



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

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

(11)



1-0033283

(51)⁸ A61K 39/12; A61K 31/047; A61K
31/198

(13) B

(21) 1-2019-00179

(22) 15/06/2017

(86) PCT/EP2017/064665 15/06/2017

(87) WO/2017/216288 21/12/2017

(30) 62/350,919 16/06/2016 US

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/06/2019 375A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4 2333 CN Leiden, NL

(72) NGUYEN, Thierry-Thien (NL); BRUNER, Mark (NL).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM
SINH MIỄN DỊCH

(57) Chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 của virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV), sorbitol, polysorbat 20, và chất đệm histidin được mô tả. Chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả là có lợi trong đó chúng ổn định ở nhiệt độ được làm lạnh trong khoảng thời gian kéo dài, và thích hợp với tá dược. Cũng được mô tả là các phương pháp sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch để gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng một mình, hoặc kết hợp với một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung, hoặc một hoặc nhiều vector adenovirus mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch của protein gp140 HIV mà có tính ổn định cải thiện, và đến phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut gây suy giảm miễn dịch ở người (Human Immunodeficiency Virus - HIV) ảnh hưởng đến hàng triệu người trên thế giới, và việc ngăn ngừa HIV thông qua vaccin hữu hiệu vẫn được ưu tiên rất cao, ngay cả trong thời đại điều trị kháng retrovirut phổ biến. HIV-1 là chủng virut gây bệnh phổ biến nhất, với hơn 90% ca HIV/AIDS có nguồn gốc từ sự nhiễm HIV-1 nhóm M. Nhóm M được chia tiếp thành các nhánh hoặc các kiểu phụ khác. Vaccin hữu hiệu lý tưởng là có khả năng gây ra cả đáp ứng tế bào hiệu nghiệm và kháng thể trung hòa rộng có khả năng làm trung hòa các chủng HIV-1 từ các nhánh khác nhau.

Mức độ đột biến cao của HIV-1 làm cho việc phát triển vaccin HIV-1 trở thành thách thức chưa từng có. Để cải thiện mức độ phủ của epitop tế bào T tiềm năng, và cải thiện đáp ứng tế bào, các kháng nguyên Gag, Pol và Env của HIV-1 “khảm”, có nguồn gốc từ các protein Kháng Nguyên Nhóm (Group Antigen - Gag), Polymeraza (Polymerase - Pol), và Vỏ (Envelope - Env) của HIV, được mô tả bởi các tác giả khác và được phát triển với nỗ lực mang lại mức độ phủ tối đa của epitop tế bào T tiềm năng (ví dụ như, Barouch et al, *Nat Med* 2010, 16: 319-323). Kháng nguyên khảm tương tự về chiều dài và cấu trúc miền với kháng nguyên HIV-1 có trong tự nhiên, thể hoang dại.

Trình tự mã hóa các kháng nguyên khảm được tách dòng trong vectơ, ví dụ, như kiểu huyết thanh adenovirut tái tổ hợp 26 (rAd26), và vectơ tái tổ hợp này được dùng trong vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống HIV (xem ví dụ Barouch et al, *supra*; và WO 2010/059732). Vectơ virut biểu hiện kháng nguyên HIV khảm này đã chứng minh có hiệu quả trong việc gây đáp ứng miễn dịch chống lại lây nhiễm HIV.

Chiến lược chữa bệnh khác mà đã được khai thác để gây đáp ứng miễn dịch chống lại HIV là sử dụng protein vỏ HIV làm chất kháng nguyên trong vaccin, như

gp140. Gai vỏ bám sinh trên bề mặt của HIV là trime. Các ví dụ của protein vỏ trime bao gồm protein gp140 nhánh C, và protein trime vỏ khảm, như protein được bộc lộ trong WO 2014/042942 và WO 2014/107744.

Protein gp140 nhánh C đã được mô tả trước đây ví dụ trong WO 2010/042942 và trong Nkolola et al. 2010, nhưng không tập trung vào hoạt động bào chế được trong các tài liệu này. Protein ở trong nước muối đệm phosphat (PBS) trong một số trong các thử nghiệm ở các tài liệu này. gp140 khảm đã được mô tả trước đây ví dụ trong WO 2014/107744 và trong Nkolola et al 2014, nhưng một lần nữa không tập trung vào bất kỳ hoạt động bào chế được nào trong các tài liệu này. Protein ở trong 25 mM Tris pH 7,5 và 150 mM NaCl trong một số trong các thử nghiệm ở các tài liệu này.

Protein vỏ HIV khảm, như gp140, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh. Protein vỏ này có thể còn được dùng kết hợp với kháng nguyên HIV khác, như kháng nguyên khảm, để tạo ra miễn dịch tăng cường chống lại HIV. Tuy nhiên, tính ổn định của protein vỏ HIV như trime không tối ưu dưới các điều kiện thường được dùng cho sản xuất y học và thương mại. Protein vỏ HIV khảm dễ bị thoái biến cả hóa học và vật lý. Tuy nhiên, nhiều yếu tố khác nhau, như bào chế chất đệm, có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của protein, và tác động thường là không dự báo được. Ví dụ, sử dụng chất đệm HEPES trong bào chế protein đã thể hiện là dẫn đến sự hình thành hydro peroxit khi phơi lộ ra ánh sáng môi trường trong quá trình sản xuất, mà có thể tác động đến tính ổn định của protein cũng như các thành phần khác trong công thức bào chế, như chất hoạt động bề mặt. Xem, ví dụ, Baicu et al. *Cryobiology* (2002) 45(1) 33-48; Lepe-Zuniga et al. *J. Immunol. Methods* (1987) 103(1), 145; và Zigler et al. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* (1985) 21(5), 282-287. Mong muốn là có công thức bào chế gp140 vaccin HIV mà có thể thích hợp để ổn định của các biến thể khác nhau của protein gp140, như nhánh C hoặc gp140 khảm, và tốt hơn là với tá dược nhôm phosphat làm sản phẩm thuốc trong lọ đơn (hơn là phụ thuộc hoàn toàn vào nơi bào chế trộn ngay lập tức trước khi phân phối vaccin), và ngoài ra có thể cho phép việc sản xuất sản phẩm thuốc đáp ứng các yêu cầu pha muện lớn và quy mô thương mại. Thường không dự báo được kết hợp nào của các thành phần sẽ tạo ra chế phẩm đáp ứng tất cả các yêu cầu này.

Theo đó, có nhu cầu trong lĩnh vực đối với công thức bào chế cải tiến của protein gp140 HIV với tính ổn định tốt hơn dưới các điều kiện được dùng để sản xuất y học và thương mại nhằm hiện thực khả năng chữa bệnh đầy đủ của protein vỏ trime này. Các công thức bào chế này có thể còn thích hợp để dùng với (các) kháng nguyên HIV khác, bao gồm vector biểu hiện (các) kháng nguyên HIV, và/hoặc tá dược.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch của protein gp140 HIV mà có tính ổn định cải thiện. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được bảo quản dưới các điều kiện được làm lạnh trong khoảng thời gian kéo dài, và tối ưu hơn để dùng trong sản xuất y học và thương mại. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể còn bao gồm tá dược. Sáng chế còn liên quan đến phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch, và phương pháp sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch để gây đáp ứng miễn dịch chống HIV.

Theo một khía cạnh chung, sáng chế liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm:

- a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
- b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20; và
- d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0.

Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án theo sáng chế bao gồm protein gp140 HIV trime được ổn định, như protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,2 mg/mL đến 1 mg/mL protein gp140 HIV.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án theo sáng chế bao gồm 5% (khối lượng/thể tích) đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5.

Theo các phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch có thể còn bao gồm tá dược, như tá dược nhôm phosphat. Theo một số nhất định trong các phương án này, nhôm phosphat có thể có mặt trong chế phẩm với nồng độ bằng 0,7-5,0 mg/mL, ví dụ 0,8-4,0 mg/mL, ví dụ 0,85 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 3,0 mg/mL, 3,5 mg/mL, 3,84 mg/mL, 4,0 mg/mL. Theo các phương án nhất định, nhôm phosphat có mặt trong chế phẩm sinh miễn dịch ở nồng độ bằng 0,85 mg/mL. Theo các phương án nhất định, nhôm phosphat có mặt trong chế phẩm sinh miễn dịch ở nồng độ bằng 3,84 mg/mL.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích chế phẩm,

- a. 0,2 mg/mL to 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2)
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL.

Theo khía cạnh chung, sáng chế liên quan đến phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm việc pha trộn:

- a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
- b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,01 đến 0,05% polysorbat 20; và
- d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0;

nhờ đó thu được chế phẩm sinh miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL, và ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ bằng 2-8°C, trong ít nhất một tháng, tốt hơn là ít nhất 2, 3, 4, 5, 6 tháng,

tốt hơn nữa là ít nhất 7, 8, 9, 10, 11, 12 tháng, còn tốt hơn nữa là ít nhất 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 tháng, tốt nhất là ít nhất 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 tháng hoặc lâu hơn, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL, và ổn định ở nhiệt độ bằng 25°C trong ít nhất 6 tháng, ví dụ 6-12 tháng, hoặc 6-24 tháng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL, và ổn định ở nhiệt độ bằng 40°C trong ít nhất 1 tuần, ví dụ 1-12 tuần, ví dụ ít nhất 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 1 month, ví dụ 1-2 tháng, 1-3 tháng, hoặc 3-6 tháng.

Và theo khía cạnh chung, sáng chế liên quan đến phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) ở đối tượng cần chủng, bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

Theo phương án cụ thể, phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV bao gồm việc dùng cho đối tượng cần chủng chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,

- a. 0,2 mg/mL đến 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% polysorbat 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL.

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV còn bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch thứ hai chứa hoặc mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung, như chế phẩm chứa hoặc mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3-12. Tốt hơn là, phương pháp bao gồm việc dùng một hoặc nhiều vector, tốt hơn là vector adenovirus 26, mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV, như các vector bao gồm trình

tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 3-12. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV có thể còn bao gồm việc dùng một hoặc nhiều vectơ MVA mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV, như các vectơ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 3-12. Một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung có thể còn bao gồm SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575). Theo một phương án, kháng nguyên bao gồm SEQ ID NO: 11 bao gồm SEQ ID NO: 12.

Theo khía cạnh chung, sáng chế liên quan đến phương pháp để điều chế chế phẩm sinh miễn dịch ổn định khi bảo quản, trong thời gian dài mà bao gồm protein gp140 HIV, phương pháp bao gồm:

(i) trộn lẫn các thành phần sau để tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch chứa các thành phần này với lượng so với tổng thể tích của chế phẩm:

- (a) 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
 - (b) 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
 - (c) 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20; và
 - (d) 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0,
 - (e) nước,
 - (f) tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL;
- và

(ii) bảo quản chế phẩm ở 2-8°C trong ít nhất một tháng, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phần bản chất kỹ thuật của sáng chế nêu trên, cũng như là phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây, sẽ được hiểu rõ hơn khi tham khảo hình vẽ kèm theo. Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án chính xác được thể hiện trong hình vẽ.

Trên các hình vẽ:

Hình 1A và 1B thể hiện kết quả của phân tích SolvoVPE của công thức bào chế protein gp140 HIV được điều chế với chất đệm axetat, chất đệm phosphat, và chất đệm histidin, và phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS) của công thức bào chế protein gp140 HIV được điều chế với sorbitol và sucroza; cụ thể là:

Hình 1A thể hiện kết quả của phân tích SolvoVPE; thay đổi về độ hấp thụ ở 350 nm (độ đục) được tạo đồ thị đối với thay đổi về độ hấp thụ ở 280 nm (nồng độ); điểm dữ liệu chỉ ra sự khác nhau giữa các mẫu được phân tích ở thời điểm 0 (T_0) và sau khi gây ứng suất các mẫu ở 40 °C trong 24 giờ (T_{24}); phân tích SolvoVPE được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1;

Hình 1B thể hiện kết quả của phân tích DLS; thay đổi về bán kính (R_h) từ thời điểm 0 (T_0) ở 20°C đến thời điểm 7 ngày ($T_{7 \text{ ngày}}$) ở 70°C được tạo đồ thị bởi đường (sucroza với sorbitol); phân tích DLS được thực hiện là như được mô tả trong Ví dụ 1;

Hình 2A-2F thể hiện kết quả của phân tích sắc ký loại kích cỡ hiệu năng cao (HP-SEC) của công thức bào chế gp140 HIV như được mô tả trong Ví dụ 2; lượng tương đối của các loại hexame, trime và khối lượng phân tử cao/thấp của protein gp140 nhánh C HIV được xác định bằng HP-SEC của các mẫu được phân tích ở thời điểm 0 (T_0) và sau khi gây ứng suất mẫu ở 40°C trong 24 giờ (T_{24}); "Tri +Hex" đề cập đến lượng tương đối của các loại trime và hexame của protein gp140 nhánh C HIV; "LMW" đề cập đến các loại khối lượng phân tử thấp, ví dụ, sản phẩm phân cắt hoặc thoái biến, cụ thể là:

Hình 2A thể hiện lượng tương đối (%) của các loại hexame và trime của protein gp140 nhánh C HIV trong mẫu T_0 ở các nồng độ protein khác nhau (0,2 mg/mL và 1,0 mg/mL);

Hình 2B thể hiện lượng tương đối (%) của các loại hexame và trime của protein nhánh C gp140 HIV trong mẫu T_0 ở các nồng độ protein khác nhau của chất hoạt động bề mặt (0,02% và 0,1%); dữ liệu được thể hiện là kết hợp của dữ liệu được gom từ các mẫu chứa PS20 và các mẫu chứa PS80;

Hình 2C thể hiện lượng tương đối (%) của các loại hexame và trime của protein gp140 nhánh C HIV trong mẫu T₂₄ ở các nồng độ protein khác nhau (0,2 mg/mL và 1,0 mg/mL);

Hình 2D thể hiện lượng tương đối (%) của các loại hexame và trime của protein nhánh C gp140 HIV trong mẫu T₂₄ ở các nồng độ protein khác nhau của chất hoạt động bề mặt (0,02% và 0,1%); dữ liệu được thể hiện là kết hợp của dữ liệu được gom từ các mẫu chứa PS20 và các mẫu chứa PS80;

Hình 2E thể hiện lượng tương đối (%) của các loại khối lượng phân tử thấp của protein gp140 nhánh C HIV trên cơ sở loại chất hoạt động bề mặt (PS20 với PS80) trong mẫu T₀;

Hình 2F thể hiện lượng tương đối (%) của các loại khối lượng phân tử thấp của protein nhánh C gp140 HIV trong mẫu T₂₄ ở các nồng độ protein khác nhau của chất hoạt động bề mặt;

Hình 3A và 3B thể hiện kết quả của nghiên cứu tính ổn định của công thức bào chế protein gp140 HIV theo các phương án của sáng chế; công thức bào chế protein gp140 kháng HIV được đưa qua nhiều chu kỳ kết đông-tan giá như được mô tả trong Ví dụ 3;

Hình 3A thể hiện nồng độ protein sau một, ba, và năm chu kỳ kết đông-tan giá như được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 280 nm; và

Hình 3B thể hiện độ đục của công thức bào chế được thử sau một, ba, và năm chu kỳ kết đông-tan giá như được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 350 nm; và

Hình 4A-4C thể hiện kết quả của nghiên cứu tính ổn định của công thức bào chế protein gp140 nhánh C HIV; công thức bào chế protein gp140 nhánh C HIV được bảo quản ở 25°C và 60% độ ẩm tương đối (RH), và 40°C và 75% RH, cả khi có và không có tá dược nhôm phosphat, và sau đó được thử bằng cách sử dụng phương pháp phân tích SDS rút gọn như được mô tả trong Ví dụ 4;

Hình 4A thể hiện nồng độ protein tương đối (%) của công thức bào chế gp140 nhánh C HIV được bảo quản ở 25°C và 60% RH không có bất kỳ tá dược nhôm phosphat;

Hình 4B thể hiện nồng độ protein tương đối (%) của công thức bào chế gp140 nhánh C HIV được bảo quản ở 40°C và 75% RH không có bất kỳ tá dược nhôm phosphat;

HÌNH 4C thể hiện nồng độ protein tương đối (%) của công thức bào chế gp140 nhánh C HIV được bảo quản ở 25°C và 60% RH với tá dược nhôm phosphat; và

Hình 4D thể hiện nồng độ protein tương đối (%) của công thức bào chế gp140 nhánh C HIV được bảo quản ở 40°C và 75% RH với tá dược nhôm phosphat.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tài liệu công bố, bài báo và bằng sáng chế khác nhau được viện dẫn hoặc được mô tả trong tình trạng kỹ thuật và trong toàn bộ bản mô tả này; mỗi tài liệu tham khảo này được kết hợp ở đây nhằm mục đích tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. Thảo luận về tài liệu, hành động, nguyên liệu, dụng cụ, vật phẩm hoặc dạng tương tự được bao gồm trong bản mô tả này là nhằm mục đích cung cấp ngữ cảnh cho sáng chế. Thảo luận này không phải là sự thừa nhận rằng bất kỳ hoặc tất cả các vấn đề này tạo thành một phần của tình trạng kỹ thuật đối với sáng chế bất kỳ được bộc lộ hoặc được yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi chỉ có dẫn khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Mặt khác, các thuật ngữ nhất định được dùng trong bản mô tả này có nghĩa như được nêu trong bản mô tả. Tất cả các bằng sáng chế, đơn sáng chế đã công bố và tài liệu công bố được viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo như thể được nêu đầy đủ trong bản mô tả này. Cần lưu ý rằng khi được sử dụng trong bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ kèm theo, các danh từ số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều, trừ khi ngữ cảnh rõ ràng chỉ ra nghĩa khác.

Trừ khi có quy định khác, các giá trị số bất kỳ, như nồng độ hoặc khoảng nồng độ được mô tả ở đây, được hiểu là được biến đổi ở tất cả các trường hợp bằng thuật ngữ "khoảng." Do đó, giá trị số thường bao gồm $\pm 10\%$ giá trị cụ thể. Ví dụ, nồng độ bằng 1 mg/mL bao gồm 0,9 mg/mL đến 1,1 mg/mL. Tương tự, khoảng nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 10% (khối lượng/thể tích) bao gồm 0,9% (khối lượng/thể tích) đến 11% (khối lượng/thể tích). Như được sử dụng ở đây, việc sử dụng khoảng số rõ ràng bao gồm tất cả các khoảng nhỏ hơn có thể, tất cả các giá trị số riêng lẻ trong khoảng đó, bao gồm các số nguyên với các khoảng và đoạn của giá trị trừ khi bối cảnh quy định rõ ràng khác đi.

Như được sử dụng ở đây, "đối tượng" có nghĩa là động vật bất kỳ, tốt hơn là động vật có vú, tốt nhất là người, sẽ được dùng hoặc đã dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo các phương án của sáng chế. Thuật ngữ "động vật có vú" như được dùng trong bản mô tả này, bao hàm động vật có vú bất kỳ. Ví dụ về động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chuột lang, khỉ, người, v.v., tốt hơn nữa là người.

Sáng chế nói chung liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm protein gp140 HIV và tùy ý tá dược, phương pháp điều chế và bảo quản chế phẩm này, và phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng bằng chế phẩm sinh miễn dịch, một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung, mà tốt hơn là được biểu hiện bằng một hoặc nhiều vector.

Kháng nguyên HIV

Virut gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) là thành viên của chi Lentivirinae, một phân của họ Retroviridae. Hai loài HIV lây nhiễm ở người: HIV-1 và HIV-2. HIV-1 là chủng phổ biến nhất của virut HIV, và được biết là gây bệnh nhiều hơn HIV-2. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "virut gây suy giảm miễn dịch ở người" và "HIV" đề cập đến, nhưng không chỉ giới hạn ở, HIV-1 và HIV-2.

HIV được chia thành nhiều nhánh có mức độ sai khác di truyền cao. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nhánh HIV" hoặc "kiểu phụ HIV" dùng để chỉ

virut gây suy giảm miễn dịch ở người liên quan được phân loại theo mức độ tương tự di truyền của chúng. Hiện nay có ba nhóm thể phân lập HIV-1: M, N, và O. Nhóm M (các chủng chính) gồm có ít nhất mười nhánh, A đến J. Nhóm O (các chủng phía ngoài) ó thể gồm có số lượng nhánh tương tự. Nhóm N là thể phân lập HIV-1 mới mà chưa được phân loại vào nhóm M hoặc nhóm O.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng nguyên HIV," "protein kháng nguyên HIV," "polypeptit kháng nguyên HIV," và "chất sinh miễn dịch HIV" đề cập đến polypeptit có khả năng gây đáp ứng miễn dịch, ví dụ, đáp ứng thể dịch và/hoặc qua trung gian tế bào, chống HIV ở đối tượng. Kháng nguyên HIV có thể là protein của HIV, đoạn hoặc epitop của chúng, hoặc kết hợp của nhiều protein HIV hoặc các phần của chúng, mà có thể gây đáp ứng miễn dịch hoặc tạo ra sự miễn dịch, ví dụ, sự miễn dịch bảo vệ, chống lại HIV ở đối tượng.

Tốt hơn là, kháng nguyên có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở vật chủ, ví dụ, gây đáp ứng miễn dịch chống lại bệnh virut hoặc sự nhiễm virut, và/hoặc tạo ra sự miễn dịch ở (tức là, chủng ngừa) đối tượng chống lại bệnh virut hoặc sự nhiễm virut, mà bảo vệ đối tượng chống lại bệnh virut hoặc sự nhiễm virut. Ví dụ, kháng nguyên có thể bao gồm protein hoặc đoạn của chúng từ HIV, như các sản phẩm gen HIV *gag*, *pol* và *env*.

Kháng nguyên HIV có thể là bất kỳ kháng nguyên HIV-1 hoặc HIV-2 hoặc đoạn của chúng. Ví dụ về kháng nguyên HIV bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sản phẩm gen *gag*, *pol*, và *env*, mà mã hoá protein cấu trúc và enzym thiết yếu. Sản phẩm gen *gag*, *pol*, và *env* được tổng hợp như polyprotein, được xử lý thêm thành nhiều sản phẩm protein khác. Sản phẩm protein sơ cấp của gen *gag* là polyprotein Gag protein cấu trúc virut, được xử lý thêm thành các sản phẩm protein MA, CA, SP1, NC, SP2, và P6. Gen *pol* mã hoá enzym virut (Pol, polymeraza), và sản phẩm protein sơ cấp được xử lý thêm thành các sản phẩm protein RT, ARNaza H, IN, và PR. Gen *env* mã hoá protein cấu trúc, cụ thể là glycoprotein của vỏ hạt virut. Sản phẩm protein sơ cấp của gen *env* là gp160, được xử lý thêm thành gp120 và gp41.

Theo các phương án nhất định, kháng nguyên HIV bao gồm kháng nguyên Gag, Env, hoặc Pol HIV, hoặc phần kháng nguyên hoặc epitop bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng, tốt hơn là kháng nguyên Gag, Env, hoặc Pol HIV-1 hoặc phần kháng nguyên hoặc epitop bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng.

Kháng nguyên HIV có thể còn là kháng nguyên HIV khảm. Như được dùng trong bản mô tả này, “kháng nguyên khảm” dùng để chỉ protein tái tổ hợp được lắp ráp từ mảnh có trình tự tự nhiên. Kháng nguyên khảm giống với kháng nguyên tự nhiên, nhưng được tối ưu hóa để tối đa hóa mức độ phủ của epitop tế bào T tiềm năng được tìm thấy trong trình tự tự nhiên, mà cải thiện độ rộng và độ bao phủ của đáp ứng miễn dịch. Kháng nguyên HIV khảm để dùng theo sáng chế tốt hơn là kháng nguyên Gag, Pol, và/hoặc Env HIV-1 khảm. Kháng nguyên Gag, Pol, và/hoặc Env HIV khảm là các kháng nguyên khảm bao gồm nhiều epitop có nguồn gốc từ một hoặc nhiều trình tự polypeptide Gag, Pol, và/hoặc Env của HIV. Ví dụ, kháng nguyên GagPol khảm bao gồm trình tự Gag khảm và trình tự Pol khảm.

Ví dụ về kháng nguyên Gag, Pol, và/hoặc Env HIV khảm có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các kháng nguyên được mô tả trong, ví dụ, US20120076812; Barouch et al., *Nat Med* 2010, 16:319-323; và Barouch et al., *Cell* 155:1-9, 2013, tất cả các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Tốt hơn là, kháng nguyên Gag, Pol, và/hoặc Env HIV khảm để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mos1Env (SEQ ID NO: 3), mos2Env (SEQ ID NO: 4), mos1Pol (SEQ ID NO: 5), mos2Pol (SEQ ID NO: 6), mos1Gag (SEQ ID NO: 7), mos2Gag (SEQ ID NO: 8), và kết hợp của chúng, ví dụ mos1GagPol (SEQ ID NO: 9) và mos2GagPol (SEQ ID NO: 10). Các ví dụ khác của kháng nguyên HIV khảm bao gồm protein Env HIV tổng hợp, mà là các protein vỏ HIV không có trong tự nhiên được tối ưu hóa để gây đáp ứng miễn dịch hoặc tạo ra sự miễn dịch chống lại một hoặc nhiều chủng HIV có trong tự nhiên, như các chủng bao gồm SEQ ID NO: 11, hoặc SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí

529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575), hoặc theo các phương án được ưu tiên, kháng nguyên bao gồm SEQ ID NO: 11 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, tất cả được mô tả trong PCT/EP2016/081159 (nộp ngày 15 tháng mười hai năm 2016 dưới tên Janssen Vaccines & Prevention B.V.), được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Protein gp140 HIV

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein gp140 HIV" đề cập đến vùng ngoại bào không phân cắt của protein vỏ gp160 khảm, tức là, (gp160)₃. Các phương án theo sáng chế đề cập đến các công thức bào chế được cải thiện của HIV gp140, tốt hơn là trime và/hoặc hexame của nhóm phụ gp140 được gắn vào vùng ngoại bào của nhóm phụ gp41 không có vùng xuyên màng gp41 và đoạn tế bào chất. Gen *env* HIV mã hóa protein gp160 tiền chất, mà được phân cắt bằng cách phân giải protein thành hai glycoprotein vỏ trưởng thành gp120 và gp41. Đầu tiên, gp160 trime hóa thành (gp160)₃ và sau đó trải qua phân cắt thành hai protein liên quan không cộng hóa trị gp120 và gp41 thông qua phản ứng phân cắt được trung gian bởi proteaza của tế bào chủ, furin, ở trình tự được bảo tồn cao trong tiền chất glycoprotein vỏ retrovirus. Sự xâm nhập virus sau đó được điều khiển bằng trime của dimer khác loại gp120/gp41. Gp120 là mảnh liên kết thụ thể, và liên kết với thụ thể CD4 trên tế bào đích mà có thụ thể này, như, ví dụ như, tế bào T-trợ giúp. Gp41, được liên kết không cộng hóa trị với gp120, là mảnh dung hợp và cung cấp bước thứ hai nhờ đó HIV đi vào tế bào. Gp41 ban đầu được che giấu trong vỏ virus, nhưng khi gp120 liên kết với thụ thể CD4, gp120 thay đổi hình dạng của nó làm cho gp41 dễ trở nên được lộ ra, khi đó nó có thể giúp đỡ trong việc dung hợp với tế bào chủ. Protein gp140 HIV được dùng làm đại diện cho trạng thái bẩm sinh của gai virus, được phân cắt.

Biểu hiện của protein gp140 đã được mô tả trong một vài công bố (ví dụ Zhang et al., 2001; Sanders et al., 2002; Harris et al., 2011), và protein ngày nay có thể còn được đặt từ các nhà cung cấp dịch vụ, ở các biến thể khác nhau ví dụ dựa trên chủng HIV khác nhau. Protein gp140 theo sáng chế có thể có đột biến vị trí phân cắt sao cho vùng gp120 và vùng ngoại bào gp41 liên kết cộng hóa trị, hoặc tùy ý vùng gp120 và

vùng ngoại bào gp41 có thể liên kết không cộng hóa trị (ví dụ bằng cầu disulphur như ví dụ ở các biến thể SOSIP). Protein Gp140 được dùng trong nhiều thử nghiệm chủng ngừa khác nhau (ví dụ Nkolola et al., 2010, 2014; Kovacs et al., 2012; Barouch et al., 2015; Sanders et al., 2015).

Theo các phương án của sáng chế, protein gp140 HIV có thể là homotrime (ví dụ, trime bao gồm ba đơn vị polypeptit tương đồng), hoặc heterotrime (ví dụ, các trime bao gồm ba polypeptit mà tất cả đều không giống nhau). Protein gp140 HIV có thể còn là hexame. Cả các loài trime và các loài hexame của protein gp140 HIV có khả năng sinh miễn dịch chống lại HIV, hoặc có thể gây đáp ứng miễn dịch chống lại HIV *in vivo*. Tốt hơn là, protein gp140 HIV là trime, và tốt hơn nữa là homotrime. Protein gp140 HIV có thể là trình tự có trong tự nhiên, ví dụ, trình tự được phân lập từ nhánh HIV bất kỳ, như nhánh A, nhánh B, nhánh C, v.v., hoặc protein gp140 khảm. "Protein gp140 khảm" bao gồm nhiều epitop có nguồn gốc từ một hoặc nhiều trình tự gp140 của một hoặc nhiều nhánh HIV.

Tốt hơn là, protein gp140 HIV là protein gp140 khảm được làm ổn định. "Protein gp140 khảm được làm ổn định" là protein gp140 mà có thể có đã được có thể được biến đổi để bao gồm trình tự polypeptit, như vùng trime hóa, mà làm tăng tính ổn định của cấu trúc trime, hoặc nó có thể là protein gp140 mà được biến đổi để bao gồm các đột biến (so với trình tự gp140 tự nhiên) mà làm ổn định cấu trúc trime, như SOSIP và/hoặc các đột biến khác. Các ví dụ của vùng trime hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng trime hóa "foldon" T4-fibritin, ví dụ, mà có trình tự axit amin của GSGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 13); vùng trime hóa cuộn xoắn đôi có nguồn gốc từ GCN4, ví dụ, mà có trình tự axit amin của MKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEV (SEQ ID NO: 14); và nhóm phụ xúc tác của aspartat transcarbamoylaza *E. coli* làm thể trime. Vùng trime hóa này có thể được dùng để hỗ trợ việc hình thành trime ổn định (xem ví dụ WO 2010/042942, Nkolola et al. 2010, WO 2014/107744, và Nkolola et al. 2014, cho các trime được làm ổn định của protein gp140). Protein gp140 trime được làm ổn định để dùng trong sáng chế có thể còn bao gồm đột biến vị trí phân cắt để tăng cường tính ổn định, ví dụ, ở vị trí phân cắt

furin, và/hoặc đột biến gọi là SOSIP (xem, ví dụ Sanders et al., 2002, 2015). Protein gp140 trime được làm ổn định có thể có nguồn gốc từ protein gp140 được phân lập từ nhánh HIV bất kỳ, ví dụ, nhánh A, protein B, protein C, v.v. Protein gp140 trime được làm ổn định có thể còn là protein gp140 khảm được làm ổn định.

Protein gp140 HIV ví dụ mà có thể được dùng trong sáng chế bao gồm protein gp140 nhánh C HIV (SEQ ID NO: 1), Protein gp140 khảm HIV (SEQ ID NO: 2), và dạng kết hợp của chúng. Cả protein gp140 nhánh C HIV (SEQ ID NO: 1) và protein gp140 khảm HIV (SEQ ID NO: 2) đều là protein gp140 khảm bao gồm vùng trime hóa "foldon" T4-fibrin.

Chế phẩm sinh miễn dịch

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế liên quan đến chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV. "Chế phẩm sinh miễn dịch" như được sử dụng ở đây đề cập đến chế phẩm có khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở đối tượng mà đã hoặc sẽ dùng chế phẩm. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể là vaccin. "Vaccin" đề cập đến chế phẩm mà có thể tạo ra sự miễn dịch bảo vệ hoặc đáp ứng miễn dịch bảo vệ cho đối tượng, hoặc có thể sử dụng để chủng ngừa cho đối tượng. Theo các phương án của sáng chế, bất kỳ protein gp140 HIV đã biết trong lĩnh vực theo sáng chế có thể được dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể bao gồm một hoặc nhiều protein gp140 HIV, như một, hai, hoặc ba protein gp140 HIV.

Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm protein gp140 trime được làm ổn định. Theo một phương án được ưu tiên, protein gp140 HIV là protein gp140 nhánh C HIV, như protein bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo phương án được ưu tiên khác, protein gp140 HIV là protein gp140 khảm HIV, như protein bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm cả protein gp140 nhánh C HIV và protein gp140 khảm HIV, như chế phẩm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch có thể bao gồm hỗn hợp của protein gp140 nhánh C HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và protein

gp140 khảm HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, ví dụ, ở tỷ lệ 1:1.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế còn bao gồm nước, tốt hơn là nước để tiêm. Thêm vào chế phẩm đến số lượng đủ (q.s.), phục thuộc vào thể tích của chế phẩm được điều chế.

Theo các phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV, như 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, hoặc 5 mg/mL. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,2 mg/mL hoặc 1 mg/mL protein gp140 HIV, như các chế phẩm bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. Theo các phương án cụ thể khác của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL hỗn hợp của protein gp140 HIV, như chế phẩm bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, ví dụ, ở tỷ lệ 1:1.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế còn bao gồm sorbitol (đường), polysorbat 20 (chất hoạt động bề mặt), và chất đệm histidin. Tác giả phát hiện ra một cách đáng ngạc nhiên là tính ổn định của protein gp140 HIV trong chế phẩm chứa histidin có tính ổn định cải thiện so với trong chế phẩm chứa các axit amin khác. Tác giả còn phát hiện ra một cách đáng ngạc nhiên là việc bao gồm polysorbat 20 trong chế phẩm cải thiện hơn tính ổn định của protein gp140 HIV trong chế phẩm. Thông thường, các chất đệm được sử dụng cho công thức bào chế protein chứa kết hợp của axetat và sorbitol, hoặc kết hợp của histidin và sucroza (xem ví dụ, Uchiyama, *Biochimica Biophysica Acta* (2014) 1844, 2041-2052). Histidin và sorbitol thường không được dùng kết hợp trong chất đệm cho công thức bào chế protein. Theo hiểu biết nhất của tác giả, kết hợp của histidin và sorbitol với polysorbat 20 (chất hoạt động bề mặt) không được dùng trong bất kỳ chế phẩm thuốc protein bán trên thị trường. Do đó, ngạc nhiên khi thấy rằng kết hợp của histidin và sorbitol cải thiện tính ổn định của protein gp140 HIV.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của sorbitol có thể nằm trong khoảng từ 2% đến 15% (khối lượng/thể tích), như 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% hoặc 15% (khối lượng/thể tích). Theo một phương án được ưu

tiên, nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích). Theo phương án được ưu tiên khác, nồng độ của sorbitol là 12% (khối lượng/thể tích).

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của polysorbat 20 có thể nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,05% (khối lượng/thể tích), như 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, hoặc 0,05% (khối lượng/thể tích). Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ của polysorbat 20 là 0,02% (khối lượng/thể tích).

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của chất đệm histidin là trong khoảng từ 5 mM đến 20 mM, như 5 mM, 10 mM, 15 mM hoặc 20 mM, và tốt hơn là 10 mM. PH của chất đệm histidin nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0, như 5,5, 6,0, 6,5, hoặc 7,0, và tốt hơn là 6,5. Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ của chất đệm histidin là 10 mM và pH của chất đệm là 6,5. Giá trị pH bất kỳ được mô tả ở đây, được hiểu là được biến đổi trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ "khoảng," mà, khi được dùng liên quan đến giá trị pH bao gồm $\pm 0,5$ của giá trị pH cụ thể. Trừ khi có chỉ định khác, tất cả giá trị pH đề cập đến pH của bản thân chất đệm histidin mà chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch còn bao gồm tá dược. Thuật ngữ "tá dược" và "chất kích thích miễn dịch" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, và được định nghĩa là một hoặc nhiều chất gây kích thích hệ miễn dịch, hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Ví dụ, tá dược có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch cho protein gp140 HIV và/hoặc chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế khi được dùng một mình hoặc kết hợp thêm với một hoặc nhiều vector adenovirus mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV. Tá dược thích hợp được sử dụng theo sáng chế nên là tá dược mà có khả năng là an toàn, dung chịu tốt và hữu hiệu ở người, như, ví dụ QS-21, Iscomatrix, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL- 1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-lethine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, muối nhôm (ví dụ nhôm hydroxit, và/hoặc nhôm phosphat; ví dụ về tá dược nhôm phosphat kaf AdjuPhos, huyền phù gel ước nhôm phosphat vô trùng), Adjuplex, và MF59. Tốt hơn là, tá dược là tá dược nhôm phosphat.

Theo các phương án của sáng chế, tá dược nhôm phosphat có thể chứa trong chế phẩm sinh miễn dịch ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,7 đến 5,0 mg/mL, ví dụ 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, hoặc 1 mg/ml, ví dụ ở nồng độ cố định bằng 0,85 mg/mL, hoặc ví dụ 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,85, 3,9, 3,95, 4,0, 4,5, hoặc 5,0 mg/mL, ví dụ ở nồng độ cố định bằng 3,84 mg/mL. Một mục tiêu của sáng chế là đề xuất chế phẩm ổn định dài hạn với tá dược nhôm phosphat có mặt cùng với chất kháng nguyên protein gp140. Phát hiện đáng ngạc nhiên là chế phẩm lỏng theo sáng chế mà bao gồm HIV gp140, chất đệm histidin, sorbitol, và polysorbat 20, ổn định trong ít nhất 6 tháng ở 2-8°C. Các chế phẩm này còn thấy là ổn định trong ít nhất 6 tháng ở nhiệt độ cao bằng 25°C. Ngoài ra, các chế phẩm này còn được thấy là ổn định trong ít nhất 2 tuần, 1 tháng, hoặc thậm chí đến 3 tháng ở 40°C, như được đo bằng SDS PAGE rút gọn.

Theo phương án ví dụ của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm:

- a. 0,2 mg/mL đến 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. 0,7 đến 4,0 mg/mL (ví dụ 0,85 mg/mL hoặc 3,84 mg/mL) tá dược nhôm phosphat.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được phối chế theo cách bất kỳ thích hợp để dùng cho đối tượng để tạo thuận lợi cho việc dùng và cải thiện tính hiệu quả, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc sử dụng qua đường miệng (trong ruột) và tiêm ngoài đường tiêu hóa. Tiêm ngoài đường tiêu hóa ví dụ có thể bao gồm dịch tiêm dưới da, tiêm trong cơ, hoặc tiêm trong da. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể còn được phối chế cho các đường dùng khác, ví dụ dùng qua niêm mạc, trực tràng, dưới lưỡi, qua miệng, hoặc trong mũi. Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch được phối chế để tiêm trong cơ.

Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế là có lợi trong đó protein gp140 HIV có thể được bảo quản ổn định ở dạng lỏng ở nhiệt độ được làm lạnh, ví dụ 2°C đến 8°C, trong khoảng thời gian kéo dài, như khoảng 2 năm. Theo các phương án nhất định, chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm tá dược, ví dụ tá dược nhôm phosphat. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa tá dược còn thích hợp với bảo quản ở dạng chất lỏng dưới các điều kiện được làm lạnh trong khoảng thời gian kéo dài. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế còn thích hợp với bảo quản ở dạng đông khô. Tuy nhiên, chế phẩm theo sáng chế do đó tốt hơn là chế phẩm lỏng, nghĩa là chúng ở dạng lỏng ở nhiệt độ bảo quản được ưu tiên, tức là ở 2-8°C. Thông thường chế phẩm hoặc phối phẩm lỏng theo sáng chế là huyền phù nước, nghĩa là không phải tất cả protein và/hoặc vật liệu hạt như nhôm phosphat có thể được hòa tan hoàn toàn. Trong các trường hợp này nên trộn chế phẩm trước khi sử dụng. Ưu tiên là bảo quản chế phẩm theo sáng chế mà bao gồm tá dược nhôm phosphat trên điểm kết đông của nước, tốt nhất là ở 2-8°C, ví dụ ví dụ 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, hoặc 8°C. Lợi ích là không cần sự đông khô nguồn lực chuyên sâu và tốn kém và hòa tan bị kết lại trước khi sử dụng, không cần trộn bên cạnh và bảo quản riêng rẽ tá dược nhôm phosphat ngoài chế phẩm có thể được bảo quản 'dùng ngay'. Ngoài ra, bảo quản ở các điều kiện được làm lạnh nhưng không kết đông làm cho chế phẩm có thể được sử dụng dễ dàng hơn trong điều kiện nguồn lực giới hạn ví dụ khi không có khả năng kết đông. Hơn nữa, tính ổn định duy trì quan sát thấy ở nhiệt độ tăng (ví dụ 25°C, và thậm chí 40°C) của chế phẩm theo sáng chế chỉ ra rằng việc thay đổi nhiệt độ không có ý, ví dụ khi tạm thời chế phẩm được phơi ra nhiệt độ phòng ngay cả trong điều kiện thời tiết ẩm, không thể ngay lập tức gây thiệt hại cho chế phẩm vacxin theo sáng chế.

Chế phẩm theo sáng chế, ngạc nhiên là bao gồm chế phẩm chứa nhôm phosphat, ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ bằng 2-8°C trong ít nhất một ngày, một tuần, hai tuần, một tháng, tốt hơn là ít nhất 2, 3, 4, 5, 6 tháng. Tốt hơn nữa là các chế phẩm này ổn định dưới các điều kiện này trong ít nhất 7, 8, 9, 10, 11, 12 tháng, còn tốt hơn nữa là ít nhất 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 tháng, tốt nhất là ít nhất 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 tháng hoặc lâu hơn, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng. Sáng chế theo các phương án nhất định do đó đề xuất chế phẩm theo sáng

chế, mà ổn định khi được bảo quản ở 2-8°C trong ít nhất một tháng, ít nhất ba tháng, ít nhất 6 tháng. Tốt hơn là các chế phẩm này là ổn định trong ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng, ít nhất 30 tháng, ít nhất 36 tháng. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế để chủng ngừa cho đối tượng, tốt hơn là đối tượng người, sau khi chế phẩm sinh miễn dịch đã được bảo quản ở 2-8°C trong ít nhất một ngày, ít nhất một tuần, ít nhất hai tuần, ít nhất ba tuần, ít nhất một tháng, ít nhất hai tháng, ít nhất ba tháng, ít nhất 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 tháng.

Nhằm mục đích của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch mà bao gồm protein gp140 HIV và sau khi được bảo quản trong ít nhất một tuần, tốt hơn là ít nhất một tháng, ở nhiệt độ được cho không thể hiện nhiều hơn 25%, tốt hơn là không nhiều hơn 10%, thoái biến protein gp140 này trên gel SDS PAGE rút gọn, được xem là chế phẩm sinh miễn dịch ổn định bảo quản thời gian dài ở nhiệt độ này. Chế phẩm sinh miễn dịch mà bao gồm protein gp140 HIV được xem là "ổn định" theo sáng chế dưới các điều kiện nhất định (ví dụ 2-8°C) trong thời gian cụ thể (ví dụ 6 tháng), nếu dưới các điều kiện này sau thời gian cụ thể này protein gp140 này không thể hiện nhiều hơn 25%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn là ít hơn 15%, tốt hơn là ít hơn 10%, tốt nhất là ít hơn 5%, thoái biến (so với lần đo ban đầu tại $t=0$) trên gel SDS PAGE rút gọn. Thoái biến là nhìn thấy bằng mắt là dải bổ sung dưới dải gp140 của khối lượng phân tử mong muốn. Thử nghiệm tùy ý như ELISA cũng có thể được dùng để đo tính ổn định, và theo các phương án nhất định, chế phẩm mà ổn định là như được xác định ở trên, còn không thể hiện nhiều hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 25%, thoái biến (gairm so với tín hiệu ban đầu ở $t=0$) trong thử nghiệm ELISA.

Phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch

Sáng chế còn liên quan đến phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Theo các phương án của sáng chế, phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm việc pha trộn protein gp140 HIV, sorbitol, polysorbat 20, và chất đệm histidin trong khoảng nồng độ thích hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật này quen thuộc với các kỹ thuật thông thường được sử dụng để điều chế các chế phẩm này.

Ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được điều chế bằng cách trộn lẫn chất đệm histidin, sorbitol, và polysorbat 20 ở nồng độ mong muốn. Sau đó, protein gp140 HIV có thể được thêm. PH của chế phẩm có thể được điều chỉnh trước hoặc sau khi thêm protein gp140 HIV. Là ví dụ minh họa khác, đầu tiên dung dịch đệm chứa histidin và sorbitol có thể được điều chế. Protein gp140 HIV được điều chế trong chất đệm ở nồng độ mong muốn, và sau đó được thêm vào dung dịch đệm chứa histidin và sorbitol, sau đó thêm Polysorbat ở nồng độ đích. Tá dược có thể được thêm cuối cùng để thu được chế phẩm cuối cùng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp để điều chế chế phẩm sinh miễn dịch ổn định khi bảo quản, trong thời gian dài mà bao gồm protein gp140 HIV. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm: (i) tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế (tức là bao gồm 0,05-5 mg/mL protein gp140 HIV, 2-15% (khối lượng/thể tích) sorbitol, 0,01-0,05% polysorbat 20, 5-20 mM chất đệm histidin pH 5,5-7,0, nước, và tốt hơn là 0,7-4,0 mg/mL nhôm phosphat), và (ii) bảo quản chế phẩm này ở 2-8°C trong ít nhất một tháng, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng, ví dụ 18-30 tháng. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm:

(i) trộn các thành phần sau để tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch chứa các thành phần này với lượng so với tổng thể tích của chế phẩm:

- (a) 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
 - (b) 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
 - (c) 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20;
 - (d) 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0,
 - (e) nước (tốt hơn là nước để tiêm),
 - (f) tá dược nhôm phosphat, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,7-4 mg/mL;
- và

(ii) bảo quản chế phẩm ở 2-8°C trong ít nhất một tháng, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng, ví dụ 18-30 tháng.

Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch

Sáng chế còn liên quan đến phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) ở đối tượng cần chủng bằng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế. Đáp ứng miễn dịch có thể là chống lại một hoặc nhiều nhánh HIV. Phương pháp được mô tả ở đây còn bao gồm việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung mà tốt hơn là được biểu hiện từ một hoặc nhiều vector, như vector adenovirus hoặc vector MVA, bao gồm phương pháp môi và tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Theo một khía cạnh chung, phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) ở đối tượng cần chủng bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế. Bất kỳ trong số các chế phẩm sinh miễn dịch được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng. Tốt hơn là, chế phẩm bao gồm protein gp140 HIV trimer được ổn định, như protein gp140 nhánh C HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc protein gp140 khảm HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc hỗn hợp của chúng. Chế phẩm có thể còn bao gồm tá dược, như tá dược nhôm phosphat. Phương án ví dụ của chế phẩm sinh miễn dịch để dùng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,

- a. 0,2 mg/mL đến 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbate 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. 0,7 đến 4,0 mg/mL (ví dụ 0,85 mg/mL hoặc 3,84 mg/mL) tá dược nhôm phosphat.

Theo các phương án của sáng chế, "gây đáp ứng miễn dịch" khi được dùng liên quan đến phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây bao hàm việc mang lại sự miễn dịch bảo vệ và/hoặc chủng ngừa đối tượng chống lại sự lây nhiễm, như lây nhiễm HIV,

nhằm mục đích phòng ngừa, cũng như gây đáp ứng miễn dịch hoặc tác dụng mong muốn ở đối tượng cần chúng chống lại sự lây nhiễm, như lây nhiễm HIV, nhằm mục đích chữa bệnh. Tốt hơn là, phương pháp theo sáng chế là để nhằm mục đích phòng ngừa, như để mang lại sự miễn dịch bảo vệ. Đáp ứng miễn dịch có thể là đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc đáp ứng miễn dịch thể dịch.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự miễn dịch bảo vệ” hoặc “đáp ứng miễn dịch bảo vệ” có nghĩa là đối tượng chủng ngừa có thể kiểm soát sự nhiễm bởi tác nhân gây bệnh mà việc chủng ngừa được thực hiện để chống lại chúng. Thông thường, đối tượng đã phát triển “đáp ứng miễn dịch bảo vệ” chỉ phát triển triệu chứng lâm sàng từ nhẹ đến trung bình hoặc không có triệu chứng nào. Thông thường, đối tượng có “đáp ứng miễn dịch bảo vệ” hoặc “sự miễn dịch bảo vệ” chống lại tác nhân nhất định sẽ không tử vong do sự nhiễm tác nhân đó.

Thông thường, việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo các phương án của sáng chế là nhằm mục đích phòng ngừa để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên HIV trước khi lây nhiễm hoặc phát triển triệu chứng. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng dự phòng sau phơi nhiễm. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể còn được dùng cho động vật có vú không phải người, như nhằm mục đích thí nghiệm.

Như được sử dụng ở đây, “lượng có hiệu quả” hoặc “lượng có hiệu quả miễn dịch” có nghĩa là lượng chế phẩm đủ để gây ra tác dụng miễn dịch hoặc đáp ứng miễn dịch mong muốn ở đối tượng cần chúng. Theo một phương án, lượng có hiệu quả có nghĩa là lượng đủ để gây đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần chúng. Theo các phương án nhất định, lượng có hiệu quả có nghĩa là lượng đủ để tạo ra sự miễn dịch ở đối tượng cần chúng, ví dụ, mang lại tác dụng bảo vệ chống lại bệnh như sự nhiễm virus. Theo các phương án nhất định, lượng có hiệu quả có nghĩa là lượng đủ để tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần chúng. Ví dụ, khi được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoặc chế phẩm sinh miễn dịch khác khác có khả năng tác động đến đáp ứng miễn dịch, như chế độ môi-tăng cường, lượng có hiệu quả có thể là lượng đủ để tăng

cường đáp ứng miễn dịch gây ra bởi một hoặc nhiều thành phần hoặc chế phẩm sinh miễn dịch khác.

Lượng có hiệu quả có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố, như tình trạng sức khỏe của đối tượng, độ tuổi, cân nặng, sức khỏe, v.v.; áp dụng cụ thể, ví dụ, có gây đáp ứng miễn dịch hoặc tạo ra sự miễn dịch bảo vệ hay không; và bệnh cụ thể, ví dụ, nhiễm virus, mà mong muốn có sự miễn dịch này. Lượng có hiệu quả có thể được xác định dễ dàng bởi một trong số các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào sáng chế. Nhìn chung, khi được sử dụng liên quan đến protein gp140 HIV lượng có hiệu quả có thể nằm trong khoảng từ, ví dụ khoảng 0,3 đến khoảng 3000 microgram (μg), ví dụ 1-1000 μg , ví dụ 10-500 μg , ví dụ khoảng 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 hoặc 500 μg .

Lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng trong chế phẩm đơn lẻ, hoặc trong nhiều chế phẩm, như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 chế phẩm (ví dụ, viên nén, viên nang và/hoặc thuốc tiêm), trong đó trong đó việc dùng nhiều chế phẩm (ví dụ, viên nén, viên nang và/hoặc thuốc tiêm) cùng nhau cung cấp cho đối tượng lượng có hiệu quả miễn dịch. Cũng có thể dùng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch cho đối tượng, và sau đó sử dụng liều lượng khác của lượng có hiệu quả của chế phẩm miễn dịch cho cùng đối tượng, trong chế độ trị liệu gọi là môi-tăng cường, như được mô tả chi tiết hơn sau đây.

Theo các phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dùng qua đường miệng (trong ruột) và tiêm ngoài đường tiêu hóa. Tiêm ngoài đường tiêu hóa có thể ví dụ bao gồm tiêm dưới da, tiêm trong cơ, hoặc tiêm trong da. Tốt hơn là, chế phẩm sinh miễn dịch được dùng bằng cách tiêm trong cơ.

Còn có thể dùng chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế cùng với một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung, hoặc một hoặc nhiều vector, như vector adenovirus, mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "cùng phân phối," "cùng sử dụng," "được dùng cùng với," hoặc "được dùng kết hợp với" đề cập đến việc dùng đồng thời hai hoặc nhiều thành phần, như chế phẩm sinh miễn dịch

chứa protein gp140 HIV, hoặc nhiều vector biểu hiện virus, như vector adenovirus. “Việc sử dụng đồng thời” có thể là việc sử dụng hai hoặc nhiều thành phần ít nhất là trong cùng một ngày. Khi hai thành phần được “dùng cùng nhau,” chúng có thể được dùng trong các chế phẩm riêng rẽ một cách tuần tự trong khoảng thời gian ngắn, như 24, 20, 16, 12, 8, hoặc 4 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ hoặc ít hơn, hoặc chúng có thể được dùng trong chế phẩm đơn lẻ vào cùng thời điểm. Ví dụ không giới hạn của việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch gp140 protein với một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung được mã hóa bởi vector như adenoviral vector, được đề xuất trong WO 2016/049287, nội dung được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Do đó, theo các phương án nhất định theo sáng chế, phương pháp gây đáp ứng miễn dịch còn bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch thứ hai chứa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV hoặc một hoặc nhiều vector mã hóa the kháng nguyên HIV. Kháng nguyên HIV bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực theo sáng chế có thể được sử dụng, như kháng nguyên Nef, Gag, Env, hoặc Pol HIV hoặc phần kháng nguyên hoặc epitop bất kỳ hoặc kết hợp của chúng. Kháng nguyên HIV khả cũng có thể được sử dụng. Kháng nguyên HIV ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên Env, Gag, và/hoặc Pol khả và kết hợp của chúng, như kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3-12, hoặc SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575). Kháng nguyên HIV bổ sung có thể ví dụ được dùng cho đối tượng là protein hoặc polypeptit được phân lập hoặc là vector mã hóa các protein hoặc polypeptit này.

Tốt hơn là, theo phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm miễn dịch thứ hai, chế phẩm miễn dịch thứ hai bao gồm một hoặc nhiều vector mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV.

Vector bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực liên quan đến sáng chế có thể được sử dụng. Tốt hơn là, vector là vector adenovirus, tốt hơn nữa là vector adenovirus

26. Điều chế vector adenovirut tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Điều chế vector adenovirut 26 (rAd26) tái tổ hợp được mô tả, ví dụ, trong WO 2007/104792 và in Abbink *et al.*, (2007) *Virology* 81(9): 4654-63. Trình tự hệ gen ví dụ của Ad26 được tìm thấy trong Mã số truy cập GenBank EF 153474 và trong SEQ ID NO:1 của WO 2007/104792. Ví dụ về vector hữu dụng cho sáng chế ví dụ bao gồm các vector được mô tả trong WO2012/082918, phần bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo. Vector adenovirut khác mà có thể được dùng kết hợp với chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế bao gồm vector được mô tả trong WO 2016/049287 và Đơn PCT số PCT/EP2016/081159, nội dung được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo các phương án của sáng chế, vector adenovirut có thể bao gồm một kháng nguyên HIV, hoặc nhiều hơn một kháng nguyên HIV, như hai, ba, hoặc bốn hoặc nhiều kháng nguyên HIV. Chế phẩm sinh miễn dịch có thể bao gồm một hoặc nhiều vector adenovirut, như hai, ba, hoặc bốn hoặc nhiều kháng nguyên HIV, mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV khác. Theo các phương án khác của sáng chế, chế phẩm thứ hai có thể bao gồm một vector adenovirut, hoặc nhiều hơn một vector adenovirut, như hai, ba, hoặc bốn hoặc nhiều vector adenovirut. Nếu chế phẩm thứ hai bao gồm nhiều hơn một vector adenovirut, vector adenovirut có thể mã hóa kháng nguyên HIV giống hoặc khác nhau.

Vector adenovirut mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV để dùng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm axit nucleic mã hóa kháng nguyên HIV mà liên kết hoạt động với gen khởi động, nghĩa là axit nucleic nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi động. Gen khởi động có thể là gen khởi động cùng loại (tức là, có nguồn gốc từ cùng nguồn di truyền với vector) hoặc gen khởi động khác loại (tức là, có nguồn gốc từ vector khác hoặc nguồn di truyền khác). Ví dụ về gen khởi động thích hợp bao gồm gen khởi động virus cự bào (CMV) và gen khởi động virus gây ung thư mô liên kết Rous (RSV). Tốt hơn là, gen khởi động nằm ngược chiều với axit nucleic ở trong băng biểu hiện.

Nhìn chung, "lượng có hiệu quả" khi được dùng viện dẫn đến vector adenovirut, có thể nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 hạt virus đến khoảng 10^{12} hạt virus, ví dụ 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , hoặc 10^{12} hạt virus. Việc điều chế và sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch

bao gồm vectơ adenovirut, như vectơ adenovirut 26, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Dược phẩm lỏng thường bao gồm chất mang lỏng chẳng hạn như nước, dầu mỏ, dầu động vật hoặc thực vật, dầu khoáng hoặc dầu tổng hợp. Dung dịch nước muối sinh lý, dextroza hoặc dung dịch sacarit khác hoặc glycol chẳng hạn như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol cũng có thể được bao gồm.

Ví dụ vectơ adenovirut tái tổ hợp có thể được bảo quản trong chất đệm mà cũng được sử dụng đối với Tiêu chuẩn thế giới về Adenovirut (Hoganson *et al.*, 2002, *Bioprocessing J* 1: 43-8): 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, và 2,5% glyxerol. Chất đệm chế phẩm adenovirut hữu dụng khác thích hợp để dùng cho người là 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 10% (khối lượng/thể tích) sucroza, và 0,2% (khối lượng/thể tích) polysorbat-80. Chất đệm chế phẩm khác thích hợp cho adenovirut tái tổ hợp có chứa 10-25 mM chất đệm xitrat độ pH 5,9-6,2, 4-6% (khối lượng/khối lượng) hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (khối lượng/khối lượng) polysorbat-80, và tùy ý 0,3-0,45% (khối lượng/khối lượng) etanol. Các chất đệm khác có thể được sử dụng, và một số ví dụ về chế phẩm thích hợp để bảo quản và để sử dụng các vectơ đã được trình bày trong dược phẩm là đã được biết.

Việc dùng chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung hoặc một hoặc nhiều vectơ adenovirut mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung thường là trong cơ, trong da hoặc dưới da. Tuy nhiên, các phương thức sử dụng khác như trong tĩnh mạch, qua trực tràng, qua da, qua đường miệng, qua đường mũi, v.v. cũng có thể được dự tính. Việc sử dụng trong cơ của chế phẩm miễn dịch có thể đạt được bằng cách sử dụng kim để tiêm huyền phù của vectơ biểu hiện, ví dụ như vectơ adenovirut, và/hoặc polypeptit kháng nguyên. Phương án thay thế là sử dụng dụng cụ tiêm không kim để dùng chế phẩm (bằng cách sử dụng, ví dụ như, Biojector™) hoặc bột đông khô chứa vaccin.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vectơ adenovirut, tốt hơn là vectơ adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế được dùng kết hợp với vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575), hoặc SEQ ID NO: 12.

Khi dùng vector adenovirut mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV, vector adenovirut biểu hiện kháng nguyên HIV được mã hóa, sao cho kháng nguyên HIV có mặt trong hệ miễn dịch của đối tượng, nhờ đó gây đáp ứng cần thiết để tạo ra sự miễn dịch, hoặc gây đáp ứng miễn dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế có thể được dùng cùng với một hoặc nhiều vector adenovirut để môi đáp ứng miễn dịch, và/hoặc sau đó dùng một hoặc nhiều vector adenovirut để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch.

Do đó, theo các phương án khác của sáng chế, phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng cần chúng bao gồm (i) việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế, và tốt hơn là còn bao gồm tá dược, và (ii) việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch thứ hai chứa một hoặc nhiều vector adenovirut mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV. Các bước (i) và (ii) được thực hiện theo trình tự bất kỳ, với một trong số các bước để gây miễn dịch môi và bước kia để thúc đẩy miễn dịch. Tùy ý, phương pháp có thể còn bao gồm việc dùng một hoặc nhiều vector Modified Vaccinia Ankara (MVA) mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV. Vector MVA có thể mã hóa bất kỳ kháng nguyên HIV được mô tả ở đây. Tốt hơn là, vector MVA mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3-12, hoặc SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc

Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575).

Các ví dụ của vector adenovirut, vector MVA, và chế độ môi - đẩy mà có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo phương án theo sáng chế bao gồm các chế phẩm được mô tả trong WO 2016/049287, bộc lộ được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Ví dụ, theo một phương án của phương pháp được bộc lộ, một hoặc nhiều vector adenovirut mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV được dùng để môi đáp ứng miễn dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều vector adenovirut để gây miễn dịch môi. Sự gây miễn dịch môi có thể được dùng chỉ một lần nhưng cũng có thể tùy ý được dùng nhiều lần, ví dụ, việc dùng để môi lần đầu ở thời điểm 0, sau đó việc dùng để môi khác khoảng 4-14 tuần, ví dụ 10-14 tuần sau khi dùng để môi lần đầu. Chế phẩm chứa protein gp140 HIV sinh miễn dịch tùy ý cùng với một hoặc nhiều vector adenovirut hoặc MVA khác mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bổ sung có thể được dùng để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch. Chủng ngừa tăng cường có thể còn được dùng một lần hoặc nhiều lần, ví dụ, lần đầu ở khoảng 22-26 tuần sau khi dùng để môi lần đầu, sau đó dùng tăng cường thêm ở khoảng 46-50 tuần sau khi dùng để môi lần đầu. Đáp ứng miễn dịch gây ra bởi sự gây miễn dịch này được theo dõi.

Theo các khía cạnh chung khác, sáng chế liên quan đến kết hợp vacxin để gây đáp ứng miễn dịch chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) ở đối tượng cần chủng. Theo các phương án của sáng chế, kết hợp vacxin bao gồm chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV, như chế phẩm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2; một hoặc nhiều vector adenovirut, tốt hơn là vector adenovirut 26, mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV, như kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 đến 12, và SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến

Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575) và tùy ý một hoặc nhiều vector MVA mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV, như kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 đến 12, và SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575).

Theo các phương án của sáng chế, kết hợp vacxin có thể được dung theo bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây để gây đáp ứng miễn dịch chống lại HIV ở đối tượng cần chúng, bao gồm môi và tăng cường đáp ứng miễn dịch.

PHƯƠNG ÁN THỰC HIỆN SÁNG CHẾ

Phương án 1 là chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm:

- a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
- b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20; và
- d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0.

Phương án 2 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 1, trong đó nồng độ của gp140 HIV là 0,2 mg/mL.

Phương án 3 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 1, trong đó nồng độ của gp140 HIV là 1 mg/mL.

Phương án 4 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1 đến 3, trong đó nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích).

Phương án 5 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1 đến 3, trong đó nồng độ của sorbitol là 12% (khối lượng/thể tích).

Phương án 6 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1-5, trong đó nồng độ của polysorbat 20 là 0,02% (khối lượng/thể tích).

Phương án 7 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1-6, trong đó nồng độ của chất đệm là 10 mM, và pH của chất đệm histidin là 6,5.

Phương án 8 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1-7, còn bao gồm tá dược nhôm phosphat, ví dụ ở nồng độ bằng 0,7-1,0 mg/mL, tốt hơn là ở nồng độ bằng 0,85 mg/mL.

Phương án 9 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1-8, trong đó protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Phương án 10 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án 1-8, trong đó protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Phương án 11 là chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,

- a. 0,2 mg/mL đến 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. tá dược nhôm phosphat, ví dụ ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL, ví dụ 0,85 mg/mL hoặc 3,84 mg/mL.

Phương án 12 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 0,2 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 13 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 0,2 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 14 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 0,2 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 15 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 0,2 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 16 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 1,0 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 17 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 1,0 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 18 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 1,0 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 19 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 11, bao gồm 1,0 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol.

Phương án 20 là chế phẩm sinh miễn dịch theo bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 19 được phối chế để tiêm trong cơ.

Phương án 21 là phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm việc pha trộn:

- a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
- b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,01 đến 0,05% polysorbat 20; và
- d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0;

nhờ đó thu được chế phẩm sinh miễn dịch.

Phương án 22 là phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng cần chủng, bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,

- a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV;
- b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,01 đến 0,05% polysorbat 20; và
- d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0.

Phương án 23 là phương pháp theo phương án 22, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,

- a. 0,2 mg/mL to 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;
- b. 5% đến 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 0,02% polysorbat 20;
- d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
- e. tá dược nhôm phosphat, ví dụ ở nồng độ bằng 0,7-4,0 mg/mL, ví dụ 0,85 mg/mL hoặc 3,84 mg/mL.

Phương án 24 là phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống HIV ở đối tượng cần chủng, bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37.

Phương án 25 là phương pháp theo một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 24, còn bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều vectơ adenovirut, tốt hơn là vectơ adenovirut 26, mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV.

Phương án 26 là phương pháp theo một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 25 còn bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều vectơ MVA mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên HIV.

Phương án 27 là phương pháp theo phương án 25 hoặc phương án 26, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên HIV bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: từ 3 đến 12, và SEQ ID NO: 11 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (i) I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), (ii) K480E (Lys đến Glu ở vị trí 480), và (iii) kết hợp của EK479-480RRRR (tức là thay thế GluLys ở vị trí 479 và 480 bằng bốn gốc Arg liên tục), I529P (Ile đến Pro ở vị trí 529), A471C (Ala đến Cys ở vị trí 471) và T575C (Thr đến Cys ở vị trí 575).

Phương án 28 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, mà ổn định ở 2-8°C trong ít nhất sáu tháng.

Phương án 29 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, mà ổn định ở 2-8°C trong ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng, ít nhất 30 tháng, ít nhất 36 tháng.

Phương án 30 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, mà ổn định ở 2-8°C trong 6-72 tháng.

Phương án 31 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, mà ổn định ở 25°C trong ít nhất sáu tháng.

Phương án 32 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, mà ổn định ở 40°C trong ít nhất một tuần, tốt hơn là ít nhất hai tuần.

Phương án 33 là phương pháp để bảo quản chế phẩm sinh miễn dịch chứa protein gp140 HIV, phương pháp bao gồm việc tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 28-32, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, và bảo quản chế phẩm này ở 2-8°C trong ít nhất một day, ví dụ ít nhất một tuần, ví dụ ít

nhất một tháng, ví dụ 1 ngày-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng, ví dụ 18-30 tháng.

Phương án 34 là phương pháp để điều chế chế phẩm sinh miễn dịch ổn định khi bảo quản, trong thời gian dài mà bao gồm protein gp140 HIV, phương pháp bao gồm: (i) tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm 0,05-5 mg/mL protein gp140 HIV, 2-15% (khối lượng/thể tích) sorbitol, 0,01-0,05% polysorbat 20, 5-20 mM chất đệm histin pH 5,5-7,0, nước, và tốt hơn là 0,7-4,0 mg/mL nhôm phosphat), và (ii) bảo quản chế phẩm này ở 2-8°C trong ít nhất một tuần, ví dụ ít nhất một tháng, ví dụ 1-72 tháng, ví dụ 6-48 tháng, ví dụ 12-36 tháng, ví dụ 18-30 tháng.

Phương án 35 là sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 1-20, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 28-32, hoặc theo một phương án bất kỳ trong số các phương án 36-37, để dùng cho đối tượng, tốt hơn là đối tượng người, để gây đáp ứng miễn dịch chống HIV, trong đó chế phẩm sinh miễn dịch trước khi dùng đã được bảo quản ở 2-8°C trong ít nhất một ngày, ví dụ ít nhất một tuần, ví dụ ít nhất hai tuần, ví dụ ít nhất ba tuần, ví dụ ít nhất một tháng, ví dụ ít nhất hai tháng, ví dụ ít nhất ba tháng, ví dụ ít nhất 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27. 28. 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 tháng.

Phương án 36 là chế phẩm sinh miễn dịch theo một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1-9, trong đó protein gp140 HIV bao gồm hỗn hợp của protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ NO: 2.

Phương án 37 là chế phẩm sinh miễn dịch theo phương án 36, trong đó protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ NO: 2 có mặt trong hỗn hợp với tỷ lệ 1:1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nghiên cứu phát triển chế phẩm cho protein gp140 nhánh C HIV

Có nhiều khả năng cho mỗi thành phần có thể chứa trong công thức bào chế protein, ví dụ, chất đệm, đường, giá trị pH, chất hoạt động bề mặt v.v. Ví dụ, các khả năng khác nhau đối với chất đệm có thể bao gồm phosphat, axetat, HEPES, Tris, MOPS, v.v.; các khả năng khác nhau đối với axit amin có thể bao gồm histidin, arginin, lysin, alanin, v.v.; các khả năng khác nhau đối với đường có thể bao gồm sucroza, sorbitol, glyxerol, manitol, trehaloza, v.v.; và các khả năng khác nhau đối với chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, Tween-20, Tween-80, v.v. Còn có nhiều dạng khác của tá dược, và các khả năng khác nhau cho mỗi loại, mà có thể còn được chứa trong công thức bào chế protein, như osmolyt (ví dụ, glyxin, prolin, glyxerol, urê, v.v.), muối (ví dụ, natri clorua, kali clorua, natri sulfat, v.v.), carbohydrat (ví dụ, lactoza), protein và polyme (ví dụ, HSA, gelatin, PVP, PLGA, PEG, v.v.), chất chelat hóa và chất chống oxy hóa (ví dụ, EDTA, DTPA, etanol, v.v.), chất bảo quản (ví dụ, rượu benzyl, m-cresol, phenol, v.v.), v.v. Xem, ví dụ, Kamberzell et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2011) 63, 1118-1159. Theo đó, có nhiều kết hợp lý thuyết khác nhau về thành phần mà có thể được dùng để xác định chế phẩm. Tuy nhiên, chế phẩm thích hợp nhất là phụ thuộc vào protein cụ thể trong chế phẩm.

Tác giả do đó đặt ra để tìm chế phẩm cải tiến mà có thể đáp ứng các yêu cầu phức tạp trong lĩnh vực không dự báo được của công thức bào chế protein, cụ thể là, công thức bào chế gp140 HIV cải tiến mà cho phép việc sản xuất sản phẩm thuốc đáp ứng các nhu cầu pha muện lớn và quy mô thương mại, và bao gồm tá dược nhôm phosphat và protein gp140 được bảo quản là sản phẩm thuốc trong các lọ riêng ở nhiệt độ được làm lạnh, và phòng ngừa tính bất ổn định liên quan đến một số thành phần nhất định có mặt trong chế phẩm được dùng hiện nay. Chế phẩm được thiết kế để bảo quản ở dạng lỏng, nhưng với tiềm năng được bảo quản ở dạng đông khô và được hoàn nguyên trong chất lỏng trước khi tiêm.

Nghiên cứu sàng lọc chế phẩm được thiết kế để đánh giá các chất đệm khác nhau (histidin, phosphat, và axetat), độ mạnh của chất đệm (10 mM đến 50 mM), đường (sucroza và sorbitol từ 2% đến 12% khối lượng/thể tích), chất hoạt động bề mặt (polysorbat 20 và polysorbat 80 từ 0,02% đến 1% khối lượng/thể tích), và giá trị pH từ

4,5 đến 7,5 trên sự ổn định của công thức bào chế protein gp140 nhánh C HIV. Các tham số biến đổi như được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Mô hình nghiên cứu công thức bào chế protein gp140 nhánh C HIV

Chất đệm	Histidin (His)	Phosphat (Pho)	Axetat (Ace)
pH	5,5-6,5	6,5-7,5	4,5-5,5
Độ mạnh chất đệm	10 mM, 20 mM, hoặc 50 mM		
Đường	Sucroza hoặc sorbitol ở 2% hoặc 12% (khối lượng/thể tích)		
Chất hoạt động bề mặt	Polysorbat 20 (PS20) hoặc polysorbat 80 (PS80) ở 0,02%, 0,05%, hoặc 0,10% (khối lượng/thể tích)		

Chế phẩm được điều chế bằng cách thêm các thành phần chất đệm ở giá trị pH được thử, sau đó thêm đường và chất hoạt động bề mặt. Độ pH được điều chỉnh khi cần. Sau đó, protein gp140 nhánh C (SEQ ID NO: 1) được thêm đến nồng độ bằng 1 mg/mL hoặc 0,2 mg/mL.

Tính ổn định của chế phẩm được phân tích sử dụng hệ SolvoVPE để đánh giá nồng độ và độ đục. Các mẫu của mỗi chế phẩm được phân tích ở thời điểm 0 (T_0), và sau đó sau khi chịu ứng suất ở 40°C trong 24 giờ (T_{24}). Tính ổn định của chế phẩm còn được phân tích sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

Phân tích SolvoVPE: SolvoVPE (C Technologies, Inc.; Bridgeport, NJ, Mỹ) được dùng để xác định nồng độ protein bằng cách đo hấp thụ UV của mẫu của mỗi chế phẩm ở 280 nm và 350 nm. Thay đổi về độ đục được xác định từ sự khác biệt về hấp thụ ở 350 nm trong khoảng đo T_0 và T_{24} . Đối với chế phẩm mong muốn, thay đổi bất kỳ về độ đục tốt hơn là nên nhỏ nhất có thể. Việc tăng độ đục cho thấy rằng protein đang kết tủa khỏi dung dịch, và chế phẩm do đó kém ổn định. Kết quả của phân tích SolvoVPE được thể hiện trên Hình 1.

Kết quả của phân tích SolvoVPE thể hiện rằng chế phẩm chất đệm axetat có sự tăng cao nhất về độ đục (thay đổi trung bình bằng +0,339), trong khi đó phẩm chất đệm phosphat thể hiện tăng vừa phải (thay đổi trung bình bằng +0,177), và chế phẩm chất

đệm histidin thể hiện gần như không thay đổi về độ đục (thay đổi trung bình bằng -0,010). Do sự thay đổi lớn về độ đục là không mong muốn, dữ liệu độ đục thể hiện rằng chất đệm histidin là chất đệm tối ưu nhất trong số các chất đệm được thử để cải thiện tính ổn định của protein gp140 HIV.

Phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS): DLS được dùng để đánh giá tính ổn định keo, và đặc biệt xem liệu có bất kỳ kết tụ protein trong công thức bào chế protein. Thay đổi về bán kính (R_h) từ T_0 ở 20°C đến T_7 ngày ở 70°C được đo. Đặc biệt hơn là, R_h được đo đối với mẫu ban đầu ở 20°C. Sau đó, mẫu được gia nhiệt đến 70°C, và giữ ở nhiệt độ bằng 70°C trong 7 ngày trước khi đo R_h cuối cùng. Sự khác biệt về giá trị R_h ban đầu và giá trị R_h cuối cùng được tạo đồ thị trên Hình 1B. Thay đổi lớn về R_h chỉ ra rằng có tích tụ protein, và chế phẩm do đó ít được mong muốn.

Các kết quả của phân tích DLS thể hiện rằng các chế phẩm chứa sorbitol có sự thay đổi ít hơn về R_h so với chế phẩm chứa sucroza. Do thay đổi lớn về R_h là không mong muốn, dữ liệu DLS chỉ ra rằng sorbitol là đường tối ưu nhất trong số các đường được thử để cải thiện tính ổn định của protein gp140 HIV.

Các kết quả của các nghiên cứu mô tả ở trên còn thể hiện rằng đường, nồng độ đường, chất hoạt động bề mặt, nồng độ chất hoạt động bề mặt và nồng độ protein có tác động lên tính ổn định, nên các tham số này được khảo sát thêm như được mô tả trong Ví dụ 2 dưới đây.

Ví dụ 2: Tác động của Đường, Chất hoạt động bề mặt, và Nồng độ protein lên tính ổn định của công thức bào chế gp140 Nhánh C HIV

Chế phẩm sinh miễn dịch protein gp140 HIV được điều chế trong 10 mM chất đệm histidin, pH $6,0 \pm 0,5$, với các thông số sau đây được biến đổi: đường (sorbitol và sucroza), nồng độ đường (2% và 12% khối lượng/thể tích), polysorbat (PS20 và PS80), nồng độ polysorbat (0,02% và 0,1% khối lượng/thể tích), và nồng độ protein (0,2 mg/mL và 1,0 mg/mL). Các chế phẩm được điều chế bằng cách thêm 10 mM chất đệm histidin, pH $6,0 \pm 0,5$, sau đó thêm đường và chất hoạt động bề mặt. Độ pH được điều chỉnh khi cần. Protein nhánh C gp140 HIV (SEQ ID NO: 1) được thêm đến nồng độ mong muốn.

Các chế phẩm sau đó được phân tích bằng Sắc ký loại kích cỡ hiệu năng cao (HP-SEC), như được mô tả dưới đây.

Các chế phẩm được điều chế và thử nghiệm như được thể hiện dưới đây trong Bảng 2.

Bảng 2: Công thức bào chế protein gp140 HIV

Chế phẩm	Đường	Nồng độ đường (% khối lượng/thể tích)	Chất hoạt động bề mặt	Nồng độ chất hoạt động bề mặt (% khối lượng/thể tích)	Nồng độ protein (mg/mL)
1)	sorbitol	12)	PS20	0,02)	0,2)
2)	sorbitol	12)	PS80	0,1)	0,2)
3)	sorbitol	2)	PS20	0,1)	0,2)
4)	sorbitol	2)	PS20	0,1)	0,2)
5)	sorbitol	2)	PS80	0,02)	1)
6)	sorbitol	12)	PS80	0,02)	1)
7)	sorbitol	12)	PS20	0,02)	1)
8)	sorbitol	2)	PS80	0,1)	1)
9)	sorbitol	12)	PS80	0,1)	1)
10)	sucroza	12)	PS80	0,02)	0,2)
11)	sucroza	2)	PS20	0,02)	0,2)
12)	sucroza	12)	PS80	0,1)	0,2)
13)	sucroza	2)	PS80	0,02)	0,2)
14)	sucroza	2)	PS80	0,1)	1)
15)	sucroza	2)	PS20	0,02)	1)
16)	sucroza	2)	PS20	0,1)	1)
17)	sucroza	12)	PS20	0,1)	1)
18)	sucroza	12)	PS20	0,1)	1)

Phân tích sắc ký loại kích cỡ hiệu năng cao (HP-SEC): HP-SEC được dùng để phân tích lượng của các loại hexame, trime, và khối lượng phân tử cao/thấp trong mẫu chế phẩm bằng cách theo dõi độ hấp thụ ở 280 nm. Protein gp140 HIV tồn tại chủ yếu là trime. Một số loại hexame protein gp140 HIV cũng quan sát được. Mặc dù các loại

trime là các loại được mong muốn, sự miễn dịch chống lại HIV quan sát được đối với cả loại trime và loại hexame. Các loại khối lượng phân tử cao (HMW) và khối lượng phân tử thấp (LMW) trong các chế phẩm là không được mong muốn. Cụ thể là, sự có mặt của các loại LMW cho thấy sự phân cắt và/hoặc thoái biến của protein gp140. Các loại HMW có thể do nhiều yếu tố, như tích tụ protein gp140. Các mẫu của mỗi chế phẩm được phân tích ở thời điểm 0 (T_0), và sau đó chịu ứng suất ở 40°C trong 24 giờ (T_{24}). Chế phẩm chứa 1 mg/mL protein gp140 nhánh C được pha loãng hai lần trước khi tiêm vào hệ HP-SEC, và chế phẩm chứa 0,2 mg/mL protein gp140 nhánh C không được pha loãng trước khi tiêm.

Các kết quả của phân tích HP-SEC được thể hiện dưới đây trong Bảng 3, và trên Hình 2A-2F. Các kết quả chỉ ra rằng lượng của trime và hexame cho cả mẫu T_0 và T_{24} phụ thuộc vào nồng độ của chất hoạt động bề mặt và protein gp140 HIV. Các chế phẩm có nồng độ chất hoạt động bề mặt thấp hơn (0,02% khối lượng/thể tích) có giá trị các loại trime +hexame của protein gp140 HIV được thấy cao hơn, với ít các loại khối lượng phân tử cao/thấp quan sát được (xem Hình 2B, 2D, và 2F), cả trước và sau khi gây ứng suất mẫu. Các chế phẩm có nồng độ protein gp140 HIV cao hơn (1,0 mg/mL) còn có giá trị các loại trime +hexame của protein gp140 HIV quan sát được cao hơn, với ít các loại khối lượng phân tử cao/thấp quan sát được (xem Hình 2B và 2D), cả trước và sau khi gây ứng suất mẫu (xem Hình 2A và 2C). Các chế phẩm chứa polysorbat 20, đối lập với polysorbat 80, còn có lượng thấp hơn của các loại khối lượng phân tử thấp hơn có mặt (xem HÌNH 2E).

Bảng 3: Các kết quả của phân tích HP-SEC.

Chế phẩm	Phân tử cao		Hexame		Trime (%)		Phân tử thấp	
	Đặc điểm khối lượng (%)		T ₀ T ₂₄		T ₀ T ₂₄		Đặc điểm khối lượng (%)	
	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄	T ₀	T ₂₄
1)	0,57)	0)	10,6 9)	10,1 3)	88,0 5)	89,8 7)	0)	0)

2)	0,22)	0)	8,48)	9,55)	80,0 8)	85,3 9)	11,22)	5,06)
3)	0,2)	0)	9,15)	9,51)	84,4 7)	85,7 7)	0)	4,72)
4)	0)	0)	9,26)	9,56)	84,6 3)	86,7 1)	0)	3,73)
5)	0)	0)	10,7 2)	12,2 7)	88,4 1)	87,7 3)	0,86)	0)
6)	0)	0)	10,7 8)	11,6)	88,4 4)	88,4)	0,78)	0)
7)	0)	0)	11,0 8)	11,7)	88,6)	88,3)	0,32)	0)
8)	0)	0)	10,4 6)	11,6 7)	87,3 3)	88,3 3)	2,21)	0)
9)	0)	0)	10,6)	11,5 7)	86,9 1)	88,4 3)	2,48)	0)
10)	0)	0)	9,79)	10,0 2)	88,1 7)	89,9 8)	2,05)	0)
11)	0)	0)	10,5 2)	10,5 4)	88,7 5)	89,4 6)	0)	0)
12)	0)	0)	8,9)	9,23)	79,7 9)	83,5 1)	11,31)	7,26)
13)	0)	0)	9,74)	10,5 8)	87,5 8)	89,4 2)	2,68)	0)
14)	0)	0)	10,3 7)	11,8 2)	87,3 8)	87,9 8)	2,25)	0,2)
15)	0)	0)	10,9 1)	12,1 5)	88,7 7)	87,8 5)	0,32)	0)

16)	0)	0)	10,5 7)	11,4 2)	87,7 1)	87,7 2)	1,72)	0,86)
17)	0)	0)	10,6 3)	11,4 5)	88,5 1)	88,4 3)	0)	0,12)
18)	0)	0)	10,7 4)	11,5 4)	88,2 8)	88,4 6)	0)	0)

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 3 chỉ ra rằng kết hợp của sorbitol và chất đệm histidin tốt hơn là kết hợp của chất đệm và sucroza. Ví dụ, các chế phẩm chứa chất đệm histidin và sorbitol, như chế phẩm 1, 4, và 7, thể hiện thay đổi ít nhất giữa T_0 và T_{24} với lượng các loài hexamer và trimer so với quan sát được đối với chế phẩm chứa chất đệm và sucroza. Kết quả này là ngạc nhiên vì chất đệm histidin và sorbitol thường không dùng kết hợp cho công thức bào chế protein, trong khi đó chất đệm và sucroza thường được dùng kết hợp. Do đó bất ngờ là chế phẩm tối ưu nhất chứa chất đệm ($\text{pH } 6,0 \pm 0,5$) và sorbitol, hơn là chất đệm histidin và sucroza. Nghiên cứu trên còn chỉ ra rằng việc bao gồm polysorbat 20 làm chất hoạt động bề mặt (xem, ví dụ, Hình 2E) ở nồng độ bằng 0,2% (khối lượng/thể tích) (xem, ví dụ, các Hình 2B, 2D, và 2F) đề xuất chế phẩm trong đó tính ổn định của protein gp140 HIV được cải thiện hơn.

Các lợi ích của chế phẩm được xác định ở đây so với chế phẩm đang được dùng cho sản phẩm thuốc gp140 drug trong các thử nghiệm lâm sàng, bao gồm chúng dùng các tá dược cấp đủ điều kiện hiện có mà sẵn có cho việc sản xuất quy mô lớn và không chịu các vấn đề đã biết mà có thể ảnh hưởng bất lợi đến tính ổn định trong dài hạn, và chúng cho phép bảo quản khô chất thuốc và sản phẩm thuốc kháng nguyên ổn định. Hơn nữa, các chế phẩm này cho phép bảo quản và ổn định sản phẩm thuốc có tá dược là sản phẩm thuốc trong lọ riêng ở nhiệt độ được làm lạnh. Các chế phẩm này thích hợp để bảo quản ở dạng lỏng, mà còn có khả năng được bảo quản ở dạng đông khô và sau đó được hoàn nguyên trong chất lỏng trước khi tiêm, cũng là một lợi ích khác nữa.

Ví dụ 3: Nghiên cứu tính ổn định của công thức bào chế protein gp140 kháng HIV

Hai chế phẩm chứa protein gp140 khảm HIV (SEQ ID NO: 2) được kiểm tra về tính ổn định trong nghiên cứu chu kỳ kết đông-tan giá và nhiệt độ. Các chế phẩm thử được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Công thức bào chế protein gp140 khảm HIV

Chế phẩm	Protein	Chất đệm	Đường	Chất hoạt động bề mặt
F1	1,0 mg/mL	10 mM histidin, pH 6,5	12% sorbitol	0,02% PS20
F2	1,0 mg/mL	10 mM histidin, pH 6,5	2% sorbitol	0,02% PS20

Các chế phẩm được đưa qua các chu kỳ kết đông-tan giá. Một chu kỳ kết đông-tan giá được thực hiện bằng cách kết đông ở -80°C hoặc -40°C trong 24 giờ, sau đó tan giá ở -2°C đến 8°C trong 24 giờ. Các mẫu được phân tích ở cuối các chu kỳ kết đông-tan giá 1, 3, và 5 bằng cách đo sự hấp thu ở 280 nm (nồng độ) và 350 nm (độ đục). Các kết quả được thể hiện trên Hình 3A và 3B.

Các kết quả này thể hiện rằng sự hấp thu ở 350 nm và 280 nm là không thay đổi nhiều đối với cả chế phẩm F1 và F2 sau nhiều chu kỳ kết đông-tan giá, cho thấy rằng nồng độ và độ đục của chế phẩm tương đối không bị ảnh hưởng. Điều này chứng minh rằng protein gp140 HIV trong các chế phẩm là ổn định để kết đông-tan giá.

Ví dụ 4: Nghiên cứu tính ổn định dài hạn của công thức bào chế protein gp140 HIV

Tính ổn định của công thức bào chế protein gp140 HIV trong chất đệm histidin, cả khi có và không có tá dược theo các phương án của sáng chế so với tính ổn định của công thức bào chế protein gp140 HIV được phối chế trong chất đệm HEPES, cả khi có và không có tá dược. Các chế phẩm thử được thể hiện trong Bảng 5. Tất cả các chế phẩm chứa 0,2 mg/mL protein gp140 nhánh C HIV (SEQ ID NO: 1).

Bảng 5: Công thức bào chế protein gp140 HIV cho nghiên cứu tính ổn định trong thời gian dài

Chế phẩm	Chế phẩm đệm	Tá được?
1)	20 mM HEPES, pH 6,5 90 mM NaCl 4% (khối lượng/thể tích) sucroza 0,02% polysorbat 80	Không tá được
2)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	Không tá được
3)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 2% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	Không tá được
4)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	Không tá được
5)	20 mM HEPES, pH 6,5 90 mM NaCl 4% (khối lượng/thể tích) sucroza 0,02% polysorbat 80	+ tá được nhôm phosphat (0,85 mg/mL)
6)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	+ tá được nhôm phosphat (0,85 mg/mL)
7)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 2% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	+ tá được nhôm phosphat (0,85 mg/mL)
8)	10 mM chất đệm histidin, pH 6,5 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20	+ tá được nhôm phosphat (0,85 mg/mL)

Các chế phẩm được bảo quản ở 2°C đến 8°C; 25°C và độ ẩm tương đối 60% (RH); và 40°C và 75% RH. Nghiên cứu tiếp tục, và các mẫu được thử sau khi bảo quản trong 2 tuần, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, và 36 tháng.

Các mẫu được thử bằng cách SDS rút gọn sau khi bảo quản lên đến ba tháng. Dưới các điều kiện rút gọn, khi SDS-PAGE được thực hiện, các dạng trime và hexame được rút gọn thành dạng monome mà thể hiện dải đơn trên gel. Sự thoái biến bất kỳ của protein đến các loại phân tử thấp hơn tạo ra sự thay đổi (giảm) ở dạng monome của protein quan sát được trên gel. Dữ liệu đối với các mẫu được bảo quản ở 25°C và 60% RH, và ở 40°C và 75% RH được thể hiện trên các Hình 4A-4D. Dữ liệu thể hiện rằng tất cả các chế phẩm ổn định khi bảo quản ở 25°C và 60% RH cả khi có và không có tá dược nhôm phosphat trong khoảng thời gian lên đến ba tháng (các Hình 4A và 4C). Tuy nhiên, các chế phẩm chứa chất đệm histidin và sorbitol ổn định hơn chế phẩm chứa HEPES và sucroza (các Hình 4B và 4D) khi bảo quản ở 40°C và 75% RH, cả khi có và không có tá dược nhôm phosphat. Ngoài ra, sau sáu tháng bảo quản ở 25°C vật liệu phối chế histidin với 12% sorbitol, không có tá dược nhôm phosphat, thể hiện tính ổn định tốt hơn so với chế phẩm được đệm HEPES như được đo bằng SDS-PAGE (% thay đổi ít hơn so với đo ban đầu; dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, gp140 mà được phối chế với chất đệm histidin, sorbitol và nhôm phosphat được thấy là ổn định ở 25°C trong ít nhất sáu tháng (dữ liệu không được thể hiện). Còn khi được phối chế với chất đệm histidin và sorbitol, ở các nồng độ cao hơn của tá dược nhôm phosphat (3,84 mg/mL), protein gp140 HIV được thấy là ổn định ở 25°C trong ít nhất sáu tháng và ở 40°C trong ít nhất ba tháng như được đo bằng SDS PAGE rút gọn (giảm ít hơn 25%, dữ liệu không được thể hiện; trong khi đo sử dụng ELISA thể hiện tính ổn định (giảm ít hơn 50%) ở 40°C trong ít nhất hai tuần, dữ liệu không được thể hiện). Các dữ liệu này còn chỉ ra rằng công thức bào chế protein gp140 HIV chứa chất đệm histidin và sorbitol có tính ổn định tăng cường, và do đó có thể được bảo quản là sản phẩm thuốc có tá dược trong lọ riêng ở nhiệt độ cao, mà là có lợi vì nó thường khó phối chế protein có tá dược mà ổn định để bảo quản ở nhiệt độ cao. Điều này nghĩa là sản phẩm thuốc có tá dược có thể

được bảo quản trong lọ riêng ở nơi sản xuất hoặc nơi đóng gói và hoàn thiện, và không cần bảo quản tách riêng với việc trộn trong tiêm thuốc hoặc cạnh giường ngay trước khi dùng. Ngoài lợi ích kinh tế, điều này có lợi ích lớn đặc biệt đối với sản phẩm vaccin HIV mà dự định còn dùng ở nhiều nơi mà khả năng và tiện nghi có thể bị giới hạn. Còn có lợi là giới hạn số lượng thao tác thực hiện với sản phẩm thuốc tại địa điểm nơi số lượng lớn các đối tượng được chủng ngừa trong một chiến dịch duy nhất. Do đó, các chế phẩm theo sáng chế cải thiện một cách đáng ngạc nhiên các đặc điểm thực hành để sử dụng vaccin cuối, đặc biệt là ở cơ sở bị giới hạn nguồn lực.

Kết hợp của hai protein gp140 HIV, một loại có SEQ ID NO: 1 và một loại có SEQ ID NO: 2 được trộn lẫn (tổng nồng độ protein 0,2-1,0 mg/mL, ví dụ 0,1 mg/mL đối với mỗi protein tạo ra tổng nồng độ protein gp140 bằng 0,2 mg/mL) và được thử trong chế phẩm được ưu tiên, tức là 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích), ví dụ 0,02%, polysorbitat 20; và 5 đến 20 mM, ví dụ 10 mM, chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0, ví dụ pH 6,5, và tốt hơn là nhôm phosphat, ví dụ 0,7-4 mg/mL, ví dụ 0,85 hoặc 3,84 mg/mL, sử dụng phương pháp như được mô tả ở trên. Chế phẩm này còn được kỳ vọng là ổn định trong ít nhất sáu tháng ở 2-8°C, giống như các protein riêng lẻ trong chế phẩm này như được chỉ ra ở trên.

Cần hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa, và các thay đổi có thể được thực hiện đối với các phương án được mô tả ở trên mà không vượt ra khỏi phạm vi sáng tạo rộng lớn của chúng. Do đó, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được bộc lộ, mà nó bao hàm các cải biến trong tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU SÁCH

1. Abbink *et al.*, (2007) *Virol* 81(9): 4654-63.
2. Baicu et al. *Cryobiology* (2002) 45(1) 33-48;
3. Barouch et al, *Nat Med* 2010, 16: 319-323
4. Barouch DH et al (2015) *Science* 349: 320-324.
5. Barouch et al., *Cell* 155:1-9, 2013
6. Harris A et al (2011). *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11440-11445.
7. Hoganson *et al.*, 2002, *Bioprocessing J* 1: 43-8
8. Kamerzell et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2011) 63, 1118-1159
9. Kovacs JM et al (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 12111-12116
10. Kerzell et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2011) 63, 1118-1159
11. Lepe-Zuniga et al. *J. Immunol. Phương pháp* (1987) 103(1), 145;
12. Nkolola et al. *J. Virol.* (2014) 88(17), 9538-9552.
13. Nkolola et al. *J. Virol.* (2010) 84(7), 3270-3279.
14. Sanders RW et al, (2002) *J. Virol.* 76: 8875-8889.
15. Sanders RW et al (2015) *Science* 349(6244): aac4223, doi: 10.1126/science.aac4223
16. Uchiyama, *Biochimica Biophysica Acta* (2014) 1844, 2041-2052
17. Zhang C W-H et al (2001) *J Biol Chem* 276: 39577-39585.
18. Zigler et al. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* (1985) 21(5), 282-287

TÀI LIỆU SÁNG CHẾ:

1. WO 2010/042942

2. WO 2014/107744
3. US20120076812;
4. WO 2016/049287
5. WO 2010/059732
6. US20120076812
7. WO 2007/104792
8. PCT/EP2016/081159

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm:
 - a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL của protein gp140 HIV hoặc của hỗn hợp của ít nhất hai protein gp140 HIV;
 - b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
 - c. 0,01 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20; và
 - d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0.
2. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của protein gp140 HIV hoặc của hỗn hợp của protein gp140 HIV là 0,2 mg/mL.
3. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của protein gp140 HIV hoặc của hỗn hợp của protein gp140 HIV là 1 mg/mL.
4. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích).
5. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của sorbitol là 12% (khối lượng/thể tích).
6. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của polysorbat 20 là 0,02% (khối lượng/thể tích).
7. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó nồng độ của chất đệm histidin là 10 mM, và pH của chất đệm là 6,5.
8. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm tá dược nhôm phosphat.
9. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.
10. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.
11. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm hỗn hợp của protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.
12. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, mà ổn định khi bảo quản ở 2-8 độ C trong ít nhất sáu tháng.

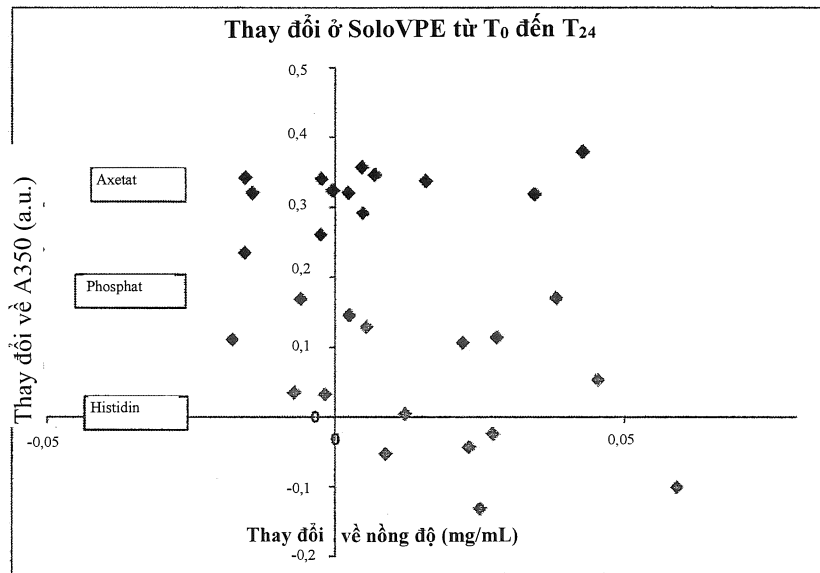
13. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là chế phẩm lỏng.
14. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 8, trong đó nhôm phosphat là tá dược có mặt với nồng độ 0,7-5,0 mg/mL.
15. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 8, trong đó protein gp140 HIV khi bảo quản trong một tuần ở 40 độ C không thoái biến nhiều hơn 25% như được đo bằng SDS PAGE.
16. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm, so với tổng thể tích của chế phẩm,
 - a. 0,2 mg/mL hoặc 1 mg/mL protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc của hỗn hợp của protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và protein gp140 HIV bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;
 - b. 5% hoặc 12% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
 - c. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20;
 - d. 10 mM chất đệm histidin ở pH bằng 6,5; và
 - e. tá dược nhôm phosphat.
17. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 16, trong đó chế phẩm này là chế phẩm lỏng.
18. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 16, trong đó chế phẩm này bao gồm tá dược nhôm phosphat ở nồng độ 0,85 mg/mL hoặc 3,84 mg/mL.
19. Phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm việc pha trộn:
 - a. 0,05 mg/mL đến 5 mg/mL protein gp140 HIV hoặc của ít nhất hai protein gp140 HIV;
 - b. 2% đến 15% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
 - c. 0,01 đến 0,05% polysorbat 20; và
 - d. 5 đến 20 mM chất đệm histidin ở pH bằng 5,5 đến 7,0;
 nhờ đó thu được chế phẩm sinh miễn dịch.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc pha trộn 0,7-4,0 mg/mL tá dược nhôm phosphat.

21. Phương pháp điều chế chế phẩm sinh miễn dịch ổn định khi bảo quản, trong thời gian dài mà bao gồm protein gp140 HIV, phương pháp này bao gồm: (i) tạo ra chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 1, và (ii) bảo quản chế phẩm này ở 2-8 độ C trong ít nhất một tuần.

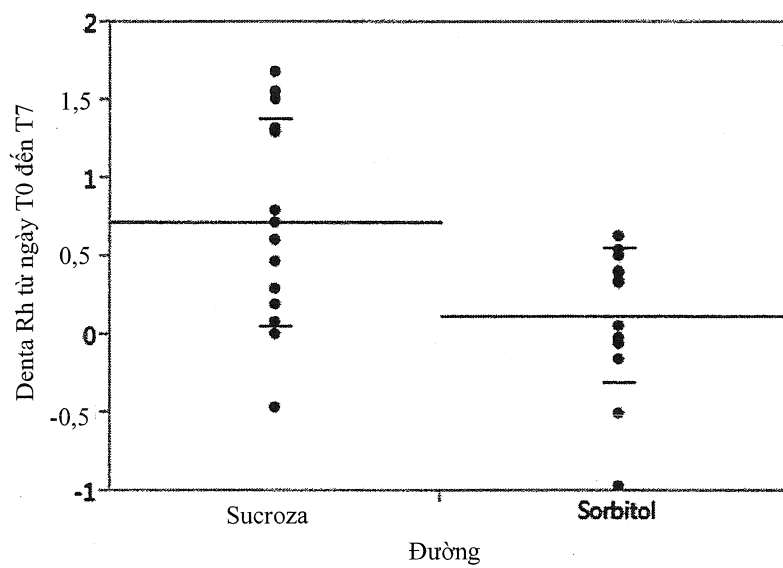
22. Phương pháp theo điểm 20, trong đó tá dược nhôm phosphat được trộn tới nồng độ 0,7-5,0 mg/mL.

1/7

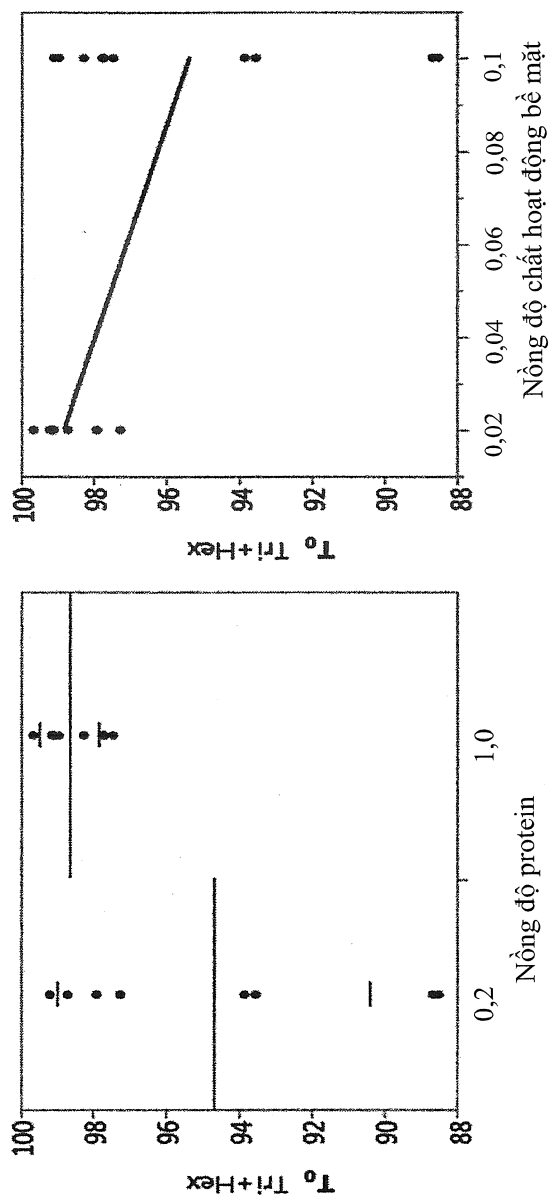
HÌNH 1A

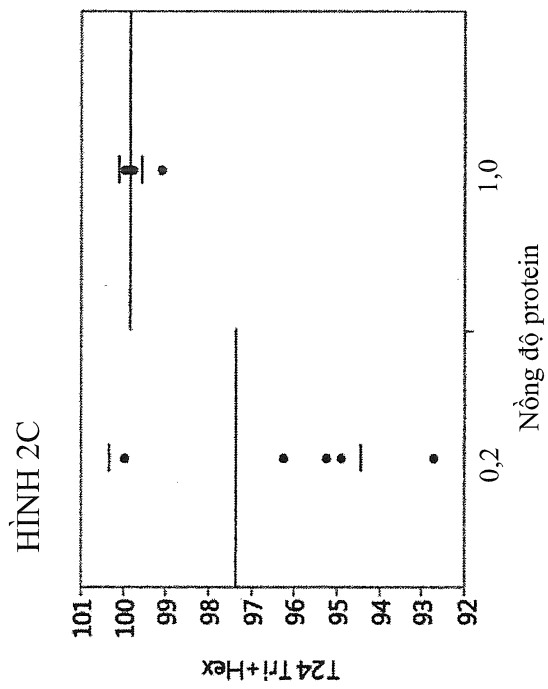
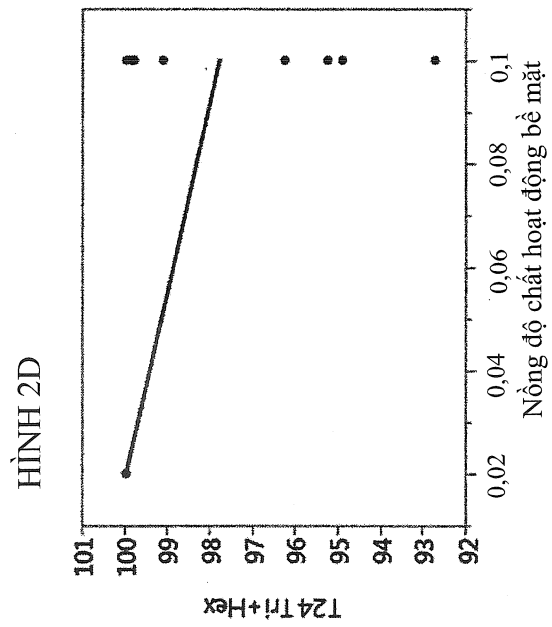


HÌNH 1B



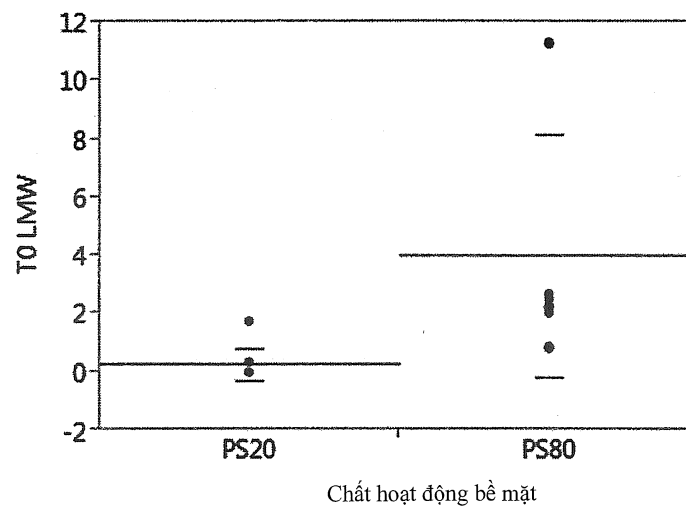
HÌNH 2A



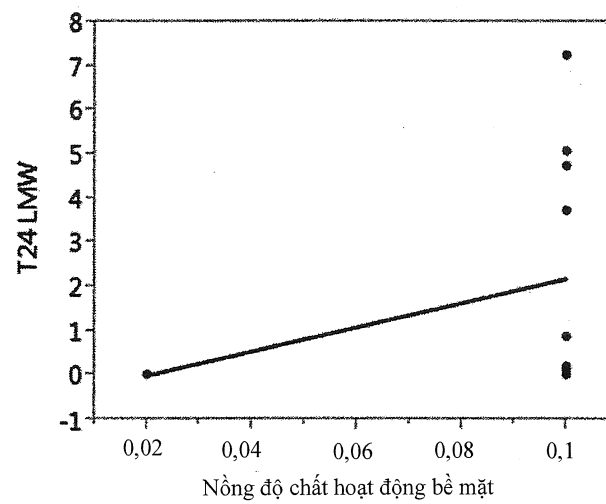


4/7

HÌNH 2E

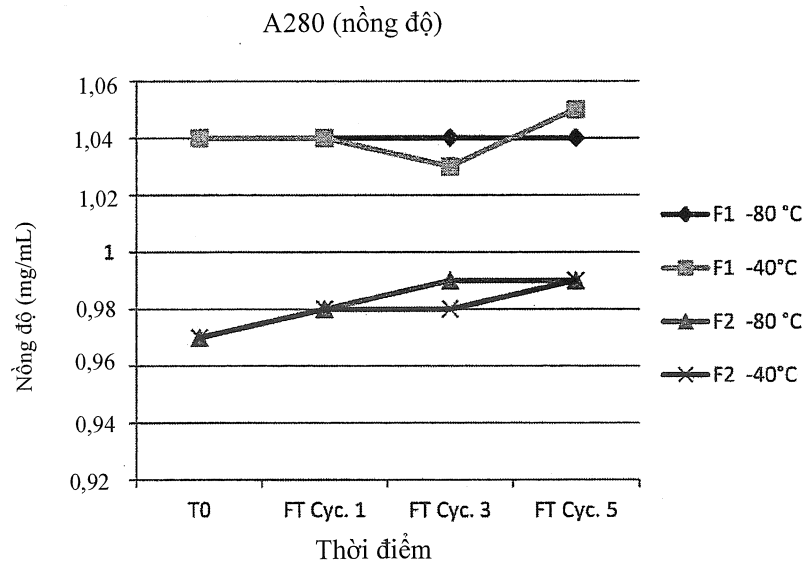


HÌNH 2F

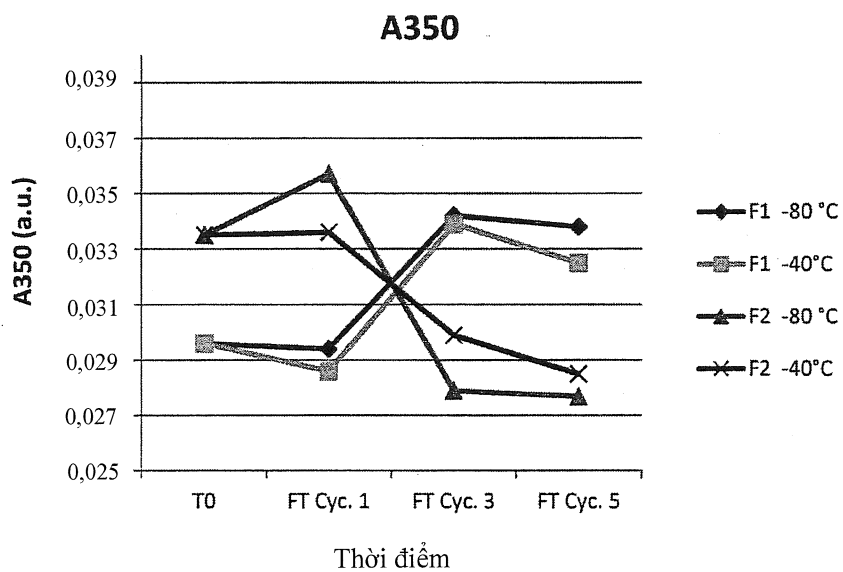


5/7

HÌNH 3A

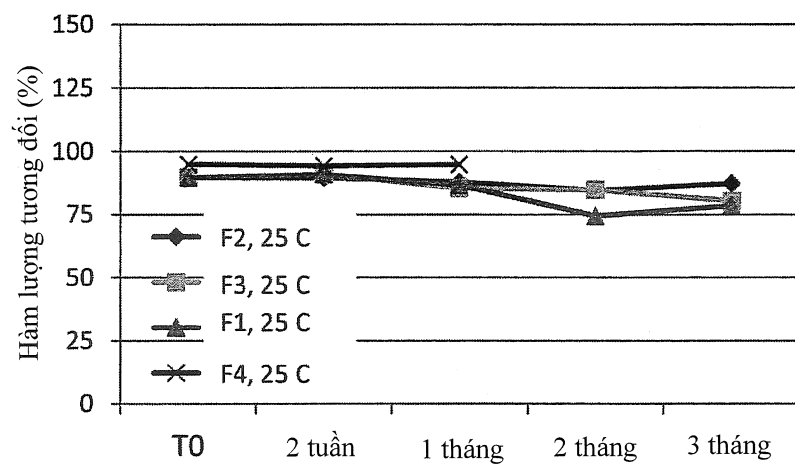


HÌNH 3B

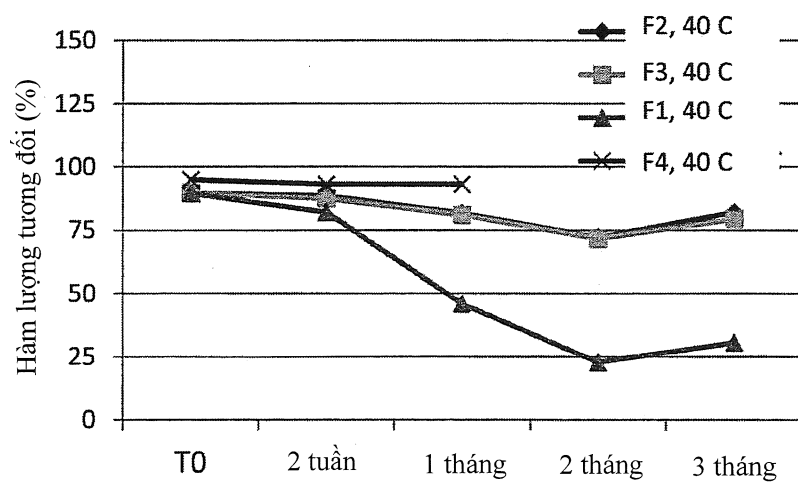


6/7

HÌNH 4A

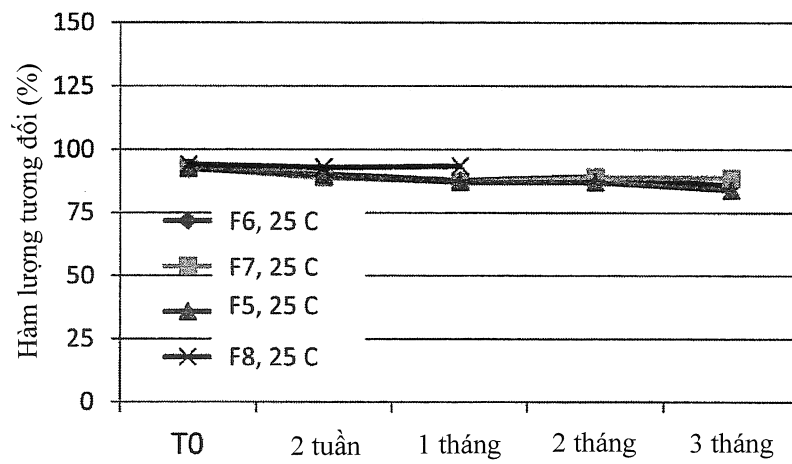


HÌNH 4B



7/7

HÌNH 4C



HÌNH 4D

