

Chất gây sốt: Đạt yêu cầu về chất gây sốt (Phụ lục 15.12).
Tiến hành trên thỏ với liều tiêm tĩnh mạch tai thỏ là 2,5 µg mỗi kháng nguyên phế cầu/mL/kg thỏ.

An toàn không đặc hiệu: Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm sống sót và tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

pH: 4,5 - 7,4 (Phụ lục 15.33).

Cảm quan: Quan sát bằng mắt thường vắc xin không có dấu hiệu bất thường: Lông nát, nắp, hàn không đạt yêu cầu, nứt, vỡ, có vật thể lạ...

Đóng gói

Phải tuân thủ theo GMP và các quy định hiện hành.

Bảo quản, hạn dùng

Trong đồ đựng kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Các tuyên bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải được cơ quan quản lý phê chuẩn.

Nhãn

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng các quy định hiện hành và đặc biệt phải ghi đủ các thông tin về tên, hàm lượng của mỗi polysaccharid và hàm lượng polysaccharid tổng số.

VẮC XIN PHÉ CẦU CỘNG HỢP HẤP PHỤ

Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum coniugatum adsorbatum

Vắc xin phế cầu cộng hợp hấp phụ gồm các kháng nguyên vô tinh khiết polysaccharid của các týp huyết thanh phế cầu *S. pneumoniae* (gọi tắt là kháng nguyên phế cầu), mỗi kháng nguyên phế cầu được liên kết cộng hợp riêng rẽ với một protein mang (carrier protein). Vắc xin phế cầu được hấp phụ với một chất hấp phụ hoặc tá chất phù hợp (thường được hấp phụ với nhôm phosphat). Chế phẩm ở dạng lỏng hoặc đông khô, phải đáp ứng các yêu cầu sau đây:

Sản xuất

Phương pháp sản xuất phải tạo ra được một vắc xin phế cầu cộng hợp đảm bảo về tính an toàn và tính sinh miễn dịch ở người. Quy trình sản xuất polysaccharid và chất mang phải dựa trên cơ sở một hệ thống chủng giống.

Phương pháp sản xuất phải được thẩm định để chứng minh sản phẩm đạt yêu cầu về an toàn theo tiêu chuẩn vắc xin và huyết thanh miễn dịch dùng cho người.

Chủng gốc và chủng sản xuất

Mỗi chủng gốc phải có hồ sơ chủng (nguồn gốc chủng, các kết quả kiểm tra xác định các đặc tính sinh lý, sinh hóa, huyết thanh học và di truyền của chủng,...).

Chủng *S. pneumoniae* dùng để sản xuất vắc xin phế cầu cộng hợp phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận. Mỗi chủng phải có khả năng sản sinh polysaccharid

VẮC XIN PHÉ CẦU CỘNG HỢP HẤP PHỤ

của từng týp huyết thanh tương ứng với sản lượng ổn định, đủ đáp ứng miễn dịch và an toàn cho người.

Canh trường nuôi cấy chủng sản xuất phải có những đặc tính giống chủng gốc: là vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh nha bào, quan sát dưới kính hiển vi có hình thái điển hình của *S. pneumoniae*, phát triển thích hợp ở 37 °C, khuẩn lạc trơn có vòng tan máu alpha; bị ly giải bởi muối mật, lên men inulin, nhạy cảm với optochin, dương tính với phản ứng Quellung.

Nuôi cấy và gặt

Các chủng sản xuất được nuôi cấy trên môi trường không chứa các thành phần tạo tủa khi tinh chế polysaccharid.

Sự thuần khiết của vi khuẩn trước khi tách chiết thu polysaccharid phải được kiểm tra theo phương pháp thích hợp như nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa phù hợp. Nếu có sự nhiễm tạp, môi trường nuôi cấy bị hủy bỏ.

Tinh chế polysaccharid

Mỗi một týp huyết thanh *S. pneumoniae* được nuôi cấy riêng biệt trên môi trường lỏng không chứa polysaccharid khối lượng phân tử cao, nếu một trong các thành phần nuôi cấy có chứa thành phần các nhóm máu thì quy trình sản xuất phải được thẩm định để chứng minh rằng sau khi tinh chế sẽ loại bỏ được chất này.

Sau khi bất hoạt, polysaccharid được tách và tinh chế bằng các phương pháp như tủa phân đoạn, sắc ký, xử lý bằng enzym và siêu ly tâm.

Polysaccharid tinh chế phải đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp:

Nhận dạng: Phải dương tính với từng týp kháng nguyên phế cầu. Xác định bằng phương pháp huyết thanh học hoặc quang phổ cộng hưởng từ ¹H (hoặc ¹³C).

Thành phần polysaccharid: Được xác định dựa trên khối lượng khô của polysaccharid hoặc phần trăm nitrogen tổng số, phosphorus, acid uronic, hexosamin, methyl pentose và O-acetyl nhóm bằng cách sử dụng các phương pháp so màu hoặc sắc ký trao đổi ion. Tiêu chuẩn phải được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận.

Độ ẩm: Nếu polysaccharid được bảo quản dưới dạng đông khô, hàm lượng ẩm phải được kiểm tra và nằm trong giới hạn tiêu chuẩn được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận.

Protein tạp chất: Không được quá 3,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng phương pháp Lowry.

Acid nucleic tạp chất: Không được quá 2,0 % so với khối lượng polysaccharid. Xác định bằng cách đo độ hấp thụ của acid nucleic ở bước sóng 260 nm hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

Chất gây sốt: Đạt yêu cầu về chất gây sốt (Phụ lục 15.12). Sử dụng phương pháp xác định chất gây sốt trên thỏ.

Nội độc tố vi khuẩn: Xác định nội độc tố theo Phụ lục 13.2. Hàm lượng nội độc tố ít hơn 0,5 EU/µg polysaccharid.

Kích thước phân tử: Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Sử dụng phương pháp sắc ký lọc gel hoặc sắc ký trao đổi ion. Hằng số phân bố K_D được xác định bằng cách đo sự phân

bổ theo kích thước phân tử của polysaccharid của đỉnh (pic) chính của đường cong phân tách.

Hoạt hóa polysaccharid

Polysaccharid được hoạt hóa bằng phương pháp hóa học trước khi cộng hợp.

Trước và trong quá trình hoạt hóa bằng phương pháp hóa học, các polysaccharid được chia thành các đơn phân (partially depolymerized).

Các polysaccharid được hoạt hóa đạt các chỉ tiêu dưới đây mới được sử dụng trong quá trình cộng hợp:

Kích thước phân tử: Kích thước phân tử của từng kháng nguyên phé cầu nằm trong tiêu chuẩn được cơ quan quản lý quốc gia chấp thuận. Xác định bằng phương pháp sắc ký lọc gel hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

Protein mang

Protein mang được sử dụng để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch ở tế bào T. Chủng sản xuất protein mang (cộng hợp) phải có hồ sơ chủng bao gồm nguồn gốc chủng, các đặc tính sinh lý, sinh hóa, tính an toàn. Sự phát triển của chủng phải cho thấy có tính ổn định bằng cách giám sát tỷ lệ mọc của vi khuẩn, pH của nuôi cấy và sản lượng. Độ tinh khiết của canh trường nuôi cấy phải được kiểm tra, canh trường nuôi cấy được bất hoạt và được tinh chế bằng phương pháp thích hợp.

Các protein mang thường được sử dụng là: Giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, protein CRM 197, protein D - protein bề mặt tế bào của vi khuẩn không điển hình *Haemophilus influenza*.

Protein mang đạt các yêu cầu dưới đây mới được sử dụng để pha chế bán thành phẩm cộng hợp:

Nhận dạng: Phải cho phản ứng dương tính. Xác định bằng phương pháp huyết thanh học.

Vô trùng: Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

Nội độc tố vi khuẩn: Không được quá 1,0 EU/ μ g protein.

Hàm lượng protein: Không được ít hơn 90 % hàm lượng protein tổng số. Được xác định bằng phương pháp phù hợp đã được thẩm định.

Bán thành phẩm đơn giá

Sự cộng hợp xảy ra khi có polysaccharid đã được hoạt hóa gắn với protein mang qua liên kết cộng hóa trị bằng nhiều phương pháp khác nhau, phụ thuộc vào nhà sản xuất. Quy trình tinh chế sản phẩm cộng hợp nhằm loại bỏ hóa chất tồn dư của quá trình cộng hợp bằng phương pháp thích hợp.

Chỉ bán thành phẩm đơn đạt các yêu cầu dưới đây mới được pha chế thành bán thành phẩm cuối cùng.

Nhận dạng: Sử dụng phương pháp huyết thanh học, phản ứng dương tính với từng kháng nguyên phé cầu.

Hóa chất tồn dư: Không được có hóa chất tồn dư. Xác định bằng phương pháp sắc ký khối phổ hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

Tỷ lệ polysaccharid - protein: Từ 0,3 đến 3,0 đối với từng kháng nguyên phé cầu. Thực hiện bằng cách xác định từng hàm lượng polysaccharid và hàm lượng protein hoặc xác

định trực tiếp tỉ lệ này bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ cộng hưởng từ ^1H hoặc phương pháp khác đã được thẩm định.

Polysaccharid cộng hợp và polysaccharid tự do: Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Xác định bằng phương pháp thích hợp đã được thẩm định.

Hàm lượng protein: Theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất đối với từng tít kháng nguyên. Xác định bằng phương pháp thích hợp đã được thẩm định như phương pháp sắc ký lỏng, sắc ký mao quản,....

Vô trùng: Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

Tính độc đặc hiệu của protein mang: Không có tính độc. Áp dụng với protein mang là giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu; tiến hành theo phương pháp đã được thẩm định.

Nội độc tố vi khuẩn: Không được lớn hơn 0,75 EU/ μ g polysaccharid. Sử dụng phương pháp LAL test.

Kiểm định bán thành phẩm cuối cùng

Tá được, chất bảo quản được bổ sung với một lượng thích hợp các bán thành phẩm cộng hợp của từng kháng nguyên phé cầu để được bán thành phẩm cuối cùng. Bán thành phẩm cuối cùng chỉ được phép pha chế thành thành phẩm khi đạt yêu cầu sau:

Vô trùng: Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 5.7).

Kiểm định vắc xin thành phẩm

Nhận dạng: Phải dương tính với từng kháng nguyên phé cầu. Xác định bằng phương pháp miễn dịch học.

Vô trùng: Đạt yêu cầu về vô trùng (Phụ lục 15.7).

Hàm lượng polysaccharid: Trong khoảng $\pm 30,0$ % hàm lượng polysaccharid ghi trên nhãn. Xác định hàm lượng polysaccharid của từng kháng nguyên phé cầu hoặc polysaccharid tổng số bằng phương pháp miễn dịch học hay phương pháp khác đã được thẩm định.

Độ ẩm tồn dư: Không được quá 2,5 % và không có lọ nào quá 3,0 % (Phụ lục 15.35). Áp dụng cho vắc xin phé cầu dạng đông khô.

Nội độc tố vi khuẩn: Đạt theo tiêu chuẩn đã đăng ký với cơ quan Kiểm định quốc gia. Phương pháp xác định theo Phụ lục 13.2.

Nhôm: Không được quá 1,25 mg trong 1 liều đơn dùng cho người (Phụ lục 15.27).

Hàm lượng chất bảo quản: Tiến hành theo phương pháp thích hợp đã được thẩm định, tiêu chuẩn phải được cơ quan Kiểm định quốc gia chấp thuận.

An toàn không đặc hiệu: Vắc xin đạt yêu cầu về an toàn không đặc hiệu khi tất cả các chuột thử nghiệm sống sót và tăng cân sau 7 ngày theo dõi (Phụ lục 15.11).

pH

Đối với vắc xin là chế phẩm dạng lỏng: Giá trị pH nằm trong khoảng mà cho thấy là an toàn và hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu tính ổn định (Phụ lục 15.33).

DƯỢC ĐIỂN VIỆT NAM VI

Đối với vắc xin là chế phẩm đông khô: Tiến hành đo pH sau khi hoàn nguyên với dung dịch thích hợp; giá trị pH nằm trong khoảng mà cho thấy là an toàn và hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu tính ổn định (Phụ lục 15.33).

Cảm quan: Quan sát bằng mắt thường vắc xin không có dấu hiệu bất thường: lỏng nút, nắp, hàn không đạt yêu cầu, nứt, vỡ, không có vật thể lạ...

Đóng gói

Phải tuân thủ theo GMP và các quy định hiện hành.

Bảo quản, hạn dùng

Trong bao bì kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Các tuyên bố về hạn sử dụng, nhiệt độ bảo quản sẽ phải dựa trên kết quả nghiên cứu về tính ổn định của vắc xin và phải được cơ quan có thẩm quyền phê duyệt..

Nhãn

Những thông tin ghi trên nhãn, hộp, tờ hướng dẫn sử dụng phải đáp ứng các quy định hiện hành và đặc biệt phải ghi đủ các thông tin về hàm lượng của từng polysaccharid; tên và hàm lượng của protein mang của 1 liều sử dụng cho người; tên, hàm lượng của chất hấp phụ; điều kiện sử dụng, bảo quản vắc xin (lắc trước khi dùng, không được để đông băng).

VẮC XIN TÁI TỔ HỢP PHÒNG PAPILLOMA VIRUS Ở NGƯỜI

Vaccinum papillomaviri humani (ADNr)

Vắc xin tái tổ hợp phòng papilloma virus ở người là chế phẩm vô trùng chứa các hạt giống virus (VLPs) nhưng không gây bệnh; có độ tinh khiết cao, chứa protein capsid chính (L1) của một hoặc nhiều týp HPV (HPV- Human Papilloma Virus).

Các kháng nguyên HPV được điều chế theo công nghệ tái tổ hợp ADN. Tùy theo nhà sản xuất, VLPs tinh khiết có thể được hấp phụ vào tá chất dạng phối hợp nhôm hydroxyd và 3-0-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (MPL) hoặc nhôm phosphat ngâm nước.

Sản xuất

Vắc xin HPV được sản xuất bằng cách đưa gen mã hóa protein capsid (L1) của virus vào tế bào nấm men hoặc biểu hiện trên hệ vector Baculovirus rồi nhân lên trên tế bào côn trùng, sau đó thu hoạch và tinh chế VLPs. Tính an toàn và phù hợp của hệ thống vector biểu hiện này cần được phê chuẩn của cơ quan quản lý có thẩm quyền. Việc sản xuất vắc xin HPV dựa vào hệ thống ngân hàng tế bào và chủng giống gốc. Tính an toàn và hiệu quả của vắc xin cần được chứng minh qua các kết quả nghiên cứu trên lâm sàng.

Vắc xin mẫu chuẩn: Vắc xin HPV chuẩn được lấy từ 1 lô vắc xin đối chứng hoặc một trong các lô vắc xin đã được

VẮC XIN TÁI TỔ HỢP PHÒNG PAPILLOMA VIRUS Ở NGƯỜI

nghiên cứu lâm sàng được khẳng định là an toàn và có hiệu quả bảo vệ. Vắc xin mẫu chuẩn cần phải đạt yêu cầu về tính ổn định.

Đánh giá đặc tính VLPs

Đặc tính của VLPs phải được đánh giá trên các lô trong quá trình phát triển vắc xin bao gồm cả các lô thử nghiệm quy trình sản xuất. Các kỹ thuật thường dùng để đánh giá đặc tính của VLPs bao gồm: Xác định thành phần protein bằng kỹ thuật SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), Western Blot, hấp phụ khối, phân tích trình tự amino acid hoặc bản đồ peptid. Hình thái và mức độ kết hợp của các VLPs cũng được xác định để khẳng định các epitop có mặt trong vắc xin và là yếu tố cần thiết tạo hiệu quả cho vắc xin. Các VLPs cũng có thể được xác định thông qua kính hiển vi lực nguyên tử (atomic force microscopy), kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy, TEM); tán xạ ánh sáng động {Dynamic light scattering (DLS)}, bản đồ epitop và phản ứng trung hòa với các kháng thể đơn dòng. Bên cạnh đó, các thành phần protein, lipid, acid nucleic và carbon hydrat cũng cần được xác định trong quá trình sản xuất vắc xin. Hàm lượng protein tế bào chủ tồn dư (có nguồn gốc từ tế bào côn trùng) phải nằm trong giới hạn an toàn theo quy định của cơ quan có thẩm quyền.

Ngân hàng tế bào và chủng giống gốc

Sản xuất vắc xin trên tế bào nấm men tái tổ hợp

Chỉ các ngân hàng tế bào đạt các yêu cầu về nhận dạng, độ tinh khiết, khả năng mọc và tính ổn định mới được đưa vào sản xuất vắc xin. Tính đồng nhất về gen cần được nghiên cứu đánh giá trên cả ngân hàng tế bào gốc và ngân hàng tế bào sản xuất. Cần mô tả đầy đủ các đặc tính sinh học của tế bào chủ và các vector biểu hiện.

Việc kiểm tra các đặc tính sinh học trong quá trình sản xuất nhằm thúc đẩy và kiểm soát sự biểu hiện của gen đã chèn trong tế bào vật chủ cần mô tả chi tiết, bao gồm các đặc tính di truyền, cấu trúc của tế bào chủ và cấu trúc của vector biểu hiện cũng như cấu trúc đoạn gen được tách dòng. Trình tự nucleotid của đoạn gen chèn vào và của các đoạn liên kết của vector với trình tự enzym giới hạn của vector chứa đoạn gen chèn vào phải được cung cấp. Phải cung cấp các dữ liệu ổn định của hệ thống vector biểu hiện trong ngân hàng tế bào tái tổ hợp qua các đời cấy chuyển, bảo quản.

Sản xuất vắc xin trên tế bào côn trùng/hệ thống vector biểu hiện Baculovirus

Trên tế bào côn trùng:

Chỉ ngân hàng tế bào đạt các yêu cầu về nhận dạng, độ tinh khiết, khả năng mọc, tính ổn định, các yếu tố ngoại lai, tính sinh khối u thì mới được đưa vào sản xuất. Các đặc tính này có thể được đánh giá ở các giai đoạn phù hợp trong quá trình sản xuất. Phương pháp kiểm tra là các phương pháp chuẩn trong dược điển hoặc các phương pháp phù