



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0028730

(51)⁷ A61K 47/48; A61P 31/00; A61K 31/70; (13) B
A61K 38/00

(21) 1-2015-00085

(22) 19/06/2013

(86) PCT/KR2013/005392 19/06/2013

(87) WO/2013/191459 27/12/2013

(30) 10-2012-0065893 20/06/2012 KR

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/06/2015 327A

(73) SK Bioscience Co., Ltd. (KR)

(Sampyeong-dong) 310, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13494, Republic of Korea.

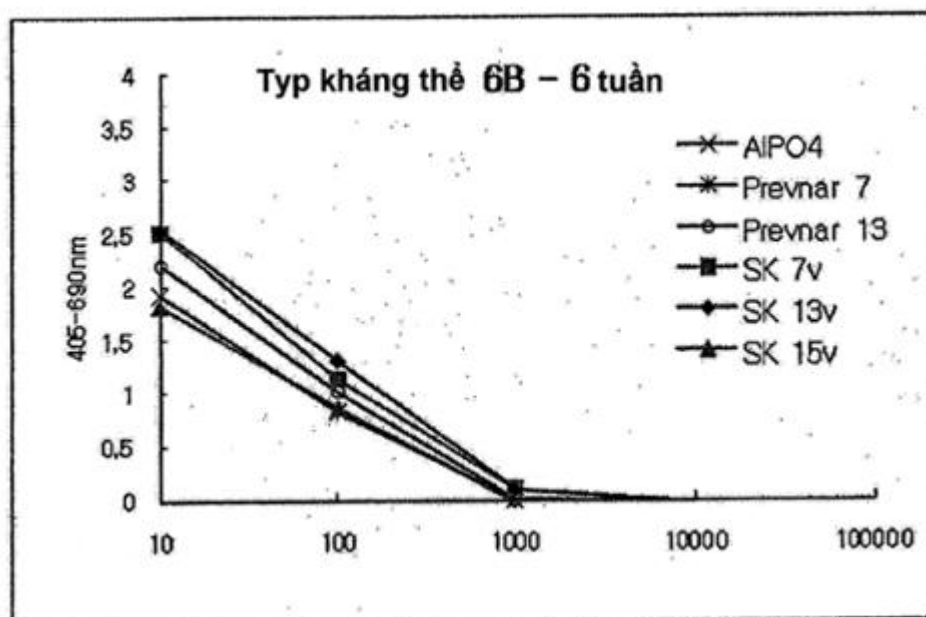
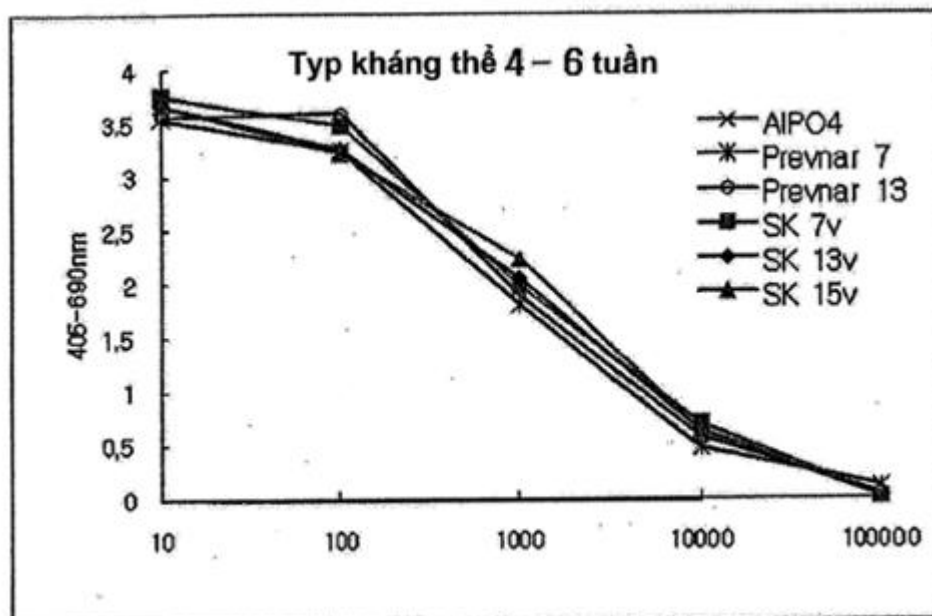
(72) SHIN, Jin-Hwan (KR); YANG, Ji-Hye (KR); HAM, Dong-Soo (KR); PARK, Mahn-Hoon (KR); KIM, Hun (KR); NOH, Myeong-Ju (KR); PARK, Su-Jin (KR); YANG, Seon-Young (KR).

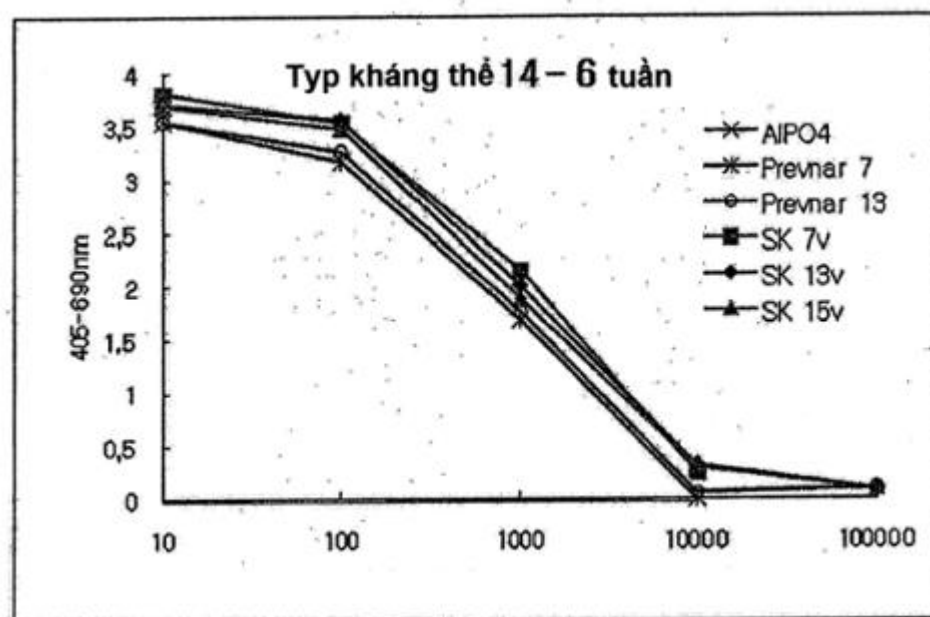
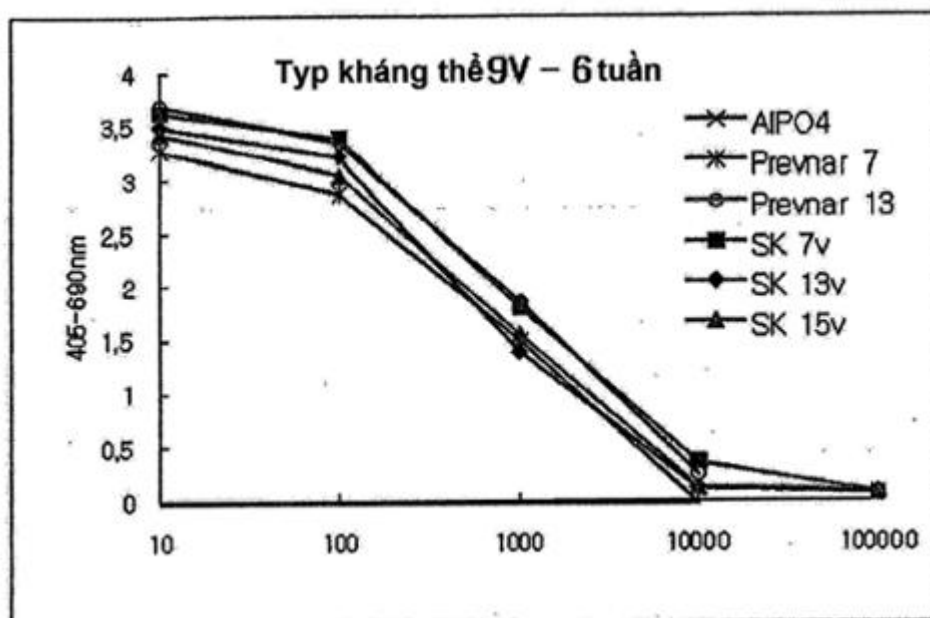
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

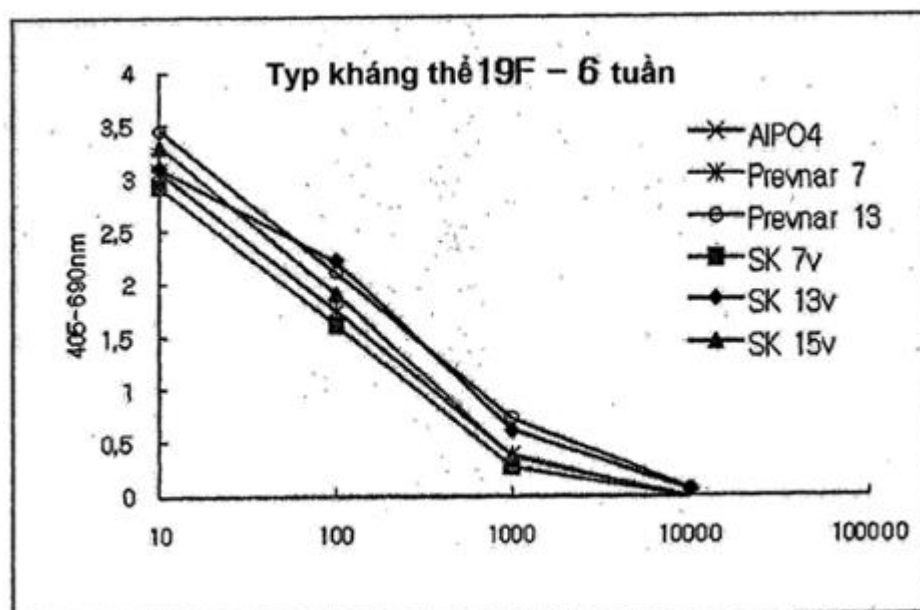
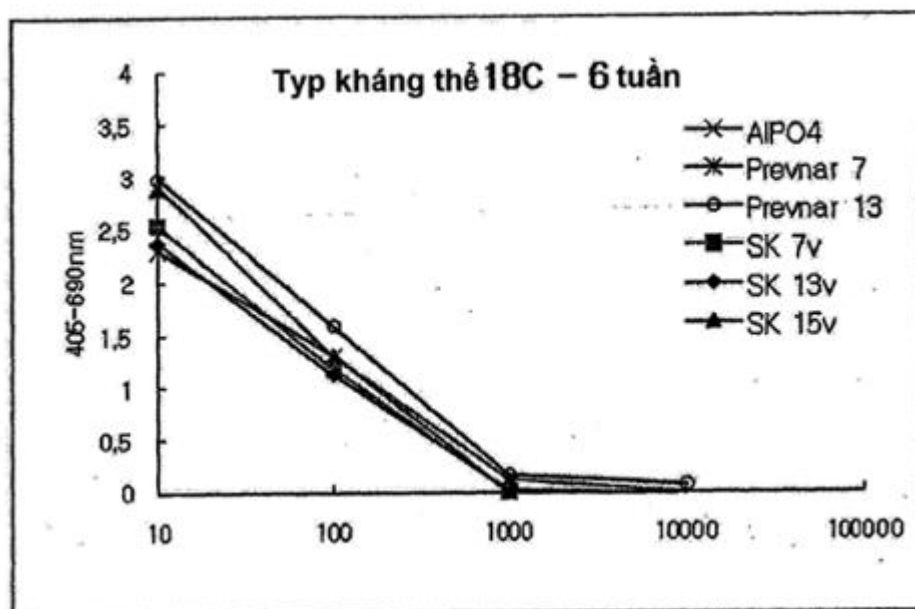
(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH ĐA HÓA TRỊ TỪ THỂ TIẾP HỢP

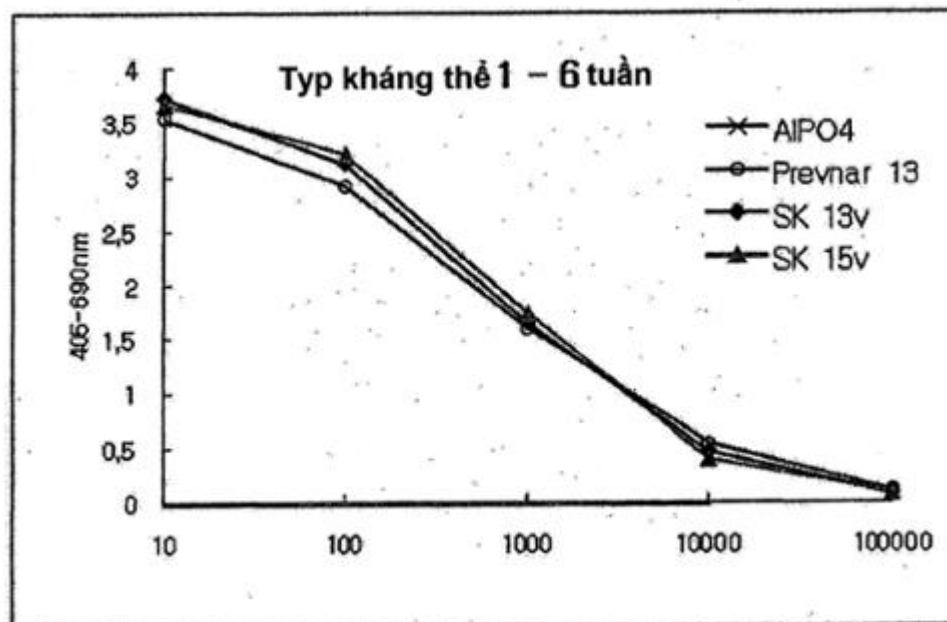
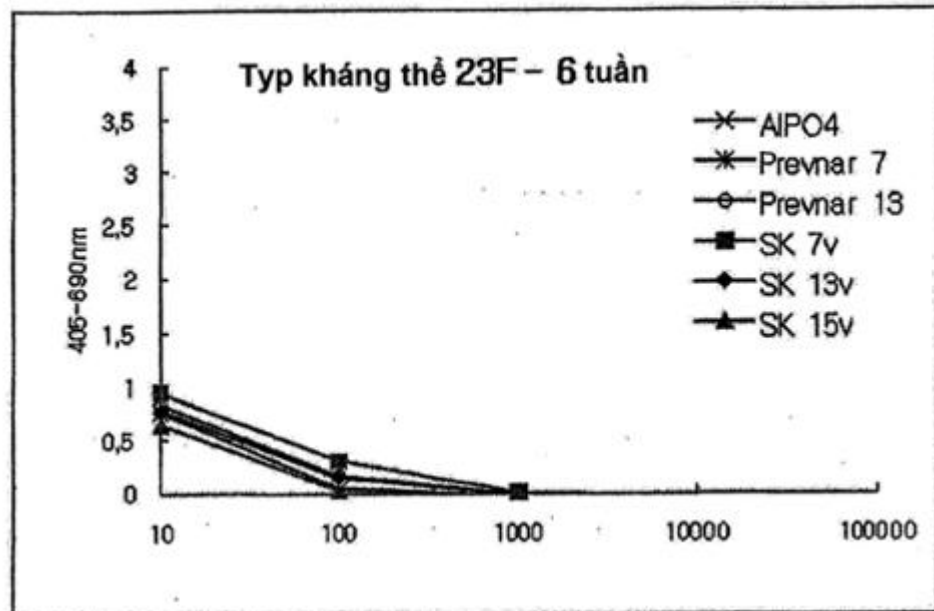
POLISACARIT-PROTEIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH NÀY

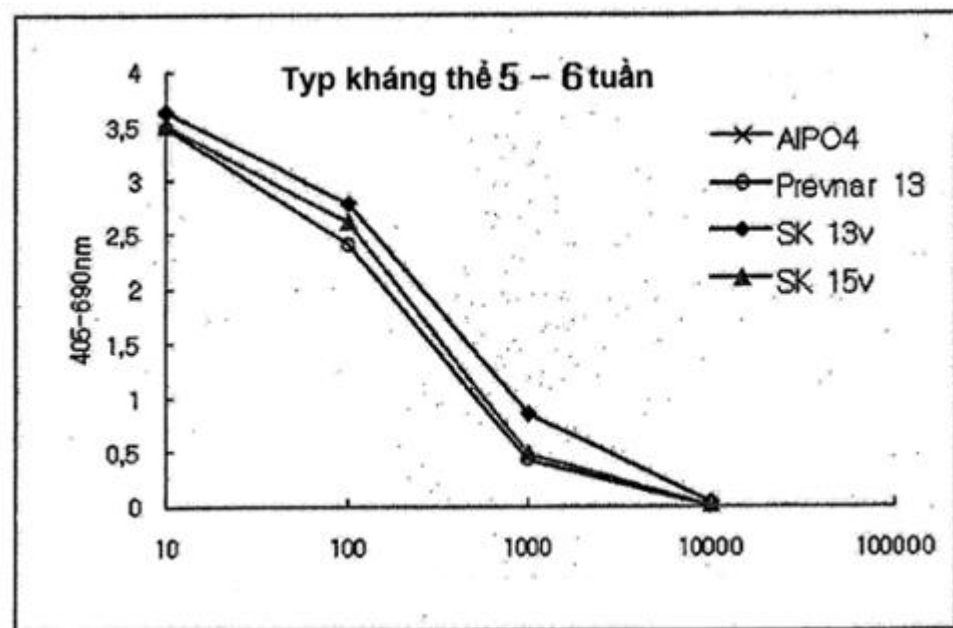
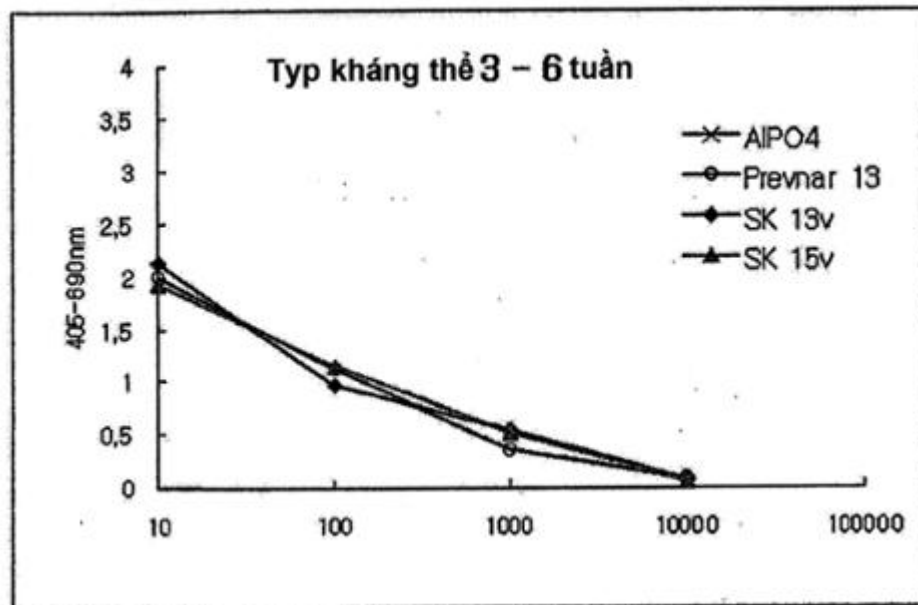
(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 15 thể tiếp hợp polisacarit-protein riêng biệt. Mỗi thể tiếp hợp chứa polisacarit dạng nang được bào chế từ typ huyết thanh phé cầu khuẩn khác nhau kết hợp với protein mang, đó là, typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F. Chế phẩm sinh miễn dịch được bào chế thành vacxin bao gồm chất phụ trợ gốc nhôm để tăng phạm vi ứng dụng nhằm đối phó với bệnh phé cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

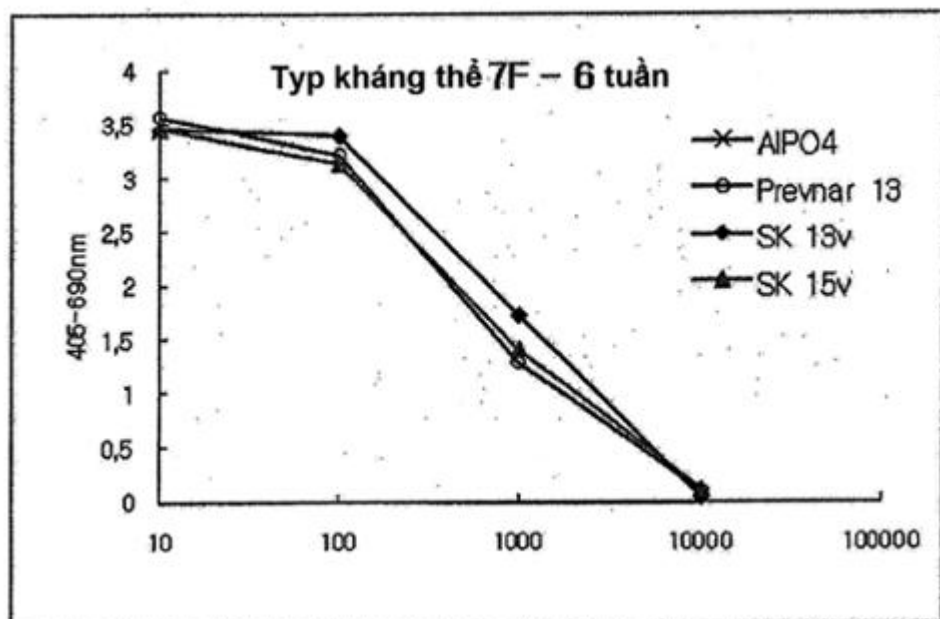
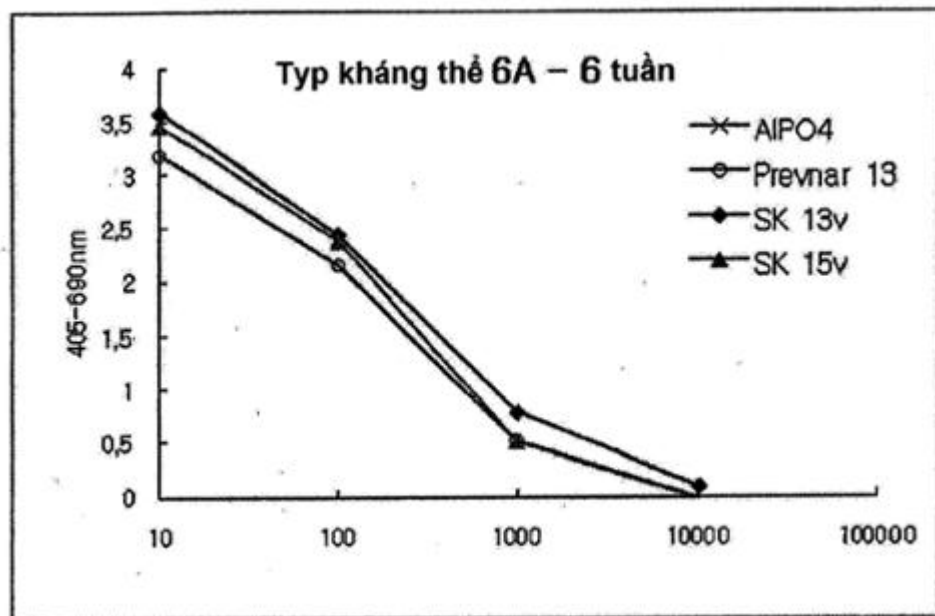


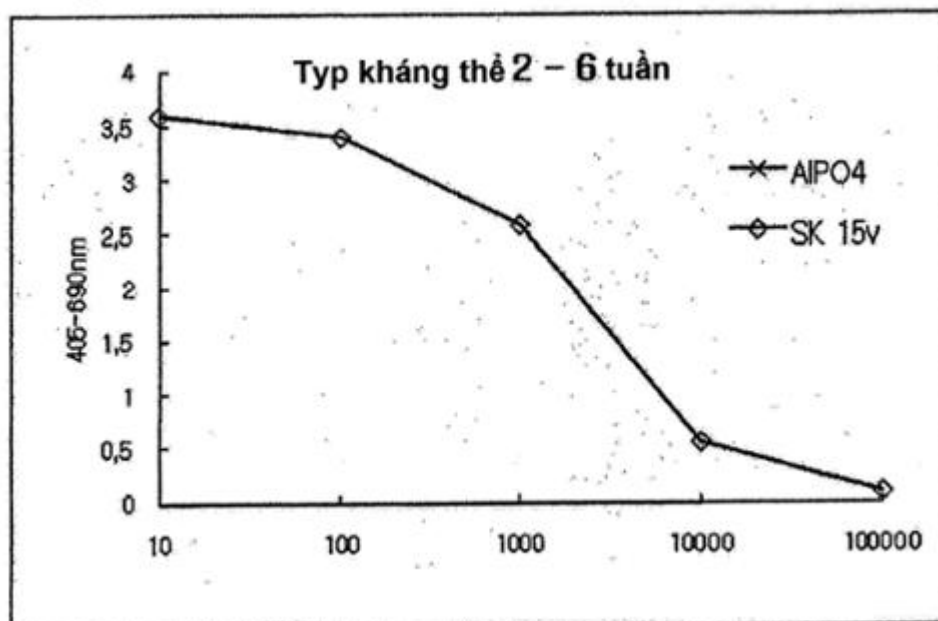
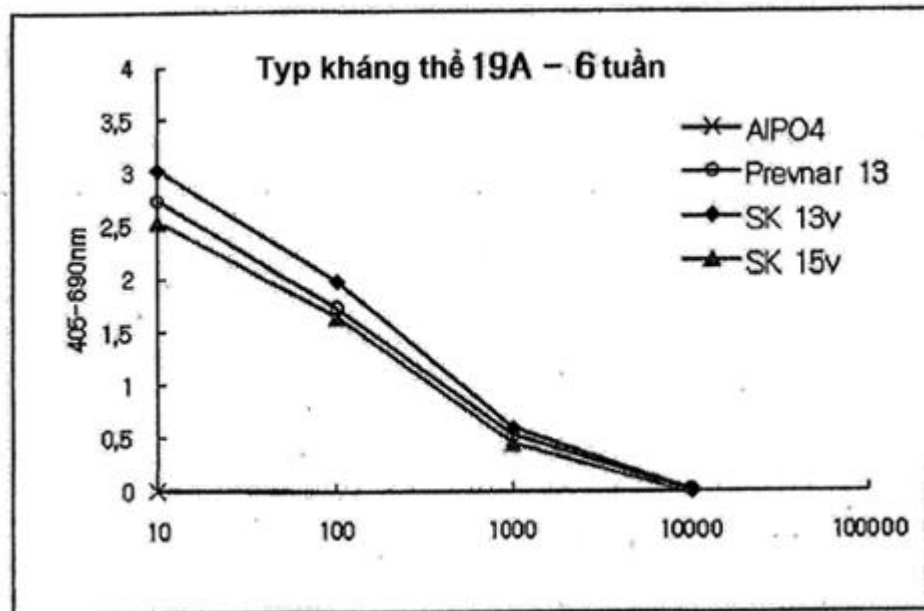


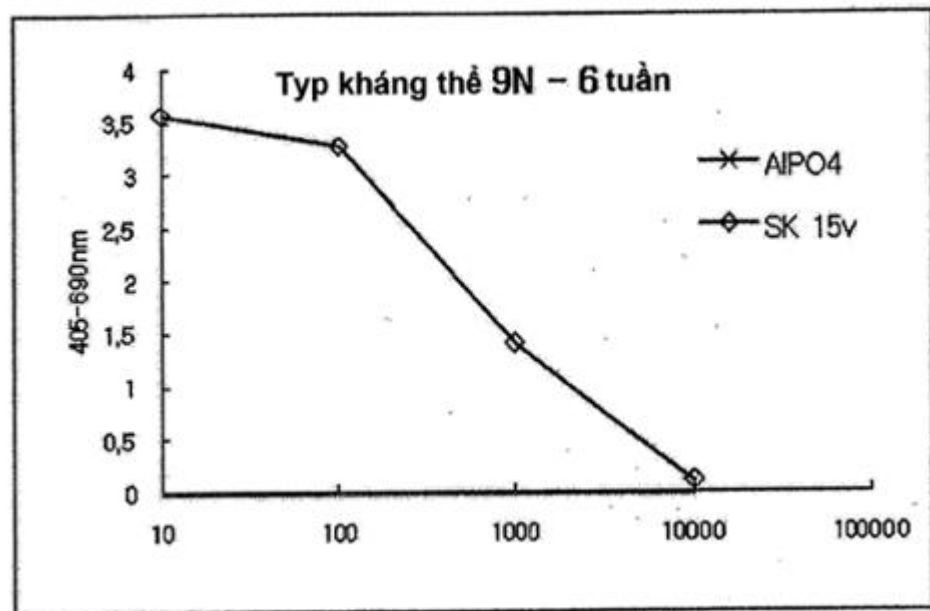












Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị bao gồm: 15 thể tiếp hợp polisacarit-protein riêng biệt được bào chế bằng cách liên hợp polisacarit dạng nang dẫn xuất từ typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae*, 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F với protein mang như là CRM₁₉₇. Sáng chế đề cập chung tới lĩnh vực y học, cụ thể là tới lĩnh vực vi trùng học, miễn dịch học, vaccin và tới việc ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, và người lớn bằng cách gây miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus pneumoniae là nguyên nhân hàng đầu của bệnh viêm phổi. Theo tài liệu Mortality Trend by Cause năm 2010 xuất bản bởi National Statistical Office, viêm phổi là 1 trong 10 nguyên nhân hàng đầu dẫn tới tử vong, với 14,9 ca tử vong trên 100000 người, tức là đã tăng thêm 82,9% từ năm 2000. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cũng ước tính rằng trong năm 2012 trên toàn thế giới có 476000 trẻ nhỏ âm tính với HIV dưới 5 tuổi tử vong vì nhiễm phải *Streptococcus pneumoniae*, chiếm 5% trên tổng số ca tử vong của trẻ nhỏ dưới 5 tuổi.

Năm 1977, bác sĩ Robert Austrian đã phát triển ra vaccin phế cầu khuẩn polisacarit 14-hóa trị để ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn và vaccin này được phát triển thành vaccin polisacarit 23-hóa trị. Vaccin polisacarit phế cầu khuẩn đa hóa trị đã cho thấy khả năng đáng kể trong việc ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở người trưởng thành và ở bệnh nhân có nguy cơ cao. Tuy nhiên, trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ phản ứng rất kém với hầu hết phế cầu khuẩn polisacarit do phản ứng miễn dịch độc lập của tế bào T. Vaccin liên hợp phế cầu khuẩn 7-hóa trị (7vPnC, Prevnar®) chứa polisacarit dạng nang từ 7 typ huyết thanh phổ biến nhất là 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F. Từ khi được phê chuẩn tại Hoa Kỳ năm 2000, Prevnar vẫn luôn thể hiện khả năng gây miễn dịch cao và hiệu quả chống bệnh xâm lấn và viêm tai giữa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Loại vaccin này hiện nay đang được chấp nhận tại khoảng 80 quốc gia trên thế giới. Prevnar được sử dụng ước tính khoảng 80-90%, 60-80%, và 40-80% đối với bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD) tại Hoa Kỳ, châu Âu, và các vùng khác trên thế giới. Như đã dự đoán, dữ liệu giám sát thu thập tại Hoa Kỳ trong những năm sau khi công bố Prevnar đã cho thấy rõ sự sụt giảm số

ca phế cầu khuẩn xâm lấn gây ra bởi typ huyết thanh nằm trong danh mục của Prevnar. Tuy nhiên, phạm vi sử dụng của typ huyết thanh bị hạn chế tại một số vùng và bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn gây ra bởi typ huyết thanh không nằm trong danh mục của Prevnar, cụ thể như 19A, lại gia tăng.

Tháng Hai năm 2010, Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) đã khuyến nghị về vaccin liên hợp phế cầu khuẩn 13-hóa trị (PCV-13) khi ấy mới được phê chuẩn cho tiêm chủng. PCV-13 là vaccin liên hợp phế cầu khuẩn bao gồm 6 typ huyết thanh bổ sung (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) cộng với 7 typ huyết thanh (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) có sẵn trong danh mục của Prevnar. US Active Bacterial Core surveillance (ABCs), có 64% trên tổng số ca IPD được ghi nhận là typ huyết thanh gây bệnh trong số trẻ nhỏ dưới 5 tuổi được điều trị bằng PCV-13. Năm 2007, chỉ 70 ca trong số 4600 ca IPD ở trẻ nhỏ dưới 5 tuổi được điều trị bằng PCV7, trong khi đa số còn lại, khoảng 2900 ca được điều trị bằng PCV-13. Hiện nay, vaccin liên hợp phế cầu khuẩn 15-hóa trị đang được phát triển trong đó bao gồm typ huyết thanh bổ sung mà tỷ lệ mắc phải tăng thêm cùng với việc thay thế typ huyết thanh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do vậy, sáng chế đề xuất chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị cho việc ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ và người lớn, bao gồm polisacarit dạng nang dẫn xuất từ 15 typ huyết thanh phế cầu khuẩn bao gồm typ huyết thanh 2 và 9N. Cụ thể, sáng chế đề cập tới chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 15-hóa trị (PCV-15) bao gồm typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một khía cạnh của sáng chế, đối tượng đề cập là chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị, bao gồm 15 thể tiếp hợp polisacarit-protein riêng biệt cùng với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý học, trong đó mỗi thể tiếp hợp chứa polisacarit dạng nang dẫn xuất từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* liên hợp với protein mang, và polisacarit dạng nang được bào chế từ typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.

Trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo như sáng chế, protein mang có thể là CRM₁₉₇. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo như sáng chế còn có thể chứa chất phụ trợ, ví dụ như, chất phụ trợ cấu thành từ chất phụ trợ gốc nhôm. Chất phụ trợ có thể được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit, và tốt hơn

là nhôm phosphat.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, đối tượng đề cập là dược phẩm nhằm tạo ra phản ứng miễn dịch đối với liên hợp polisacarit dạng nang *Streptococcus pneumoniae*, chứa một lượng hiệu quả về mặt miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch đã nêu.

Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm có thể là chế phẩm sinh miễn dịch được bào chế chứa: 2 µg của mỗi sacarit, ngoại trừ 6B ở mức 4 µg; khoảng 34 µg protein mang CRM₁₉₇; 0,125 mg chất phụ trợ nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); và natri clorua và natri suxinat đệm làm tá dược.

Hiệu quả của sáng chế

Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa polisacarit dạng nang dẫn xuất từ 15 typ huyết thanh phế cầu khuẩn riêng biệt bao gồm typ huyết thanh 2 và 9N, do đó dẫn tới độ chuẩn kháng huyết thanh IgG và hoạt động kháng thể chức năng được nâng cao. Bởi vậy, chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị có thể được thuận lợi sử dụng cho việc ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ và người lớn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ FIG.1 tới FIG.15 thể hiện mức của IgG typ huyết thanh-đặc hiệu đo được 3 tuần sau khi áp dụng tiêm thứ phát (tổng cộng 6 tuần) vacxin thuộc sáng chế và Ví dụ so sánh (Prevnam 7 và Prevnam 13).

Mô tả chi tiết sáng chế

Typ huyết thanh thay thế được tạo ra từ một số typ huyết thanh với khả năng đề kháng kháng sinh và đề kháng đa thuốc. Khác biệt địa lý trong việc phân phối typ huyết thanh đã dẫn đến sự chênh lệch về mức độ phổ biến của Prevnam giữa các vùng. (Harboe ZB, Benfield TL, Valentinier-Branth P. và cộng sự. Những xu thế heo thời gian ở bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn và typ huyết thanh phế cầu khuẩn qua 7 thập kỷ. Bệnh lâm sàng lây nhiễm 2010; 50:329-37). Bởi thế, không có lý do nào để loại bỏ bất kỳ typ huyết thanh nào trong vacxin liên hợp phế cầu khuẩn sẵn có hiện giờ. Đúng hơn, nhu cầu là phải tăng thêm phạm vi sử dụng của thuốc bằng cách thêm số lượng typ huyết thanh.

Năm 2008, Dự án Typ huyết thanh phế cầu khuẩn Toàn cầu (GSP) đã công bố báo cáo dựa trên dữ liệu IPD chọn ra từ năm 1980 đến năm 2007, trong đó cho thấy, đứng sau typ huyết thanh 18C, typ huyết thanh 2 đứng thứ 11 trong top 20 typ huyết thanh toàn cầu về tỷ lệ mắc bệnh. Thêm vào đó, Samir K. Saha và cộng sự đã báo cáo

rằng typ huyết thanh 2 có thể trở thành mối đe dọa vì nó có khả năng cao gây ra *Streptococcus pneumoniae* màng não ở Bangladesh nhưng lại không được đưa vào trong bất kỳ vaccin liên hợp phế cầu khuẩn nào (Saha SK, Al Emran HM, Hossain B, Darmstadt GL, Saha S, và cộng sự. (2012) *Streptococcus pneumoniae*, Typ huyết thanh-2, Viêm màng não ở trẻ nhỏ tại Bangladesh: mối đe dọa lây nhiễm phế cầu khuẩn mới được nhận biết. PLoS ONE 2012; 7(3): e32134). Bởi thế, nếu thêm vào typ huyết thanh 2, số lượng ca bệnh phế cầu khuẩn có thể giảm đi và thêm nữa là có thể điều chế typ huyết thanh thay thế có khả năng xảy ra với khâu tiêm chủng bằng PCV-13.

Typ huyết thanh phế cầu khuẩn cho thấy mô thức phân phối thay đổi theo độ tuổi. Cụ thể là, typ huyết thanh 9N được nhận định là tương đối quan trọng ở trẻ sơ sinh từ 0 đến 23 tháng tuổi, nếu so với trẻ nhỏ từ 24 đến 59 tháng tuổi. Typ huyết thanh 9N xếp thứ 14 sau 13 typ huyết thanh phổ biến nhất được đưa vào PCV-13. Điều này cho thấy việc bao gồm typ huyết thanh 9N sẽ đóng góp vào việc giảm thấp ca bệnh phế cầu khuẩn đặc biệt là ở trẻ sơ sinh.

Sáng chế đề cập chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị bao gồm polisacarit dạng nang dẫn xuất từ 15 typ huyết thanh phế cầu khuẩn bao gồm typ huyết thanh 2 và 9N. Cụ thể, sáng chế đề cập chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị, bao gồm: 15 thể tiếp hợp polisacarit-protein riêng biệt, cùng chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý học, trong đó mỗi thể tiếp hợp chứa polisacarit dạng nang từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* liên hợp với protein mang, và polisacarit dạng nang được bào chế từ typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.

Polisacarit dạng nang có thể được bào chế theo kỹ thuật tiêu chuẩn được biết đến trong giải pháp kỹ thuật đã biết. Polisacarit dạng nang có thể được thu giảm kích cỡ nhằm giảm độ bám hoặc tăng độ hòa tan của polisacarit dạng nang đã hoạt hóa. Trong sáng chế, polisacarit dạng nang được bào chế từ typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F của *Streptococcus pneumoniae*. Những thể tiếp hợp phế cầu khuẩn này được bào chế bằng quá trình riêng biệt và được bào chế thành liều chế phẩm riêng lẻ. Ví dụ như, mỗi typ huyết thanh polisacarit phế cầu khuẩn được nuôi cấy trong môi trường đậu tương rồi được tinh chế bằng quá trình quay ly tâm, kết tủa, và siêu lọc.

Protein mang tốt hơn là protein không tính độc và không gây phản ứng và có thể thu được liều lượng cùng độ tinh khiết đủ dùng. Protein mang nên phù hợp với phương

pháp liên hợp tiêu chuẩn. Trong chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị của sáng chế, protein mang có thể là CRM₁₉₇. CRM₁₉₇ là biến thể không tính độc (i.e., biến độc tố) của độc tố bạch hầu được phân lập từ nhóm nuôi cấy của chủng *Corynebacterium diphtheria* C7 (β 197) phát triển trong axit casamino và môi trường chiết xuất nấm men. CRM₁₉₇ được tinh chế bằng quá trình siêu lọc, kết tủa amoni sulfat, và sắc ký trao đổi ion. Mặt khác, CRM₁₉₇ được tái tổ hợp điều chế tương ứng với Patent Hoa Kỳ số 5,614,382.

Biến độc tố bạch hầu khác cũng phù hợp để làm protein mang. Protein mang phù hợp khác bao gồm độc tố vi khuẩn vô hoạt như biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà; biến độc tố bệnh tả (WO2004/083251). *E. coli* LT, *E. coli* ST, và ngoại độc tố A từ *Trực khuẩn mủ xanh*. Protein màng ngoài vi khuẩn như là phức hợp màng ngoài C (OMPC), protein lỗ, protein chuyển-gắn kết (transferring-binding), pneumolysin, protein bề mặt phế cầu khuẩn A (PspA), protein bám dính phế cầu khuẩn (PsaA), C5a peptidase từ Nhóm A hoặc Nhóm B liên cầu, hoặc protein influenza haemophilus D, cũng có thể được sử dụng. Protein khác như ovalbumin, hemocyanin limpet lỗ khóa (KLH), albumin huyết thanh bò (BSA) hoặc dẫn xuất protein đã tinh chế của lao tố (PPD) cũng có thể được sử dụng như protein mang. Độc tố bạch hầu biến thể như là CRM₁₇₃, CRM₂₂₈, và CRM₄₅ cũng có thể được sử dụng như protein mang.

Để điều chế polisacarit cho phản ứng với protein mang, polisacarit tinh chế đã hoạt hóa về mặt hóa học. Một khi được hoạt hóa, mỗi polisacarit dạng nang được liên hợp riêng biệt với protein mang để tạo thành thể tiếp hợp glico. Theo một phương án của sáng chế, polisacarit dạng nang liên hợp với cùng loại protein mang. Bước hoạt hóa hóa học của polisacarit và bước liên hợp tiếp đó với protein mang đạt được bằng phương tiện thông dụng (ví dụ xem, Patent Hoa Kỳ số 4,673,574 và 4,902,506). Nhóm hidroxyl trong polisacarit được oxy hóa thành nhóm andehit bằng tác nhân oxy hóa như là periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat, canxi periodat hoặc axit periodic). Việc hoạt hóa hóa học dẫn tới suy biến oxy hóa bất quy tắc của nhóm hidroxyl liên kề. Bước liên hợp đạt được bằng phản ứng khử. Ví dụ như, polisacarit dạng nang đã hoạt hóa và protein mang được cho phản ứng với tác nhân khử như natri xyanobohidrua. Nhóm andehit không phản ứng có thể bị loại bỏ bằng việc bổ sung tác nhân oxy hóa mạnh.

Sau khi đã liên hợp polisacarit dạng nang với protein mang, thể tiếp hợp polisacarit-protein được tinh chế (làm giàu tương ứng với hàm lượng của thể tiếp hợp polisacarit-protein) bằng nhiều kỹ thuật khác nhau. Kỹ thuật bao gồm cô đặc/bổ sung

dung môi, sắc ký cột, và lọc sâu. Thở tiếp hợp polisacarit-protein đã tinh chế được tổng hợp để chế phẩm hóa chế phẩm sinh miễn dịch của sáng chế, vốn có thể sử dụng như vaccin. Chế phẩm của chế phẩm sinh miễn dịch của sáng chế có thể đạt được bằng cách sử dụng phương pháp được công nhận trong giải pháp kỹ thuật đã biết. Ví dụ, 15 thể tiếp hợp phẩy cầu khuẩn riêng biệt có thể được bào chế với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý học để điều chế theo chế phẩm. Ví dụ của những chất dẫn thuốc như vậy bao chứa, nhưng không hạn chế ở, nước, dung dịch muối đậm, rượu đa chức (ví dụ: glycerin, glicol propylen, glicol polyetylen lỏng) và dung dịch đường dextroza.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch của sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều chất phụ trợ. Như định nghĩa trong bản mô tả, "chất phụ trợ" là chất có tác dụng tăng cường gây miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch thuộc sáng chế. Do vậy, chất phụ trợ được đưa vào để tạo ra phản ứng miễn dịch và được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất phụ trợ thích hợp để tăng cường hiệu quả của chế phẩm bao gồm, nhưng không hạn chế ở:

(1) muối nhôm (alum), như là nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm sulfat, v.v.;

(2) chế phẩm nhũ tương dầu-trong-nước (có hoặc không có tác nhân kích thích miễn dịch đặc hiệu như là muramyl peptit (định nghĩa dưới đây) hoặc thành phần của màng tế bào vi khuẩn), ví dụ như, (a) MF59 (WO 90/14837), chứa 5% Squalene, 0,5% Tween 80, và 0,5% span 85 (ngẫu nhiên có thể chứa nhiều lượng MTP-PE (xem bên dưới), dù không bắt buộc) được bào chế thành hạt siêu vi bằng máy vi lưu hóa như là máy vi lưu hóa Mẫu 110Y (Vi lưu hóa, Newton, MA), (b) SAF, chứa 10% Squalene, 0,4% Tween 80, 5% polime hãm-pluronic L121, và thr-MDP (xem bên dưới) hoặc được vi lưu hóa thành nhũ tương siêu vi hoặc được tạo xoáy để tạo ra nhũ tương có cỡ hạt lớn hơn, và (c) RibitTM Hệ thống chất phụ trợ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) chứa 2% Squalene, 0,2% Tween 80, và một hoặc nhiều thành phần của màng tế bào vi khuẩn từ nhóm bao gồm 3-O-deacylated monophosphorylipid A (MPLTM) được mô tả trong Patent Hoa Kỳ số 4,912,094 (Corixa), trehalosa dimycolate (TDM), và khung màng tế bào (CWS), tốt hơn là MPL + CWS (DetoxTM);

(3) chất phụ trợ saponin, như là Quil A hoặc STIMULONTM QS-21 (Kháng nguyên, Framingham, MA) (Patent Hoa Kỳ số 5,057,540) hoặc các hạt được hình thành từ đó như là ISCOM (phức hợp tăng cường miễn dịch);

(4) lipopolisacarit vi khuẩn, lipit tổng hợp A tương tự như hợp chất phosphat

glucozamin amino-ankyl (AGP), hoặc dẫn xuất hoặc tương tự của chúng, có thể được cung cấp từ Corixa, và được mô tả trong Patent Hoa Kỳ số 6,113,918; một trong các chất AGP là 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino]etyl 2-Deoxy-4-0-phosphono-3-0-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-b-D-glucopyranosit, mà cũng được ghi nhận là 529 (trước đây được ghi nhận là RC529), mà được bào chế ở thể nước hoặc nhũ tương ổn định,

(5) polynucleotit tổng hợp như là oligonucleotit bao gồm (các) môtip CpG (Patent Hoa Kỳ số 6,207,646);

(6) xytokin, như là interleukin (ví dụ: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, v.v.), interferon (ví dụ: interferon gamma), yếu tố kích thích khuẩn lạc ở đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF), yếu tố kích thích khuẩn lạc ở đại thực bào (M-CSF), yếu tố hoại tử u (TNF), phân tử đồng kích thích B7-1 và B7-2, v.v.;

(7) đột biến đã khử độc của độc tố vi khuẩn ADP-ribosylating như độc tố tả (CT) hoặc ở dạng thể hoang dại hoặc thể đột biến, ví dụ như, tại vị trí axit glutamic ở axit amin vị trí 29 được thế bởi axit amin khác, tốt hơn là histidin, tương ứng với WO 00/18434 (xem WO 02/098368 và WO 02/098369), độc tố ho gà (PT), hoặc độc tố không chịu nhiệt E. coli (LT), cụ thể là LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (xem ví dụ: WO 93/13302 và WO 92/19265); và

(8) thành phần bổ sung như là chất tam phân của thành phần bổ sung C3d.

Muramyl peptit bao gồm, nhưng không hạn chế ở, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoyl-sn-glyxero-3-hydroxyphosphoryloxy)-etylamin (MTP-PE), v.v..

Theo một phương án cụ thể, muối nhôm được sử dụng như chất phụ trợ. Chất phụ trợ muối nhôm có thể là vacxin kết tủa phèn hoặc vacxin hấp phụ phèn. Muối nhôm bao gồm, nhưng không hạn chế ở, nhôm oxit hydrat hoá, nhôm oxit trihydrat (ATH), nhôm hydrát, nhôm trihydrat, Alhydrogel, Superfos, Amphojel, nhôm hydroxit (III), nhôm hydroxyphosphat sulfat (chất phụ trợ nhôm phosphat (APA)), và nhôm oxit vô định hình. APA là huyền phù của nhôm hydroxyphosphat. Nếu nhôm clorua và natri phosphat được hòa theo tỷ lệ 1:1, sulfat nhôm hydroxyphosphat sẽ kết tủa. Hạt kết tủa được định kích cỡ thành 2-8µm bằng sử dụng thiết bị nghiền cắt tốc độ cao và thẩm tách với nước muối

sinh lý, theo sau đó là bước tiệt trùng. Theo một phương án của sáng chế, $\text{Al}(\text{OH})_3$ (ví dụ như, Alhydrogel hoặc Superfos) có bán trên thị trường được dùng để hấp phụ protein. 50-200g protein có thể được hấp phụ trên 1 mg nhôm hydroxit, và tỷ lệ này phụ thuộc vào điểm đẳng điện (pI) của protein và độ pH là dung môi. Protein có pI thấp được hấp phụ mạnh so với protein có pI cao. Muối nhôm cấu thành trạm kháng nguyên mà từ từ giải phóng kháng nguyên trong từ 2 tới 3 tuần, không đặc biệt chuyên hoạt hóa thực bào, bổ thể và cơ chế miễn dịch bẩm sinh.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm (ví dụ như vacxin) nhằm tạo ra phản ứng miễn dịch đối với liên hợp polisacarit dạng nang *Streptococcus pneumoniae*, chứa một lượng hiệu quả về mặt miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch.

Vacxin của sáng chế có thể được sử dụng để bảo vệ hoặc điều trị cho người mắc cảm với sự lây nhiễm phế cầu khuẩn, bằng cách đưa vacxin vào cơ thể qua đường dùng toàn thân hoặc niêm mạc. Theo định nghĩa trong bản mô tả, thuật ngữ “liều hiệu quả” đề cập tới lượng cần thiết để thúc đẩy kháng thể tới mức vừa đủ nhằm giảm thiểu đáng kể khả năng lây nhiễm *Streptococcus pneumoniae* hoặc tác hại của nó. Đường dùng của thuốc bao gồm tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm nội bì hoặc tiêm dưới da; hoặc đưa thuốc vào niêm mạc qua miệng/đường tiêu hóa, đường hô hấp hoặc đường niệu dục.

Theo một phương án của sáng chế, dùng thuốc qua đường mũi được áp dụng cho việc điều trị viêm phổi hoặc viêm tai giữa vì như vậy thể truyền trùng tỷ hầu của phế cầu khuẩn có thể được ngăn ngừa hiệu quả hơn, nhờ đó làm suy giảm tác hại lây nhiễm ở giai đoạn sớm nhất. Số lượng thể tiếp hợp trong mỗi liều vacxin được ước chọn ở mức mà dẫn tới độ phản ứng bảo vệ miễn dịch mà không để lại tác dụng phụ đáng kể. Liều lượng có thể thay đổi tùy thuộc vào typ huyết thanh phế cầu khuẩn. Thông thường, mỗi liều chứa 0,1 đến 100 μg polisacarit, cụ thể là 0,1 đến 10 μg , và cụ thể hơn là 1 đến 5 μg . Liều lượng thành phần tối ưu cho loại vacxin cụ thể có thể xác định dựa trên nghiên cứu theo tiêu chuẩn bao gồm việc theo dõi phản ứng miễn dịch tương ứng ở đối tượng. Ví dụ như, liều lượng tiêm chủng cho đối tượng con người có thể được ước lượng bằng cách ngoại suy kết quả thử nghiệm trên động vật. Thêm vào đó, liều lượng có thể được ước lượng dựa trên kinh nghiệm.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, vacxin là chế phẩm dung dịch vô trùng của polisacarit dạng nang phế cầu khuẩn của typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, và 23F mà được độc lập liên hợp với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5 mL được

bào chế gồm: 2 µg mỗi sacarit, ngoại trừ 6B ở 4 µg; ước tính khoảng 34 µg protein mang CRM197; 0,125 mg chất phụ trợ nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); natri clorua và natri suxinat đệm làm tá dược. Dung dịch được đổ vào ống theo liều lượng mà không kèm chất bảo quản. Sau khi lắc đều, vaccin ở thể đồng nhất, huyền phù trắng sẵn sàng để tiêm trong cơ.

Theo một phương án cụ thể hơn, chế phẩm của sáng chế có thể đưa vào đối tượng bằng một liều tiêm. Ví dụ, vaccin của sáng chế có thể được tiêm từ 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn với khoảng cách phù hợp như là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng giữa mỗi lần tiêm hoặc tổng thời gian của các lần tiêm. Lịch tiêm phòng có thể áp dụng theo lịch trình đã được thiết kế cho vaccin Prevnar. Ví dụ như, lịch tiêm cho trẻ sơ sinh và trẻ đang chập chững biết đi để phòng bệnh xâm lấn gây ra bởi *S. pneumoniae* theo typ huyết thanh được bao gồm trong vaccin Prevnar là vào tháng tuổi thứ 2, 4, 6 và 12-15. Do đó, theo khía cạnh này, chế phẩm được tiêm 4 lần, đó là, vào tháng tuổi thứ 2, 4, 6, và 12-15.

Chế phẩm của sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều protein từ *Streptococcus pneumoniae*. Ví dụ về protein *Streptococcus pneumoniae* thích hợp để đưa vào vaccin bao gồm những loại đã được xác định trong công bố đơn Quốc tế WO02/083855, cũng như được mô tả trong công bố đơn Quốc tế WO02/053761.

Chế phẩm của sáng chế có thể đưa vào đối tượng qua một hoặc nhiều đường dùng của thuốc được biết đến là kỹ năng thông thường trong giải pháp kỹ thuật đã biết như dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa, qua chân bì, qua niêm mạc, qua đường mũi, trong cơ, trong màng bụng, trong da, qua tĩnh mạch, hoặc dưới da và được bào chế tương đương. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế có thể đưa vào cơ thể ở dạng chế phẩm chất lỏng bằng cách tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm động mạch, tiêm qua chân bì hoặc qua niêm mạc hô hấp. Chế phẩm chất lỏng để đưa vào cơ thể là dung dịch hoặc dạng tương tự.

Chế phẩm của sáng chế có thể được bào chế ở dạng liều lượng bằng chai thủy tinh nhỏ liều đơn vị, chai thủy tinh nhỏ nhiều liều, hoặc kim tiêm bơm sẵn thuốc. Chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt dược khoa cho chế phẩm chất lỏng bao gồm dung môi gốc nước hoặc dung môi ngoài gốc nước, huyền phù, nhũ tương hoặc dầu. Ví dụ về dung môi ngoài gốc nước bao gồm propylen glycol, polietylen glycol, và etyl oleat. Chất dẫn thuốc gốc nước bao gồm nước, dung môi rượu/nước, nhũ tương, hoặc huyền phù, nước muối sinh lý, dung dịch đệm. Ví dụ về dầu bao gồm dầu thực vật hoặc dầu động vật, dầu đậu

phộng, dầu đậu nành, dầu ô liu, dầu hướng dương, dầu gan, dầu tổng hợp như là dầu biển, và chất béo thu được từ sữa hoặc trứng. Dược phẩm có thể là đẳng trương, ưu trương hoặc nhược trương. Tuy nhiên, tốt hơn là dược phẩm để truyền hoặc để tiêm về cơ bản ở dạng đẳng trương. Là vì, dạng đẳng trương hoặc ưu trương có lẽ thuận lợi hơn cho việc bảo quản chế phẩm. Khi dược phẩm là ưu trương, chế phẩm có thể pha loãng thành đẳng trương trước khi đưa vào đối tượng. Tác nhân trương lực có thể là tác nhân trương lực điện ly như là muối hoặc tác nhân trương lực không điện ly như là cacbohydrat. Tác nhân trương lực điện ly bao gồm natri clorua, canxi clorua, kali clorua, và magie clorua, nhưng không bị giới hạn trong số này. Tác nhân trương lực không điện ly bao gồm sorbitol và glixerin, nhưng không bị giới hạn trong số này. Tốt hơn là, ít nhất chất đệm chấp nhận được về mặt dược khoa được bao gồm. Ví dụ như, khi dược phẩm là dạng để truyền hoặc để tiêm, tốt hơn là chế phẩm được bào chế trong chất đệm với khả năng đệm ở độ pH từ 4 đến 10, như là độ pH 5-9 hoặc 6-8. Chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm TRIS, axetat, glutamat, lactat, maleat, tartrat, phosphat, xitrat, cacbonat, glyxinat, histidin, glyxin, suxinat, và dung dịch đệm trietanolamin.

Cụ thể, nếu dược phẩm là để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa, chất đệm có thể được chọn từ những chất phù hợp với United States Pharmacopeia (USP). Ví dụ như, chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm monoaxit như là axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric, và axit lactic; axit đa chức như là axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit cacbonic, axit glutamic, axit malic, axit suxinic, và axit tartaric; và bazơ như là amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin, và TRIS. Để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa, chất dẫn thuốc (để tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm trong khớp, và tiêm trong cơ) bao gồm dung dịch natri clorua, dung dịch dextroza Ringer, dung dịch dextroza và natri clorua, dung dịch Ringer lactat và dầu không bay hơi. Chất dẫn thuốc để tiêm tĩnh mạch bao gồm dung dịch Ringer dextroza hoặc dung dịch truyền gốc dextroza tương tự, chất bổ sung dinh dưỡng và chất bổ sung điện phân. Ví dụ bao gồm dung dịch vô trùng như là nước và dầu, với hoặc không với tác nhân hoạt tính bề mặt và chất phụ trợ chấp nhận được về mặt dược khoa. Nhìn chung, nước, nước muối sinh lý, dung dịch dextroza, dung dịch đường liên quan, và glicol như là propylen glicol hoặc polietylen glicol, cụ thể là, polysorbate 80 là phù hợp dùng để tiêm. Ví dụ về dầu bao gồm dầu thực vật hoặc dầu động vật, dầu đậu phộng, dầu đậu nành, dầu ô liu, dầu hướng dương, dầu gan, dầu tổng hợp như là dầu biển và chất béo từ sữa hoặc trứng.

Chế phẩm của sáng chế có thể chứa tác nhân hoạt tính bề mặt. Tốt hơn là,

polyoxyetylen sorbitan este (thường được gọi là Tween), cụ thể là, polysorbate 20 và polysorbate 80; copolyme (như là DOWFAX™) của etylen oxit (EO), propylen oxit (PO), butylen oxit (BO); octoxynol với vòng lặp khác của nhóm etoxy (oxy-1,2-ethanediyl), cụ thể là, octoxynol-9 (Triton-100); etylphenoxypolyoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit như là lexitin; nonyl phenol etoxylat như là hệ Tergitol™ NP; lauryl, cetyl, stearyl, polyoxyetylen béo ete dẫn xuất rượu oleyl (chất hoạt tính bề mặt Brij), cụ thể là, trietylglicolmonolauryl ete (Brij 30); sorbitan ete được ghi nhận là SPAN, cụ thể là, sorbitan trioleat (Span 85) và sorbitan monolaurat nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Tween 80 tốt hơn là chứa trong nhũ tương.

Hỗn hợp của tác nhân hoạt tính bề mặt như là Tween 80/Span 85 có thể được sử dụng. Hợp chất của polyoxyetylen sorbitan este như là Tween 80 và octoxynol như là Triton X-100 cũng phù hợp. Hợp chất của Laureth 9 và Tween và/hoặc octoxynol cũng dùng được. Tốt hơn là, lượng chất polyoxyetylen sorbitan este (như Tween 80) được bao gồm chiếm từ 0,01% đến 1% (w/v), cụ thể là 0,1%; lượng chất octylphenoxy polyoxyetanol hoặc nonyl phenoxy polyoxyetanol (như là Triton X-100) được bao gồm chiếm từ 0,001% tới 0,1% (w/v), cụ thể là từ 0,005% tới 0,02%; và lượng chất polyoxyetylen ete (như là laureth 9) được bao gồm chiếm từ 0,1% tới 20% (w/v), có thể từ 0,1% tới 10%, cụ thể là từ 0,1% tới 1% hoặc khoảng 0,5%. Theo một phương án của sáng chế, được phẩm đưa vào cơ thể qua hệ kiểm soát dẫn thuốc. Ví dụ như, tiêm truyền tĩnh mạch, miếng dán thấm qua da, liposome, hoặc có thể sử dụng các đường dùng thuốc khác. Trong một khía cạnh, đại phân tử như là vi cầu hạt hoặc mô cấy có thể được sử dụng.

Những bộc lộ trên đây nhìn chung mô tả sáng chế. Hiểu biết đầy đủ hơn có thể đạt được bằng cách tham khảo ví dụ cụ thể dưới đây. Những ví dụ này được mô tả chủ yếu là cho mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tiêu bản chế phẩm Polisacarit dạng nang *S. pneumoniae*

Việc nuôi cấy *S. pneumoniae* và tinh chế polisacarit dạng nang được thực hiện như đã biết là kỹ năng thông thường trong giải pháp kỹ thuật đã biết. Typ huyết thanh *S. pneumoniae* thu được từ American Type Culture Collection (ATCC). *S. pneumoniae* được đặc tính hóa bằng các nang và mức bất động, song cầu gram-dương hình dao mổ và

tan huyết alpha trong môi trường thạch máu. Typ huyết thanh được xác định bằng xét nghiệm Quelling sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu (Patent Hoa Kỳ số 5,847,112).

Tiêu bản chế phẩm của Ngân hàng Tế bào

Vài thế hệ của nguyên liệu giống được tạo ra để mở rộng chủng tế bào và loại bỏ phần tử có gốc động vật (thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ bổ sung của nguyên liệu giống được sản xuất. Thế hệ bổ sung đầu tiên được tạo ra từ lọ thủy tinh của F3, và thế hệ tiếp đó được tạo ra từ lọ thủy tinh của thế hệ bổ sung đầu tiên. Lọ thủy tinh chứa nguyên liệu giống được bảo quản lạnh ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) trong glixerin tổng hợp như là chất bảo quản siêu lạnh. Với tiêu bản chế phẩm của ngân hàng tế bào, tất cả nhóm nuôi cấy được nuôi trong môi trường đậu tương. Trước quá trình đông lạnh, các tế bào được cô đặc bằng quay ly tâm, môi trường đã sử dụng được loại bỏ, và viên tế bào được đưa vào môi trường nuôi cấy mới chứa chất bảo quản siêu lạnh (như là glixerin tổng hợp).

Cấy truyền

Nhóm nuôi cấy từ ngân hàng tế bào đang hoạt động được dùng để cấy truyền vào lọ giống chứa môi trường đậu tương. Lọ giống được dùng để cấy truyền trong hệ lên men chứa môi trường đậu tương.

Lên men giống

Lên men giống được thực hiện trong hệ lên men với nhiệt độ và độ pH được kiểm soát. Sau khi đạt tới mật độ quang học mục tiêu, hệ lên men được dùng để cấy truyền hệ sản xuất lên men chứa môi trường đậu tương.

Sản xuất lên men

Sản xuất lên men là bước cuối cùng trong quy trình lên men. Nhiệt độ, độ pH và tốc độ khuấy được kiểm soát.

Khử hoạt tính

Quá trình lên men được chấm dứt sau khi sự tăng trưởng bị đình lại bằng tác động của máy khử hoạt tính. Sau khi khử hoạt tính, hàm lượng trong hệ lên men được làm nguội và độ pH là canh nuôi cấy đã phân giải được điều chỉnh.

Tinh chế

Canh từ hệ lên men được quay ly tâm và lọc để loại bỏ mảnh vụn tế bào vi khuẩn. Một số bước cô đặc/bổ sung dung môi, kết tủa/rửa gạn, và các bước lọc sâu được dùng để loại bỏ tạp chất và tinh chế polisacarit dạng nang.

Ví dụ 2. Tiêu bản chế phẩm của liên hợp Polisacarit dạng nang-CRM₁₉₇ *S. pneumoniae*

Polisacarit của typ huyết thanh khác nhau được hoạt hóa theo các quá trình khác nhau và sau đó liên hợp với CRM₁₉₇. Quá trình hoạt hóa bao gồm giảm thiểu kích cỡ của polisacarit dạng nang tới trọng lượng phân tử mục tiêu, hoạt hóa hóa học và trao đổi chất đệm qua siêu lọc. CRM₁₉₇ là đã tinh chế liên hợp với polisacarit dạng nang đã hoạt hóa, và thể tiếp hợp được tinh chế bằng siêu lọc và cuối cùng lọc qua màng 0,22 μm . Biến số của quá trình như là độ pH, nhiệt độ, nồng độ và thời gian là như sau.

(1) Hoạt hóa

Bước 1

Mỗi typ huyết thanh polisacarit pha loãng với nước để tiêm, với natri axetat và natri phosphat tới nồng độ cuối trong khoảng từ 1,0 tới 2,0 mg/mL. Với typ huyết thanh 1, natri hydroxit (0,05M nồng độ bazơ cuối) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $50^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm nguội tới $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ và sự thủy phân được ngăn lại bằng cách thêm 1M HCl đến khi đạt tới độ pH mục tiêu là $6,0\pm 0,1\%$. Với typ huyết thanh 3, HCl (0,01M nồng độ axit cuối) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $50^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm nguội tới $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ và sự thủy phân được ngăn lại bằng cách thêm 1M natri phosphat đến khi đạt tới độ pH mục tiêu là $6,0\pm 0,1\%$. Với typ huyết thanh 4, HCl (0,1M nồng độ axit cuối) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $45^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm nguội tới $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ và sự thủy phân được ngăn lại bằng cách thêm 1M natri phosphat đến khi đạt tới độ pH là $6,0\pm 0,1\%$. Với typ huyết thanh 6A, axit axetic băng (0,2M nồng độ axit cuối) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $60^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm nguội tới $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ và sự thủy phân được ngăn lại bằng cách thêm 1M natri hydroxit đến khi đạt tới độ pH là $6,0\pm 0,1\%$. Với typ huyết thanh 14 và 18C, axit axetic băng (0,2M nồng độ axit cuối) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $94^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm nguội tới $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ và sự thủy phân được ngăn lại bằng cách thêm 1M natri phosphat đến khi đạt tới độ pH là $6,0\pm 0,1\%$.

Bước 2: Phản ứng periodat

Đương lượng natri periodat cần thiết cho sự hoạt hóa sacarit phế cầu khuẩn được xác định bằng tổng hàm lượng sacarit. Khi trộn hoàn toàn, phản ứng oxy hóa được phép diễn ra trong khoảng từ 16 tới 20 tiếng ở $21^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ cho tất cả typ huyết thanh ngoại trừ với 1, 7F, và 19F, thì nhiệt độ là $\leq 10^{\circ}\text{C}$.

Bước 3: Siêu lọc

Sacarit đã oxy hóa được cô đặc và bổ sung dung môi là nước để tiêm (WFI) trên máy siêu lọc 100 kDa MWCO (máy siêu lọc 30kDa với typ huyết thanh 1 và máy siêu lọc 5 kDa với typ huyết thanh 18C). Bước bổ sung dung môi được tiến hành bằng 0,9% dung dịch natri clorua với typ huyết thanh 1, 0,01M natri axetat làm chất đệm (pH 4,5) với typ huyết thanh 7F, và 0,01M natri phosphat làm chất đệm (pH 6,0) với typ huyết thanh 19F. Hàm lượng thấm qua bị loại bỏ và hàm lượng còn lại được lọc qua màng 0,22 μm .

Bước 4: Đông khô

Với typ huyết thanh 3, 4, 5, 9N, 9V, và 14, sacarit đã cô đặc được trộn với protein mang CRM₁₉₇, đổ vào chai thủy tinh, đông khô và sau đó được bảo quản ở $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Với typ huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, và 23F, lượng xác định sucroza được tính toán thêm vào sao cho đạt đến nồng độ $5 \pm 3\%$ sucroza trong hỗn được phản ứng liên hợp. Typ huyết thanh 1 và 18C không cần thêm sucroza. Sacarit đã cô đặc sau đó được đổ vào chai thủy tinh, đông khô và bảo quản ở $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Quá trình liên hợp

Liên hợp ở thể nước được bào chế cho typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14, và 18C, và liên hợp DMSO được bào chế cho typ huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F và 23F.

Bước 1: Pha loãng

Liên hợp ở thể nước

Với typ huyết thanh 3, 4, 5, 9N, 9V và 14, hỗn hợp sacarit-CRM₁₉₇ hoạt hóa đã đông khô được tan chảy và cân bằng ở nhiệt độ phòng. Sacarit-CRM₁₉₇ hoạt hóa đã đông khô được hoàn nguyên trong 0,1 M chất đệm natri phosphat ở tỷ lệ điển hình tùy theo typ huyết thanh. Với typ huyết thanh 1 và 18C, sacarit đã đông khô được hoàn nguyên trong dung dịch gồm CRM₁₉₇ trong 1 M natri phosphat hai bazơ ở tỷ lệ điển hình 0,11 L của natri phosphat trên 1 L của dung dịch CRM₁₉₇.

Liên hợp dimetyl sulfoxit (DMSO)

Typ huyết thanh Sacarit hoạt hóa đã đông khô 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, 23F và protein mang CRM₁₉₇ đã đông khô được cân bằng ở nhiệt độ phòng và được hoàn nguyên trong DMSO.

Bước 2: Phản ứng liên hợp

Thế tiếp hợp ở thể nước

Với typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14 và 18C, phản ứng liên hợp được khởi đầu bằng cách thêm dung dịch natri xyanoborohyđrua (100 mg/mL) để đạt tới 1,0 - 1,2 mol natri xyanoborohyđrua trên mol sacarit. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong từ 44 đến 96 tiếng ở 23°C đến 37°C. Nhiệt độ và thời gian phản ứng được điều chỉnh tùy theo typ huyết thanh. Nhiệt độ sau đó được giảm xuống 23°±2°C và natri clorua 0,9% được thêm vào bình phản ứng. Dung dịch natri borohyđrua (100 mg/mL) được thêm vào để đạt tới 1,8 - 2,2 đương lượng của natri borohyđrua trên mol sacarit. Hỗn hợp được ủ trong 3 đến 6 tiếng ở 23°±2°C. Bước này giảm thiểu bất kỳ andehit nào chưa phản ứng còn hiện diện trong sacarit. Sau đó, hỗn hợp pha loãng với natri clorua 0,9%, rồi hỗn hợp thế tiếp hợp đã pha loãng được lọc từ màng sơ cấp 1,2 µm vào bình chứa.

Thế tiếp hợp DMSO

Với typ huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F và 23F, sacarit đã hoạt hóa và protein mang CRM₁₉₇ được trộn ở tỷ lệ từ khoảng 0,8 g đến 1,25 g sacarit/g CRM₁₉₇. Phản ứng liên hợp được khởi đầu bằng cách thêm dung dịch natri xyanoborohyđrua (100mg/mL) ở tỷ lệ 0,8 - 1,2 đương lượng của natri xyanoborohyđrua với một mol sacarit được hoạt hóa. WFI được thêm vào hỗn hợp phản ứng tới mục tiêu 1% (v/v), và hỗn hợp được ủ trong 11 - 27 tiếng ở 23°±2°C. Dung dịch natri borohyđrua, 100 mg/mL (1,8 - 2,2 đương lượng điển hình của natri borohyđrua trên mol sacarit được hoạt hóa) và WFI (mục tiêu 5% v/v) được thêm vào phản ứng và hỗn hợp được ủ trong 3 - 6 tiếng ở 23°±2°C. Bước này giảm thiểu bất kỳ andehit nào chưa phản ứng còn hiện diện trong sacarit. Sau đó, hỗn hợp phản ứng pha loãng với natri clorua 0,9%, rồi hỗn hợp thế tiếp hợp đã pha loãng được lọc từ màng sơ cấp 1,2 µm vào bình chứa.

Bước 3: Siêu lọc

Hỗn hợp thể tiếp hợp đã pha loãng được cô đặc và bổ sung dung môi trên máy siêu lọc 100 kDa MWCO với tối thiểu 20 độ thể tích của 0,9% natri clorua hoặc chất đậm. Hàm lượng thấm qua bị loại bỏ.

Bước 4: Lọc vô trùng

Hàm lượng còn lại sau khi siêu lọc qua máy 100 kDa MWCO được lọc qua màng 0,22 μm . Kiểm tra giữa quy trình (hàm lượng sacarit, protein tự do, sacarit tự do, phần dư DMSO và phần dư xyanua; thể tiếp hợp DMSO và phần dư DMSO ngoài những chất đã kể trên) được tiến hành với sản phẩm đã lọc. Kiểm tra giữa quy trình với hàm lượng còn lại sau khi lọc được tiến hành để xác định liệu có cần thêm nồng độ bổ sung, dung môi bổ sung, và/hoặc pha loãng. Nếu cần thiết, thể tiếp hợp đã qua lọc pha loãng với 0,9% natri clorua nhằm đạt tới nồng độ cuối nhỏ hơn 0,55 g/L. Kiểm tra cuối quy trình đối với hàm lượng sacarit, hàm lượng protein và sacarit: tỷ lệ protein được tiến hành ở giai đoạn này. Cuối cùng, thể tiếp hợp được lọc (0,22 μm) và kiểm tra cuối quy trình (về ngoài hàm lượng, protein tự do, sacarit tự do, nội độc tố, xác định kích thước phân tử, phần dư xyanua, phần dư DMSO, nhận diện sacarit và nhận diện CRM₁₉₇) được tiến hành. Khối chất cô đặc cuối được bảo quản ở 2°-8°C.

Ví dụ 3. Vacxin liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị

Thể tích cần thiết của khối chất cô đặc cuối được tính toán dựa trên thể tích mẻ nguyên liệu và nồng độ khối sacarit. Sau khi hàm lượng cần thiết 0,85% natri clorua (nước muối sinh lý), polysorbate 80 và chất đậm suxinat được thêm vào bình chứa chế phẩm chưa dán nhãn, nồng độ khối được thêm vào. Tiêu bản chế phẩm sau đó được trộn đều và lọc vô trùng qua màng 0,22 μm . Khối chất đã chế phẩm hóa được trộn nhẹ trong suốt và khi thêm khối chất nhôm phosphat. Độ pH được kiểm tra và được điều chỉnh nếu cần thiết. Sản phẩm khối chất đã chế phẩm hóa được bảo quản ở 2-8°C. Sản phẩm chứa, trong thể tích 0,5 ml, 2 μg của mỗi sacarit, ngoại trừ 6B là 4 μg ; ước tính khoảng 34 μg protein mang CRM₁₉₇; 0,125 mg chất phụ trợ nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); 4,25 mg natri clorua; 295 μg chất đậm natri suxinat; và 100 μg polysorbate 80.

Ví dụ 4. Sự gây miễn dịch của vacxin liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị

Vacxin phế cầu khuẩn đa hóa trị, tức là, vacxin (SK-15) đã điều chế trong Ví dụ 3 được kiểm tra khả năng tạo ra phản ứng miễn dịch ở thỏ. Hiệu quả gây miễn dịch được đặc tính hóa bởi kháng nguyên-đặc hiệu ELISA cho nồng độ huyết thanh IgG và bởi thử nghiệm thực bào opsonin (OPA) cho chức năng kháng thể. Thỏ Trắng New Zeal được

tiêm miễn dịch trong cơ ở tuần 0 và tuần 3 với liều lâm sàng cho người của mỗi polisacarit (2 μ g của mỗi PS, ngoại trừ 6B ở 4 μ g). Huyết thanh được lấy mẫu cứ mỗi 3 tuần sau khi được miễn dịch.

Chỉ số của nồng độ IgG trong typ huyết thanh đặc hiệu

Polisacarit dạng nang (PnPs) cho mỗi typ huyết thanh được bọc trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng với thông số 500ng/đĩa. Lượng tương đương của huyết thanh được lấy mẫu từ mỗi đối tượng và được dự trữ theo nhóm. Bình huyết thanh được pha loãng hàng loạt lên 10 lần bằng chất đệm pha loãng kháng thể bao gồm Tween 20, C-PS 4 μ g/mL và typ huyết thanh 22F polisacarit dạng nang (PnPs 22F) 4 μ g/mL và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đĩa nuôi cấy được rửa 5 lần bằng dung dịch rửa và giếng nuôi cấy được nhúng ngập vào 50uL huyết thanh tiền hấp phụ pha loãng và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 18 tiếng. Giếng nuôi cấy được rửa theo cùng cách và sau đó thể tiếp hợp IgG-phosphatase kiềm dê kháng thể (1:50000) được thêm vào mỗi giếng, theo sau đó là bước ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 tiếng. Đĩa được rửa như đã mô tả như trên và 1mg/mL p-nitrophenylamin đệm làm chất nền được thêm vào mỗi giếng nuôi cấy và sau đó phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 tiếng. Phản ứng được dập tắt bằng cách thêm 50uL của 3M NaOH và hệ số hấp thụ đo được là 405 nm và 690 nm. Để làm ví dụ so sánh, vacxin 7-hóa trị (Prevnam 7, Pfizer) và vacxin 13-hóa trị (Prevnam 13, Pfizer) được áp dụng vào cùng quy trình này. Kết quả thể hiện trong Fig. 1 đến 15.

Xét nghiệm gây miễn dịch chức năng (OPA)

Chức năng kháng thể được đánh giá bằng kiểm tra huyết thanh trong thực nghiệm OPA. Hàm lượng tương đương của huyết thanh được lấy mẫu từ mỗi đối tượng, dự trữ theo nhóm và được pha loãng 10 lần. *S. pneumoniae* được nuôi cấy trong môi trường THY bằng typ huyết thanh và được pha loãng tới 1000CFU/10uL. 200uL chất đệm opsonin hóa, 10uL huyết thanh pha loãng, và 10uL *S. pneumonia* pha loãng được trộn lẫn và cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 tiếng. Hỗn hợp tế bào HL-60 tiền phân biệt và bổ thể được thêm vào và để phản ứng trong máy ủ CO₂ (ở 37°C) trong 1 tiếng. Nhiệt độ được giảm xuống để ngăn hiện tượng thực bào và 5uL phản ứng được phết lên đĩa nuôi cấy thạch trước khi sấy khô trong 30 - 60 phút. Đĩa nuôi cấy được ủ trong máy ủ CO₂ (ở 37°C) trong 12 - 18 tiếng và sau đó là đếm số lượng cụm khuẩn. Độ chuẩn OPA được biểu thị như là tỷ lệ pha loãng mà ở 50% khử được theo dõi. Để làm ví dụ so sánh,

vacxin 13-hóa trị (Pevnar 13, Pfizer) được áp dụng vào cùng quy trình này. Kết quả thể hiện trong Bảng 1-3.

Bảng 1

Độ chuẩn OPA của 15 typ huyết thanh polisacarit 3 tuần sau khi miễn dịch tiên phát

Typ huyết thanh	Pevnar 13	SK-15	Typ huyết thanh	Pevnar 13	SK-15
1	1:16	1:4	9V	1:256	1:256
2	-	1:128	9N	-	1:512
3	Không pha loãng	Không pha loãng	14	1:256	1:256
4	1:128	1:128	18C	1:1024	1:1024
5	1:64	1:32	19A	1:512	1:256
6A	1:512	1:256	19F	1:256	1:128
6B	1:256	1:128	23F	1:256	1:256
7F	1:1024	1:1024	-	-	-

Bảng 2

Độ chuẩn OPA của 15 typ huyết thanh polisacarit 3 tuần sau khi miễn dịch thứ phát

Typ huyết thanh	Pevnar13	SK-15	Typ huyết thanh	Pevnar 13	SK-15
1	1:64	1:64	9V	1:512	1:512
2	-	1:512	9N	-	1:2048
3	1:2	1:4	14	1:1024	1:1024
4	1:1024	1:1024	18C	1:1024	1:512
5	1:256	1:256	19A	1:1024	1:1024

6A	1:2048	1:2048	19F	1:1024	1:512
6B	1:2048	1:2048	23F	1:2048	1:2048
7F	1:2048	1:2048	-	-	-

Bảng 3

Độ chuẩn OPA của 15 typ huyết thanh polisacarit 6 tuần sau khi miễn dịch thứ phát

Typ huyết thanh	Prevnar 13	SK-15	Typ huyết thanh	Prevnar 13	SK-15
1	1:64	1:64	9V	1:512	1:512
2	-	1:512	9N	-	1:2048
3	1:4	1:4	14	1:1024	1:1024
4	1:1024	1:1024	18C	1:2048	1:2048
5	1:512	1:512	19A	1:2048	1:1024
6A	1:2048	1:2048	19F	1:1024	1:512
6B	1:2048	1:1024	23F	1:2048	1:2048
7F	1:2048	1:2048	-	-	-

Phản ứng miễn dịch của typ huyết thanh-đặc hiệu bằng vacxin của sáng chế và ví dụ so sánh được đánh giá qua IgG ELISA và OPA bổ thể-trung gian cho kháng thể chức năng. Fig. 1 đến Fig.15 cho thấy kết quả của IgG ELISA và Bảng 1 đến 3 cho thấy kết quả của chỉ số gây miễn dịch chức năng thu được bằng OPA, so sánh với phản ứng miễn dịch trong các nhóm điều trị. Kết quả này biểu thị rằng vacxin liên hợp polisacarit phế cầu khuẩn 15-hóa trị sẽ thúc đẩy độ chuẩn IgG và hoạt động kháng thể chức năng tương đương với hoặc tốt hơn Prevnar-13.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị chứa: 15 thể tiếp hợp polisacarit-protein riêng biệt, cùng với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý học, trong đó mỗi thể tiếp hợp polisacarit-protein chứa polisacarit dạng nang từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* liên hợp với protein mang, và polisacarit dạng nang được bào chế từ typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F.
2. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 1, trong đó protein mang là CRM₁₉₇.
3. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa thêm chất phụ trợ.
4. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 3, trong đó chất phụ trợ là chất phụ trợ gốc nhôm.
5. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 4, trong đó chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit.
6. Chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm 5, trong đó chất phụ trợ là nhôm phosphat.
7. Dược phẩm để sử dụng thúc đẩy phản ứng miễn dịch đối với liên hợp polisacarit dạng nang *Streptococcus pneumoniae*, chứa một lượng hiệu quả miễn dịch của chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị theo điểm bất kỳ từ 1 đến 6.
8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch đa hóa trị là liều đơn 0,5 ml được bào chế chứa:

2 µg mỗi sacarit, ngoại trừ 6B là 4 µg;

khoảng 34 µg protein mang CRM₁₉₇;

0,125 mg chất phụ trợ nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); và

natri clorua và đệm natri suxinat làm tá dược.

Fig.1

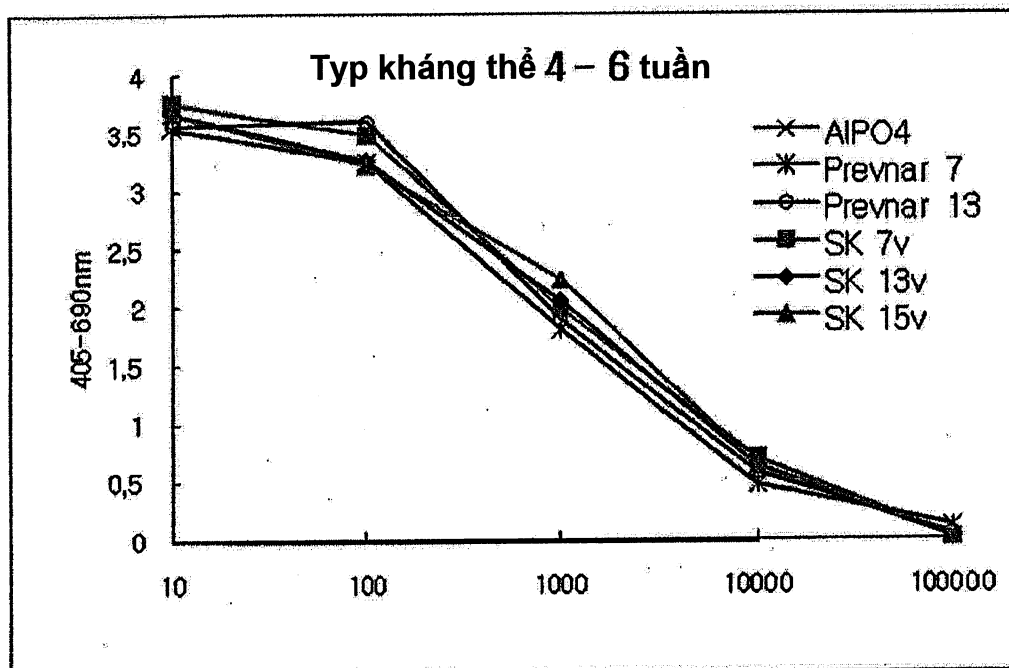


Fig.2

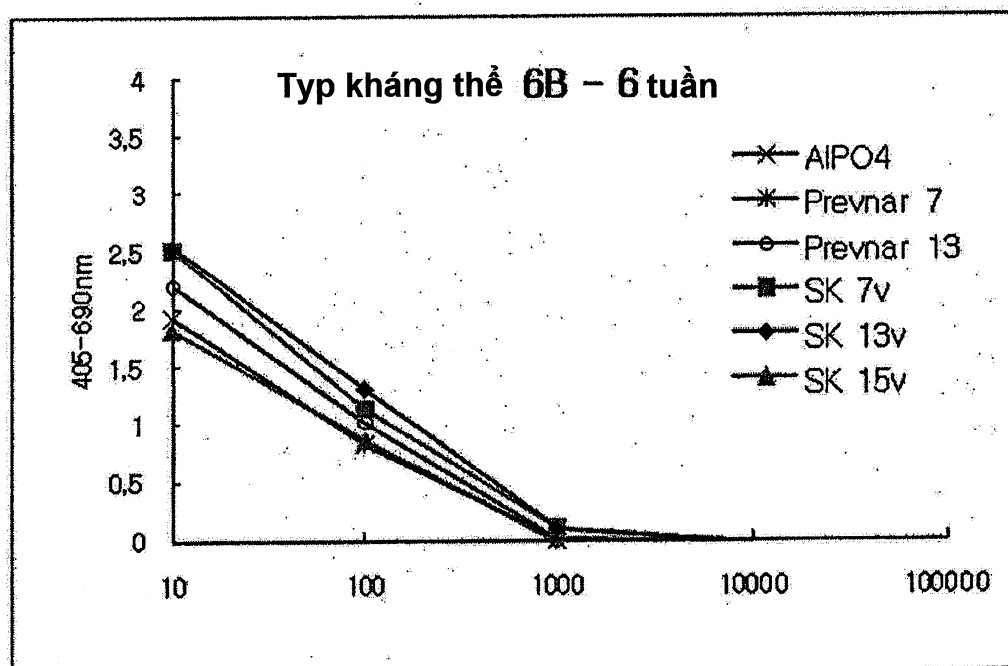


Fig.3

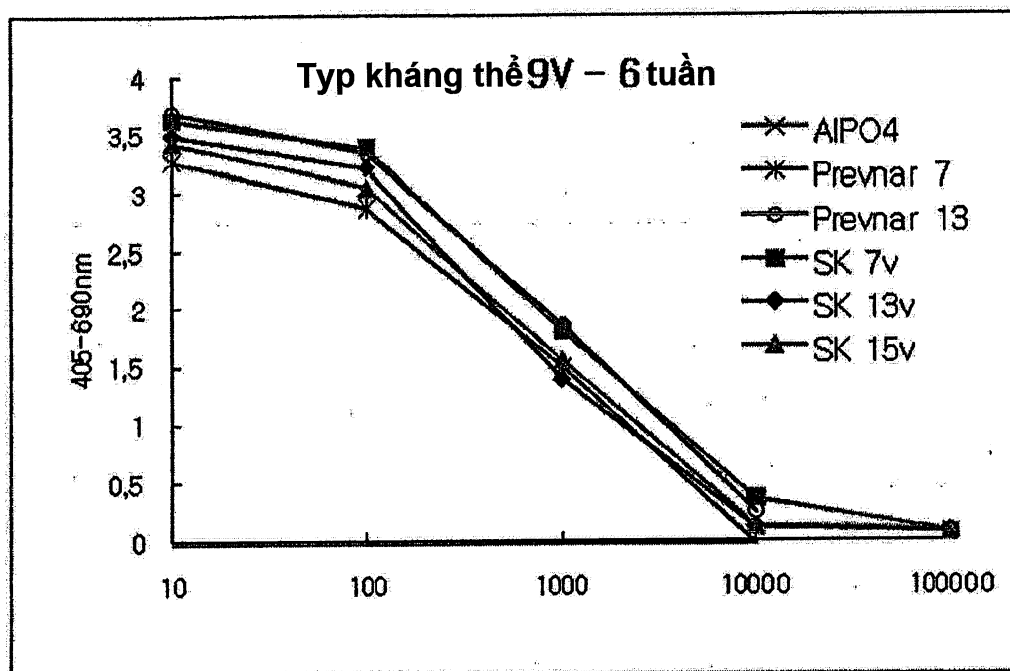


Fig.4

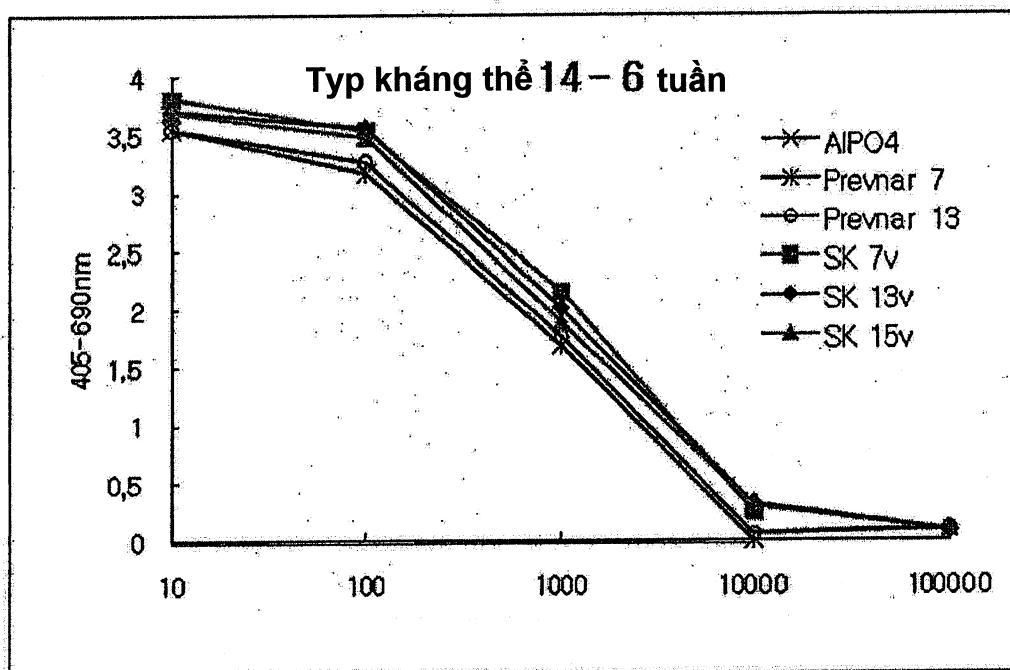


Fig.5

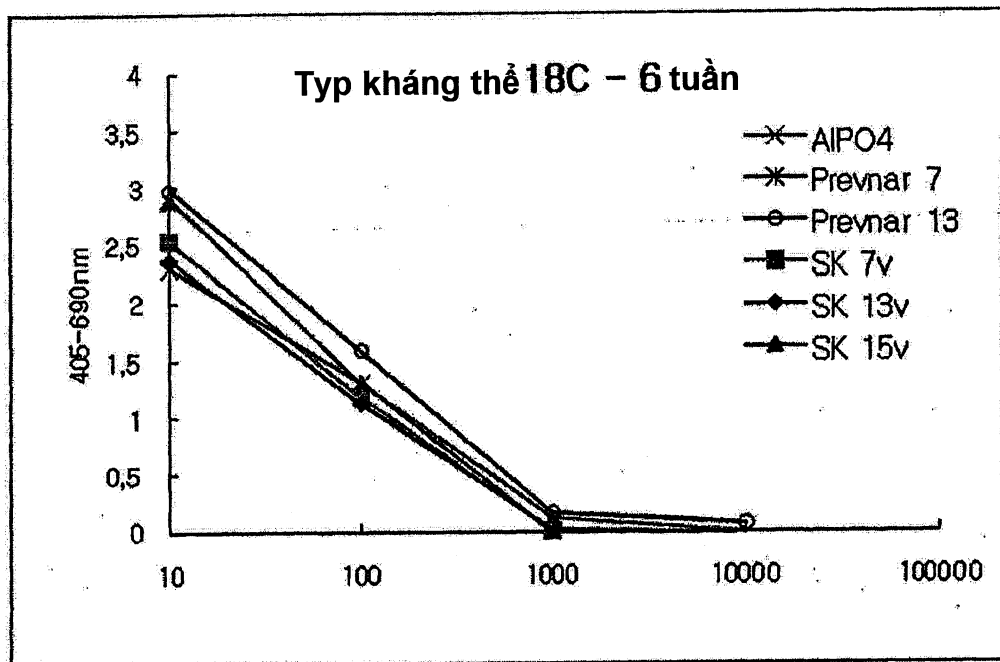


Fig.6

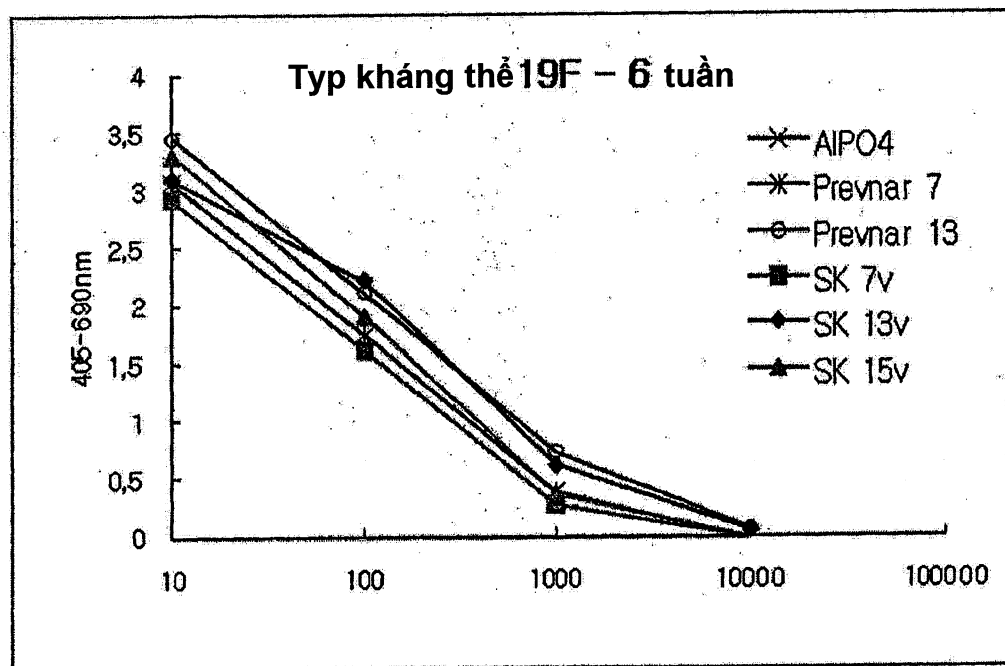


Fig.7

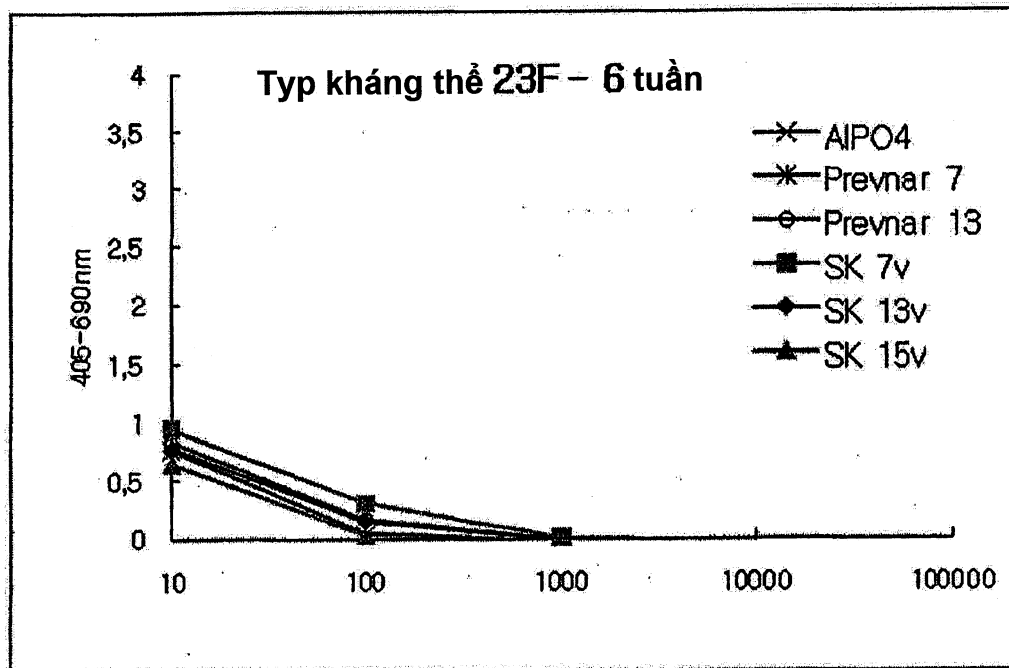


Fig.8

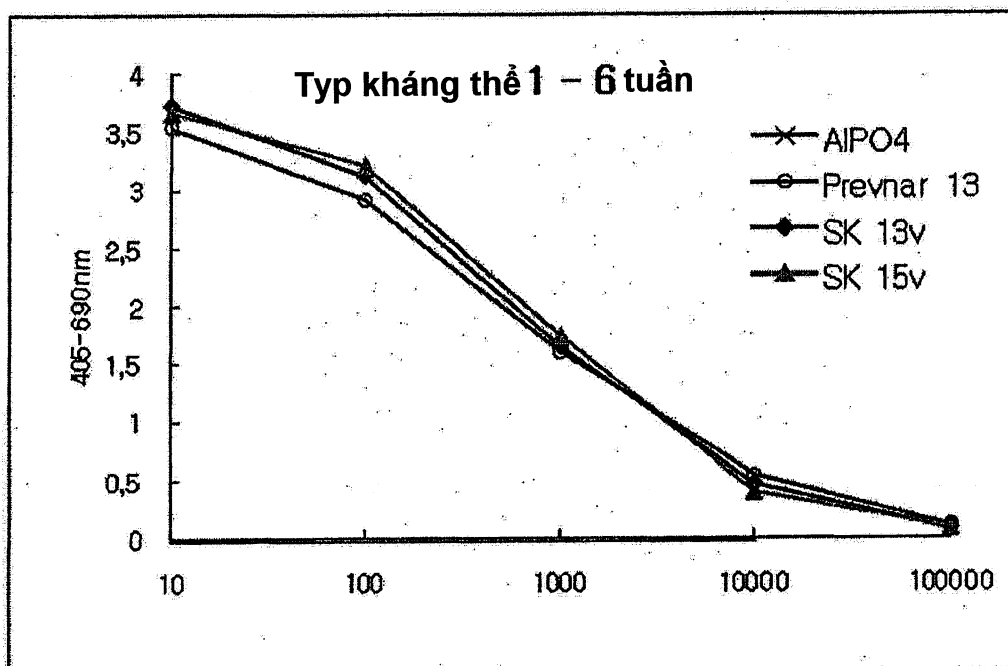


Fig.9

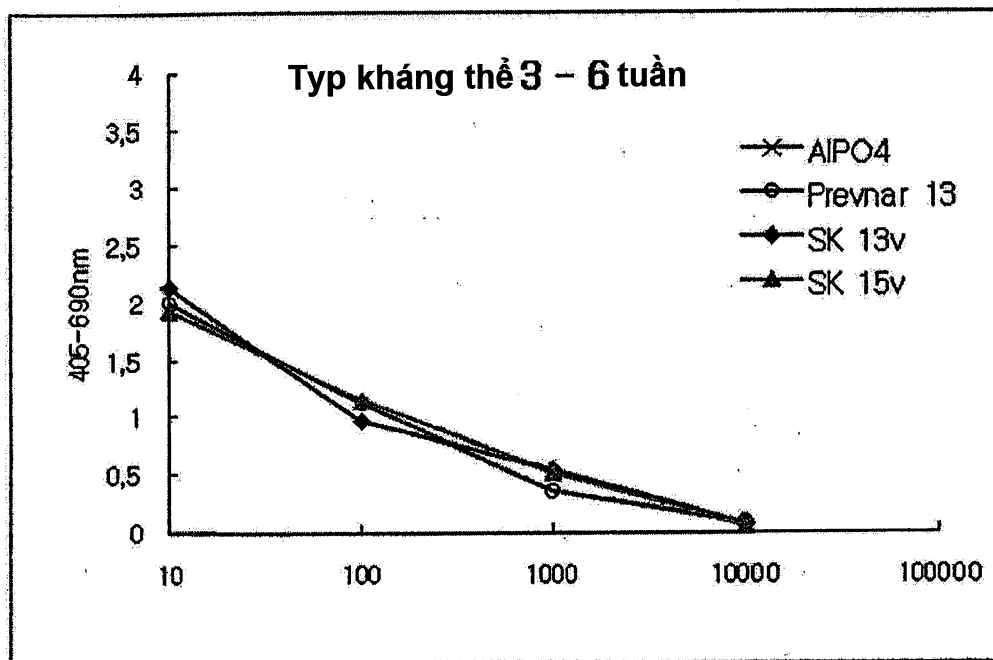


Fig.10

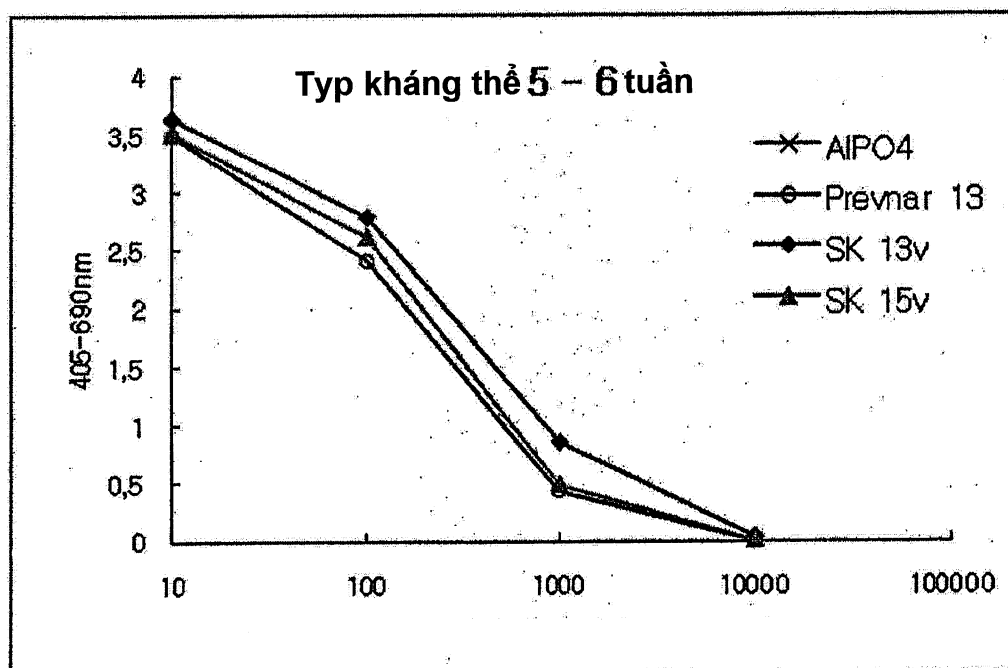


Fig.11

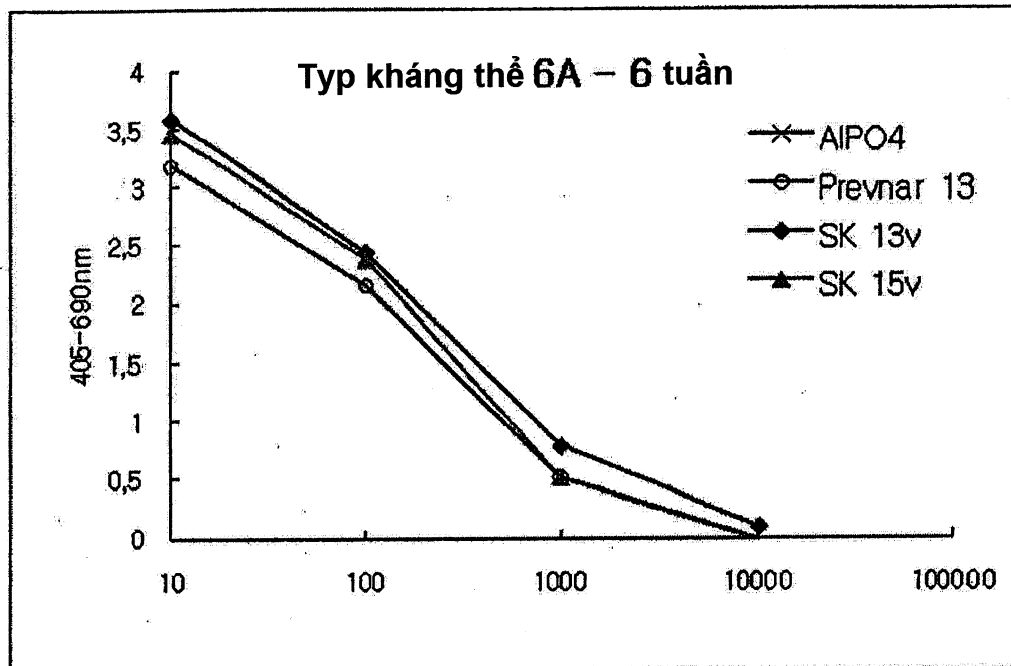


Fig.12

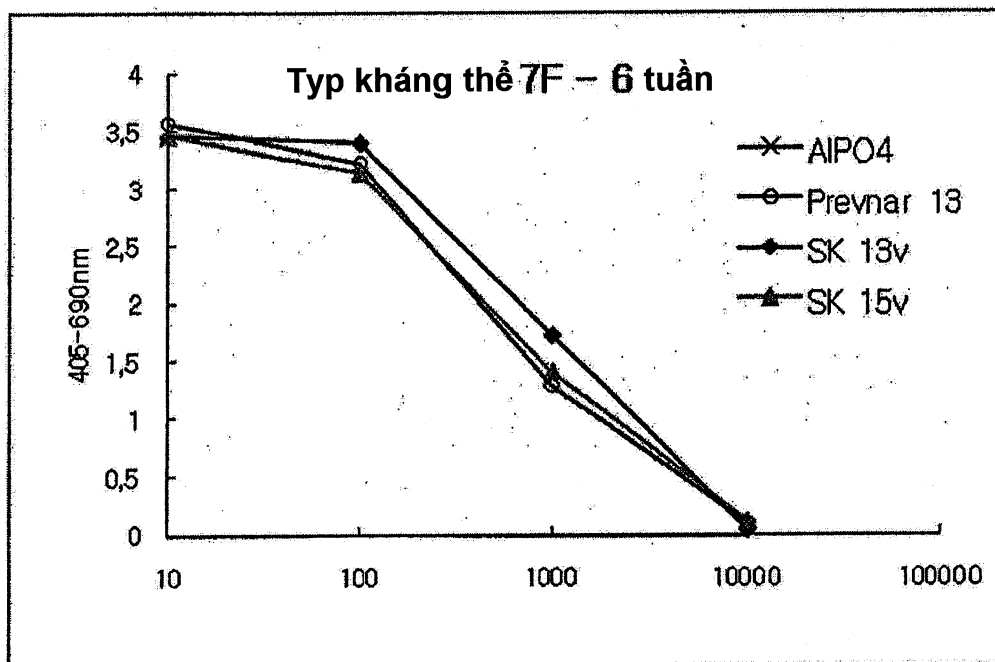


Fig.13

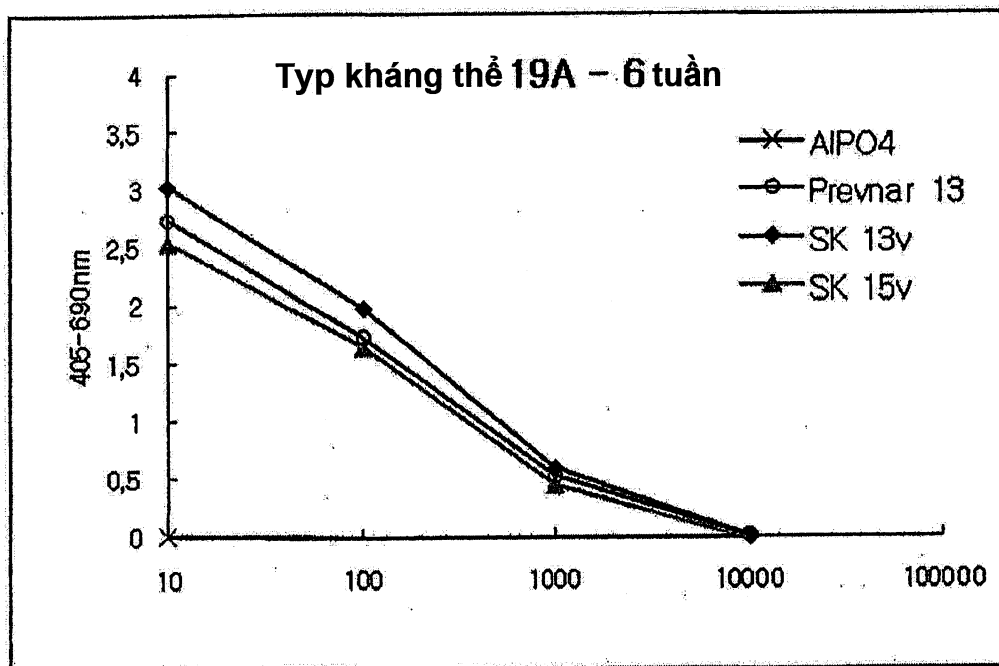


Fig.14

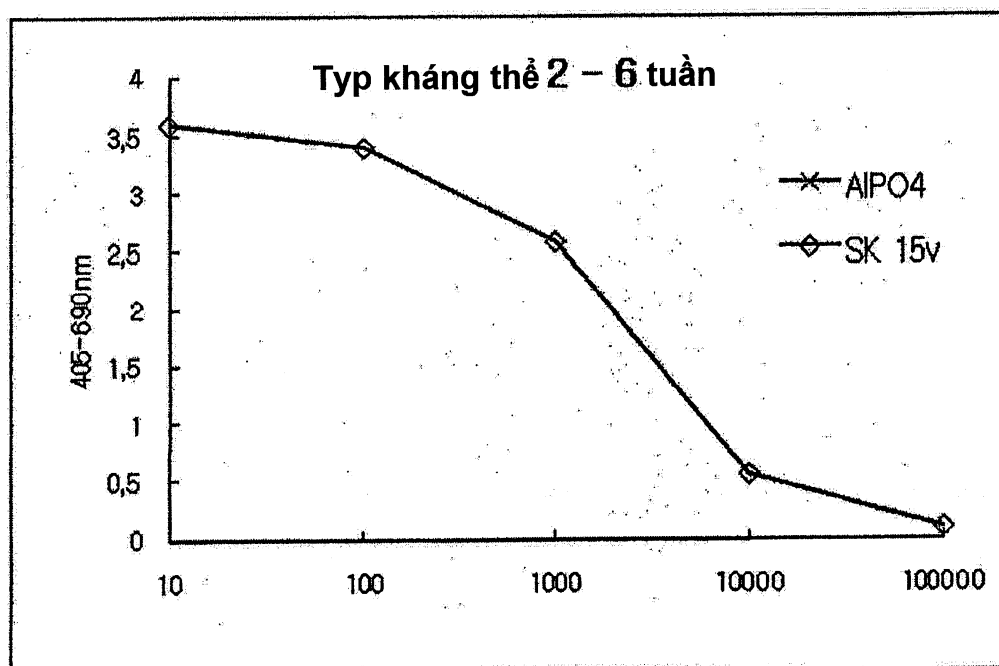


Fig.15

