



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

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



1-0029128

(51)⁷ A61K 47/48; A61P 37/00; A61K 39/39; (13) B
A61K 47/36

-
- (21) 1-2015-02471 (22) 05/12/2013
(86) PCT/KR2013/011194 05/12/2013 (87) WO/2014/092377 19/06/2014
(30) 10-2012-0143310 11/12/2012 KR
(45) 25/08/2021 401 (43) 25/11/2015 332A
(73) SK Bioscience Co., Ltd. (KR)
(Sampyeong-dong) 310, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13494,
Republic of Korea.
(72) PARK, Mahn-Hoon (KR); KIM, Hun (KR); YANG, Ji-Hye (KR); YANG, Seon-
Young (KR); NOH, Myeong-Ju (KR); PARK, Su-Jin (KR); SHIN, Jin-Hwan (KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH ĐA GIÁ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa 13 thể tiếp hợp polysacarit-protein khác nhau, trong đó mỗi thể tiếp hợp polysacarit-protein chứa polysacarit bao nang từ các kiểu huyết thanh khác nhau của vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với protein mang, và polysacarit bao nang được tạo ra từ 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa: 13 thể tiếp hợp polysacarit-protein riêng biệt được tạo ra bằng cách tiếp hợp polysacarit bao nang có nguồn gốc từ 12 kiểu huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae*, 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F và kiểu huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* 2 hoặc 9N với protein mang như CRM₁₉₇. Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y học, và cụ thể là vi sinh vật học, miễn dịch học, vaccin và ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ em và người lớn bằng cách tiêm chủng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus pneumoniae là nguyên nhân hàng đầu gây bệnh viêm phổi. Theo Khuynh hướng Tử vong do Nguyên nhân (Mortality Trend by Cause) năm 2010 xuất bản bởi Cơ quan Thống kê Quốc gia, bệnh viêm phổi là một trong 10 nguyên nhân hàng đầu gây tử vong, với 14,9 ca tử vong trên 100000 người, tăng 82,9% từ năm 2000. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cũng dự đoán trong 2012 rằng trên toàn thế giới, 476000 trẻ em 5 tuổi hoặc nhỏ hơn mà âm tính với HIV chết bởi nhiễm khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, chiếm 5% trong tất cả các nguyên nhân tử vong ở trẻ em dưới 5 tuổi.

Năm 1977, Tiến sĩ Robert Austrian phát triển vaccin polysacarit 14-giá cho phế cầu khuẩn nhằm ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn và sau đó vaccin được phát triển thành vaccin polysacarit 23-giá. Vaccin polysacarit phế cầu khuẩn đa giá đã được chứng minh có giá trị trong ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở người già và bệnh nhân có nguy cơ cao. Tuy nhiên, trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ phản ứng kém với hầu hết polysacarit của phế cầu khuẩn do phản ứng miễn dịch phụ thuộc tế bào T. Vaccin tiếp hợp 7-giá cho phế cầu khuẩn (7vPnC, Prevnar®) chứa polysacarit bao nang từ 7 kiểu huyết thanh thông dụng nhất 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F. Từ khi

được công nhận ở Mỹ năm 2000, Prevnar thể hiện là gây miễn dịch và hiệu quả cao chống lại bệnh xâm nhập và viêm tai giữa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Vacxin này hiện nay được công nhận ở khoảng 80 nước trên thế giới. Prevnar phòng ngừa khoảng 80-90%, 60-80%, và 40-80% bệnh phế cầu khuẩn xâm nhập (IPD) lần lượt ở Mỹ, Châu Âu, và các vùng khác trên thế giới. Như dự đoán, dữ liệu khảo sát được thu thập trong nhiều năm sau khi Prevnar được đưa ra chứng tỏ một cách rõ ràng sự giảm đi của bệnh phế cầu khuẩn xâm nhập gây ra bởi kiểu huyết thanh được phòng ngừa bởi Prevnar ở Mỹ. Tuy nhiên, độ phòng ngừa của kiểu huyết thanh bị giới hạn ở một số vùng và bệnh phế cầu khuẩn xâm nhập gây ra bởi kiểu huyết thanh mà không được phòng ngừa bởi Prevnar, cụ thể là 19A, đã tăng lên.

Hội đồng Tư vấn về Thực hành Tiêm chủng (Advisory Committee on Immunization Practices - ACIP) thông báo vào tháng 2 năm 2010 đề xuất của họ về vacxin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn 13-giá (PCV-13) mới được thông qua để tiêm chủng. PCV-13 là vacxin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn chứa sáu kiểu huyết thanh bổ sung (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) ngoài bảy kiểu huyết thanh (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) đã có trong Prevnar. Theo khảo sát Active Bacterial Core (ABC) của Mỹ, tổng số 64% các trường hợp IPD được biết đến là kiểu huyết thanh gây bệnh trong số trẻ em 5 tuổi hoặc thấp hơn được phòng ngừa bởi PCV-13. Năm 2007, chỉ 70 trường hợp trong số 4600 trường hợp IPD ở trẻ em 5 tuổi hoặc ít hơn được phòng ngừa bởi PCV7, trong khi 2900 trường hợp được phòng ngừa bởi PCV-13, chiếm phần lớn các trường hợp. Hiện tại, vacxin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn 15-giá đang được phát triển chứa các kiểu huyết thanh bổ sung mà tỉ lệ của chúng tăng với sự thay thế kiểu huyết thanh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đồng thời, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá để ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ em và người lớn, chứa polysaccharit bao nang có nguồn gốc từ 13 kiểu huyết thanh của phế cầu khuẩn gồm kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm tiếp hợp 13-giá (PCV-13) cho

phế cầu khuẩn chứa kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N, và kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, và 23F.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch đa giá, chứa 13 thể tiếp hợp polysaccharit-protein riêng biệt cùng với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý, trong đó mỗi thể tiếp hợp chứa polysaccharit bao nang có nguồn gốc từ một kiểu huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với protein mang, và polysaccharit bao nang được tạo ra từ 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F, và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9A.

Trong chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế, protein mang có thể là CRM₁₉₇. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế có thể còn chứa tá dược, ví dụ, tá dược gồm tá dược gốc nhôm. Tá dược có thể được chọn từ nhóm gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit, và tốt hơn là, nhôm phosphat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm để kích thích phản ứng miễn dịch với tiếp hợp polysaccharit bao nang của *Streptococcus pneumoniae*, chứa lượng hiệu quả miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch đã nêu.

Theo một phương án, được phẩm có thể là chế phẩm gây miễn dịch được bào chế để chứa: 2 µg polysaccharit mỗi kiểu huyết thanh, ngoại trừ 6B là 4 µg; khoảng 34 µg protein mang CRM₁₉₇; 0,125 mg tá dược nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); và tá dược là dung dịch đệm natri clorua và natri suxinat.

Hiệu quả kỹ thuật

Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế chứa polysaccharit bao nang có nguồn gốc từ 13 kiểu huyết thanh riêng biệt của phế cầu khuẩn bao gồm kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N, do đó dẫn tới hiệu giá IgG huyết thanh và hoạt động của kháng thể chức năng cao. Do đó, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế có thể

được sử dụng thuận lợi để ngăn ngừa bệnh phế cầu khuẩn ở trẻ sơ sinh, trẻ em và người lớn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sự thay thế kiểu huyết thanh được thực hiện bởi một số kiểu huyết thanh với kháng kháng sinh và kháng đa thuốc. Ngoài ra, sự khác biệt về khu vực trong phân bố kiểu huyết thanh dẫn đến sự khác biệt trong tính phòng ngừa của Prevnar theo khu vực (Harboe ZB, Benfield TL, Valentiner-Branth P, et al. Temporal Trends in Invasive Pneumococcal Disease and Pneumococcal Serotypes over 7 Decades. Clin Infect Dis 2010; 50:329-37). Do đó, không có lý do nào để loại bỏ một kiểu huyết thanh bất kỳ trong vaccin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn đang tồn tại. Hơn nữa, có nhu cầu mở rộng thêm tính phòng ngừa bằng cách bổ sung kiểu huyết thanh.

Năm 2008, Dự án Kiểu huyết thanh của phế cầu khuẩn toàn cầu (Pneumococcal Global Serotype Project - GSP) công bố báo cáo dựa trên dữ liệu IPD được thu thập từ 1980 tới 2007, thể hiện rằng, theo sau kiểu huyết thanh 18C, kiểu huyết thanh 2 là kiểu huyết thanh có tỉ lệ mắc phải cao thứ 11 trong số 20 kiểu huyết thanh đứng đầu toàn cầu. Ngoài ra, Samir K. Saha et al. báo cáo rằng kiểu huyết thanh 2 có thể trở thành mối đe dọa vì kiểu huyết thanh 2 có khả năng cao gây ra viêm màng não do phế cầu khuẩn ở Bangladesh nhưng đã không có trong vaccin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn bất kỳ nào (Saha SK, Al Emran HM, Hossain B, Darmstadt GL, Saha S, et al. (2012) *Streptococcus pneumoniae* Serotype-2 Childhood Meningitis in Bangladesh: A Newly Recognized Pneumococcal Infection Threat. PLoS ONE 2012; 7(3): e32134). Do đó, nếu vaccin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn chứa kiểu huyết thanh 2, số lượng các bệnh phế cầu khuẩn có thể được giảm và còn được chuẩn bị cho sự thay thế kiểu huyết thanh có thể xảy ra khi tiêm chủng với PCV-13.

Kiểu huyết thanh của phế cầu khuẩn thể hiện các kiểu phân bố khác nhau theo tuổi của đối tượng. Cụ thể, kiểu huyết thanh 9N được phát hiện ra là khá quan trọng ở trẻ sơ sinh tuổi từ 0 tới 23 tháng, là đối tượng để tiêm chủng vaccin tiếp

hợp cho phế cầu khuẩn, được so sánh với trẻ em tuổi từ 24 tới 59 tháng. Kiểu huyết thanh 9N là kiểu huyết thanh phổ biến nhất thứ 14 theo sau 13 kiểu huyết thanh được chứa trong PCV-13. Điều này chỉ ra rằng việc chứa kiểu huyết thanh 9N sẽ đóng góp vào sự giảm tỉ lệ mắc bệnh phế cầu khuẩn, cụ thể là ở trẻ sơ sinh.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa 13 polysacarit bao nang trong Prevenar 13, một trong các kiểu huyết thanh được thay thế với kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá, chứa: 13 thể tiếp hợp polysacarit-protein riêng biệt, cùng với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý, trong đó mỗi tiếp hợp chứa polysacarit bao nang từ một kiểu huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với protein mang, và polysacarit bao nang được tạo ra từ 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F, và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N.

Polysacarit bao nang có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật tiêu chuẩn được biết đến bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Polysacarit bao nang có thể bị giảm về kích thước nhằm giảm độ nhớt hoặc tăng độ hòa tan của polysacarit bao nang hoạt hóa. Theo sáng chế, polysacarit bao nang được tạo ra từ 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F của *Streptococcus pneumoniae*, và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N của *Streptococcus pneumoniae*. Các thể tiếp hợp phế cầu khuẩn này được tạo ra bằng quy trình phân tách và bào chế thành chế phẩm liều đơn. Ví dụ, *Streptococcus pneumoniae* của mỗi kiểu huyết thanh được phát triển trong môi trường chứa đậu tương và sau đó mỗi kiểu huyết thanh polysacarit của phế cầu khuẩn được tinh chế qua việc ly tâm, kết tủa, và siêu lọc.

Protein mang tốt hơn là protein không độc và không gây phản ứng miễn dịch và có khả năng thu được với lượng đủ và tinh khiết. Protein mang nên tuân theo các quy trình tiếp hợp tiêu chuẩn. Trong chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế, protein mang có thể là CRM₁₉₇. CRM₁₉₇ là biến thể không độc (nghĩa là, độc tố

giảm lực) của bệnh bạch hầu độc tố của bệnh bạch hầu được phân lập từ môi trường nuôi cấy của chủng *Corynebacterium diphtheria* C7 (β 197) phát triển trên môi trường chứa axit casamino và phần chiết nấm men. CRM₁₉₇ được tinh chế bằng siêu lọc, kết tủa amoniac sulfat, và sắc ký trao đổi ion. Mặt khác, CRM₁₉₇ được tạo ra bằng cách tái tổ hợp theo Patent Mỹ số 5614382.

Độc tố giảm lực của bệnh bạch hầu khác còn thích hợp để dùng làm protein mang. Protein mang thích hợp khác bao gồm các độc tố vi khuẩn hoạt hóa ví dụ như độc tố giảm lực của bệnh uốn ván, độc tố giảm lực của bệnh ho gà; độc tố giảm lực của bệnh dịch tả (WO2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, và độc tố A ngoại tế bào từ *Pseudomonas aeruginosa*. Protein màng ngoài của vi khuẩn ví dụ như phức hợp màng ngoài c (OMPC), porin, protein liên kết transferrin, pneumolysin, protein bề mặt của phẩy cầu khuẩn A (PspA), protein bám dính của phẩy cầu khuẩn (PsaA), peptidaza C5a từ streptococcus Nhóm A hoặc Nhóm B, hoặc protein D *Haemophilus influenzae*, có thể cũng được sử dụng. Các protein khác, ví dụ như ovalbumin, hemoxyanin hà (KLH), albumin huyết thanh bò (BSA) hoặc protein được tinh chế là dẫn xuất của tuberculin (PPD) có thể cũng được sử dụng như protein mang. Các biến thể độc tố của bệnh bạch hầu ví dụ như CRM₁₇₃, CRM₂₂₈, và CRM₄₅ có thể cũng được sử dụng như protein mang.

Nhằm tạo ra polysacarit để phản ứng với protein mang, polysacarit được tinh chế được hoạt hóa về mặt hóa học. Sau khi được hoạt hóa, mỗi polysacarit bao nang được tiếp hợp riêng lẻ với protein mang để tạo thành tiếp hợp glyco. Theo một phương án, mỗi polysacarit bao nang được tiếp hợp với cùng protein mang. Hoạt hóa hóa học của polysacarit và sự tiếp hợp tiếp theo với protein mang đạt được theo các phương pháp thông thường (ví dụ, Patent Mỹ số 4673574 và 4902506). Nhóm hydroxyl trong polysacarit được oxy hóa thành nhóm aldehyt bởi các chất oxy hóa ví dụ như các periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat, canxi periodat hoặc axit periodic). Hoạt hóa hóa học dẫn tới sự phân hủy chất oxy hóa không bình thường của các nhóm hydroxyl liền kề. Tiếp hợp thu được bằng cách amin hóa chất khử. Ví dụ, polysacarit bao nang được hoạt hóa và protein

mang phản ứng với sự có mặt của chất khử ví dụ như natri xyanoborohydrua. Các nhóm aldehyt không phản ứng có thể được loại bỏ bằng cách bổ sung chất oxy hóa mạnh.

Sau khi tiếp hợp polysacarit bao nang với protein mang, tiếp hợp polysacarit-protein có thể được tinh chế (được làm giàu với tiếp hợp polysacarit-protein) bằng một loạt các kỹ thuật. Các kỹ thuật này bao gồm cô đặc/phân lọc, sắc ký cột, và lọc sâu. Tiếp hợp được tinh chế polysacarit-protein được trộn để bào chế chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, mà có thể được sử dụng làm vaccin. Sự bào chế chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp được nhận biết trong lĩnh vực liên quan. Ví dụ, 13 thể tiếp hợp cho phẩy cầu khuẩn riêng lẻ có thể được bào chế với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý để tạo ra chế phẩm. Các ví dụ về các chất dẫn thuốc như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, muối đệm, rượu polyhydric (ví dụ, glyxerol, glycol propylen, glycol polyetylen lỏng) và các dung dịch dextroza.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều tá dược. Như được chỉ ra ở đây, "tá dược" chỉ chất đóng vai trò tăng cường tính gây miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế. Do đó, tá dược thường được cung cấp để tăng cường phản ứng miễn dịch và được biết đến rộng rãi bởi người có hiểu biết bình thường trong lĩnh vực. Tá dược thích hợp để tăng cường hiệu quả của chế phẩm gồm, nhưng không giới hạn ở:

(1) các muối nhôm (alum), ví dụ như nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm sulfat, v.v.;

(2) Chế phẩm huyết tương dạng dầu-trong-nước (có hoặc không có các chất kích thích miễn dịch đặc hiệu ví dụ như peptit muramyl (như được chỉ ra bên dưới) hoặc các thành phần của thành tế bào vi khuẩn), ví dụ như, (a) MF59 (WO 90/14837), chứa 5% Squalene, 0,5% Tween 80, và 0,5% Span 85 (tùy ý chứa các lượng khác nhau của MTP-PE (xem bên dưới, mặc dù không cần thiết), được bào chế thành hạt thành phần siêu hiển vi sử dụng máy vi lỏng hóa ví dụ như máy vi

lông hóa mẫu 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, chứa 10% Squalene, 0,4% Tween 80, 5% polyme bị khóa bởi pluronic L121, và thr-MDP (xem bên dưới), hoặc được lông hóa thành huyết tương thành phần siêu hiển vi hoặc được khuấy xoáy để tạo ra huyết tương kích thước hạt lớn, và (c) hệ tá được Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) chứa 2% Squalene, 0,2% Tween 80, và một hoặc nhiều thành phần của thành tế bào vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm 3-O-khử axyl monophosphory lipit A (MPL™) được mô tả trong Patent Mỹ số 4912094 (Corixa), trehalosa dimycolat (TDM), và khung của thành tế bào (CWS), tốt hơn là MPL + CWS (Detox™);

(3) tá được saponin, ví dụ như Quil A hoặc STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patent Mỹ số 5057540) hoặc hạt được tạo thành từ ví dụ như ISCOM (các phức hợp kích thích miễn dịch);

(4) lipopolysacarit của vi khuẩn, đồng dạng lipit tổng hợp A ví dụ như các hợp chất aminoalkyl glucosamin phosphat (AGP), hoặc các dẫn xuất hoặc đồng dạng của chúng, mà có sẵn từ Corixa, và được mô tả trong Patent Mỹ số 6113918; một AGP ví dụ là 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamin]etyl 2-Deoxy-4-0-phosphono-3-0-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamin]-b-D-glucopyranosit, cũng được biết đến là 529 (được biết đến trước đây là RC529), được bào chế ở dạng nước hoặc nhũ tương ổn định;

(5) polynucleotit tổng hợp ví dụ như oligonucleotit gồm motip CpG (Patent Mỹ số 6207646);

(6) xytoxin, ví dụ như 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, gamma interferon), yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF), yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào (M-CSF), yếu tố hoại tử khối u (TNF), các phân tử đồng kích thích B7-1 và B7-2, v.v.;

(7) các biến thể được khử độc của độc tố ribosyl hóa ADP của vi khuẩn ví dụ như độc tố bệnh dịch tả (CT) hoặc ở dạng tự nhiên hoặc biến thể, ví dụ, axit glutamic ở vị trí axit amin 29 được thay thế bằng axit amin khác, tốt hơn là histidin, theo WO 00/18434 (cũng xem WO 02/098368 và WO 02/098369), độc tố bệnh ho gà (PT), hoặc độc tố không bền nhiệt của *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) các thành phần bổ trợ ví dụ như trime của thành phần bổ trợ C3d.

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

Theo một phương án cụ thể, muối nhôm được dùng làm tá dược. Tá dược muối nhôm có thể là vaccin được kết tủa nhôm hoặc vaccin được hấp thụ nhôm. Các muối nhôm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alumin được hydrat, alumin trihydrat (ATH), nhôm hydrat, nhôm trihydrat, Alhydrogel, Superfos, Amphojel, nhôm hydroxit (III), nhôm hydroxyphosphat sulfat (Tá dược Nhôm Phosphat (APA)), và alumin vô định hình. APA là huyền phù của nhôm hydroxyphosphat. Nếu nhôm clorua và natri phosphat được trộn với tỉ lệ 1:1, nhôm hydroxyphosphat sulfat được kết tủa. Phần kết tủa được xác định kích thước tới 2-8 μm bằng cách sử dụng máy trộn cắt cao năng và được thấm tách với nước muối sinh lý, tiếp theo là khử trùng. Theo một phương án, $\text{Al}(\text{OH})_3$ có sẵn (ví dụ, Alhydrogel hoặc Superfos) để dùng cho hấp thụ protein. 50-200 g protein có thể được hấp thụ mỗi 1 mg nhôm hydroxit, và tỉ lệ này phụ thuộc vào điểm đẳng điện (pI) của protein và pH của dung môi. Protein có pI thấp được hấp thụ mạnh được so sánh với protein có pI cao. Các muối nhôm hình thành chỗ chứa kháng nguyên mà giải phóng chậm các kháng nguyên trong vòng 2 đến 3 tuần, kích hoạt không đặc hiệu thực bào, các bộ thể, và hệ miễn dịch bẩm sinh.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm (ví dụ, chế phẩm vaccin) để kích thích phản ứng miễn dịch với tiếp hợp polysacarit bao nang của *Streptococcus pneumoniae*,

chứa lượng có hiệu quả miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch.

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được sử dụng để bảo vệ hoặc điều trị người nhạy cảm với việc nhiễm phế cầu khuẩn, bằng cách sử dụng vaccin thông qua đường toàn thân hoặc niêm mạc. Như được chỉ ra ở đây, thuật ngữ “lượng hiệu quả” chỉ lượng cần thiết để kích thích kháng thể tới mức độ đủ để giảm đáng kể khả năng nhiễm *Streptococcus pneumoniae* hoặc tính nghiêm trọng của nó. Các cách sử dụng này có thể bao gồm việc tiêm thông qua các đường trong cơ, trong màng bụng, nội bì hoặc dưới da; hoặc cách sử dụng thông qua niêm mạc tới các đường uống/ăn, hô hấp hoặc cơ quan sinh dục-niệu.

Theo một phương án, việc áp dụng trong mũi được sử dụng để điều trị bệnh viêm phổi hoặc viêm tai giữa vì sự truyền bằng đường mũi họng của phế cầu khuẩn có thể được ngăn ngừa hiệu quả hơn, do đó làm suy yếu sự lây nhiễm ở giai đoạn đầu của nó. Lượng tiếp hợp trong mỗi liều vaccin được chọn bằng lượng kích thích phản ứng miễn dịch bảo vệ mà không có tác dụng phụ đáng kể. Lượng như vậy có thể thay đổi phụ thuộc vào kiểu huyết thanh của phế cầu khuẩn. Thông thường, mỗi liều chứa 0,1 tới 100 μg của polysaccharit, cụ thể 0,1 tới 10 μg , và cụ thể hơn là 1 tới 5 μg . Lượng tối ưu của các thành phần của vaccin cụ thể có thể được xác định bởi các nghiên cứu cơ bản liên quan tới việc quan sát phản ứng miễn dịch thích hợp ở đối tượng. Ví dụ, lượng để tiêm chủng cho đối tượng là người có thể được xác định bằng cách ngoại suy kết quả của thử nghiệm trên động vật. Ngoài ra, liều lượng có thể được xác định bằng thực nghiệm.

Trong phương án cụ thể theo sáng chế, chế phẩm vaccin là chế phẩm dạng lỏng tiệt trùng chứa polysaccharit bao nang của phế cầu khuẩn của 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, và 23F, và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N, được tiếp hợp riêng lẻ với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5 mL có thể được bào chế chứa: 2 μg polysaccharit mỗi kiểu huyết thanh, ngoại trừ 6B là 4 μg ; khoảng 34 μg protein mang CRM₁₉₇; 0,125 mg tá dược nguyên tố nhôm (0,5 mg nhôm phosphat); và natri clorua và đệm natri suxinat

làm tá dược. Chất lỏng có thể được nạp đầy vào ống tiêm liều đơn không có bất kỳ chất bảo quản nào. Sau khi lắc, chất lỏng trở thành vaccin dạng huyền phù màu trắng đồng nhất và sẵn sàng để tiêm trong cơ.

Theo phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng ở dạng liều đơn. Ví dụ, chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được áp dụng 2, 3, 4, hoặc nhiều lần với khoảng cách thời gian thích hợp, ví dụ như, khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng hoặc hỗn hợp của chúng. Kế hoạch tiêm chủng có thể tuân theo kế hoạch được thiết kế cho vaccin Prevnar. Ví dụ, kế hoạch thông thường cho trẻ sơ sinh và trẻ tập đi để chống lại bệnh xâm nhập gây ra bởi *S. pneumoniae* là lúc 2, 4, 6 và 12-15 tháng tuổi. Do đó, theo khía cạnh này, chế phẩm được dùng 4 lần, nghĩa là, lúc 2, 4, 6, và 12-15 tháng tuổi.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều protein từ *Streptococcus pneumoniae*. Ví dụ về protein của *Streptococcus pneumoniae* thích hợp cho việc chứa trong chế phẩm gồm các protein được nhận diện trong Đơn đăng ký Patent quốc tế với số Công bố WO02/083855, cũng như các protein được mô tả trong Đơn đăng ký Patent quốc tế với số Công bố WO02/053761.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng qua một hoặc nhiều cách áp dụng được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực ví dụ như đường tiêm, qua da, qua niêm mạc, trong mũi, trong cơ, trong màng bụng, trong da, trong ven, hoặc dưới da và được bào chế tương ứng. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng chế phẩm lỏng trong cơ, trong màng bụng, dưới da, trong ven, trong tĩnh mạch, hoặc tiêm qua da hoặc tiêm qua niêm mạc hô hấp. Chế phẩm dạng lỏng để tiêm có thể chứa dung dịch hoặc tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng lọ liều đơn vị, lọ liều đa, hoặc ống tiêm được nạp đầy trước. Chất mang dược dụng cho chế phẩm dạng lỏng bao gồm dung môi chứa nước hoặc không chứa nước, huyền phù, nhũ tương hoặc dầu. Ví dụ về dung môi không chứa nước gồm propylen glycol,

polyetylen glycol, và etyl oleat. Chất mang chứa nước gồm nước, dung môi rượu/nước, nhũ tương, hoặc huyền phù, muối sinh lý, và dung dịch đệm. Ví dụ về dầu gồm dầu thực vật hoặc động vật, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu ô liu, dầu hoa hướng dương, dầu gan, dầu tổng hợp ví dụ như dầu từ biển, và lipit 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 tiêm cơ bản là đẳng trương. Do đó, tính đẳng trương hoặc tính ưu trương có thể là ưu điểm để lưu trữ chế phẩm. Khi dược phẩm là ưu trương, chế phẩm có thể được pha loãng tới mức đẳng trương trước khi sử dụng. Chất gây đẳng trương có thể là chất gây đẳng trương ion hóa ví dụ như muối hoặc chất gây đẳng trương không ion hóa ví dụ như cacbohydrat. Chất gây đẳng trương ion hóa bao gồm natri clorua, canxi clorua, kali clorua, và magie clorua, nhưng không bị giới hạn ở đó. Chất gây đẳng trương không ion hóa bao gồm sorbitol và glyxerol, nhưng không bị giới hạn ở đó. Tốt hơn là, bao gồm ít nhất một dung dịch đệm dược dụng. Ví dụ, khi dược phẩm là dung dịch truyền hoặc tiêm, tốt hơn là nó được bào chế trong dung dịch đệm với khả năng hỗ trợ ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 10, ví dụ như độ pH 5-9 hoặc 6-8. Dung dịch 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 dùng để tiêm, dung dịch đệm có thể được chọn từ các dung dịch được chấp nhận bởi Dược điển Mỹ (United States Pharmacopeia - USP). Ví dụ, dung dịch đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm monoaxit ví dụ như axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric, và axit lactic; diaxit ví dụ như axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit cacbonic, axit glutamic, axit malic, axit suxinic, và axit tartaric; axit đa chức ví dụ như axit xitric và axit phosphoric; và bazơ ví dụ như amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin, và TRIS. Đối với tiêm, chất dẫn thuốc (để tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong khớp, và trong cơ) bao gồm dung dịch natri clorua, dung dịch dextroza của Ringer, dextroza và natri clorua, dung dịch của Ringer được lactat hóa và dầu cố định. Chất dẫn thuốc để dùng trong tĩnh mạch bao gồm dung dịch dextroza của Ringer hoặc dextroza tương

tự dựa trên việc truyền dịch, bổ trợ dinh dưỡng và bổ trợ điện phân. Ví dụ gồm chất lỏng tiệt trùng như nước và dầu, có hoặc không có hoạt chất bề mặt và tá dược được dụng. Thông thường, nước, muối sinh lý, dung dịch dextroza, dung dịch đường có liên quan, và các glycol ví dụ như propylen glycol hoặc polyetylen glycol, cụ thể, polysorbat 80, là thích hợp để tiêm. Ví dụ về dầu gồm dầu động vật và thực vật, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu ô liu, dầu hướng dương, dầu gan, dầu tổng hợp ví dụ như dầu từ biển, và lipid thu được từ sữa hoặc trứng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa hoạt chất bề mặt. Tốt hơn là, polyoxyetylen sorbitan este (thông thường được gọi là Tweens), cụ thể, polysorbat 20 và polysorbat 80; copolyme (ví dụ như DOWFAX™) của etylen oxit (EO), propylen oxit (PO), butylen oxit (BO); octoxynol với số lượng các nhóm ethoxy(oxy-1,2-ethanediyl) lặp lại khác nhau, cụ thể, octoxynol-9(Triton-100); etylphenoxypolyethoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit ví dụ như lexitin; nonylphenol ethoxyl hóa ví dụ như các Tergitol™ NP; lauryl, xetyl, stearyl, ete béo polyoxyetylen có gốc rượu oleylic (hoạt chất bề mặt Brij), cụ thể, ete trietylglycol monolauryl (Brij 30); sorbitan ete được biết đến là SPAN, cụ thể, sorbitan trioleat (Span 85) và sorbitan monolaurat nhưng không giới hạn ở đó. Tween 80 tốt hơn là ở trong nhũ tương.

Hỗn hợp của các hoạt chất bề mặt ví dụ như Tween 80/Span 85 có thể được sử dụng. Hỗn hợp polyoxyetylen sorbitan este ví dụ như Tween 80 và octoxynol ví dụ như Triton X-100 là thích hợp. Hỗn hợp của Laureth 9 và Tween và/hoặc octoxynol là thích hợp. Tốt hơn là, lượng polyoxyetylen sorbitan este (ví dụ như Tween 80) là 0,01% tới 1% (w/v), cụ thể 0,1%; lượng octylphenoxy polyoxyetanol hoặc nonylphenoxy polyoxyetanol (ví dụ như Triton X-100) là 0,001% tới 0,1% (w/v), cụ thể 0,005% tới 0,02%; và lượng polyoxyetylen ete (ví dụ như laureth 9) là 0,1% tới 20% (w/v), có thể là 0,1% tới 10%, cụ thể 0,1% tới 1% hoặc khoảng 0,5%. Theo một phương án, dược phẩm được vận chuyển qua hệ thống điều tiết giải phóng. Ví dụ, truyền trong tĩnh mạch, miếng dán thấm qua da, liposom, hoặc các đường khác có thể được sử dụng cho việc dùng thuốc. Theo một khía cạnh, các

đại phân tử ví dụ như vi cầu hoặc mảnh ghép có thể được sử dụng.

Phần bộc lộ phía trên mô tả chung sáng chế. Sự hiểu biết hoàn chỉnh hơn có thể đạt được bằng cách viện dẫn các ví dụ cụ thể sau. Các ví dụ này được mô tả đơn lẻ cho mục đích minh họa và không có dự định hạn chế phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sự tạo thành của Polysacarit bao nang của *S. pneumoniae*

Nuôi cấy *S. pneumoniae* và tinh chế polysacarit bao nang được tiến hành như được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Kiểu huyết thanh của *S. pneumoniae* thu được từ Bảo tàng giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC). *S. pneumoniae* được xác định đặc tính là dạng bao nang và bất động, Gram-dương, song cầu khuẩn dạng mũi móc và sự tan máu alpha trong môi trường thạch chứa máu. Kiểu huyết thanh được nhận diện bằng thử nghiệm Quelling sử dụng kháng-huyết thanh đặc hiệu (Patent Mỹ số 5847112).

Sự tạo thành ngân hàng tế bào

Một vài thế hệ giống được tạo ra nhằm mở rộng chủng và loại bỏ các thành phần nguồn gốc động vật (thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ bổ sung của hạt giống được tạo ra. Thế hệ bổ sung đầu tiên được tạo ra từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được tạo ra từ lọ chứa thế hệ bổ sung đầu tiên. Các lọ đựng giống được lưu trữ đông lạnh ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) với glyxerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để tạo ra ngân hàng tế bào, tất cả giống cấy được phát triển trong môi trường chứa đậu tương. Trước khi đông lạnh, tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm, môi trường đã dùng được loại bỏ, và khối nhỏ tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh (ví dụ như glyxerol tổng hợp).

Nuôi cấy

Giống cây từ ngân hàng tế bào đang hoạt động được dùng để cấy vào chai giống chứa môi trường chứa đậu tương. Chai giống được dùng để cấy vào bình lên men giống chứa môi trường chứa đậu tương.

Sự lên men giống

Sự lên men giống được tiến hành trong bình lên men giống với nhiệt độ và độ pH được kiểm soát. Sau khi đạt tới mật độ quang học mong muốn, bình lên men giống được dùng để cấy vào bình lên men sản xuất chứa môi trường chứa đậu tương.

Lên men sản phẩm

Lên men sản phẩm là bước cuối cùng trong quá trình lên men. Nhiệt độ, độ pH và tốc độ khuấy được kiểm soát.

Sự bất hoạt

Khi sự phát triển dừng lại, sự lên men được dừng lại bằng cách bổ sung chất bất hoạt. Sau khi bất hoạt, các thành phần trong thiết bị lên men được làm lạnh và độ pH của chúng được điều chỉnh.

Sự tinh chế

Dịch nuôi cấy từ thiết bị lên men được ly tâm và được lọc để loại bỏ mảnh vỡ của tế bào vi khuẩn. Một vài chu kỳ hoạt động cô đặc/phân lọc, kết tủa/rửa giải, và lọc sâu được dùng để loại bỏ tạp chất và tinh chế polysacarit bao nang.

Ví dụ 2. Sự tạo thành thể tiếp hợp Polysacarit bao nang-CRM₁₉₇ của *S. pneumoniae*

Polysacarit của các kiểu huyết thanh khác nhau được hoạt hóa theo các chu trình khác nhau và sau đó được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Quá trình kích hoạt bao gồm sự giảm kích cỡ của polysacarit bao nang tới khối lượng phân tử đích, hoạt hóa hóa học và trao đổi dung dịch đậm qua việc siêu lọc. CRM₁₉₇ đã tinh chế được tiếp hợp

với polysacarit bao nang được hoạt hóa, và thể tiếp hợp được tinh chế sử dụng siêu lọc và cuối cùng được lọc qua màng lọc 0,22 μm . Các thông số của quá trình ví dụ như độ pH, nhiệt độ, hàm lượng và thời gian như sau.

(1) Hoạt hóa

Bước 1

Polysacarit của mỗi kiểu huyết thanh được pha loãng với nước để tiêm, natri axetat, và natri phosphat tới nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 2,0 mg/mL. Với kiểu huyết thanh 1, natri hydroxit (nồng độ bazơ cuối cùng 0,05M) được thêm vào và dung dịch được ủ ở $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm lạnh tới khoảng từ 21 đến 25°C và sự thủy phân được dừng lại bằng cách bổ sung HCl 1M tới khi đạt được độ pH đích là $6,0 \pm 0,1$. Với kiểu huyết thanh 3, HCl (nồng độ axit cuối cùng 0,01M) được bổ sung và dung dịch được ủ ở $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm lạnh tới khoảng từ 21 đến 25°C và sự thủy phân được dừng lại bằng cách bổ sung natri phosphat 1M tới khi đạt được độ pH đích là $6,0 \pm 0,1$. Với kiểu huyết thanh 4, HCl (nồng độ axit cuối cùng 0,1M) được bổ sung và dung dịch được ủ ở $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm lạnh tới khoảng từ 21 đến 25°C và sự thủy phân được dừng lại bằng cách bổ sung natri phosphat 1M tới khi đạt được độ pH đích là $6,0 \pm 0,1$. Với kiểu huyết thanh 6A, axit axetic băng (nồng độ axit cuối cùng 0,2M) được bổ sung và dung dịch được ủ ở $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm lạnh tới khoảng từ 21 đến 25°C và sự thủy phân được dừng lại bằng cách bổ sung natri hydroxit 1M tới khi đạt được độ pH đích là $6,0 \pm 0,1$. Với kiểu huyết thanh 14 và 18C, axit axetic băng (nồng độ axit cuối cùng 0,2M) được bổ sung và dung dịch được ủ ở $94^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch được làm lạnh tới khoảng từ 21 đến 25°C và sự thủy phân được dừng lại bằng cách bổ sung natri phosphat 1M tới khi đạt được độ pH đích là $6,0 \pm 0,1$.

Bước 2: Phản ứng periodat

Đương lượng mol của natri periodat cần cho sự hoạt hóa sacarit của phế cầu khuẩn được xác định sử dụng hàm lượng sacarit tổng số. Với việc trộn kỹ, phản ứng oxy hóa được dễ tiến hành trong khoảng từ 16 đến 20 giờ ở 21 - 25°C cho tất cả các kiểu huyết thanh ngoại trừ 1, 7F, và 19F, trong đó nhiệt độ là $\leq 10^\circ\text{C}$.

Bước 3: Siêu lọc

Sacarit đã oxy hóa được cô đặc và được phân lọc với nước để tiêm (water for injection - WFI) với thiết bị siêu lọc 100 kDa MWCO (thiết bị siêu lọc 30kDa cho kiểu huyết thanh 1 và thiết bị siêu lọc 5 kDa cho kiểu huyết thanh 18C). Phân lọc được thực hiện sử dụng dung dịch natri clorua 0,9% cho kiểu huyết thanh 1, dung dịch đệm natri axetat 0,01M (độ pH 4,5) cho kiểu huyết thanh 7F, và dung dịch đệm natri phosphat 0,01M (độ pH 6,0) cho kiểu huyết thanh 19F. Phần thấm qua được loại bỏ và phần giữ lại được lọc qua màng lọc 0,22 μm .

Bước 4: Sự đông khô

Với kiểu huyết thanh 3, 4, 5, 9N, 9V, và 14, sacarit cô đặc được trộn với protein mang CRM₁₉₇, được nạp đầy vào bình thủy tinh, được đông khô và sau đó được lưu trữ ở $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

Với kiểu huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, và 23F, thêm vào lượng sucroza được xác định mà được tính toán để đạt được $5\% \pm 3\%$ hàm lượng sucroza trong hỗn hợp phản ứng tiếp hợp. Kiểu huyết thanh 1 và 18C không cần sự bổ sung sucroza nào. Sacarit cô đặc sau đó được nạp đầy vào bình thủy tinh, được đông khô và sau đó được lưu trữ ở $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

(2) Quá trình tiếp hợp

Thẻ tiếp hợp chứa nước được tiến hành với kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14, và 18C, và thẻ tiếp hợp DMSO được tiến hành với kiểu huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F và 23F.

Bước 1: Sự hòa tan

Thẻ tiếp hợp chứa nước

Với kiểu huyết thanh 3, 4, 5, 9N, 9V và 14, hỗn hợp sacarit-CRM₁₉₇ được đông khô được hoạt hóa, tan ra và cân bằng với nhiệt độ phòng. Sacarit-CRM₁₉₇ được đông khô và được hoạt hóa sau đó được hoàn nguyên trong dung dịch đệm 0,1M natri phosphat với tỉ lệ thông thường với mỗi kiểu huyết thanh. Với kiểu huyết thanh 1 và 18C, sacarit được đông khô được hoàn nguyên trong dung dịch CRM₁₉₇ trong 1 M diaxit natri phosphat với tỉ lệ thông thường 0,11 L natri phosphat mỗi 1 L dung dịch CRM₁₉₇.

Tiếp hợp Dimetyl sulfoxit (DMSO)

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

Bước 2: Phản ứng Tiếp hợp

Thẻ tiếp hợp chứa nước

Với kiểu huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14 và 18C, tiếp hợp phản ứng được khởi đầu bằng cách thêm vào dung dịch natri xyanoborohydrua (100 mg/mL) để đạt được 1,0 – 1,2 mol natri xyanoborohydrua mỗi mol sacarit. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 44 - 96 giờ ở 23°C đến 37°C. Nhiệt độ và thời gian phản ứng được điều chỉnh theo kiểu huyết thanh. Nhiệt độ sau đó được giảm tới $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và natri clorua 0,9% được thêm vào thiết bị phản ứng. Dung dịch natri borohydrua (100 mg/mL) được thêm vào để đạt được 1,8 – 2,2 đương lượng mol natri borohydrua

mỗi mol sacarit. Hỗn hợp được ủ trong 3 - 6 giờ ở $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Quy trình này dẫn đến sự giảm aldehyt không phản ứng bất kỳ có trên sacarit. Hỗn hợp được pha loãng với natri clorua 0,9% và hỗn hợp tiếp hợp được pha loãng được lọc vào bình giữ sử dụng màng lọc trước 1,2 μm .

Tiếp hợp DMSO

Với kiểu huyết thanh 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F và 23F, sacarit được hoạt hóa và protein mang CRM₁₉₇ được trộn với tỉ lệ nằm trong khoảng 0,8 g – 1,25 g sacarit/g CRM₁₉₇. Phản ứng tiếp hợp được khởi đầu bằng cách thêm vào dung dịch natri xyanoborohydrua (100mg/mL) với tỉ lệ 0,8 – 1,2 đương lượng mol natri xyanoborohydrua với một mol sacarit được hoạt hóa. WFI được thêm vào hỗn hợp phản ứng tới đích là 1 % (v/v), và hỗn hợp được ủ trong 11 - 27 giờ ở $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Dung dịch natri borohydrua, 100 mg/mL (thông thường 1,8 – 2,2 đương lượng mol natri borohydrua mỗi mol sacarit được hoạt hóa) và WFI (đích là 5% v/v) được thêm vào phản ứng và hỗn hợp được ủ trong 3 - 6 giờ ở $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Quy trình này dẫn đến sự giảm aldehyt không phản ứng bất kỳ có trên sacarit. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được pha loãng với natri clorua 0,9%, và hỗn hợp tiếp hợp được pha loãng được lọc vào đường ống giữ sử dụng màng lọc trước 1,2 μm .

Bước 3: Siêu lọc

Hỗn hợp tiếp hợp đã pha loãng được cô đặc và được phân lọc trên thiết bị siêu lọc MWCO 100 kDa với tối thiểu là 20 lần thể tích của 0,9% natri clorua hoặc dung dịch đệm. Phần thấm qua được loại bỏ.

Bước 4: Lọc tiệt trùng

Phần còn lại sau bước phân lọc MWCO 100 kDa được lọc qua màng lọc 0,22 μm . Các đối chứng trong-quy trình (thành phần sacarit, protein tự do, sacarit tự do, và gốc xyanua; và trong trường hợp tiếp hợp DMSO, DMSO dư được kiểm tra bổ sung) được tiến hành trên sản phẩm được lọc. Các đối chứng trong-quy trình trên phần còn lại được lọc được tiến hành để xác định liệu rằng có cần thêm bước

cô đặc bổ sung, phân lọc, và/hoặc pha loãng. Nếu cần, thể tiếp hợp đã lọc được pha loãng với 0,9% natri clorua để đạt được nồng độ cuối cùng ít hơn 0,55 g/L. Thử nghiệm giải phóng cho thành phần sacarit, thành phần protein và tỉ lệ sacarit:protein được tiến hành ở giai đoạn này. Cuối cùng, thể tiếp hợp được lọc (0,22 μm) và thử nghiệm giải phóng (bề ngoài, protein tự do, sacarit tự do, độc tố nội tế bào, xác định kích thước phân tử, xyanua dư, DMSO dư, độ tương đồng sacarit và độ tương đồng CRM₁₉₇) được tiến hành. Khối dung dịch cô đặc cuối cùng được lưu trữ ở 2 – 8°C.

Ví dụ 3. Chế phẩm vacxin tiếp hợp cho phế cầu khuẩn đa giá

Thể tích cần cho khối cô đặc cuối cùng được tính toán dựa trên thể tích mẻ nuôi cấy và khối cô đặc sacarit. Sau khi lượng cần thiết là 0,85% natri clorua (muối sinh lý), polysorbat 80 và dung dịch đệm suxinat được thêm vào bình pha chế được dán nhãn trước, khối cô đặc được thêm vào. Phần tạo ra sau đó được trộn kỹ và được lọc khử trùng qua màng 0,22 μm . Khối đã bào chế được trộn nhẹ nhàng trong và sau khi thêm vào khối nhôm phosphat. Độ pH được kiểm tra và điều chỉnh nếu cần thiết. Khối sản phẩm được bào chế được lưu trữ ở 2-8°C. Sản phẩm chứa, với thể tích 0,5 ml, 2 μg polysacarit mỗi kiểu huyết thanh, ngoại trừ 6B là 4 μg ; khoảng 32 μg protein mang CRM₁₉₇; 0,125 mg tá dược chứa nguyên tố nhôm (0,5 mg nhôm phosphat); khoảng 4,25 mg natri clorua; khoảng 295 μg chất đệm natri suxinat; và khoảng 100 μg polysorbat 80.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa: 13 thể tiếp hợp polysacarit-protein riêng biệt, cùng với chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt sinh lý, trong đó mỗi thể tiếp hợp polysacarit-protein chứa polysacarit bao nang từ một kiểu huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với protein mang, và polysacarit bao nang được tạo ra từ 12 kiểu huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F và 23F, và kiểu huyết thanh 2 hoặc 9N, trong đó protein mang là CRM₁₉₇.
2. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo điểm 1, còn chứa tá dược.
3. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo điểm 2, trong đó tá dược là tá dược gốc nhôm.
4. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo điểm 3, trong đó tá dược được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit.
5. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo điểm 4, trong đó tá dược là nhôm phosphat.
6. Dược phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch với thể tiếp hợp polysacarit bao nang *Streptococcus pneumoniae*, chứa lượng có hiệu quả miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm gây miễn dịch đa giá là liều đơn 0,5 ml được bào chế để chứa:

2 µg polysacarit mỗi kiểu huyết thanh, ngoại trừ 6B là 4 µg;

khoảng 34 µg protein mang CRM₁₉₇;

0,125 mg tá dược chứa nguyên tố nhôm (0,5 mg nhôm phosphat); và

chất đệm natri clorua và natri suxinat làm tá dược.