng cách tác động đến loại và mức độ của đáp ứng miễn dịch sinh ra để chống lại kháng nguyên này. Chất bổ trợ giúp kéo dài đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên và làm giảm độc tố của một số kháng nguyên hoặc làm tăng độ hòa tan cho một số kháng nguyên.

Thuật ngữ “ổn định” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vacxin kết hợp theo sáng chế, trong đó mỗi kháng nguyên trong vacxin này có hoạt lực/hoạt tính gây miễn dịch cao hơn giới hạn chấp nhận, sau khi bảo quản ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong ít nhất 1 tháng, tốt hơn nếu 12 tháng và tốt nhất nếu 24 tháng.

Thuật ngữ “đáng kể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ hấp thụ hoặc ghép cặp của Hib vào chất bổ trợ, trong đó thuật ngữ “Hib không được hấp thụ đáng kể vào chất bổ trợ bất kỳ” có nghĩa là mức độ hấp thụ của Hib vào chất bổ trợ nhỏ hơn 15%, và tốt hơn nếu nhỏ hơn 10%. Kháng nguyên Hib không được hấp thụ có chủ đích vào chất bổ trợ bất kỳ; mức độ hấp thụ có thể xảy ra do kháng nguyên vô tình tiếp xúc với chất bổ trợ.

Thuật ngữ “trong khoảng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng của mỗi thành phần trong vaccin, có nghĩa là tốt hơn nếu vaccin chứa thành phần này với lượng $\pm 20\%$, tốt hơn nữa nếu $\pm 10\%$ và tốt nhất nếu $\pm 5\%$ lượng xác định của thành phần này.

Thuật ngữ “khoảng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thời gian khuấy các thành phần trong hỗn hợp trong phương pháp sản xuất vaccin kết hợp theo sáng chế, tốt hơn nếu $\pm 20\%$, tốt hơn nữa nếu $\pm 10\%$ và tốt nhất nếu $\pm 5\%$ trị số xác định.

Thuật ngữ “hoạt tính gây miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vaccin kết hợp theo sáng chế khi sử dụng cho đối tượng, vaccin này có khả năng sản sinh kháng thể kháng mỗi kháng nguyên trong vaccin kết hợp để phòng ngừa các bệnh hoặc tình trạng lây nhiễm tương ứng.

Liên quan đến kháng nguyên trong vaccin kết hợp, thuật ngữ “ghép cặp hoặc hấp thụ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng liên kết vật lý bất kỳ giữa kháng nguyên và chất bổ trợ.

Vaccin kết hợp theo sáng chế

Sáng chế đề xuất vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP), kháng nguyên virus bại liệt (IPV) và tùy ý một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên *Haemophilus influenzae* (Hib) và kháng nguyên virus viêm gan (Hep).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp chứa toàn bộ các thành phần kháng nguyên ở dạng lỏng trong một lọ duy nhất.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa năm thành phần bao gồm kháng nguyên D, kháng nguyên T, kháng nguyên wP, kháng nguyên Hib và kháng nguyên IPV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn chứa sáu thành phần bao gồm kháng nguyên D, kháng nguyên T, kháng nguyên wP, kháng nguyên Hib, kháng nguyên Hep và kháng nguyên IPV.

Theo một phương án, kháng nguyên bạch hầu (D) và kháng nguyên uốn ván (T) theo sáng chế được hấp thụ vào nhôm phosphat.

Theo một khía cạnh khác, chủng IPV theo sáng chế là một hoặc nhiều chủng Salk được chọn từ nhóm bao gồm Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 hoặc một hoặc nhiều chủng Sabin được chọn từ nhóm bao gồm Sabin typ 1 hoặc Sabin typ 2.

Theo một khía cạnh khác, kháng nguyên Hib theo sáng chế được tiếp hợp với chất mang protein được chọn từ nhóm bao gồm độc tố uốn ván cải biến (TT), độc tố bạch hầu cải biến (DT), độc tố bạch hầu đột biến (CRM 197) và protein ngoài màng của *Neisseria meningitides* hoặc biến thể tương đương bất kỳ của chúng hoặc chất mang bất kỳ đã biết khác.

Theo một khía cạnh khác, kháng nguyên Hib theo sáng chế không được hấp thụ đáng kể vào chất bổ trợ bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, kháng nguyên Hib trong vaccin kết hợp theo sáng chế có nguồn gốc từ polysaccharit vỏ của chủng Hib b.

Theo một khía cạnh, kháng nguyên Hep theo sáng chế được hấp thụ vào nhôm phosphat.

Theo một khía cạnh khác, kháng nguyên Hep theo sáng chế có nguồn gốc từ kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg), tức là kháng nguyên bề mặt của chủng Hep B.

Theo một khía cạnh khác, vaccin kết hợp theo sáng chế chứa chất bảo quản là 2-phenoxyetanol trong công thức bào chế.

Theo một khía cạnh khác, vaccin kết hợp theo sáng chế chứa năm thành phần bao gồm kháng nguyên D, kháng nguyên T, kháng nguyên wP, kháng nguyên Hib b, kháng nguyên Hep B và chất bảo quản là 2-phenoxyetanol trong công thức bào chế, với điều kiện là vaccin này không chứa kháng nguyên IPV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vaccin kết hợp nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vaccin kết hợp theo sáng chế sao cho vaccin này chứa mỗi kháng nguyên ở lượng đủ để thu được đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại kháng nguyên này.

Kháng nguyên trong vaccin kết hợp theo sáng chế

Bệnh bạch hầu gây ra bởi *Corynebacterium diphtheriae* (vi khuẩn gram dương hiếu khí không tạo bào tử). Vi khuẩn này biểu hiện ngoại độc tố ribosyl hóa ADP mã hóa bởi vật liệu di truyền của thực khuẩn thể (“độc tố bạch hầu”), ngoại độc tố này có thể được xử lý (ví dụ bằng formaldehyt) để thu được độc tố cải biến. Độc tố cải biến này không có độc tính nhưng vẫn có tính kháng nguyên và có thể kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu kháng độc tố sau khi tiêm. Tốt hơn nếu chế phẩm chứa kháng nguyên bạch hầu sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế chứa độc tố bạch hầu cải biến.

Bệnh uốn ván gây ra bởi *Clostridium tetani* (vi khuẩn hình que gram dương tạo bào tử). Vi khuẩn này biểu hiện endopeptidaza (“độc tố uốn ván”), độc tố này có thể được xử lý để thu được độc tố cải biến không có độc tính nhưng vẫn có tính kháng nguyên và có thể kích thích sản xuất kháng thể đặc hiệu kháng độc tố sau khi tiêm. Tốt hơn nếu chế phẩm chứa kháng nguyên uốn ván sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế chứa độc tố uốn ván cải biến.

Bệnh ho gà gây ra bởi *Bordetella pertussis*. Kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) theo sáng chế có thể được điều chế từ chủng *Bordetella pertussis* có khả năng lây nhiễm. Kháng nguyên wP theo sáng chế có thể được bất hoạt bằng nhiều phương pháp, như sử dụng hóa chất. Tuy nhiên, tốt hơn nếu *B. pertussis* (wP) bất hoạt sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế được bất hoạt ở nhiệt độ $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút. Tốt hơn nếu chế phẩm chứa kháng nguyên wP sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế được điều chế từ chủng *Bordetella pertussis* 134, chủng *Bordetella pertussis* 509 và chủng *Bordetella pertussis* 10536. Tốt hơn nếu chế phẩm nuôi cấy riêng biệt chứa chủng *Bordetella pertussis* 10536, chủng *Bordetella pertussis* 509 và chủng *Bordetella pertussis* 134 được trộn ở tỷ lệ bằng 1:1:1 dựa vào độ đục của chúng.

Haemophilus influenzae là cầu khuẩn gram âm gây nhiễm trùng máu và bệnh viêm màng não. Theo một phương án, kháng nguyên Hib theo sáng chế có nguồn gốc từ polysaccharit vỏ của chủng *Haemophilus influenzae*, có thể được tiếp hợp hoặc ghép cặp với chất mang protein. Các chất mang protein được sử dụng để tiếp hợp kháng nguyên Hib có thể được chọn từ nhóm bao gồm độc tố uốn ván cải biến (TT), độc tố bạch hầu cải biến (DT), độc tố bạch hầu đột biến (CRM 197) và protein ngoài màng của *Neisseria meningitidis* hoặc biến thể tương đương bất kỳ của chúng. Các chất mang protein thích hợp khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit tổng hợp,

protein sốc nhiệt, protein ho gà, xytokin, lymphokin, hormon, yếu tố sinh trưởng, protein nhân tạo chứa nhiều epitop tế bào T biểu hiện CD4 của người từ các kháng nguyên có nguồn gốc từ các tác nhân gây bệnh khác nhau, như protein N19, protein D có nguồn gốc từ *H.influenzae*, protein bề mặt phế cầu khuẩn PspA, pneumolysin, protein hấp thu sắt, độc tố A hoặc độc tố B có nguồn gốc từ *C.difficile* và protein *S.agalactiae*. Tốt hơn nếu chế phẩm chứa kháng nguyên Hib sử dụng trong vacxin kết hợp theo sáng chế chứa kháng nguyên Hib được tiếp hợp hoặc ghép cặp với độc tố uốn ván cải biến.

Thể tiếp hợp polysacarit có thể được điều chế bằng phương pháp ghép cặp bất kỳ đã biết. Ví dụ, polysacarit có thể được ghép cặp thông qua liên kết thioete. Phương pháp tiếp hợp này được thực hiện bằng cách hoạt hóa polysacarit với 1-xyano-4-đimetylamino pyridin tetraflororat để thu được este xyanat. Sau đó, polysacarit đã được hoạt hóa có thể được ghép cặp trực tiếp hoặc thông qua nhóm đệm với nhóm amin trên chất mang protein. Thể tiếp hợp này cũng có thể được điều chế bằng phương pháp khử amin hóa trực tiếp. Theo phương pháp khác, polysacarit được hoạt hóa bằng xyano bromua (CNBr) được tạo dẫn xuất với axit adipic hydrazit được ghép cặp với chất mang protein bằng phản ứng ngưng tụ carbodiimit. Thể tiếp hợp polysacarit sử dụng trong vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết.

Theo một phương án, kháng nguyên Hib theo sáng chế không được hấp thụ đáng kể vào chất bổ trợ bất kỳ; tốt hơn nếu mức độ hấp thụ của kháng nguyên Hib vào chất bổ trợ không lớn hơn 15%; tốt hơn nữa nếu mức độ hấp thụ của kháng nguyên Hib vào chất bổ trợ không lớn hơn 10%.

Theo một phương án khác, kháng nguyên Hib không được hấp thụ có chủ đích vào chất bổ trợ bất kỳ.

Theo một phương án ưu tiên khác, kháng nguyên Hib theo sáng chế có nguồn gốc từ polysacarit vỏ của chủng Hib b.

Bệnh viêm gan gây ra bởi các chủng virus viêm gan khác nhau, như A, B, C, D, E, F hoặc G. Virus viêm gan B (HBV) là một trong số các tác nhân chính gây bệnh viêm gan virus. Các hạt virus HBV bao gồm lõi được bao bởi lớp vỏ protein bên ngoài hoặc capsit. Thành phần chính của capsit là protein kháng nguyên bề mặt HBV hoặc

“HBsAg”. Khi được sử dụng để gây miễn dịch, kháng nguyên này kích thích sản sinh kháng thể kháng HBsAg để bảo vệ chống lại lây nhiễm HBV. Theo một khía cạnh ưu tiên, chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan (Hep) sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế chứa kháng nguyên Hep có nguồn gốc từ kháng nguyên bề mặt của chủng virus viêm gan B (HBsAg).

Để sản xuất vaccin, HBsAg có thể được điều chế bằng cách tinh chế kháng nguyên ở dạng hạt từ huyết tương của đối tượng bị viêm gan B mãn tính, do HBsAg được tổng hợp với số lượng lớn ở gan và giải phóng vào dòng máu trong quá trình lây nhiễm HBV hoặc bằng cách biểu hiện protein này bằng phương pháp ADN tái tổ hợp. HBsAg để sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế có thể được điều chế bằng một trong hai phương pháp này.

Bệnh bại liệt gây ra bởi virus bại liệt. Vaccin kết hợp theo sáng chế có thể chứa chủng virus bại liệt Sabin (Sabin typ 1 và/hoặc Sabin typ 2) hoặc chủng virus bại liệt Salk. Theo một phương án ưu tiên, vaccin kết hợp theo sáng chế chứa chủng Salk. Có 3 typ Salk có thể gây bệnh bại liệt. Ba typ này có cấu trúc tương tự nhau và gây triệu chứng giống nhau, nhưng tính kháng nguyên rất khác nhau và tình trạng lây nhiễm bởi một typ không bảo vệ chống lại tình trạng lây nhiễm bởi các typ còn lại. Virus bại liệt Salk bao gồm 3 chủng - typ 1 (ví dụ, chủng Mahoney), typ 2 (ví dụ, chủng MEF-I) và typ 3 (ví dụ, chủng Saukett). Theo một phương án ưu tiên, vaccin kết hợp theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều chủng Salk nêu trên.

Virus bại liệt có thể được sinh trưởng trong quá trình nuôi cấy tế bào. Dòng tế bào Vero (dòng tế bào ổn định có nguồn gốc từ thận khỉ) có thể được sử dụng để nuôi cấy virus bại liệt. Sau khi sinh trưởng, hạt virus có thể được tinh chế bằng các phương pháp đã biết. Virus bại liệt có thể được bất hoạt. Liều lượng virus bại liệt thường được thể hiện bằng đơn vị “DU” (“đơn vị kháng nguyên D”). Tốt hơn nếu chế phẩm chứa kháng nguyên IPV sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế chứa một hoặc nhiều chủng được sử dụng trong sản xuất vaccin. Sau đó, chế phẩm bán thành phẩm được sử dụng để sản xuất vaccin kết hợp theo sáng chế.

Thành phần không có tính kháng nguyên trong vaccin kết hợp theo sáng chế

Ngoài các thành phần kháng nguyên, vaccin kết hợp theo sáng chế có thể chứa một số tá dược được dùng là thành phần không có tính kháng nguyên. Ví dụ về các tá

được được dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất điều chỉnh độ pH, chất đệm, chất hỗ trợ, chất bảo quản, chất mang và chất điều chỉnh độ đẳng trương.

Chất hỗ trợ

Các kháng nguyên trong chế phẩm cuối cùng có thể được hấp thụ vào chất hỗ trợ hoặc không. Chất hỗ trợ có chức năng kích thích sản sinh miễn dịch chống lại các thành phần vacxin, làm cho vacxin hiệu quả hơn.

Chức năng của chất hỗ trợ có thể bao gồm:

- Tạo điều kiện thuận lợi cho kháng nguyên tiếp xúc với hệ miễn dịch và tác động đến đáp ứng miễn dịch thu được, cũng như chất lượng của đáp ứng miễn dịch này (mức độ hoặc thời gian);
- Giảm độc tính của một số kháng nguyên; và
- Làm tăng độ hòa tan của một số thành phần vacxin.

Các nghiên cứu đã cho thấy nhiều vacxin chứa nhôm tạo ra đáp ứng kháng thể cao hơn và kéo dài hơn vacxin không chứa chất hỗ trợ này. Vai trò của chất hỗ trợ thường quan sát thấy trong miễn dịch lần đầu hơn là khi tăng liều.

Chất hỗ trợ chứa nhôm là chất hỗ trợ thường được sử dụng nhất. Các chất hỗ trợ này cũng đã được FDA chấp thuận để sử dụng trong vacxin. Có ba chất hỗ trợ chứa nhôm bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat và kali nhôm sulfat (thường được gọi là “phèn”).

Theo một phương án, một số kháng nguyên của vacxin kết hợp theo sáng chế được hấp thụ vào nhôm phosphat và một số kháng nguyên của vacxin kết hợp theo sáng chế được hấp thụ vào nhôm hydroxit. Một số kháng nguyên theo sáng chế có thể không được hấp thụ hoặc hấp thụ không đáng kể vào chất hỗ trợ. Tốt hơn nếu, chất hỗ trợ để hấp thụ kháng nguyên tạo ra đặc tính mong muốn cho vacxin kết hợp theo sáng chế. Chất hỗ trợ để hấp thụ kháng nguyên được mô tả chi tiết hơn trong phần “Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp theo sáng chế”.

Chất bảo quản

Vacxin dễ bị nhiễm khuẩn. Do đó, để tránh nguy cơ lây nhiễm vi sinh vật có hại, có thể lây nhiễm ngẫu nhiên vào vacxin, chất bảo quản có thể được bổ sung vào

khi điều chế vaccin. Các chất bảo quản được sử dụng bao gồm benzethonium clorua (pemerol), thiomersal, phenol và 2-phenoxyetanol.

Thimerosal là hợp chất chứa thủy ngân hữu cơ được sử dụng làm chất bảo quản trong nhiều vaccin. Có các báo cáo liên quan đến phản ứng dị ứng với thiomersal chủ yếu là phản ứng quá mẫn muộn tại chỗ, bao gồm đỏ và sưng ở vị trí tiêm. Cũng có các báo cáo trái ngược nhau về mối liên quan giữa bệnh tự kỷ và thủy ngân.

2-phenoxyetanol cũng được gọi là “1-hydroxy-2-phenoxyetan”, “2-hydroxyetyl phenyl ete”, “etylenglycol phenyl ete”, v.v.. 2-phenoxyetanol có độ an toàn cao hơn chất bảo quản chứa thủy ngân (ví dụ, thiomersal). Do đó, cần tránh sử dụng thiomersal và sử dụng 2-phenoxyetanol trong vaccin.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng 2-phenoxyetanol làm chất bảo quản trong vaccin. Theo một phương án ưu tiên khác, hàm lượng của 2-phenoxyetanol bằng 5mg/ml vaccin.

Chất điều chỉnh độ đẳng trương

Để kiểm soát độ đẳng trương của vaccin, tốt hơn nếu chất điều chỉnh độ đẳng trương được sử dụng trong sản xuất vaccin. Ví dụ về các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối (ví dụ, NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂), đường (ví dụ, dextroza, manitol, lactoza), axit amin (ví dụ, arginin, glycin, histidin) và rượu đa chức (ví dụ, sucroza, glyxerol, sorbitol). Theo một phương án ưu tiên, muối sinh lý, như muối natri được sử dụng trong sản xuất vaccin. Tốt nhất nếu, natri clorua (NaCl) được sử dụng trong sản xuất vaccin kết hợp theo sáng chế.

Chất điều chỉnh độ pH hoặc chất đệm

Khi cần, các chất điều chỉnh độ pH đã biết có thể được sử dụng để điều chỉnh độ pH của vaccin, như natri hydroxit hoặc axit hydrocloric. Các chất đệm khác nhau, như natri phosphat, kali phosphat và xitrat có thể được sử dụng trong sản xuất vaccin kết hợp theo sáng chế.

Thành phần của vaccin kết hợp theo sáng chế

Thành phần của vaccin kết hợp theo sáng chế phải đảm bảo vaccin có tính miễn dịch do tác dụng của mỗi lượng kháng nguyên trong vaccin. Tốt hơn nếu mỗi kháng nguyên trong vaccin kết hợp theo sáng chế được sử dụng ở lượng sao cho khi sử dụng

cho đối tượng, vaccin kết hợp này kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, chống lại kháng nguyên này trong vaccin. Vaccin kết hợp theo sáng chế chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên ho gà toàn tế bào (WP), kháng nguyên bại liệt (IPV) và tùy ý các kháng nguyên khác được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên *Haemophilus influenzae* (Hib) và kháng nguyên virus viêm gan (Hep).

Theo một phương án, vaccin kết hợp theo sáng chế chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU, nằm trong khoảng từ 1 đến 15 DU và nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU/0,5ml để thu được vaccin ổn định chứa năm thành phần, có hoạt tính gây miễn dịch và ở dạng lỏng hoàn toàn.

Theo một phương án ưu tiên khác, vaccin theo sáng chế chứa năm thành phần bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng khoảng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng khoảng 16 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng khoảng 10 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng khoảng 40 DU, 8 DU và 32 DU/0,5ml. Vaccin này là vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn và có hoạt tính gây miễn dịch khi sử dụng cho đối tượng.

Theo một phương án ưu tiên khác, vaccin theo sáng chế chứa sáu thành phần bao gồm kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g, kháng nguyên Hep B với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml, và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU, nằm trong khoảng từ 1 đến 15 DU và nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU/0,5ml để thu được vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn và có hoạt tính gây miễn dịch khi sử dụng cho đối tượng.

Theo một phương án ưu tiên khác, vaccin theo sáng chế chứa sáu thành phần bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng khoảng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng khoảng 16 IOU/0,5ml, Hib b với lượng khoảng 10µg, kháng nguyên Hep B với lượng khoảng 10µg/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng khoảng 40 DU, 8 DU và 32 DU/0,5ml. Vaccin này là vaccin ổn định có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại toàn bộ các kháng nguyên trong vaccin khi sử dụng cho đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, vaccin theo sáng chế chứa năm thành phần bao gồm kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 20µg và kháng nguyên Hep B với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20µg/0,5ml để thu được vaccin kết hợp ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn và có hoạt tính gây miễn dịch.

Theo một khía cạnh ưu tiên, vaccin theo sáng chế chứa năm thành phần bao gồm kháng nguyên D với lượng khoảng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng khoảng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng khoảng 16 IOU, kháng nguyên Hib b với lượng khoảng 10µg và kháng nguyên Hep B với lượng khoảng 10µg/0,5ml. Vaccin này là vaccin ổn định ở dạng lỏng hoàn toàn và có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại toàn bộ các kháng nguyên trong vaccin khi sử dụng cho đối tượng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên D, kháng nguyên T, kháng nguyên wP, kháng nguyên Hib, kháng nguyên Hep hoặc kháng nguyên IPV bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của vaccin kết hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, tốt hơn nếu hàm lượng nhôm (Al^{3+}) trong vaccin kết hợp theo sáng chế không lớn hơn 2mg/0,5ml, tốt hơn nữa nếu không lớn hơn 1mg/0,5ml và tốt hơn nhất nếu không lớn hơn 0,6mg/0,5ml.

Theo một khía cạnh khác, tốt hơn nếu hàm lượng 2-phenoxyetanol trong vaccin kết hợp theo sáng chế có thể bằng 5mg/ml.

Phương pháp sản xuất vaccin kết hợp theo sáng chế

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vacxin kết hợp theo sáng chế. Hoạt tính gây miễn dịch, độ ổn định và khả năng duy trì cấu trúc ổn định của kháng nguyên trong chế phẩm miễn dịch có thể phụ thuộc vào phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này. Các yếu tố này có thể bao gồm thứ tự bổ sung kháng nguyên, chất bổ trợ đặc hiệu cho từng kháng nguyên được sử dụng, các thông số khác nhau được sử dụng bao gồm điều kiện khuấy trộn, nhiệt độ và độ pH.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vacxin kết hợp ở dạng lỏng hoàn toàn chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP), kháng nguyên IPV và tùy ý một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên *Haemophilus influenzae* (Hib) và kháng nguyên virus viêm gan (Hep), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) điều chế hợp phần I chứa hỗn hợp bao gồm i) kháng nguyên bạch hầu (D), ii) kháng nguyên uốn ván (T) và iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP);
- b) tùy ý, điều chế hợp phần II chứa kháng nguyên Hep được hấp thụ vào muối nhôm;
- c) tùy ý, phối trộn hợp phần II với hợp phần I để thu được hỗn hợp; và
- d) bổ sung hỗn hợp thu được ở bước a) hoặc bước c) vào kháng nguyên Hib, tiếp theo bổ sung kháng nguyên IPV.

Theo một phương án ưu tiên, kháng nguyên D và kháng nguyên T theo sáng chế được hấp thụ vào nhôm phosphat.

Theo một phương án ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến bước điều chế hợp phần I bao gồm các công đoạn sau:

- a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;
- b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên uốn ván (T) vào bình nêu trên;
- c) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên bạch hầu (D) vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;
- d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên;

e) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy không đổi;

f) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5;

g) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy; và

h) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này cũng bao gồm bước điều chế hợp phần II bao gồm các công đoạn sau:

a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

c) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên; và

e) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này cũng bao gồm bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II bao gồm công đoạn bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp.

Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này cũng bao gồm bước phối trộn hỗn hợp nêu trên với kháng nguyên Hib và kháng nguyên IPV, trong đó bước này bao gồm các công đoạn sau:

a) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib trong điều kiện khuấy để thu được hỗn hợp;

b) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào chế phẩm chứa kháng nguyên IPV, tiếp theo bổ sung dung dịch nước muối; và

c) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Theo một phương án ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến bước bổ sung hợp phần I vào kháng nguyên Hib và kháng nguyên IPV, trong đó bước này bao gồm các công đoạn sau:

a) bổ sung hợp phần I vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib trong điều kiện khuấy để thu được hỗn hợp

b) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào chế phẩm chứa kháng nguyên IPV, tiếp theo bổ sung dung dịch nước muối; và

c) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vaccin kết hợp, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) điều chế hợp phần I chứa hỗn hợp bao gồm) kháng nguyên bạch hầu (D), ii) kháng nguyên uốn ván (T) và iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP);

b) điều chế hợp phần II chứa kháng nguyên Hep được hấp thụ vào muối nhôm;

c) phối trộn hợp phần II với hợp phần I để thu được hỗn hợp; và

d) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào kháng nguyên Hib.

Phương pháp sản xuất vaccin kết hợp này cũng bao gồm bước điều chế hợp phần I bao gồm các công đoạn sau:

a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên uốn ván vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

c) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên bạch hầu vào bình nêu trên;

d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên;

e) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

f) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5;

g) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên wP vào bình nêu trên; và

h) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Phương pháp sản xuất vaccin kết hợp này cũng bao gồm bước điều chế hợp phần II bao gồm các công đoạn sau:

a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;.

b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan vào bình nêu trên;

- c) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên;
- d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy; và
- e) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này cũng bao gồm bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II bao gồm công đoạn bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp.

Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp này cũng bao gồm các bước sau:

- a) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib; và
- b) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Theo một phương án ưu tiên, công đoạn khuấy trong bước bất kỳ nêu trên được thực hiện ở tốc độ bằng 150 vòng/phút, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 2 giờ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Vacxin chứa sáu thành phần theo sáng chế và phương pháp sản xuất vacxin này

A) Công thức điều chế của vacxin chứa sáu thành phần theo ví dụ này như sau:

Mỗi 0,5ml vacxin chứa các thành phần sau:

Bảng 1

Thành phần	Lượng
Độc tố bạch hầu cải biến (DT)	20 Lf
Độc tố uốn ván cải biến (TT)	7,5 Lf
Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	16 IOU
Kháng nguyên <i>Haemophilus influenzae</i> typ b (Hib) (polysacarit vỏ)	10 μ g
Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg)	10 μ g

Virut bại liệt bất hoạt (IPV)	
Typ 1	40 DU
Typ 2	8 DU
Typ 3	32 DU
Thành phần khác	
Chất bổ trợ chứa nhôm (như nhôm-phosphat)	Không lớn hơn 0,6mg Al ³⁺
2-phenoxyetanol	2,5mg

B) Phương pháp sản xuất vacxin chứa sáu thành phần này như sau:

Bước điều chế hợp phần I

Gel nhôm phosphat được bổ sung vào bình, tiếp theo bổ sung kháng nguyên uốn ván và kháng nguyên bạch hầu trong điều kiện khuấy để thu được hỗn hợp. Sau đó, 2-phenoxyetanol được trộn với hỗn hợp này trong bình nêu trên. Sau đó, dung dịch natri clorua được bổ sung vào bình nêu trên. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5. Sau đó, kháng nguyên wP được bổ sung vào bình nêu trên. Sau đó, kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Bước điều chế hợp phần II

Gel nhôm phosphat được bổ sung vào bình, tiếp theo bổ sung kháng nguyên virut viêm gan B. Sau đó, dung dịch natri clorua được bổ sung vào bình nêu trên, tiếp theo bổ sung 2-phenoxyetanol. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

Bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II

Bước này được thực hiện bằng cách bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp.

Bước bổ sung kháng nguyên Hib b và kháng nguyên bán thành phẩm IPV

Tiếp theo, hỗn hợp chứa hợp phần I và hợp phần II nêu trên được phối trộn với chế phẩm chứa kháng nguyên Hib b để thu được hỗn hợp. Tiếp theo, bổ sung hỗn hợp này vào kháng nguyên IPV để thu được hỗn hợp và dung dịch nước muối được bổ

sung vào hỗn hợp nêu trên để thu được vacxin chứa sáu thành phần, kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Ví dụ 2: Vacxin chứa năm thành phần theo sáng chế và phương pháp sản xuất vacxin này

A) Công thức điều chế của vacxin chứa năm thành phần theo ví dụ này như sau:

Mỗi 0,5ml vacxin chứa các thành phần sau:

Bảng 2

Thành phần	Lượng
Độc tố bạch hầu cải biến (DT)	20 Lf
Độc tố uốn ván cải biến (TT)	7,5 Lf
Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	16 IOU
Kháng nguyên <i>Haemophilus influenzae</i> typ b (Hib) (polysacarit vỏ)	10µg
Virut bại liệt bất hoạt (IPV)	
Typ 1	40 DU
Typ 2	8 DU
Typ 3	32 DU
Thành phần khác	
Chất bổ trợ chứa nhôm (như nhôm phosphat)	Không lớn hơn 0,6mg Al ³⁺
2-phenoxyetanol	2,5mg

B) Phương pháp sản xuất vacxin chứa năm thành phần này như sau:

Bước điều chế hợp phần I

Gel nhôm phosphat được bổ sung vào bình, tiếp theo bổ sung kháng nguyên uốn ván và kháng nguyên bạch hầu trong điều kiện khuấy để thu được hỗn hợp. Sau đó, 2-phenoxyetanol được trộn với hỗn hợp này trong bình nêu trên. Sau đó, dung dịch natri clorua được bổ sung vào bình nêu trên. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5. Sau đó, kháng nguyên wP

được bổ sung vào bình nêu trên. Sau đó, kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Bước bổ sung kháng nguyên Hib b và kháng nguyên bán thành phẩm IPV

Hợp phần I được bổ sung vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib b để thu được hỗn hợp, sau đó hỗn hợp này được phối trộn với chế phẩm chứa kháng nguyên IPV và dung dịch nước muối để thu được vaccin chứa năm thành phần. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Ví dụ 3: Vaccin chứa năm thành phần theo sáng chế và phương pháp sản xuất vaccin này

A) Công thức điều chế của vaccin chứa năm thành phần theo ví dụ này như sau:

Mỗi 0,5ml vaccin chứa các thành phần sau:

Bảng 3

Thành phần	Lượng
Độc tố bạch hầu cải biến (D)	20 Lf
Độc tố uốn ván cải biến (T)	7,5 Lf
Kháng nguyên <i>B. pertussis</i> bất hoạt (wP)	16 IOU
Kháng nguyên <i>Haemophilus influenzae</i> typ b (Hib) (polysacarit vỏ)	10µg
Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg)	10µg
Thành phần khác	
Chất bổ trợ chứa nhôm (như nhôm phosphat)	Không lớn hơn 0,6mg Al ³⁺
2-phenoxyetanol	2,5mg

B) Phương pháp sản xuất vaccin chứa năm thành phần này như sau:

Bước điều chế hợp phần I

Gel nhôm phosphat được bổ sung vào bình, tiếp theo bổ sung kháng nguyên uốn ván và kháng nguyên bạch hầu trong điều kiện khuấy để thu được hỗn hợp. Sau đó, 2-phenoxyetanol được phối trộn với hỗn hợp này trong bình nêu trên. Sau đó, dung

dịch natri clorua được bổ sung vào bình nêu trên. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5. Sau đó, kháng nguyên wP được bổ sung vào bình nêu trên. Sau đó, kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Bước điều chế hợp phần II

Gel nhôm phosphat được bổ sung vào bình, tiếp theo bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan B. Sau đó, dung dịch natri clorua được bổ sung vào bình nêu trên, tiếp theo bổ sung 2-phenoxyetanol để thu được hỗn hợp. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

Bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II

Bước này được thực hiện bằng cách bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp.

Bổ sung kháng nguyên bán thành phẩm Hib b

Tiếp theo, hỗn hợp chứa hợp phần I và hợp phần II nêu trên được phối trộn với chế phẩm chứa kháng nguyên Hib b để thu được vacxin chứa năm thành phần. Kiểm tra và điều chỉnh độ pH của hỗn hợp thu được đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Ví dụ 4: Thử nghiệm đánh giá hoạt lực *in vivo* của kháng nguyên bạch hầu, kháng nguyên uốn ván, kháng nguyên ho gà toàn tế bào, kháng nguyên *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), kháng nguyên virus viêm gan B và kháng nguyên bại liệt bất hoạt, và dữ liệu độ ổn định hoặc hoạt lực của các kháng nguyên này

A) Thử nghiệm đánh giá hoạt lực *in vivo* của kháng nguyên bạch hầu, kháng nguyên uốn ván, kháng nguyên ho gà toàn tế bào, kháng nguyên *Haemophilus influenzae* typ b (Hib), kháng nguyên virus viêm gan B và kháng nguyên bại liệt bất hoạt.

1. Độc tố bạch hầu cải biến

Động vật thử nghiệm : chuột lang

Số lượng chuột cần cho 1 lô : 116 (48 để thử nghiệm, 48 để đối chứng và 20 để xác định nồng độ LD₅₀)

Đường dùng vacxin : tiêm dưới da

Thể tích tiêm : 1,0ml

Số ngày chuột được nuôi : 28

Hoạt lực của độc tố bạch hầu được xác định trên chuột lang bằng phương pháp thách thức miễn dịch gây chết. Theo phương pháp này, ba dung dịch pha loãng chứa mỗi vacxin thử nghiệm và vacxin đối chứng được điều chế sao cho dung dịch pha loãng trung bình chứa liều ED_{50} có hoạt lực bảo vệ ít nhất 50% chuột thử nghiệm hoặc cao hơn. Nhóm bao gồm 16 chuột lang thử nghiệm được tiêm với mỗi dung dịch pha loãng chứa vacxin thử nghiệm và vacxin đối chứng, và sau 28 ngày, các chuột thử nghiệm được tiêm dưới da độc tố bạch hầu chứa 100 LD_{50} . Nhóm bao gồm 20 chuột lang khác không được gây đáp ứng miễn dịch để xác định nồng độ độc tố bạch hầu và nhóm chuột lang này được tiêm với các dung dịch pha loãng khác nhau chứa độc tố bạch hầu, 5 chuột lang đối với mỗi dung dịch pha loãng. Thử nghiệm được thực hiện trong 33 ngày. Các kết quả thử nghiệm được tính toán bằng phương pháp hồi quy PROBIT. Mẫu được xem là đạt thử nghiệm đánh giá hoạt lực của độc tố bạch hầu khi mẫu này chứa ≥ 30 IU/liều đơn trên người.

- Vacxin thử nghiệm phải tuyến tính và tương đương với vacxin đối chứng.

- Giới hạn tin cậy của hoạt lực đánh giá phải nằm trong khoảng từ 50% đến 200%.

- Hoạt lực đánh giá không nhỏ hơn 30 IU/liều đơn trên người.

- Giới hạn của khoảng tin cậy 95% của hoạt lực đánh giá phải nằm trong khoảng từ 5% đến 200%, trừ khi giới hạn dưới của khoảng tin cậy 95% của hoạt lực đánh giá lớn hơn 30 IU/liều.

2. Độc tố uốn ván cải biến

Động vật thử nghiệm : chuột nhắt bạch tạng Thụy Sĩ

Số lượng chuột cần cho 1 lô : 116 (48 để thử nghiệm, 48 để đối chứng và 50 để xác định nồng độ LD_{50})

Đường dùng vacxin : tiêm dưới da

Thể tích tiêm : 0,5ml

Số ngày chuột được nuôi : 28

Hoạt lực của độc tố uốn ván cải biến được xác định trên chuột nhắt bạch tạng Thụy Sĩ bằng phương pháp thách thức miễn dịch gây chết. Theo phương pháp này, ba dung dịch pha loãng chứa mỗi vacxin thử nghiệm và vacxin đối chứng được điều chế sao cho dung dịch pha loãng trung bình chứa liều ED_{50} có hoạt lực bảo vệ ít nhất 50% chuột thử nghiệm hoặc cao hơn. Nhóm bao gồm 16 chuột nhắt bạch tạng Thụy Sĩ thử nghiệm được tiêm với mỗi dung dịch pha loãng chứa vacxin thử nghiệm và vacxin đối chứng, và sau 28 ngày, các chuột thử nghiệm được tiêm dưới da độc tố uốn ván chứa 100 LD_{50} . Nhóm bao gồm 20 chuột nhắt bạch tạng Thụy Sĩ khác không được gây đáp ứng miễn dịch để xác định nồng độ độc tố uốn ván và tiêm 4 dung dịch pha loãng chứa liều LD_{50} chuẩn đối với mỗi 5 chuột. Thử nghiệm được thực hiện trong 33 ngày. Các kết quả thử nghiệm được tính toán bằng phương pháp hồi quy PROBIT. Mẫu được xem là đạt thử nghiệm đánh giá hoạt lực của độc tố uốn ván khi mẫu này chứa ≥ 60 IU/liều đơn trên người.

- Vacxin thử nghiệm phải tuyến tính và tương đương với vacxin đối chứng.
- Giới hạn tin cậy của hoạt lực đánh giá phải nằm trong khoảng từ 50% đến 200%.
- Hoạt lực đánh giá không nhỏ hơn 60 IU/liều đơn trên người.
- Giới hạn của khoảng tin cậy 95% của hoạt lực đánh giá phải nằm trong khoảng từ 5% đến 200%, trừ khi giới hạn dưới của khoảng tin cậy 95% của hoạt lực đánh giá lớn hơn 60 IU/liều.

3. Kháng nguyên ho gà toàn tế bào

Động vật thử nghiệm	: chuột nhắt Thụy Sĩ
Số lượng chuột cần cho 1 lô và 50 để xác định nồng độ LD_{50})	: 194 (72 để thử nghiệm, 72 để đối chứng)
Đường dùng vacxin	: tiêm màng bụng
Thể tích tiêm	: 0,5ml
Số ngày chuột được nuôi	: 14

Hoạt lực của kháng nguyên ho gà toàn tế bào được xác định trên chuột nhắt Thụy Sĩ bằng thử nghiệm đánh giá hoạt lực bảo vệ. Theo phương pháp này, ba dung

dịch pha loãng chứa mỗi vacxin thử nghiệm và vacxin đối chứng được điều chế trong dung dịch nước muối đẳng trương sao cho dung dịch pha loãng trung bình chứa liều ED₅₀ có hoạt lực bảo vệ ít nhất 50% chuột thử nghiệm hoặc cao hơn. Nhóm bao gồm 24 chuột nhất Thụy Sĩ được gây miễn dịch bằng mỗi dung dịch pha loãng, sau đó toàn bộ các chuột thử nghiệm được tiêm màng bụng với 0,03ml (khoảng 100000 vi khuẩn/0,03ml) vào ngày thứ 14. Sau khi thách thức miễn dịch, các chuột nhất thử nghiệm được quan sát trong 14 ngày và tình trạng chết và sống sót của các chuột nhất thử nghiệm được ghi lại. Tình trạng chuột nhất chết xuất hiện trong ba ngày đầu sau khi thách thức miễn dịch được xem là không đặc hiệu. Các kết quả thử nghiệm được tính toán bằng phương pháp hồi quy PROBIT. Mẫu được xem là đạt thử nghiệm đánh giá hoạt lực của kháng nguyên ho gà toàn tế bào khi mẫu này chứa ≥ 4 IU/liều đơn trên người và giới hạn tin cậy dưới không nhỏ hơn 2 IU/liều đơn trên người.

4. Kháng nguyên *Hemophilus influenza* typ b (Hib)

Động vật thử nghiệm	: chuột nhất Thụy Sĩ
Số lượng chuột cần cho 1 lô	: 16 (8 để gây miễn dịch, 8 để đối chứng)
Đường dùng vacxin	: tiêm dưới da
Thể tích tiêm	: 0,5ml
Số ngày chuột được nuôi	: 35

Hoạt lực của kháng nguyên Hib b được xác định trên chuột nhất Thụy Sĩ bằng phương pháp ELISA. Theo thử nghiệm này, hai nhóm (nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng) mỗi nhóm 8 chuột nhất Thụy Sĩ được chọn. Mỗi chuột nhất ở nhóm thử nghiệm được tiêm dưới da với 0,5ml vacxin pha loãng ở tỷ lệ bằng 1:4 và nhóm đối chứng không được tiêm vacxin. Liều tăng được tiêm vào ngày thứ 10 và 20, và máu được lấy lần cuối cùng vào ngày thứ 35. Các mẫu huyết thanh được xác định kháng thể kháng Hib bằng phương pháp ELISA. Mẫu được xem là đạt thử nghiệm đánh giá hoạt lực của kháng nguyên Hib khi $\geq 50\%$ chuột nhất trong nhóm thử nghiệm có biến đổi huyết thanh.

5. Kháng nguyên bề mặt của virut viêm gan B

Động vật thử nghiệm	: chuột nhất Balb C
---------------------	---------------------

Số lượng chuột cần cho 1 lô : 110 (50 để thử nghiệm, 50 để đối chứng, 10 để đối chứng giả dược)

Đường dùng vaccin : tiêm màng bụng

Thể tích tiêm : 1,0ml

Số ngày chuột được nuôi : 28

Hoạt lực của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B được xác định trên chuột nhắt Balb/C. Trong thử nghiệm này, năm dung dịch pha loãng hai lần chứa mỗi vaccin thử nghiệm và vaccin đối chứng được điều chế, và mười chuột nhắt được tiêm màng bụng với mỗi dung dịch pha loãng. Mười chuột nhắt khác được tiêm với dung môi pha loãng và đóng vai trò là nhóm đối chứng. Các chuột nhắt đã được tiêm được lấy máu vào ngày thứ 28 sau khi tiêm và huyết thanh được phân tách cẩn thận để không tan hồng cầu. Các mẫu huyết thanh được xác định nồng độ kháng thể kháng virus viêm gan B bằng phương pháp ELISA. Mẫu được xem là đạt thử nghiệm đánh giá hoạt lực của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B khi giới hạn trên của hoạt lực tương đối của mẫu ≥ 1 .

6. Vaccin bại liệt bất hoạt (IPV)

Động vật thử nghiệm : chuột cống Wistar

Số lượng chuột cần cho 1 lô : 100 (50 cho vaccin thử, 50 cho vaccin đối chứng)

Đường dùng vaccin : tiêm bắp

Thể tích tiêm : 0,5ml

Số ngày chuột được nuôi : 21

Hoạt lực của kháng nguyên IPV được xác định trên chuột cống RIVM TOX. Năm dung dịch pha loãng ba lần chứa mỗi vaccin thử nghiệm và vaccin đối chứng được điều chế và mười chuột cống được tiêm bắp với 0,5ml mỗi dung dịch pha loãng. Chuột thử nghiệm được lấy máu vào ngày thứ 21 sau khi tiêm và huyết thanh được phân tách cẩn thận để không tan hồng cầu. Các mẫu huyết thanh được xác định nồng độ kháng thể kháng các typ huyết thanh 1, 2 và 3 của virus bại liệt bằng thử nghiệm trung hòa huyết thanh.

Thử nghiệm được xem là không đạt, trừ khi:

- Liều hữu hiệu trung bình (ED_{50}) của cả vaccin thử và vaccin đối chứng nằm trong khoảng từ liều nhỏ nhất đến liều lớn nhất đã tiêm cho chuột cống thử nghiệm;
- Phân tích thống kê cho thấy không có mức độ khác biệt đáng kể về độ tuyến tính hoặc tương đương;
- Giới hạn tin cậy dưới của hoạt lực đánh giá tương đối nằm trong khoảng từ 25% đến 400% hoạt lực đánh giá.

B) Dữ liệu độ ổn định hoặc hoạt lực của các kháng nguyên trong vaccin kết hợp theo sáng chế

1) Các thử nghiệm được thực hiện như mô tả trong ví dụ IV A đối với toàn bộ các kháng nguyên của vaccin chứa sáu thành phần trong ví dụ I. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Thành phần		Giới hạn chấp nhận	Nghiên cứu kéo dài ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)	
			6 tháng	12 tháng
Độc tố bạch hầu cải biến (DT) (hoạt lực)		$\geq 60 \text{ IU/ml}$	157,28	--
Độc tố uốn ván cải biến (TT) (hoạt lực)		$\geq 120 \text{ IU/ml}$	209,57	--
<i>B. pertussis</i> (wP) bất hoạt (hoạt lực)		$\geq 8 \text{ IU/ml}$	9,44	9,69
Kháng nguyên polysacarit vỏ (Hib b) (hoạt lực)		$\geq 50 \%$	62,5	75
Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) (hoạt lực)		$\geq 1,0$	1,56	1,50
Virus bại liệt bất hoạt (IPV) (hoạt lực)	typ 1	Hoạt lực của vaccin thử nghiệm không được thấp hơn vaccin đối chứng	--	Đạt
	typ 2		--	Đạt
	typ 3		--	Đạt

Do đó, các kết quả trên bảng 4 cho thấy ngay cả khi bảo quản vacxin trong thời gian dài ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, thì kháng nguyên trong vacxin vẫn còn có hoạt lực/hoạt tính gây miễn dịch cao hơn giới hạn chấp nhận.

2) Các thử nghiệm được thực hiện như mô tả trong ví dụ IV A đối với toàn bộ các kháng nguyên của vacxin chứa năm thành phần trong ví dụ II. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

Thành phần		Giới hạn chấp nhận	Nghiên cứu kéo dài ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)	
			6 tháng	12 tháng
Độc tố bạch hầu cải biến (DT) (hoạt lực)		$\geq 60 \text{ IU/ml}$	166,22	--
Độc tố uốn ván cải biến (TT) (hoạt lực)		$\geq 120 \text{ IU/ml}$	208,77	--
<i>B. pertussis</i> (wP) bất hoạt (hoạt lực)		$\geq 8 \text{ IU/ml}$	9,37	10,5
Kháng nguyên polysacarit vỏ (Hib) (hoạt lực)		$\geq 50 \%$	87,5	75
Virus bại liệt bất hoạt (IPV) (hoạt lực)	typ 1	Hoạt lực của vacxin thử nghiệm không được thấp hơn vacxin đối chứng	--	Đạt
	typ 2		--	Đạt
	typ 3		--	Đạt

Do đó, các kết quả trên bảng 5 cho thấy ngay cả khi bảo quản vacxin trong thời gian dài ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, thì kháng nguyên trong vacxin vẫn còn có hoạt lực/hoạt tính gây miễn dịch cao hơn giới hạn chấp nhận.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vaccin kết hợp chứa kháng nguyên bạch hầu (D), kháng nguyên uốn ván (T), kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP), kháng nguyên *Haemophilus influenzae* typ b (Hib b), kháng nguyên virus viêm gan B (Hep B) và chất bảo quản là 2-phenoxyetanol, trong đó kháng nguyên Hib b được tiếp hợp với chất mang protein được chọn từ nhóm bao gồm độc tố uốn ván cải biến, độc tố bạch hầu cải biến, độc tố bạch hầu đột biến (CRM 197) và protein ngoài màng của *Neisseria meningitidis* hoặc chất mang bất kỳ đã biết, và mức độ hấp thụ của kháng nguyên Hib b vào chất hỗ trợ bất kỳ nhỏ hơn 15% và toàn bộ các thành phần này ở dạng lỏng và ổn định, và kháng nguyên Hib b không sử dụng tức thì bằng cách điều chế vaccin ngay trước khi sử dụng.
2. Vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên D và kháng nguyên T được hấp thụ vào nhôm phosphat.
3. Vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hib b không được hấp thụ đáng kể vào chất hỗ trợ bất kỳ.
4. Vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hib b có nguồn gốc từ polysaccharit vỏ của chủng Hib b.
5. Vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hep B được hấp thụ vào nhôm phosphat.
6. Vaccin theo điểm 1, trong đó kháng nguyên Hep B có nguồn gốc từ kháng nguyên bề mặt của chủng Hep B.
7. Vaccin theo điểm 1, trong đó vaccin này chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml và kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml.
8. Vaccin theo điểm 7, trong đó vaccin này chứa kháng nguyên D với lượng bằng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng bằng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng bằng 16 IOU/0,5ml và kháng nguyên Hib b với lượng bằng 10 μ g/0,5ml.
9. Vaccin theo điểm 1, trong đó vaccin này chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g và kháng nguyên Hep B với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml.

10. Vacxin theo điểm 9, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng bằng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng bằng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng bằng 16 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng bằng 10 μ g và kháng nguyên Hep B với lượng bằng 10 μ g/0,5ml.

11. Vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 20 μ g và kháng nguyên Hep B với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml.

12. Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) điều chế hợp phần I chứa hỗn hợp bao gồm i) kháng nguyên bạch hầu (D), ii) kháng nguyên uốn ván (T) và iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) trong bình phản ứng;

(b) điều chế hợp phần II chứa kháng nguyên Hep B được hấp thụ vào muối nhôm;

(c) phối trộn hợp phần II với hợp phần I để thu được hỗn hợp; và

(d) bổ sung hỗn hợp thu được ở bước c) vào kháng nguyên Hib b.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó kháng nguyên D và kháng nguyên T được hấp thụ vào nhôm phosphat.

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung chất bảo quản là 2-phenoxyetanol vào hợp phần I.

15. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước điều chế hợp phần I bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

(b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên uốn ván (T) vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(c) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên bạch hầu (D) vào bình nêu trên;

(d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(e) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên;

(f) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5;

(g) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên wP vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy; và

(h) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

16. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước điều chế hợp phần II bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

(b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan B (Hep B) vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(c) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên;

(d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên; và

(e) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

17. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II bao gồm công đoạn bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp trong bình phản ứng.

18. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước bổ sung kháng nguyên Hib b bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung hỗn hợp thu được ở bước c) theo điểm 12 vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib b để thu được hỗn hợp;

(b) sau đó bổ sung hỗn hợp nêu trên vào dung dịch nước muối; và

(c) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

19. Vacxin kết hợp theo điểm 1, trong đó vacxin này còn chứa kháng nguyên IPV.

20. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên D và kháng nguyên T được hấp thụ vào nhôm phosphat.

21. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên IPV là các chủng Salk được chọn từ nhóm bao gồm Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 hoặc các chủng Sabin được chọn từ nhóm bao gồm Sabin typ 1 hoặc Sabin typ 2.

22. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên Hib b không được hấp thụ đáng kể vào chất bổ trợ bất kỳ.

23. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên Hib b có nguồn gốc từ polysaccharit vỏ của chủng Hib b.

24. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên Hep B được hấp thụ vào nhôm phosphat.

25. Vacxin theo điểm 19, trong đó kháng nguyên Hep B có nguồn gốc từ kháng nguyên bề mặt của chủng Hep B.

26. Vacxin theo điểm 19, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU, nằm trong khoảng từ 1 đến 15 DU và nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU/0,5ml.

26. Vacxin theo điểm 26, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng bằng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng bằng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng bằng 16 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng bằng 10 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng bằng 40 DU, 8 DU và 32 DU/0,5ml.

28. Vacxin theo điểm 19, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 40 Lf, kháng nguyên T với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 25 Lf, kháng nguyên wP với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30 IOU/0,5ml và kháng nguyên Hib b với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml, kháng nguyên Hep B với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU, nằm trong khoảng từ 1 đến 15 DU và nằm trong khoảng từ 1 đến 50 DU/0,5ml.

29. Vacxin theo điểm 28, trong đó vacxin này chứa kháng nguyên D với lượng bằng 20 Lf, kháng nguyên T với lượng bằng 7,5 Lf, kháng nguyên wP với lượng bằng 16 IOU/0,5ml, kháng nguyên Hib b với lượng bằng 10 μ g, kháng nguyên Hep B với lượng bằng 10 μ g/0,5ml và kháng nguyên IPV bao gồm các chủng Mahoney typ 1, MEF typ 2 và Saukett typ 3 với lượng tương ứng bằng 40 DU, 8 DU và 32 DU/0,5ml.

30. Phương pháp sản xuất vacxin kết hợp theo điểm 19, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

(a) điều chế hợp phần I chứa hỗn hợp bao gồm i) kháng nguyên bạch hầu (D), ii) kháng nguyên uốn ván (T) và iii) kháng nguyên ho gà toàn tế bào (wP) trong bình phản ứng;

(b) điều chế hợp phần II chứa kháng nguyên Hep B được hấp thụ vào muối nhôm;

(c) phối trộn hợp phần II với hợp phần I để thu được hỗn hợp; và

(d) bổ sung hỗn hợp thu được ở bước c) vào kháng nguyên Hib b, tiếp theo bổ sung kháng nguyên IPV.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó kháng nguyên D và kháng nguyên T được hấp thụ vào nhôm phosphat.

32. Phương pháp theo điểm 30, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung chất bảo quản là 2-phenoxyetanol vào hợp phần I.

33. Phương pháp theo điểm 30, trong đó bước điều chế hợp phần I bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

(b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên uốn ván vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(c) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên bạch hầu vào bình nêu trên;

(d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(e) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên;

(f) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5;

(g) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên wP vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy; và

(h) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

34. Phương pháp theo điểm 30, trong đó bước điều chế hợp phần II bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung gel nhôm phosphat vào bình;

(b) bổ sung chế phẩm chứa kháng nguyên virus viêm gan B (Hep B) vào bình nêu trên trong điều kiện khuấy;

(c) bổ sung dung dịch natri clorua vào bình nêu trên;

(d) bổ sung 2-phenoxyetanol vào bình nêu trên; và

(e) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0.

35. Phương pháp theo điểm 30, trong đó bước phối trộn hợp phần I với hợp phần II bao gồm công đoạn bổ sung các thành phần trong hợp phần II vào hợp phần I để thu được hỗn hợp trong bình phản ứng.

36. Phương pháp theo điểm 30, trong đó bước bổ sung kháng nguyên Hib b và kháng nguyên IPV bao gồm các công đoạn sau:

(a) bổ sung hỗn hợp thu được ở bước c) theo điểm 30 vào chế phẩm chứa kháng nguyên Hib b để thu được hỗn hợp;

(b) bổ sung hỗn hợp nêu trên vào chế phẩm chứa kháng nguyên IPV, tiếp theo bổ sung dung dịch nước muối; và

(c) kiểm tra và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.