



(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)



1-0035311

(51)⁷ A61K 39/00; C07K 14/315; A61K 39/116; A61K 47/36; A61K 39/085; A61K 39/09 (13) B

(21) 1-2018-00076

(22) 03/06/2016

(86) PCT/IB2016/053265 03/06/2016

(87) WO 2016/199003 A1 15/12/2016

(30) 2185/MUM/2015 08/06/2015 IN

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/05/2018 362A

(73) SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD. (IN)

212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune Maharashtra 411028, India

(72) DHERE, Rajeev Mhalasakant (IN); MALVIYA, Hitesh Kumar (IN); JANA, Swapan Kumar (IN); PISAL, Sambhaji Shankar (IN); MALLYA, Asha Dinesh (IN);

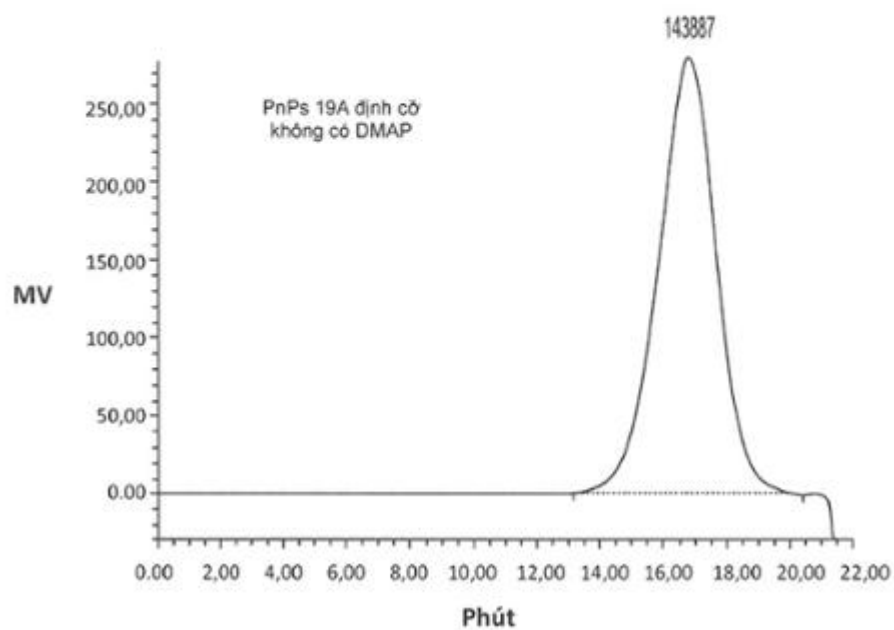
MAHOR, Sunil (IN); GAUTAM, Manish Maheshkumar (IN); JOSHI, Chetan Vilas (IN); MALEPATI, Venkata Vamsi Krishna (IN); JADHAV, Prashant Shivaji (IN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN CHỨA THỂ LIÊN HỢP POLYSACCARIT-PROTEIN
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ĐA HÓA TRỊ

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein *Streptococcus pneumoniae* đa hóa trị ổn định và chế phẩm vacxin thu được bằng phương pháp này. Các chế phẩm vacxin ổn định này biểu hiện phần trăm hấp phụ tối ưu cho mỗi thể liên hợp trong đó, có thể ngăn cản sự kết tập bằng cách áp dụng: i) cho hấp phụ riêng biệt hoặc tách riêng thể liên hợp mà theo cách khác thì thể hiện phần trăm hấp phụ thấp hơn sự hấp phụ kết hợp, ii) hệ đệm histidin-axit succinic cùng với sự chuyển dịch độ pH từ độ pH trung tính đến độ pH axit, iii) tỷ lệ polysaccarit với protein nằm trong khoảng từ 0,5 đến khoảng 1,4, iv) bộ cánh khuấy tuabin kiểu Rushton sáu lưỡi trong bình bào chế.

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Đa)	Mn (Đa)	MP (Đa)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.881	36050010	178357	124375	143887	100,00	1,434025



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm vaccin chứa thể liên hợp polysaccarit – protein *Streptococcus pneumoniae* đa hóa trị có mức hấp phụ tăng cường và chế phẩm vaccin thu được bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus pneumoniae là nguyên nhân hàng đầu của bệnh viêm phổi vi khuẩn, bệnh viêm màng não, và nhiễm khuẩn ở trẻ em. Ước tính gần đây về con số tử vong của trẻ em do *S. pneumoniae* nằm trong khoảng từ 0,7 – 1,0 triệu mỗi năm trên toàn thế giới. Trong năm 2000, khoảng 14,5 triệu ca mắc bệnh phế cầu khuẩn (khoảng tương đối 11,1–18,0 triệu) được ước tính đã xảy ra. Bệnh phế cầu khuẩn gây tử vong khoảng 0,826 triệu trường hợp (0,58 – 0,926 M) ở trẻ em trong độ tuổi 1–59 tháng, trong đó 0,091 triệu (0,063–0,1 M) là trẻ dương tính với HIV và 0,735 triệu (0,51–0,82 M) là âm tính với HIV.

Vaccin polysaccarit phế cầu khuẩn đa hóa trị đã được cấp đăng ký trong nhiều năm đã chứng minh là có giá trị trong việc phòng bệnh phế cầu khuẩn ở người trưởng thành, cụ thể, người già và nhóm người có nguy cơ cao. Tuy nhiên, trẻ nhỏ và trẻ em nhỏ tuổi đáp ứng kém với polysaccarit phế cầu khuẩn không liên hợp. Vaccin phế cầu khuẩn dạng liên hợp, Prevnar®, chứa 7 typ huyết thanh phân tách phổ biến nhất (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F) gây ra bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn ở trẻ em nhỏ và trẻ sơ sinh ở thời điểm này, lần đầu tiên được cấp đăng ký tại Mỹ vào tháng hai, năm 2000.

Hơn nữa, Prevnar™ 13 (Wyeth) là một vaccin đã được thông qua có chứa các thể liên hợp của polysaccarit từ typ huyết thanh 6A, 6B, 19A, 19F ngoài 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C và 23F. Synflorix™ (GSK) là một vaccin khác đã được thông qua mang lại khả năng bảo vệ chống lại 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, và 23F cũng như bảo vệ chéo chống lại 19A & 6A.

Chế phẩm vaccin thông thường phải ổn định và có sự ổn định đồng nhất để đáp ứng nhu cầu về thời hạn sử dụng dài và việc sử dụng các vật chứa nhiều liều. Vaccin dựa trên protein, bao gồm thể liên hợp polysaccarit-protein, được đưa vào quy trình kết

tủa và kết tập protein có thể khiến cho tổng nồng độ hiệu quả của vaccin thấp hơn do sự không sẵn có sản phẩm protein kết tủa. Vaccin chứa thể liên hợp polysaccharit-protein, cụ thể, dường như có xu hướng kết tập mạnh hơn chất mang protein đơn độc (xem Berti et al, 2004, Biophys J 86:3-9). Sự lựa chọn chế phẩm vaccin chứa thể liên hợp polysaccharit-protein có thể ảnh hưởng mạnh đến mức kết tập protein. Xem Ho et al., 2001, Vaccine 19:716-725.

Mặc dù đã có nhiều chế phẩm vaccin chứa thể liên hợp polysaccharit-protein phẩy cầu đa hóa trị được phát triển trên toàn thế giới, vẫn có nhu cầu trong lĩnh vực các chế phẩm vaccin mang lại sự hấp phụ cao các thể liên hợp riêng biệt và không kết tập /kết tủa chế phẩm gây miễn dịch có chứa thể liên hợp polysaccharit-protein này.

Các tá dược thường sử dụng trong vaccin phẩy cầu khuẩn đa hóa trị như vậy là muối nhôm như nhôm hydroxit và nhôm phosphat. Nhiều tá dược thử nghiệm khác đã được biết, tuy nhiên sự hấp phụ muối nhôm vẫn là vấn đề của chế phẩm tá dược vaccin thông dụng nhất. Mặc dù việc sử dụng chúng đã rộng rãi, muối nhôm có thể không phải luôn luôn tương thích với kháng nguyên cụ thể do vậy gây ra mức dao động đáng kể về phần trăm hấp phụ thể liên hợp polysaccharit-protein trên phèn hoặc tính kháng nguyên.

Đặc tính gây miễn dịch và tính ổn định của vaccin liên hợp nghiên cứu được hấp phụ trên tá dược nhôm phụ thuộc vào các thông số khác nhau như i) tính kháng nguyên của mỗi kháng nguyên, ii) kiểu chất mang protein sử dụng để liên hợp, và iii) kiểu tá dược được sử dụng. Quan trọng nhất là, mức hấp phụ của kháng nguyên trên tá dược đã được báo cáo trước đó là một trong các thông số then chốt để chứng minh độ ổn định theo lô của quy trình bào chế và khả năng ảnh hưởng của nó đến hiệu lực của sản phẩm vaccin. Hơn nữa, phần trăm hấp phụ của thể liên hợp polysaccharit-protein có thể giảm trong quá trình bảo quản của chế phẩm hoặc trong các tình trạng bất lợi như chênh lệch nhiệt độ. Xem lần họp thứ 54 của Ủy ban chuyên gia WHO về Tiêu chuẩn hóa sinh học, Recommendations for the production & control of Pneumococcal conjugate vaccines, 17-21 November 2003; Carl E. Frasch, Session IV: Conjugate Vaccin; Vaccine Technology II; Portugal. 2008.

Theo hướng dẫn của Cơ quan quản lý Châu Âu (EMA) về thể liên hợp polysaccharit-protein phẩy cầu khuẩn, sự hấp phụ hoàn toàn (% thể liên hợp không gán kết) sẽ được coi là thông số kiểm soát chất lượng quyết định cùng với hàm lượng phèn,

độ vô khuẩn, độ đồng nhất và hàm lượng polysaccarit tự do. Xem Báo cáo đánh giá của Synflorix 2009, Quy trình số EMEA/H/C/000973. WHO khuyến cáo về độ hấp phụ tối đa của kháng nguyên kết tủa do phèn (ví dụ, bạch hầu và biến độc tố uốn ván) trong đó ít nhất 80% kháng nguyên trong vacxin này được hấp phụ.

Trong quá trình sản xuất thể liên hợp polysaccarit-protein, chế phẩm có thể chứa hạt kết tụ có kiểu polysaccarit-polysaccarit, kiểu protein–protein hoặc kiểu polysaccarit-protein. Cũng quan sát thấy các hạt kết tụ này trong sản phẩm cuối cùng dẫn đến việc loại bỏ từ 4% đến 10% ống thủy tinh đã nạp chứa vacxin (các) thể liên hợp polysaccarit-protein, do đó tác động đến tính ổn định và hiệu lực của vacxin liên hợp.

Do hạn chế bàn luận ở trên về sự kết tụ và tính ổn định của polysaccarit và thể liên hợp của nó, vẫn tồn tại nhu cầu riêng biệt để làm giảm sự kết tụ và ổn định polysaccarit trong quá trình xử lý phía sau của quy trình đến giai đoạn thành phẩm trong quy trình sản xuất vacxin phế cầu khuẩn dạng liên hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng tính ổn định của vacxin chứa muối nhôm, và các phương pháp cụ thể để giảm thiểu mức kết tập và tăng cường phần trăm hấp phụ của thể liên hợp cụ thể trong vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein phế cầu đa hóa trị. Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng sự hấp phụ kết hợp của thể liên hợp polysaccarit-protein và việc áp dụng tỷ lệ polysaccarit với protein cao hơn 1:1 gây ra i) phần trăm hấp phụ thấp hơn 55% đối với thể liên hợp *S. pneumoniae* của typ huyết thanh 6A, 9V và 23F và ii) phần trăm hấp phụ nằm trong khoảng từ 80% đến 90% với các thể liên hợp typ huyết thanh còn lại, do đó không đạt được sự hấp phụ hoàn toàn đối với một thể liên hợp typ huyết thanh riêng biệt cho chế phẩm chứa thể liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị đưa ra. Cũng thấy rằng chế phẩm vacxin được bào chế bằng cách áp dụng độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 mang lại mức kết tập nằm trong khoảng từ 4 đến 10% và độ hấp phụ thấp hơn.

Sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein phế cầu đa hóa trị ổn định, thể hiện mức hấp phụ tối ưu nằm trong khoảng từ 75 đến 99% với mỗi thể liên hợp trong đó, trong phương pháp này, sự kết tập được ngăn chặn bằng cách sử dụng ít nhất một trong các điều kiện sau:

- a. Sự hấp phụ riêng biệt hoặc tách riêng đối với thể liên hợp mà thể liên hợp này theo cách khác sẽ thể hiện sự hấp phụ thấp hơn tương đối so với sự hấp phụ kết hợp;
- b. Hệ đệm histidin-axit succinic cùng với sự chuyển dịch độ pH từ độ pH trung tính đến độ pH axit;
- c. tỷ lệ polysaccarit với protein nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,4; và/hoặc
- d. Sử dụng bộ cánh khuấy tuabin kiểu Rushton sáu lưỡi trong bình bảo chế.

Sáng chế cũng bộc lộ phương pháp bảo chế thể liên hợp polysaccarit-protein có mức sinh miễn dịch tăng lên và hàm lượng polysaccarit tự do thấp hơn đối với polysaccarit *Streptococcus pneumoniae* chứa liên kết phosphodiester, cụ thể là 19A, 19F, 6A và 6B. Quy trình liên hợp này giảm thiểu sự phân hủy polysaccarit định cỡ gây ra do sản phẩm phụ là tác nhân xyanyl hóa và ngăn cản sự kết tập polysaccarit-polysaccarit sau đó bằng cách ổn định các polysaccarit không bền. Vấn đề then chốt để giảm mức kết tập có thể được cho là do việc sử dụng polysaccarit định cỡ nằm trong khoảng từ 100 – 200 KDa, và tỷ lệ polysaccarit so với CDAP (tác nhân xyanyl hóa) nằm trong khoảng từ (1):(0,8 – 1).

Chế phẩm sinh miễn dịch được bảo chế theo sáng chế mang lại mức kết tập giảm giữa thể liên hợp Polysaccarit - Polysaccarit, và Polysaccarit - Protein đồng thời tăng tính ổn định và mức sinh miễn dịch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Profin SEC-HP-RI của PnP 19A đã định cỡ (178 KDa) trước khi xử lý DMAP

Fig.2: Profin SEC-HP-RI của PnP 19A đã định cỡ (70 KDa) sau 24 giờ (A) và profin xử lý DMAP- phân hủy cỡ 14,5KDa sau 72 giờ (B)

Fig.3: Profin SEC-HP-RI của PnP 19A đã định cỡ (178 KDa; A) và mức kết tập phụ thuộc thời gian của polysaccarit đã hoạt hóa gây ra do CDAP (3B, 3C & 3D), 3E (thể liên hợp không có DF 10 KDa), 3F (thể liên hợp có DF 10 KDa), 3G-19A đã định cỡ /3H-19A đã hoạt hóa (tỷ lệ Ps:CDAP điều chỉnh là 1:1 đối với 19A) trong phương pháp liên hợp mà không sử dụng bước thẩm lọc 10KDa.

Fig.4: Profin SEC-HP-RI của các PnP 19F đã định cỡ (157 KDa; A) và mức kết tập phụ thuộc thời gian của polysaccarit đã hoạt hóa gây ra do CDAP (B), 4C/4D (tỷ lệ Ps:CDAP điều chỉnh là 1:1 đối với 19F) trong phương pháp liên hợp mà không sử dụng bước thẩm lọc 10Kda.

Fig.5: Bộ cánh khuấy tuabin kiểu Rushton sáu lưỡi

Fig 6: Quy trình hấp phụ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế là mang lại sự ổn định cải thiện của vacxin chứa muối nhôm và, cụ thể, phương pháp giảm thiểu mức kết tập và tăng cường phần trăm hấp phụ của từng thể liên hợp riêng biệt cụ thể trong vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein phế cầu đa hóa trị. Các tác giả của sáng chế đã quan sát thấy rằng việc hấp phụ kết hợp của các thể liên hợp polysaccarit-protein và sử dụng tỷ lệ polysaccarit với protein cao hơn 1:1 sẽ tạo ra i) phần trăm hấp phụ thấp hơn 55% đối với thể liên hợp *S. pneumoniae* đối với typ huyết thanh 6A, 9V và 23F và ii) phần trăm hấp phụ từ khoảng 80% đến 90% đối với các thể liên hợp typ huyết thanh còn lại, do đó không đạt được mức hấp phụ hoàn toàn đối với thể liên hợp typ huyết thanh riêng biệt cho chế phẩm chứa thể liên hợp phế cầu khuẩn đa hóa trị đưa ra. Cũng quan sát thấy chế phẩm vacxin bào chế bằng cách sử dụng độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 gây ra mức kết tập nằm trong khoảng từ 4 đến 10% và sự hấp phụ thấp hơn.

Polysaccarit được nuôi cấy bằng phương pháp như được mô tả trong Patent số WO2013088448A1, trong đó phương pháp này bao gồm (a) cung cấp nguyên liệu cấy của chủng vi khuẩn biểu hiện CP; (b) nuôi cấy chủng này bằng cách lên men ở độ pH=7,2, trong đó tốc độ bổ sung môi trường dinh dưỡng bằng với tốc độ bổ sung hỗn hợp kiềm để duy trì độ pH đã đặt; c) lên men môi trường nuôi cấy ở 35-38°C trong điều kiện khuấy ở tốc độ 50-150 vòng/phút với tốc độ dòng khí là 0,1-0,5vvm.

Polysaccarit được tinh chế bằng quy trình mô tả trong Patent số WO2012127485. Pn-P được điều chế bằng quy trình tức thời thể hiện mức thu hồi nằm trong khoảng từ 60 đến 70%, trong đó việc khử tạp nhiễm C-polysaccarit là từ 1 đến 5 lần so với hàm lượng C-P của phương pháp sắc ký sau tương tác kỵ nước (Hydrophobic interaction chromatography - HIC) hoặc phương pháp sắc ký trao đổi tiền ion (ion exchange chromatography - IEC), hàm lượng tạp nhiễm protein thấp hơn 1% và hàm lượng tạp

nhễm axit nucleic là thấp hơn 1%. Quy trình đã được tiến hành trên quy mô nghiên cứu, thí điểm và thương mại.

Quy trình này có thể tinh chế polysaccarit với tiêu tốn thời gian ít hơn 80-90% & chi phí thấp hơn 90% so với phương pháp dựa trên CTAB/rượu.

Theo một phương án quan trọng của sáng chế, phần trăm hấp phụ tăng lên nằm trong khoảng từ 75 đến 95% có thể thu được đối với thể liên hợp *S. pneumoniae* bằng cách i) sử dụng tỷ lệ polysaccarit với protein nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,4 ii) áp dụng bước hấp phụ riêng biệt hoặc tách riêng để hấp phụ kèm thể liên hợp *S. pneumoniae*, iii) duy trì độ pH thấp hơn trong quá trình bào chế.

Theo một khía cạnh của phương án đầu tiên, tỷ lệ polysaccarit với protein ưu tiên là 1:1.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ nhất, chế phẩm này bao gồm ít nhất 2 thể liên hợp polysaccarit protein có polysaccarit được chọn từ các typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F và 45

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ nhất, kiểu hấp phụ riêng biệt có thể được sử dụng đối với typ huyết thanh *S. pneumoniae* bất kỳ được chọn từ các typ huyết thanh 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F và 45, ưu tiên đối với typ huyết thanh *S. pneumoniae* 6A, 9V, và 23F.

Theo khía cạnh được ưu tiên của phương án thứ nhất, vacxin chứa thể liên hợp phế cầu đa hóa trị là hóa trị 10 trong đó typ huyết thanh *S. pneumoniae* 6A, 9V, và 23F được hấp phụ riêng biệt ở dạng hỗn hợp tách biệt và sau đó bổ sung vào hỗn hợp khác chứa hỗn hợp của typ huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A và 19F đã được hấp phụ theo cách kết hợp.

Theo khía cạnh được ưu tiên khác của phương án thứ nhất, vacxin chứa thể liên hợp phế cầu đa hóa trị là hóa trị 11, 13, 15, 16 hoặc cao hơn trong đó ít nhất một typ huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F và 45 được hấp phụ riêng biệt hoặc được hấp phụ trong nhóm nhỏ hơn ở dạng hỗn hợp tách biệt và sau đó bổ sung vào hỗn hợp khác gồm có

hỗn hợp các typ huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A và 19F đã được hấp phụ theo phương thức kết hợp.

Theo khía cạnh ưu tiên khác nữa của phương án thứ nhất, vacxin chứa thể liên hợp phẩy cầu đa hóa trị là có 16 hóa trị trong đó ít nhất một typ huyết thanh *S. pneumoniae* được chọn từ nhóm gồm có các typ huyết thanh 2, 3, 4, 6A, 9V, 12F, 15B, 18C, và 23F được hấp phụ riêng biệt hoặc trong các nhóm nhỏ hơn ở dạng hỗn hợp riêng biệt và sau đó bổ sung vào hỗn hợp khác gồm có hỗn hợp các typ huyết thanh *S. pneumoniae* 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A và 19F mà đã được hấp phụ theo phương thức kết hợp.

Phương án thứ hai của sáng chế là mức kết tập trong chế phẩm chứa thể liên hợp polysaccarit-protein phẩy cầu khuẩn đa hóa trị có thể được ngăn cản hoàn toàn bằng cách i) sử dụng độ chuyển dịch pH từ độ pH trung tính đến độ pH axit và ii) sử dụng hỗn hợp đệm histidin-axit succinic.

Theo một khía cạnh của phương án thứ hai, độ chuyển dịch pH này có thể xảy ra từ giá trị 6,8 đến độ pH được chọn từ nhưng không hạn chế ở 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8 và 5,9. Tốt hơn là từ giá trị 6,8 đến độ pH được chọn từ 5,4; 5,5; 5,6; 5,7 và 5,8.

Theo khía cạnh khác của phương án thứ hai, hệ đệm histidin-axit succinic có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ 1mM đến 200 M. Nồng độ này tốt hơn là ít nhất 1 mM (ví dụ tối đa là 200mM, 150mM, 100mM, 90mM, 80mM, 70mM, 60mM, 50mM, 40mM, 30mM, 20mM, 10mM, v.v.). Tốt hơn nữa là, nồng độ đệm histidin-axit succinic trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10mM đến 40 mM.

Phương án thứ ba của sáng chế là sự tạo thành thể keo tụ hoặc hạt kết tụ trong thể liên hợp phẩy cầu lớn có thể được ngăn cản bằng cách sử dụng bộ cánh khuấy cánh bằng tuốc bin rushton thay cho bộ cánh khuấy kiểu hướng trục và xuyên tâm khuấy từ, trong bình bào chế.

Độ ổn định của chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được xác định dễ dàng bằng các kỹ thuật chuẩn, đã được biết rõ và thông dụng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, chế phẩm sinh miễn dịch được tiến hành thử nghiệm về phần trăm hấp phụ của thể liên hợp, tính ổn định, mức kết tập, mức sinh miễn dịch, mức tạo hạt, mức hao hụt protein (nồng độ), và thông số tương tự, bằng các phương pháp bao gồm, nhưng không hạn chế ở, phương pháp ELISA, phân tán ánh sáng, mật độ quang,

ly tâm theo tốc độ lắng, ly tâm cân bằng lắng đọng, lưỡng sắc mạch vòng (CD), thử nghiệm Lowry, thử nghiệm axit bixinchonic (BCA), và phương pháp tương tự.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp ELISA mới có thể định lượng trực tiếp polysaccarit liên hợp/gắn kết mà không ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của thể liên hợp trong vacxin chứa thể liên hợp phế cầu đa hóa trị. Phương pháp này có thể được sử dụng để định lượng hàm lượng thể liên hợp không hấp phụ trong nền chế phẩm là một thông số chỉ báo cho phần trăm hấp phụ trong đó thể liên hợp thể hiện sự hấp phụ nhiều hơn 70%. Tốt hơn là, phương pháp ELISA này có thể sử dụng một bước trước thử nghiệm bao gồm giải hấp phụ thể liên hợp từ tá dược phèn mà không ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của chất mang protein cũng như polysaccarit liên hợp. Cụ thể hơn, việc hòa tan thể liên hợp được hấp phụ trên phèn đạt được bằng cách sử dụng natri hydroxit và axit xitric.

Chất mang protein có thể được chọn từ nhóm bao gồm nhưng không hạn chế ở CRM197, P4, biến độc tố bạch hầu, biến độc tố uốn ván, mảnh C của biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà, protein D của *H. influenza*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, và ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*, phức c của màng ngoài (OMPC), porin, protein gắn kết transferin, pneumolysin (là một chất phá hủy tế bào nội mô phổi), protein A bề mặt phế cầu (PspA), adhesin A bề mặt phế cầu (PsaA), PhtD phế cầu khuẩn, protein bề mặt phế cầu BVH-3 và BVH-11, kháng nguyên bảo vệ (PA) của *Bacillus anthracis* và yếu tố gây phù (EF) và yếu tố gây chết (LF) đã giải độc tố của *Bacillus anthracis*, ovalbumin, KLH-Keykey limpet hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin), albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò (BSA) và dẫn xuất protein tinh chế của tuberculin (PPD), cụ thể là CRM197 hoặc P4.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm đa hóa trị có thể bao gồm

- i) ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccarit protein có TT là chất mang protein; hoặc
- ii) ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccarit protein có DT là chất mang protein; hoặc
- iii) ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccarit protein có adhesin A bề mặt phế cầu (PsaA) là chất mang protein; hoặc

iv) ít nhất một thể liên hợp polysaccharit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có TT là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có DT là chất mang protein; hoặc

v) ít nhất một thể liên hợp polysaccharit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có TT là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có adhesin A bề mặt phế cầu(PsaA) là chất mang protein; hoặc

vi) ít nhất một thể liên hợp polysaccharit protein có CRM197 là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có DT là chất mang protein, ít nhất một polysaccharit protein có adhesin A bề mặt phế cầu (PsaA) là chất mang protein.

Theo phương án khác, chất mang protein ưu tiên được liên hợp với typ huyết thanh 3 là CRM-197, typ huyết thanh 4 là TT hoặc DT và typ huyết thanh 18C là CRM197.

Phương án khác của sáng chế bao gồm sử dụng PsaA làm chất mang protein trong thành phẩm. PsaA cũng có thể được sử dụng trong thành phẩm làm tá dược.

Theo một số phương án, chế phẩm đa hóa trị của sáng chế có thể bao gồm chất hoạt động bề mặt tốt hơn là polysorbat 20. Theo một số phương án, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,01% đến 10% trọng lượng/thể tích của chế phẩm. Theo phương án khác nữa, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm là 0,01% trọng lượng/thể tích của chế phẩm. Theo phương án khác, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm là 0,05% trọng lượng/thể tích của chế phẩm. Theo phương án khác nữa, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm là 0,1% trọng lượng/thể tích của chế phẩm. Theo phương án khác, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm là 1,0% trọng lượng/thể tích của chế phẩm. Theo phương án khác nữa, nồng độ cuối cùng của polysorbat 20 trong chế phẩm là 10,0% polysorbat 20 trọng lượng/thể tích của chế phẩm.

Chế phẩm vaccin đa hóa trị theo sáng chế có thể bao gồm chất bảo quản được chọn từ nhóm bao gồm nhưng không hạn chế ở chất bảo quản có thủy ngân (ví dụ, thimerosal), 2-phenoxy-ethanol, methyl paraben, propyl paraben và rượu benzylic (hoặc hỗn hợp của chúng).

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein phẩy cầu đa hóa trị, tốt hơn là có 10 hoặc 16 hóa trị có thể bao gồm thể liên hợp hấp phụ nhôm phosphat, histidin, axit succinic, natri clorua, Polysorbat 20 và thiomersal.

Việc bào chế vacxin theo sáng chế có thể bao gồm bước bổ sung tá dược muối nhôm với lượng 20-375 μ g, 20-300 μ g, 20-200 μ g, 25-150 μ g Al+++ trên mỗi liều 0,5ml.

Đặc trưng, chế phẩm sinh miễn dịch được bào chế là thuốc tiêm được, hoặc là dung dịch lỏng hoặc huyền phù; các dạng rắn thích hợp cho hòa tan trong, hoặc tạo huyền phù trong tá dược lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế. Việc bào chế có thể là nhũ hóa hoặc bao nang trong liposom để tăng cường hiệu quả tá dược. Đường dùng phân phối trực tiếp chế phẩm này thường sẽ là ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, tiêm, dưới da, trong màng bụng, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ hoặc phân phối đến khoang kẽ của mô). Chế phẩm cũng có thể được sử dụng vào chỗ bị thương. Các kiểu đường dùng khác bao gồm đường miệng và tại phổi, thuốc đạn, và dụng cụ tiêm qua da hoặc xuyên qua da - kim, và hypospray (phun thuốc dạng khô lên da để hấp thụ). Chế độ liều có thể là liệu trình một liều hoặc nhiều liều (ví dụ, bao gồm các liều tăng cường).

Tốt hơn là, vacxin theo sáng chế có thể được bảo quản trong dung dịch hoặc làm đông khô, trong đó chế phẩm vacxin đông khô theo sáng chế có thể đưa ra dưới dạng chế phẩm 1, 5 hoặc 10 liều với chất pha loãng chứa nhôm phosphat gel và NaCl.

Phương án khác của sáng chế bao gồm việc sử dụng bộ cánh khuấy cánh bằng tuốc bin rushton trong bình bào chế (Fig.5).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Bước lên men

Phương pháp này bao gồm (a) cung cấp nguyên liệu cấy của chủng vi khuẩn biểu hiện CP; (b) nuôi cấy chủng này bằng cách lên men ở độ pH = 7,2, trong đó tốc độ bổ sung môi trường là bằng với tốc độ bổ sung hỗn hợp kiềm để duy trì độ pH đã chọn; c) lên men môi trường nuôi cấy ở 35-38°C trong điều kiện khuấy ở 50-150 vòng/phút với tốc độ dòng khí là 0-0,5vvm.

Ví dụ 2: Bước tinh chế polysaccarit nang

Tinh chế polysaccarit nang typ huyết thanh 19F của *S. pneumoniae* (HIC sau đó IEC)

5L môi trường đã làm trong từ môi trường đã lên men chứa typ huyết thanh 19F của *S. pneumoniae* được cô đặc và thẩm lọc đến 500ml bằng cách sử dụng màng 100 KDa MWCO. Bước thẩm lọc được thực hiện bằng cách sử dụng đệm natri phosphat 25mM ở độ pH trung tính sau đó thẩm lọc với nước để tiêm (WFI).

Nucleaza được bổ sung vào dung dịch polysaccarit để đạt được nồng độ cuối cùng là dung dịch 8 U/ml. Việc xử lý enzym được tiến hành ở 37°C, trong 10 ± 2 giờ kèm khuấy.

Amoni sulphat được bổ sung vào dung dịch polysaccarit đã xử lý với nucleaza đến độ bão hòa 50% và ủ ở 2 – 8°C trong 12 ± 2 giờ (ngoại trừ typ huyết thanh 5 và 4). Hỗn hợp được đưa vào ly tâm. Hạt bi (hạt kết tủa) được loại bỏ. Dung dịch này (~500ml) được đưa vào bước thẩm lọc 100kD sử dụng NaCl sau đó là WFI lạnh. Dung dịch đã thẩm lọc chứa polysaccarit với đệm và nồng độ muối cao được nạp lên cột HIC.

Cột sắc ký tương tác kỵ nước (300ml) được cân bằng bằng 50% đệm amoni sulphat bão hòa và dung dịch polysaccarit (500 ml) sau đó được nạp lên trên cột với độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn là ở độ pH từ 6 đến 7. Cột này được rửa thêm với đệm chứa 50% amoni sulphat bão hòa. Trong các điều kiện trên, polysaccarit được thu hồi trong dòng dung dịch chảy qua và dung dịch rửa cân bằng từ cột này.

Dung dịch polysaccarit sau đó được cô bằng phễu lọc 100KDa MWCO và sau đó thẩm lọc với NaCl và nước pha tiêm (WFI).

Cột sắc ký trao đổi ion (300ml) (vật trao đổi anion mạnh) được cân bằng bằng đệm natri phosphat 20mM và dung dịch polysaccarit (500ml) sau đó được nạp lên trên cột này ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn là ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5. Cột này được rửa thêm bằng đệm. Polysaccarit đã hấp phụ được rửa giải bằng cách rửa giải theo bước gradient sử dụng 1,0M NaCl (polysaccarit khác nhau được rửa giải ở các cường độ ion khác nhau với NaCl).

Dung dịch polysaccarit sau đó được cô bằng cách sử dụng phễu lọc 100KDa MWCO và sau đó rửa giải với nước pha tiêm (WFI).

Dung dịch polysaccarit đã thẩm lọc được lọc qua phễu lọc màng 0,22 μ vào trong các chai polypropylen. Polysaccarit tinh khiết được bảo quản đông lạnh ở $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Quy trình trên cũng được áp dụng với typ huyết thanh 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F, & 23F.

Kết quả:

Sắc ký sau trao đổi ion và sau HIC của C-Polysaccarit được đánh giá bằng phổ NMR H1/P31. Quy trình này làm giảm 2-3 lần hàm lượng tạp chất.

Ví dụ 3: Bước định cỡ polysaccarit

Thiết bị đồng nhất (Microfluidics) được sử dụng để làm giảm trọng lượng phân tử của polysaccarit trước bước hoạt hóa. Việc giảm kích thước của 19A được thực hiện ở điều kiện 24-28 KPSI, trong đó việc giảm kích thước của 19F được thực hiện ở điều kiện 26-30 KPSI trong đó số lần chuyển là từ 1 đến 3 lần. Polysaccarit đã giảm kích thước được thẩm lọc và cô sau khi lọc cỡ 0,22 μ , lọc. Polysaccarit đã định cỡ sau đó được đưa đến kỹ thuật HPSEC-RI để đánh giá trọng lượng phân tử trung bình.

Ví dụ 4: Quy trình liên hợp tổng quát

Việc liên hợp polysaccarit với chất mang protein được tiến hành bằng phương pháp liên hợp CDAP của Lees và đồng nghiệp (Vaccine 26: 190-198, 1996). Polysaccarit đã giảm kích thước bằng cơ học (ngoại trừ đối với 6A được sử dụng ở dạng tự nhiên hoặc định cỡ phụ thuộc vào kích thước của 6A) được hòa tan trong NaCl 2M. CDAP (trong axetonitril) từ dung dịch gốc 100mg/ml được bổ sung vào dung dịch polysaccarit theo tỷ lệ polysaccarit:CDAP. Khoảng 1 phút sau, NaOH 2M được bổ sung để thu được độ pH hoạt hóa cụ thể. Việc hoạt hóa polysaccarit được thực hiện ở độ pH này trong 4-10 phút ở 22°C . CRM-197 (lượng phụ thuộc vào tỷ lệ Ps/Protein ban đầu) được bổ sung vào polysaccarit đã hoạt hóa và phản ứng kết hợp được thực hiện ở độ pH cụ thể trong 3-8 giờ phụ thuộc vào typ huyết thanh. Phản ứng này sau đó được dừng bằng glyxin trong 1 giờ ở 22°C , và qua đêm ở 12°C . Thể liên hợp sau đó được tinh chế bằng phương pháp thẩm lọc từ 300kDa đến 500kDa sau đó thẩm lọc 100kDa. Ngoài ra, hàm lượng polysaccarit và protein của thể liên hợp đã lọc 0,22 μm tinh chế được xác định.

Bảng 1. Các biến số thông số của phản ứng liên hợp đặc hiệu theo typ huyết thanh của 10 typ huyết thanh:

Chi tiết liên hợp của 10 typ huyết thanh										
Đặc điểm	Điều kiện xử lý của các typ huyết thanh khác nhau									
	1	5	6A	6B	7F	9V	14	19A	19F	23F
Nồng độ Ps (mg/ml)	4,5	5	5	11	10	8	10	9,5	9,5	9
Ps hòa tan	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Thời gian hoạt hóa (phút)	4	4	4	4	4	4	4	4	10	4
Tỷ lệ Ps/CDAP	1:1,25	1:1	1:1	1:1,15	1:1,25	1:1,2	1:1,1	1:1	1:0,8	1:1,1
Nồng độ CRM 197 (mg/ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Tỷ lệ Ps/CRM	0,82	0,75	1,05	0,77	0,85	0,87	0,82	0,86	0,96	0,71
pH ^a :pH ^c :pH ^q	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	09:09:09	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5
Ps tự do (%)	< 1	6,3	2,63	1,57	< 1	ND	2,53	1,5	1,07	2,59
Protein tự do (%)	ND	1,54	2,2	ND	ND	ND	ND	ND	2,2	ND
Phân bố kích thước Mol (%)	70,56	74,93	67,67	76,52	75,68	72,75	76,59	78,1	74,35	72,91

Bảng 2: So sánh phần trăm hấp phụ của các typ huyết thanh cụ thể của chế phẩm PCV-10 trong phương pháp bào chế một mẻ và hai mẻ.

Số thứ tự	Typ huyết thanh của chế phẩm PCV-10	Phương pháp một mẻ (tất cả các kháng nguyên cùng nhau) % hấp phụ	Phương pháp hai mẻ (Mẻ A và B) % hấp phụ
-----------	-------------------------------------	--	--

		Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2	Thử nghiệm 3	Thử nghiệm 4	Thử nghiệm 5	Thử nghiệm 6
1	Typ huyết thanh 1	90	85	92	>99	>99	97
2	Typ huyết thanh 5	84	82	85	90	88	97
3	Typ huyết thanh 6A	67	51	61	77	71	93
4	Typ huyết thanh 6B	82	72	83	84	80	86
5	Typ huyết thanh 7F	83	77	81	87	86	84
6	Typ huyết thanh 9V	67	43	74	89	85	85
7	Typ huyết thanh 14	86	83	88	92	91	90
8	Typ huyết thanh 19A	95	92	97	95	93	85
9	Typ huyết thanh 19F	91	87	93	91	88	75
10	Typ huyết thanh 23F	56	52	58	84	81	81

Trong phương pháp một mẻ, các typ huyết thanh 6A, 9V, và 23F được hấp phụ kém trong chế phẩm, trong khi đó đối với phương pháp hai mẻ, phần trăm hấp phụ là >70% đối với tất cả các typ huyết thanh.

Bảng 3: Hiệu quả của sự chuyển dịch độ pH lên phản ứng kết tập của chế phẩm PCV-10

	Mô tả chế phẩm	% số ống bị loại do hạt kết tụ (hạt/thể keo tụ màu trắng)
--	----------------	--

Số thứ tự		Thử nghiệm -7	Thử nghiệm-8	Thử nghiệm-9
1	Chế phẩm PCV-10 không có ‘chuyển dịch độ pH’	10%	4%	6%
2	Chế phẩm PCV-10 có ‘chuyển dịch độ pH’ từ giá trị 6,8 đến khoảng độ pH 5,6-5,8	Thử nghiệm-10	Thử nghiệm-11	Thử nghiệm-12
		Không kết tụ (không có sản phẩm bị loại khi sàng lọc)	Không kết tụ (không có sản phẩm bị loại khi sàng lọc)	Không kết tụ (không có sản phẩm bị loại khi sàng lọc)

Không tìm thấy hạt kết tụ với khoảng pH là 5,6-5,8 đối với chế phẩm PCV10 khi so sánh với độ pH= 6,8.

Tỷ lệ polysaccarit với protein (1:1) được thấy là có hiệu quả thuận lợi lên hàm lượng hấp phụ thể liên hợp Pneumococcal trong chế phẩm.

Bảng 4: Hiệu quả của tỷ lệ Ps với CRM₁₉₇ đối với sự hấp phụ của thể liên hợp phế cầu (typ huyết thanh 6A) trong chế phẩm

Số thứ tự	Thể liên hợp phế cầu typ huyết thanh 6A lượng lớn	Tỷ lệ Ps với Protein	Hấp phụ (%)
1	ZPN6ACP1201	1,95	34
2	ZPN6ACP1203	1,51	42
3	ZPN6ACP1204-A	1,32	87
4	ZPN6ACP1204-B	1,15	95
5	ZPN6ACP1205	1,09	86

Quan sát thấy hiệu quả của tỷ lệ polysaccarit với protein đối với sự hấp phụ thể liên hợp. Thể liên hợp 6A có tỷ lệ Ps với protein là >1,5 thể hiện sự hấp phụ kém. Hầu

hết typ huyết thanh sử dụng trong chế phẩm PCV-10 chứa tỷ lệ Ps: Pr nằm trong khoảng từ 0,6-1,3 mang lại sự hấp phụ tối ưu của các typ huyết thanh khác nhau bao gồm typ huyết thanh 6A. Dựa trên số liệu hấp phụ thu được đối với typ huyết thanh 6A và thử nghiệm chế phẩm PCV-10, trong khi bào chế hóa trị 16, có thể suy luận rằng tỷ lệ Ps:Pr của 6 thể liên hợp còn lại trong khoảng tương tự có thể đảm bảo sự hấp phụ không đổi cho toàn bộ 16 thể liên hợp typ huyết thanh.

Bảng 5: Tiêu chuẩn kỹ thuật của bộ cánh khuấy bằng tuốc bin rushton cho các bình khác nhau

Thể tích hình học (L)	14
Thể tích hoạt động (L)	10,0
Đường kính cánh (mm)	74,7
Chiều cao cánh (mm)	17,3
Số cánh	6
Tốc độ kiểm soát khuấy (vòng/phút)	50-500
Tốc độ ở chu vi (m/s)	0,19-1,95

Ví dụ 6: Quy trình ELISA

Hàm lượng kháng nguyên và phần trăm hấp phụ được xác định bằng phương pháp ELISA kẹp điều chỉnh.

Thử nghiệm ELISA kẹp thông thường được điều chỉnh với các điều kiện thử nghiệm/điều kiện thí nghiệm sau và do đó có các thuộc tính thuận lợi sau:

- i. định lượng Polysaccarit liên hợp trong sự có mặt của 9 kháng nguyên liên hợp khác trong vacxin hóa trị 10
- ii. rửa giải tất cả 10 thể liên hợp ra khỏi gel nhôm phosphat trong đó mức hấp phụ là lớn hơn 80%
- iii. trong đó bắt giữ thể liên hợp xảy ra thậm chí nếu ở độ pH = 9 mà không phá hỏng tính kháng nguyên của thể liên hợp

Hàm lượng kháng nguyên và phần trăm hấp phụ được xác định bằng ELISA theo quy trình nêu sau đây:

Ngày 1

1. Các đĩa được bao phủ bằng kháng thể bắt giữ (kháng thể kháng-chất mang protein) sau đó ủ trong 0,5- 2 giờ ở $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$
2. các đĩa được rửa 3-6 lần bằng máy rửa đĩa ELISA
3. các đĩa được chặn bởi đệm phong bế (3% BSA trong 1X PBS và đệm tris cho typ huyết thanh 14 và 9V) sau đó ủ trong 1,5 – 2,5 giờ ở $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$
4. các đĩa được rửa 3 lần bằng máy rửa đĩa ELISA
5. các mẫu được bổ sung vào các đĩa
6. các đĩa được ủ qua đêm ở $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Ngày 2

1. Các đĩa được để đạt đến nhiệt độ phòng
2. kháng thể sơ cấp được bổ sung vào sau khi rửa các đĩa 3 lần sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút sau đó rửa.
3. kháng thể thứ cấp được bổ sung vào và sau đó ủ ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút.
4. cơ chất TMB được bổ sung vào sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 15-20 phút trong bóng tối
5. bổ sung dung dịch dừng
6. các đĩa được đọc ở bước sóng 450nm.

Quy trình hòa tan mẫu mà không ảnh hưởng có hại đến epitop của chất mang protein

Lượng thích hợp NaOH 0,5M- 2M được bổ sung vào 2ml mẫu vacxin. Mẫu này được đưa vào lắc xoáy tròn nhẹ đến khi trong. Độ pH của dung dịch này được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 9-12 cho đến khi dung dịch này trong. Độ pH của dung dịch này được đưa trở lại giá trị 6-7,4 bằng axit xitric 0,5M đến 2M. Dung dịch này được đưa vào ly tâm (các mẫu hòa tan) ở mức 3000 đến 6000 x g trong 5 phút và phần chất nổi được thu thập để thử nghiệm.

Bảng 6

Typ huyết thanh	Mê 1	Mê 2
-----------------	------	------

	Hàm lượng µg/ml	% hấp phụ	Hàm lượng µg/ml	% hấp phụ
Typ huyết thanh 1	3,87	89	4,66	99,4
Typ huyết thanh 5	3,57	83	4,03	90,8
Typ huyết thanh 6A	3,39	83	4,6	68,3
Typ huyết thanh 6B	8,01	80	6,8	85
Typ huyết thanh 7F	4,72	97	4,18	84,4
Typ huyết thanh 9V	4,61	80	3,95	70,4
Typ huyết thanh 14	5,11	94	5,06	92,5
Typ huyết thanh 19A	4,42	94	3,65	91,8
Typ huyết thanh 19F	4,35	82	4,14	81,4
Typ huyết thanh 23F	3,66	72	4,03	75

Ví dụ 7: Vacxin liên hợp phế cầu khuẩn - hóa trị 10 (PCV10)

Bảng 7: Chế phẩm PCV10

Số thứ tự	Tên của thành phần	Lượng/liều (0,5ml)
1	Polysaccarit typ huyết thanh 1, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 19A, 19F và 23F*	2µg mỗi loại
2	Polysaccarit typ huyết thanh 6B*	4µg
3	Nhôm phosphat Adju-Phos®	0,125mg là Al ⁺⁺⁺
4	Natri clorua	4,5mg
5	Axit succinic	1,18mg

6	Polysorbat-20	50µg
7	Thiomersal (chỉ đối với dạng nhiều liều)	25µg
8	L-histidin	1,55mg

* Thành phần hoạt tính được liên hợp với chất mang protein CRM197

Ví dụ 8: Chế phẩm 1 (PCV16)

Vacxin phế cầu khuẩn dạng liên hợp - hóa trị 16 (PCV16)

Bảng 8: Chế phẩm PCV16 “I”

Số thứ tự	Chế phẩm	Lượng/liều
Thành phần hoạt tính *		
1	Typ huyết thanh 1	2,0µg
2	Typ huyết thanh 2	2,0µg
3	Typ huyết thanh 3	2,0µg
4	Typ huyết thanh 4	2,0µg
5	Typ huyết thanh 5	2,0µg
6	Typ huyết thanh 6A	2,0µg
7	Typ huyết thanh 6B	4,0µg
8	Typ huyết thanh 7F	2,0µg
9	Typ huyết thanh 9V	2,0µg
10	Typ huyết thanh 12F	2,0µg

11	Typ huyết thanh 14	2,0 µg
12	Typ huyết thanh 15B	2,0µg
13	Typ huyết thanh 18C	2,0µg
14	Typ huyết thanh 19A	2,0µg
15	Typ huyết thanh 19F	2,0µg
16	Typ huyết thanh 23F	2,0µg
Thành phần không hoạt động		
17	Nhôm phosphat	NMT 1,25mg là Al ³⁺
18	Histidin	1,55mg
19	Chất mang protein	11,3 – 113,3µg
20	Axit succinic	1,18mg
21	Natri clorua	4,5mg
22	Polysorbat 20	50µg
23	Thiomersal**	25µg
24	Nước cất pha tiêm	lượng vừa đủ

* Thành phần hoạt tính của vaccin được liên hợp với ít nhất một chất mang protein được chọn từ CRM197, TT và DT.

** Chỉ bổ sung vào dạng nhiều liều

Ví dụ 9: Chế phẩm 1 (PCV16)

Bảng 9: Chế phẩm PCV16 “II”

Số thứ tự	Chế phẩm	Lượng/liều
-----------	----------	------------

Thành phần hoạt tính*		
1	Typ huyết thanh 1	2,0µg
2	Typ huyết thanh 2	2,0µg
3	Typ huyết thanh 3	2,0µg
4	Typ huyết thanh 4	2,0µg
5	Typ huyết thanh 5	2,0µg
6	Typ huyết thanh 6A	2,0µg
7	Typ huyết thanh 6B	4,0µg
8	Typ huyết thanh 7F	2,0µg
9	Typ huyết thanh 9V	2,0µg
10	Typ huyết thanh 12F	2,0µg
11	Typ huyết thanh 14	2,0µg
12	Typ huyết thanh 15B	2,0µg
13	Typ huyết thanh 18C	2,0µg
14	Typ huyết thanh 19A	2,0µg
15	Typ huyết thanh 19F	2,0µg
16	Typ huyết thanh 23F	2,0µg
Thành phần không hoạt động		
17	Nhôm phosphat	NMT 1,25mg là Al ³⁺
18	Histidin	1,55mg

19	Chất mang protein	11,3 – 113,3µg
20	Axit succinic	1,18mg
21	Natri clorua	4,5mg
22	Polysorbat 20	50µg
23	2-Phenoxy Etanol**	10mg
24	Nước cất pha tiêm	Lượng vừa đủ

** Thành phần hoạt tính của vacxin được liên hợp với ít nhất một chất mang protein được chọn từ CRM197, TT và DT.*

*** Chỉ bổ sung vào dạng nhiều liều*

Ví dụ 10:

I) Sự phân hủy của các PnP đã định cỡ (19A, 19F, 6A và 6B) trong sự có mặt của DMAP:

Các PnP định cỡ trong dung dịch phản ứng được xử lý với DMAP với tỷ lệ 1:1,5 và kiểm tra profin phân hủy của nó bằng kỹ thuật SEC-HP-RI.

Kết quả:

Quan sát thấy rằng chỉ các PnP typ 19A trải qua sự phân hủy trong sự có mặt của DMAP trong đó phosphodiester khác chứa các PnP (typ 19F, 6A & 6B) vẫn còn nguyên vẹn. Xem Fig.1 (không có DMAP) & 2 thể hiện mức phân hủy do DMAP của PnP.

Để giảm thiểu mức phân hủy của typ 19A này, các PnP đã hoạt hóa được đưa vào thẩm lọc 10KDa sử dụng NaCl 2M để loại DMAP tạo thành từ dung dịch phản ứng trước khi liên hợp với CRM₁₉₇.

II) Sự phân hủy và sự kết tập của các PnP đã định cỡ (typ 19A, 19F, 6A và 6B) trong sự có mặt của CDAP:

Các PnP đã định cỡ trong dung dịch phản ứng được xử lý với CDAP với tỷ lệ 1:1,5 trong quá trình hoạt hóa. Quan sát thấy rằng 50% DMAP được tạo ra là sản phẩm phụ (được đo bởi RP-HPLC) dẫn đến sự phân hủy PnP cũng như gây kết tập giữa các PnP đã hoạt hóa sau thời gian hoạt hóa nhất định (Xem Bảng 2). Mức phân hủy và mức

kết tập được kiểm tra bằng profin SEC-HP-RI. Xem Fig.3A (không có CDAP), 3B, 3C & 3D (đối với 19A) & 4A (không có CDAP) 4B (đối với 19F) thể hiện mức kết tập & mức phân hủy do CDAP của các PnP.

Bảng 10: Các yếu tố có vai trò cho sự liên kết chéo polysaccarit-polysaccarit & mức kết tập

Tác động của “thời gian hoạt hóa CDAP” lên sự hình thành “hạt kết tụ polysaccarit-polysaccarit”

typ huyết thanh	Trọng lượng phân tử của các PnP định cỡ/biến đổi (KDa) [SEC-HP-RI]	PnP biến đổi được hoạt hóa (KDa) [SEC-HP-RI]	Tác động
6A	432	435	Không gây kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa
6B	131	131	Không gây kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa
19A	178	254 (sau 20 phút)	Kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa
		487 (sau 60 phút)	Kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa
		1173 (sau 120 phút)	Kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa
19F	157	205 (sau 30 phút)	Kết tập giữa các polysaccarit đã hoạt hóa

III) Ngăn chặn sự phân hủy và sự kết tập của các PnPs định cỡ (19A và 19F) có tỷ lệ PnP:CDAP là 1:1,5 bằng cách sử dụng kỹ thuật thẩm lọc:

Để giảm thiểu sự phân hủy và sự kết tập của 19A, các PnP đã hoạt hóa được đưa đến bước thẩm lọc 10KDa sử dụng NaCl 2M để loại DMAP tạo ra từ dung dịch phản ứng trước khi liên hợp với CRM₁₉₇. Xem Fig.3E (thể liên hợp không có 10KDa DF) & 3F (thể liên hợp có 10KDa DF) thể hiện profin SEC-HP-RI của thể liên hợp sử dụng các PnP đã hoạt hóa được thẩm lọc 10KDa và CRM₁₉₇. Tuy nhiên, bước thẩm lọc gây ảnh hưởng bất lợi đến hiệu suất tiếp hợp làm giảm 30%-40% hiệu suất tổng thể.

IV) Ngăn chặn sự phân hủy và sự kết tập của các PnPs định cỡ (19A và 19F) bằng cách làm giảm tỷ lệ PnP:CDAP xuống mức 1:1 (19A) và mức 1:0,8 (19F) mà không sử dụng bước thẩm lọc

Các PnP định cỡ trong dung dịch phản ứng được xử lý với CDAP lần lượt với tỷ lệ 1:1 và 1:0,8 đối với typ 19A và 19F và kiểm tra profin phân hủy và kết tập của nó bằng SEC-HP-RI.

Kết quả:

Quan sát thấy là các tỷ lệ P:CDAP điều chỉnh (1:1 đối với 19A và 1:0,8 đối với 19F) ngăn cản sự phân hủy và sự kết tập của cả PnP typ 19A và 19F. Xem Fig.3 (G & H đối với typ 19A) & Fig.4 (C & D đối với typ 19F). Một thuận lợi của việc sử dụng các tỷ lệ điều chỉnh này đó là tránh được bước thẩm lọc 10KDa do đó làm giảm thiểu mức hao hụt hiệu suất tổng thể.

Quan sát thấy là trong trường hợp typ huyết thanh 19A, khi “thời gian hoạt hóa CDAP” dài hơn 10 phút, nó gây ra liên kết chéo các polysaccarit đã hoạt hóa với các polysaccarit đã hoạt hóa sau đó dẫn đến sự hình thành “hạt kết tụ polysaccarit-polysaccarit”.

Ngoài ra, trong trường hợp typ huyết thanh 19F, khi “thời gian hoạt hóa CDAP” dài hơn 20 phút, nó gây ra liên kết chéo các polysaccarit đã hoạt hóa với các polysaccarit đã hoạt hóa sau đó dẫn đến sự hình thành “hạt kết tụ polysaccarit-polysaccarit”. Hơn nữa, thời gian của phản ứng liên hợp được thấy là dài hơn thời gian cần cho liên kết chéo các polysaccarit đã hoạt hóa với các polysaccarit đã hoạt hóa do đó gây hình thành hạt kết tụ. Xem Fig.3 & Fig.4.

Tuy nhiên, đối với các typ huyết thanh khác như 6APnP và 6BPnP, không quan sát thấy sự liên kết chéo.

Ví dụ 11:

Điều chế thể liên hợp: PnP19A & PnP19F

Việc liên hợp polysaccarit với chất mang protein được tiến hành bằng phương pháp liên hợp CDAP của Lees và cộng sự (Vaccine 26: 190-198, 1996) với các điều chỉnh sau:

i) Để điều chế thể liên hợp 19A, sử dụng tỷ lệ polysaccarit với CDAP là 1:1 ở 22°C với thời gian hoạt hóa là 4 phút và sử dụng tỷ lệ polysaccarit với protein là 1:1

ii) Để điều chế thể liên hợp 19F, sử dụng tỷ lệ polysaccarit với CDAP là 1:0,8 ở 22°C với thời gian hoạt hóa là từ 9 đến 10 phút và tỷ lệ polysaccarit với protein là 1:1 đối với typ 19F.

Bảng 11. So sánh kết quả liên hợp của typ 19A và 19F với “phương pháp liên hợp CDAP truyền thống” (Lô 1) và “phương pháp liên hợp cải tiến” (Lô 2)

I) Chi tiết phản ứng liên hợp				
Thể liên hợp	Thể liên hợp 19A		Thể liên hợp 19F	
Số mẻ	Lô 1	Lô 2	Lô 1	Lô 2
Nồng độ PnP (mg/ml)	9,5	9,5	9,5	9,5
PnPs hòa tan	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Thời gian hoạt hóa (phút)	4	4	4	9 đến 10
Tỷ lệ PnP/CDAP	1,0:1,5	1,0:1,0	1,0:1,5	1,0:0,8
Nồng độ CRM (mg/ml)	20	20	20	20
Tỷ lệ ban đầu P/CRM ₁₉₇	1,0:1,5	1,0:1,0	1,0:1,5	1,0:1,0
pH ^a :pH ^c :pH ^q	9,0:9,0:9,0	9,0:9,0:9,0	9,5:9,5:9,5 5	9,5:9,5:9,5

II) Đặc điểm thể liên hợp thu được				
Thể liên hợp	Thể liên hợp 19A		Thể liên hợp 19F	
Số mẻ	Lô 1	Lô 2	Lô 1	Lô 2
Tỷ lệ cuối cùng PnP/CRM ₁₉₇	0,53	0,86	0,52	0,96
CRM ₁₉₇ /PnP	1,88	1,16	1,92	1,04
PnP tự do (%)	1,9	1,5	1,7	1,07
CRM ₁₉₇ tự do (%)	ND	ND	ND	2,2
Kích thước phân tử trung bình SEC-HP-I)(KDa)	1081	853	994	847
Kích thước phân tử trung bình (UV/RI/MALS) (KDa)	8212	6012	6393	4773

Kết quả:

Quan sát thấy là tỷ lệ polysaccarit:CDAP biến đổi, thời gian hoạt hóa CDAP và tỷ lệ polysaccarit:protein ban đầu, được thấy là giảm thiểu sự phân hủy do 4-dimethylamino-pyridin của polysaccarit đã định cỡ trong quá trình hoạt hóa và cũng ngăn cản sự kết tập polysaccarit-polysaccarit sau đó, bằng cách đó cải thiện đặc điểm của thể liên hợp cuối cùng về mặt hàm lượng polysaccarit tự do.

Phương pháp liên hợp cải thiện để điều chế thể liên hợp 19A & 19F tạo ra thể liên hợp không thể hiện tín hiệu phosphomonoeste bất kỳ trong các proton thể liên hợp tương ứng (^3P Proton NMR), các proton này chỉ ra rằng phương pháp liên hợp điều chỉnh được thấy là có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự thủy phân của phản ứng liên hợp chéo polysaccarit.

Đối với nhiều phương án có thể áp dụng nguyên tắc của sáng chế, nên hiểu rằng các phương án minh họa chỉ là các ví dụ ưu tiên của sáng chế và không nên hiểu theo cách làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ. Các tác giả sáng chế cam kết rằng toàn bộ sáng chế nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vacxin chứa thể liên hợp polysaccarit-protein *Streptococcus pneumoniae* đa hóa trị ổn định chứa ít nhất 10 thể liên hợp polysaccarit protein *Streptococcus pneumoniae* tách biệt có polysaccarit được chọn từ các typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9A, 9V, 9F, 9N, 10A, 11 A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 38 và 45, trong đó ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có CRM197 làm chất mang protein, ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có độc tố uốn ván (TT) làm chất mang protein, và ít nhất một thể liên hợp polysaccarit protein có độc tố bạch hầu (DT) làm chất mang protein, trong đó các typ huyết thanh 6A, 9V và 23 F được hấp phụ riêng rẽ trên tá được nhôm, các typ huyết thanh được chọn từ 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, và 22F được trộn và hấp phụ vào tá được nhôm, và sự hấp phụ này nằm trong khoảng từ 75-99%, và trong đó chế phẩm này có đệm histidin-axit succinic trong nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa 10 thể liên hợp polysaccarit protein *Streptococcus pneumoniae* tách biệt có polysaccarit từ các typ huyết thanh 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F và 23F.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa 16 thể liên hợp polysaccarit protein *Streptococcus pneumoniae* tách biệt có polysaccarit từ các typ huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, và 23F, trong đó typ huyết thanh 3 được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 18C được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 4 được liên hợp với DT, typ huyết thanh 15B được liên hợp với TT.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó typ huyết thanh 3 được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 18C được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 4 được liên hợp với DT, typ huyết thanh 15B được liên hợp với TT và typ huyết thanh 22F được liên hợp với TT.
5. Chế phẩm theo điểm 1, tồn tại ở trạng thái đông khô, chứa thêm chất pha loãng chứa gel nhôm phosphat và NaCl.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa 17 thể liên hợp polysaccarit protein *Streptococcus pneumoniae* tách biệt có polysaccarit từ các typ huyết thanh 1, 2,

3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F và 23F, trong đó typ huyết thanh 3 được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 18C được liên hợp với CRM197, typ huyết thanh 4 được liên hợp với DT, typ huyết thanh 15B được liên hợp với TT và typ huyết thanh 22F được liên hợp với TT.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó thể liên hợp typ huyết thanh 6A *Streptococcus pneumoniae* -CRM197 thể hiện tính miễn dịch gia tăng khi có mặt trong chế phẩm hóa trị 16 hoặc hóa trị 17.

8. Chế phẩm vacxin liên hợp polysaccharit-protein *Streptococcus pneumoniae* đa hóa trị ổn định chứa 10 thể liên hợp polysaccharit protein *Streptococcus pneumoniae* tách biệt có polysaccharit từ các typ huyết thanh 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F, và 23F trong đó các polysaccharit được liên hợp với CRM197 làm chất mang protein, trong đó typ huyết thanh 6A, 9V và 23F được hấp phụ riêng rẽ trên tá dược nhôm, các typ huyết thanh được chọn từ 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A, và 19F được trộn và được hấp phụ vào tá dược nhôm, và độ hấp phụ nằm trong khoảng từ 75-99%, và trong đó chế phẩm này có đệm histidin-axit succinic trong nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.

Fig.1

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.881	36050010	178357	124375	143887	100,00	1,434025

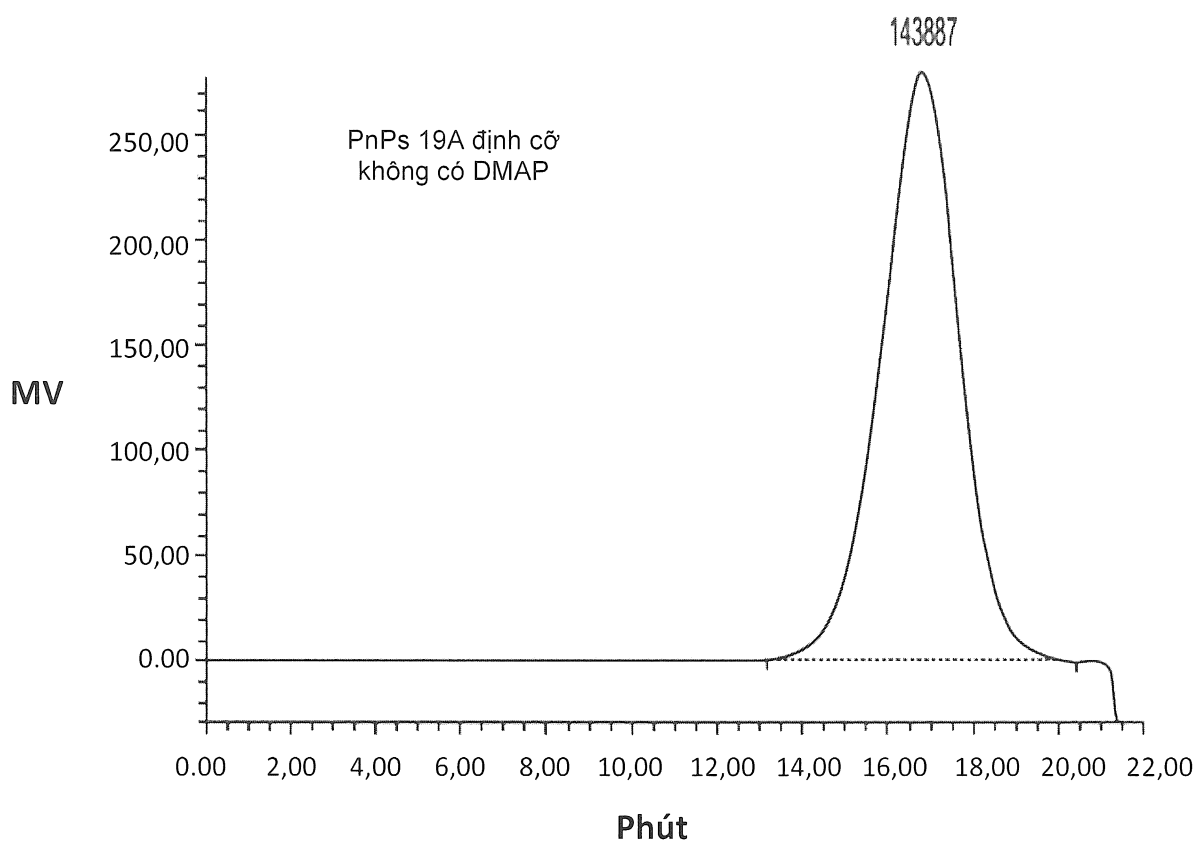


Fig.2A

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Điện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 8	18.120	16821344	69941	37105	61650	100,00	1,884959

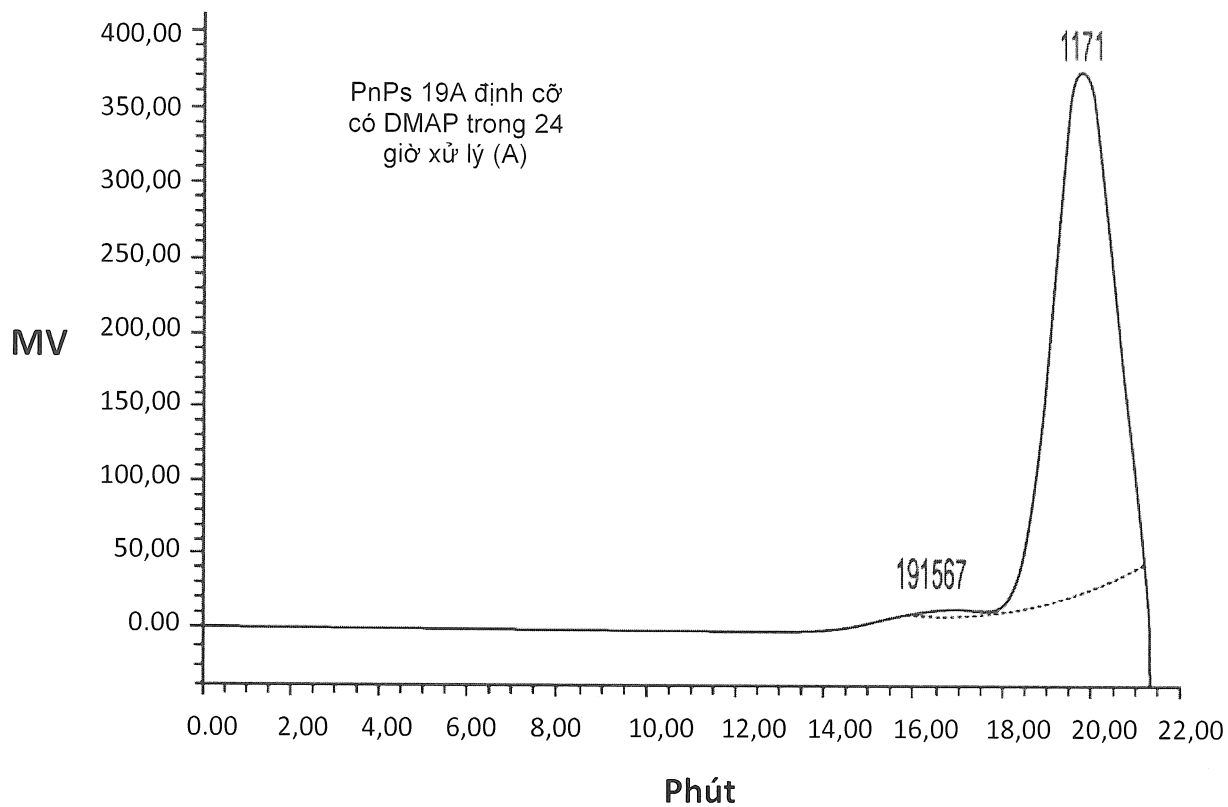


Fig.2B

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Dải rộng	16.417	561317	224030	194108	191587	1,62	1,154181
2	Đỉnh 9	19.875	34140780	14487	9007	11712	98,38	1,606378

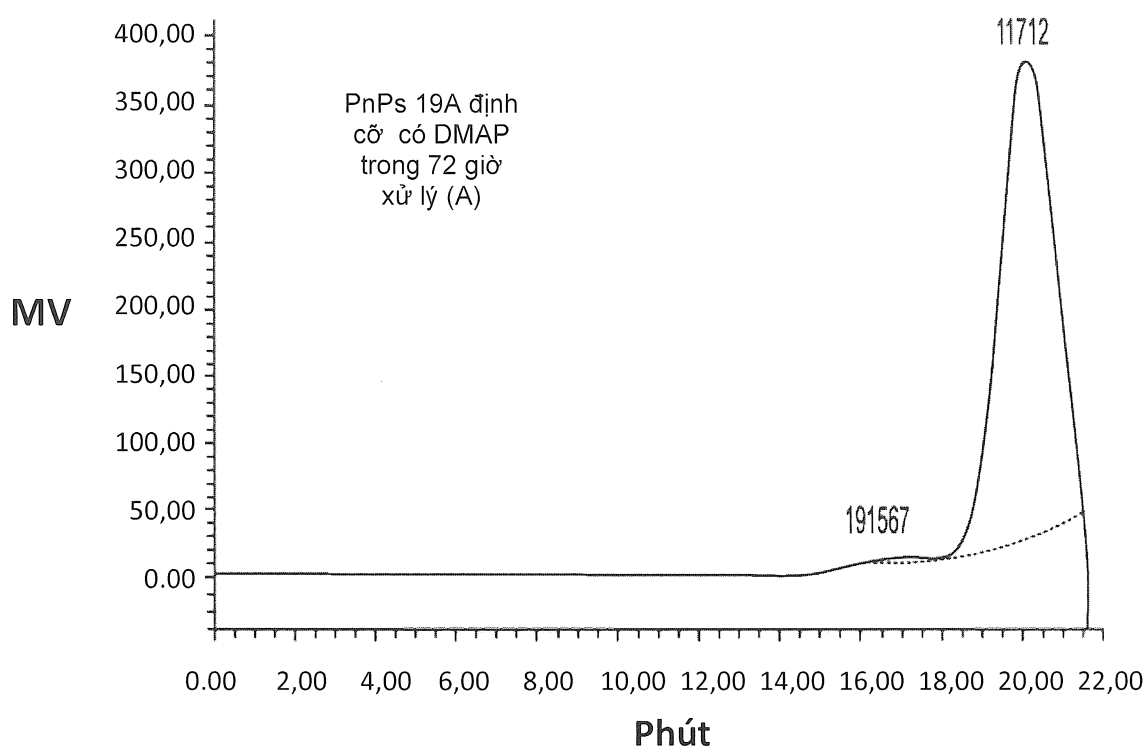


Fig.3A

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.881	36050010	178357	124375	143887	100,00	1,434025

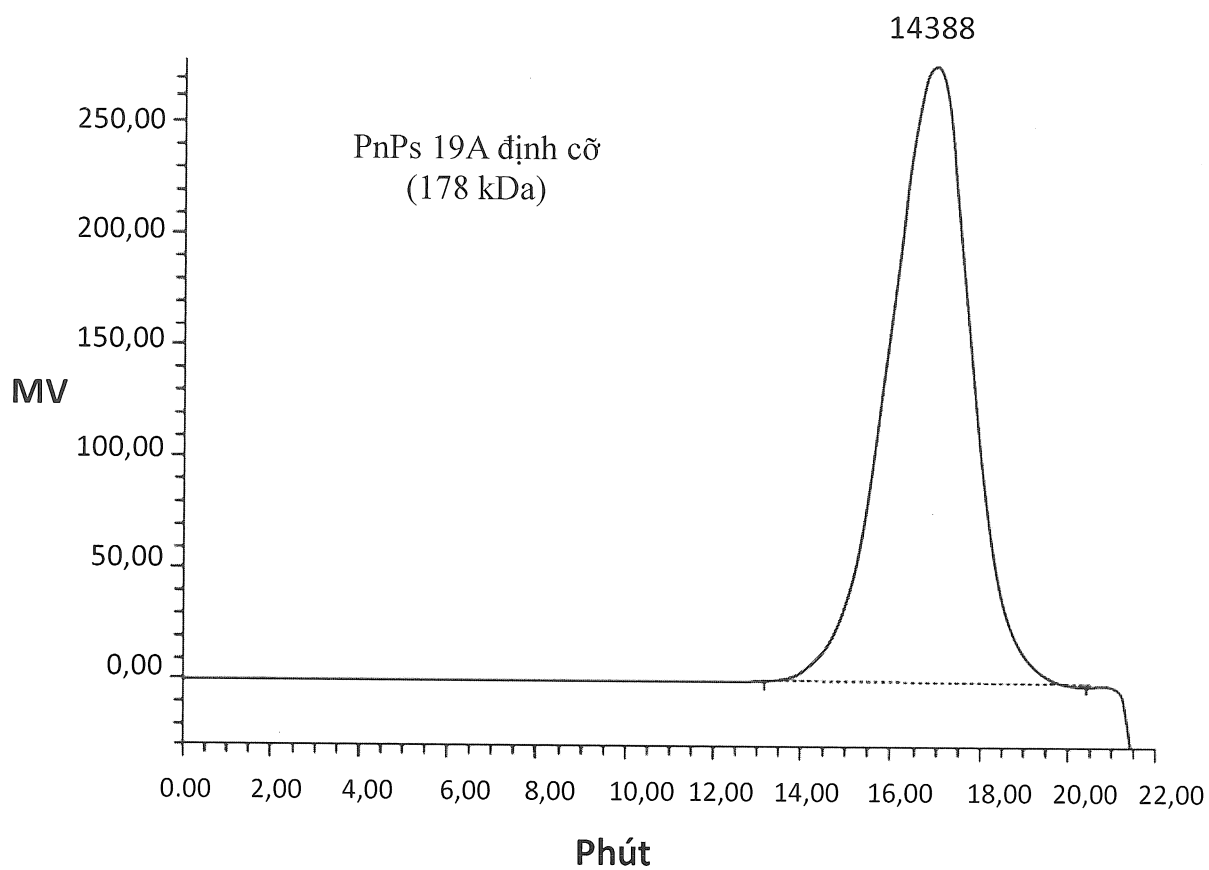


Fig.3B

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	17.144	16882446	254221	114791	121766	100,00	2,214838

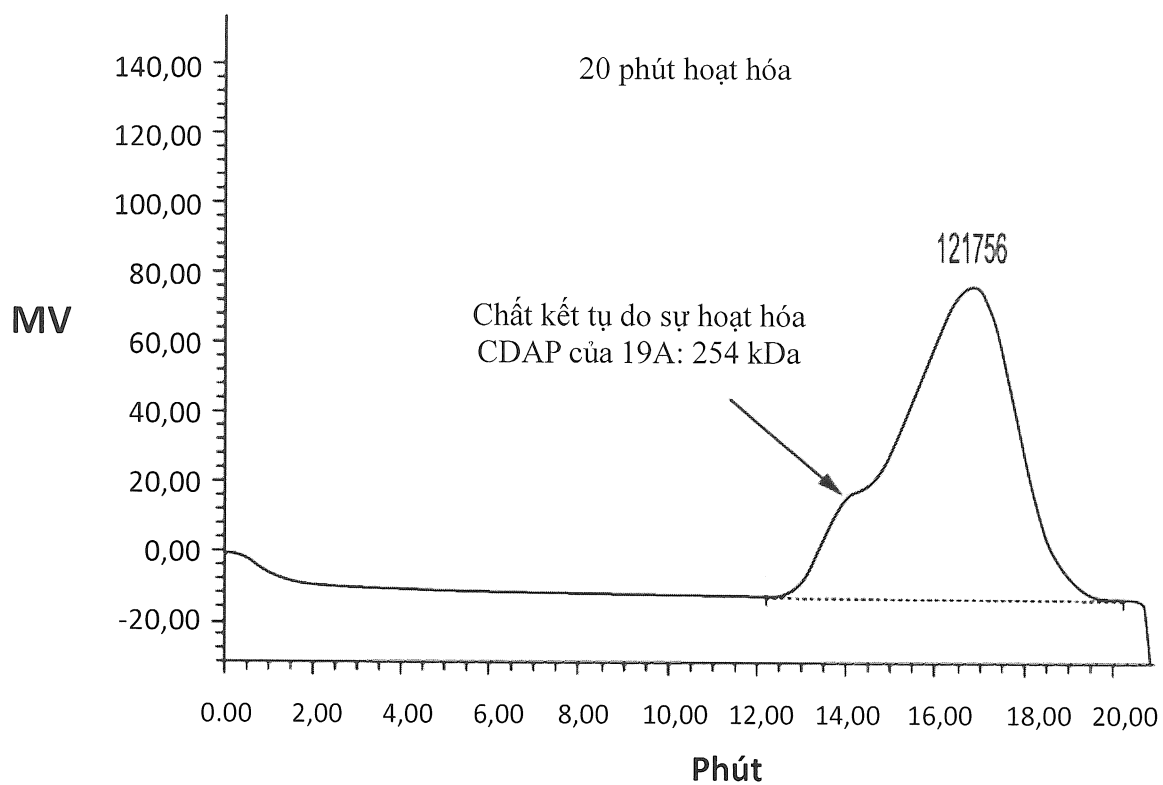
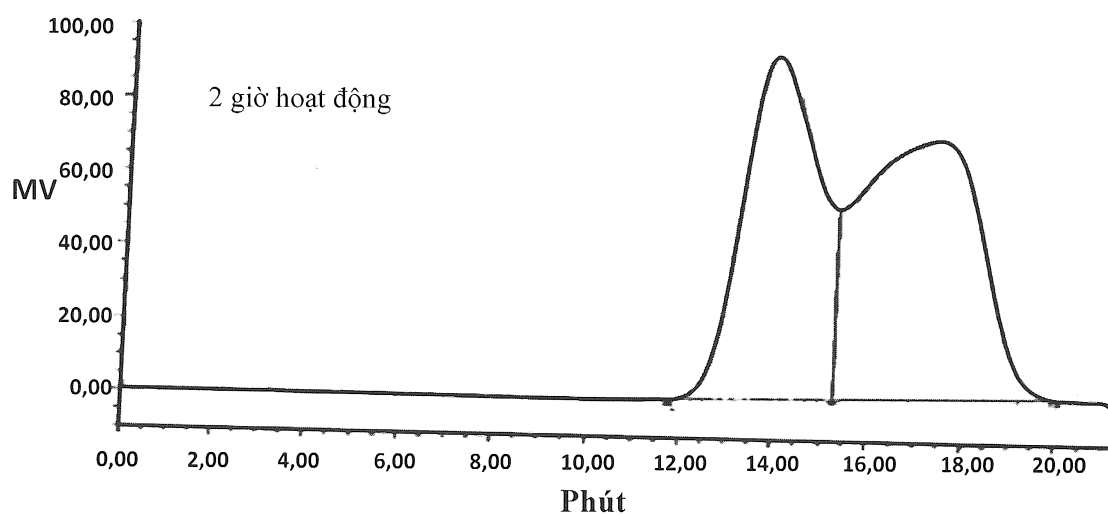
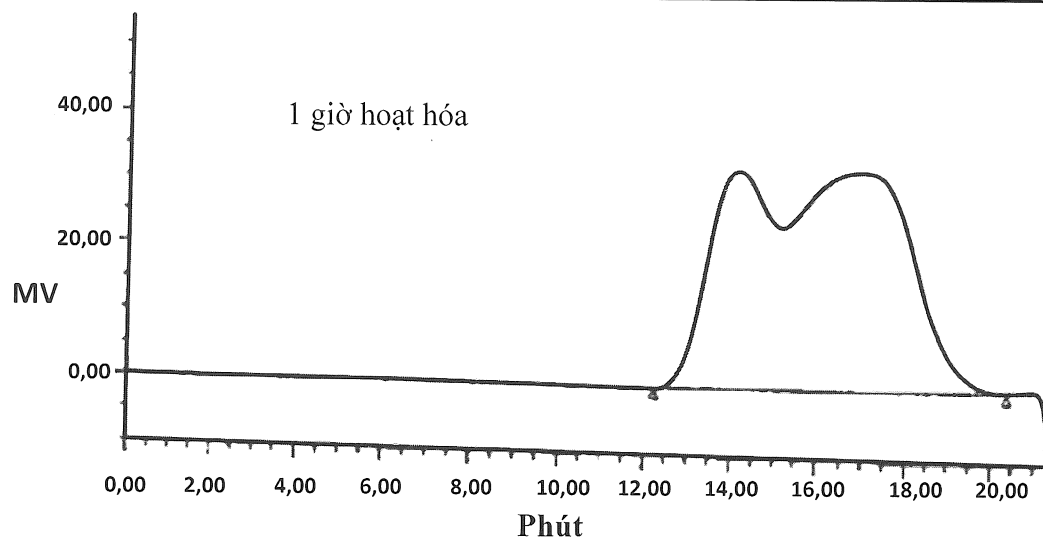


Fig.3C & 3D

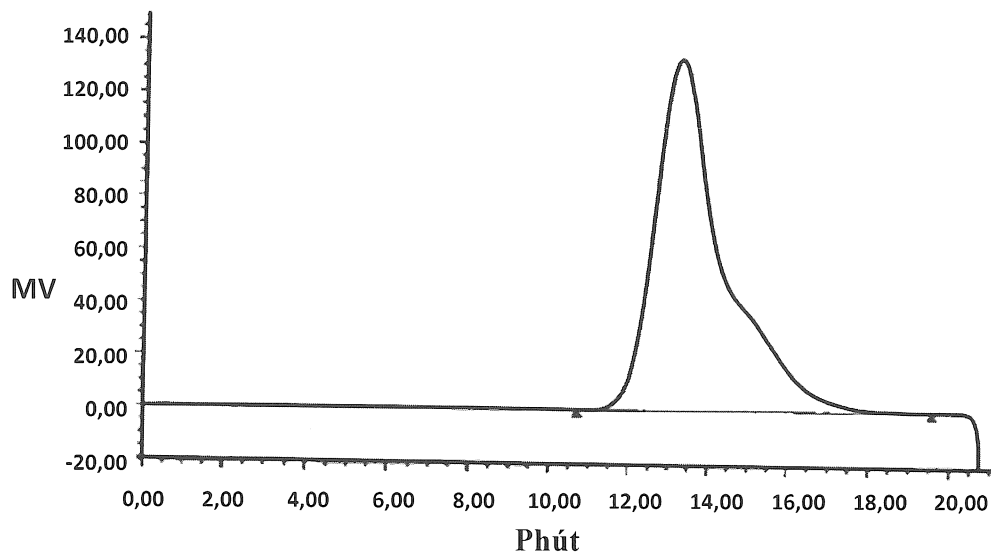
	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Dải rộng	14.123	9442789	487267	172206	941445	100,00	2,829559



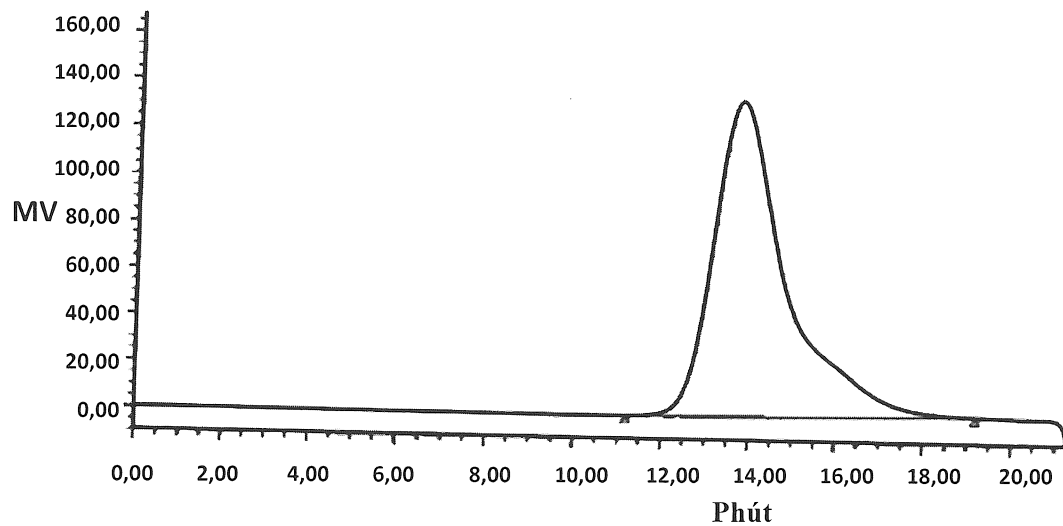
	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Dải rộng	13.860	10289208	1173521	911209	1150119	44,70	1,287873
2	Đỉnh 4	17.373	12731305	173846	114964	117250	55,30	1,612173

35311

Fig.3E & 3F



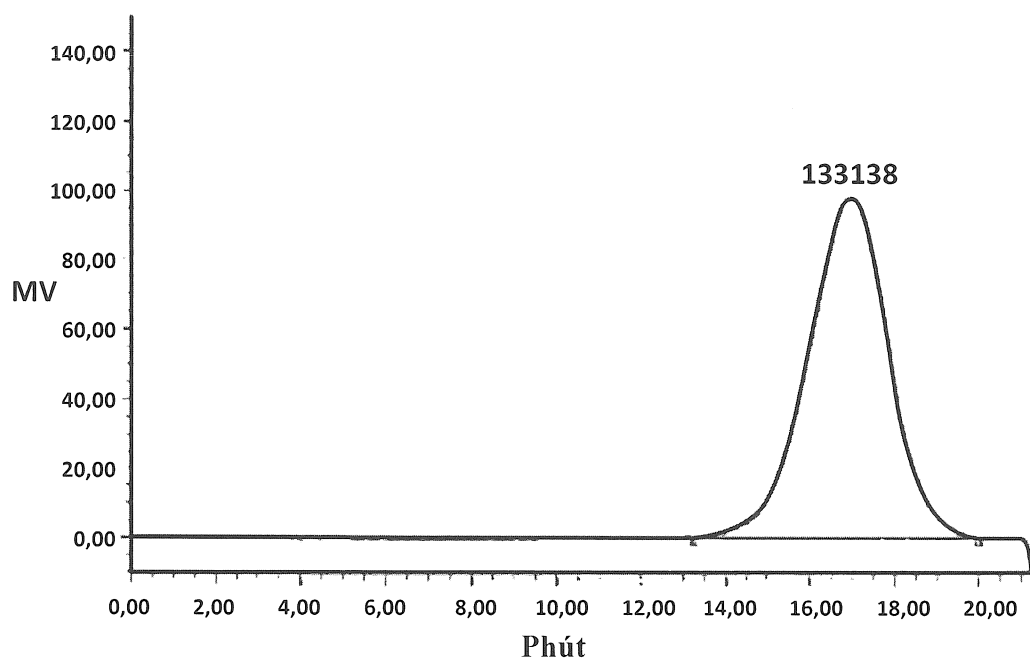
	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Dải rộng	13.243	16128396	898464	499923	1008801	100,00	1,797203



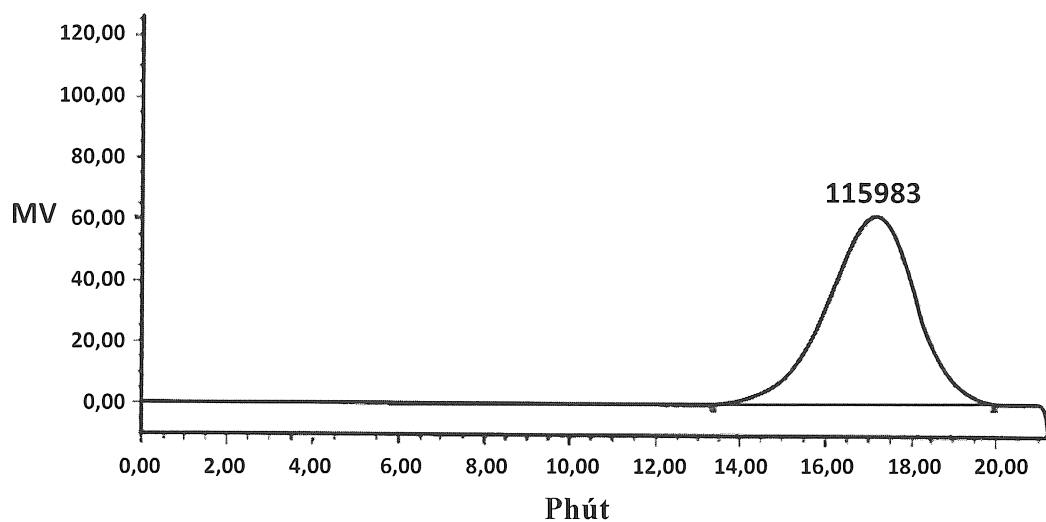
	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích
1	Dải rộng	13.729	15487260	1098757	619271	1189617	100,00

35311

Fig.3G & 3H



	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.980	12939746	166907	113770	133136	100,00	1,467050



	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	17.192	8884468	156239	99497	115983	100,00	1,570293

35311

Fig.4A

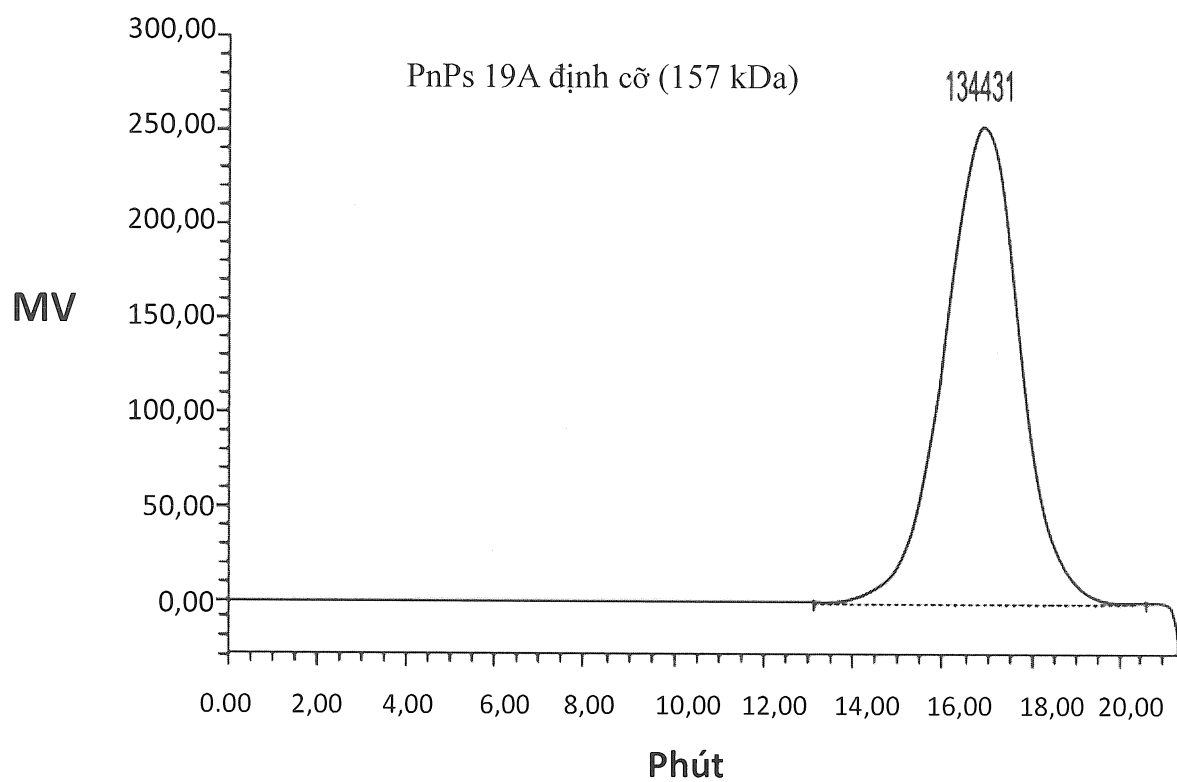


Fig.4B

	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.989	30256211	157553	114413	134431	100,00	1,377054

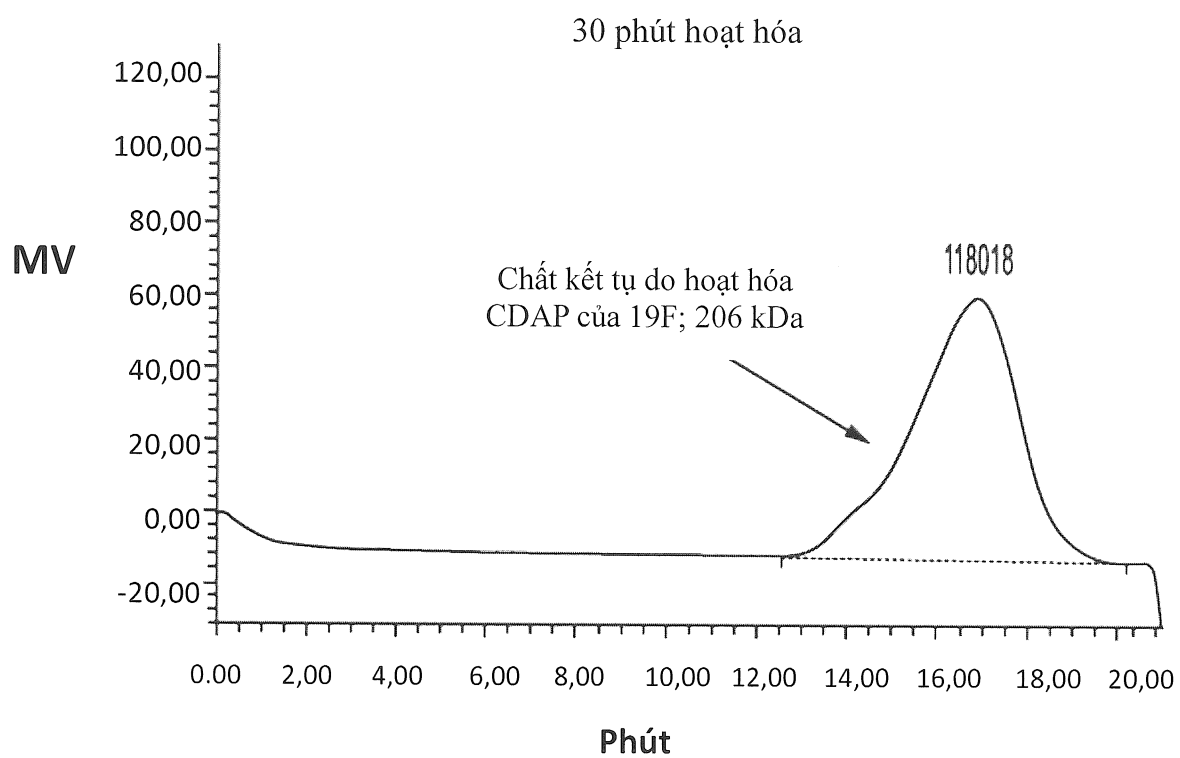
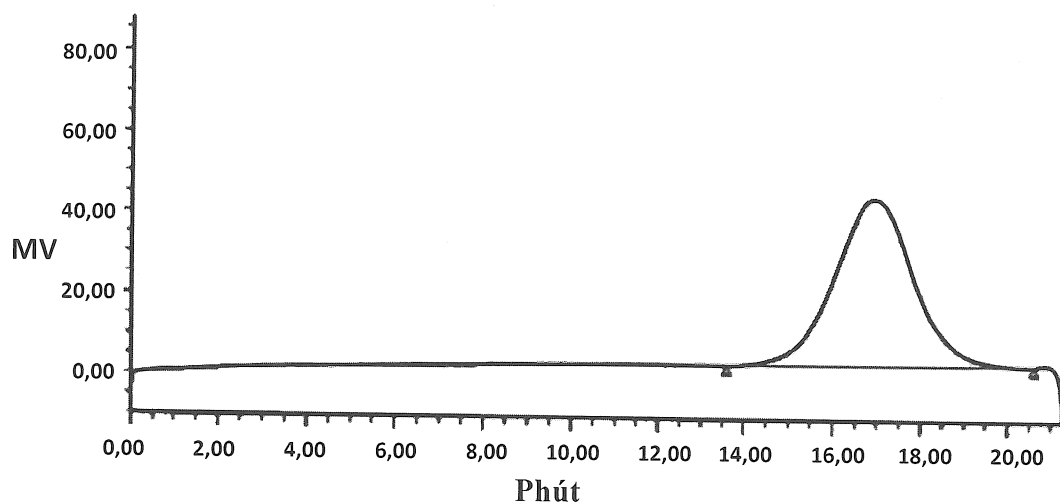
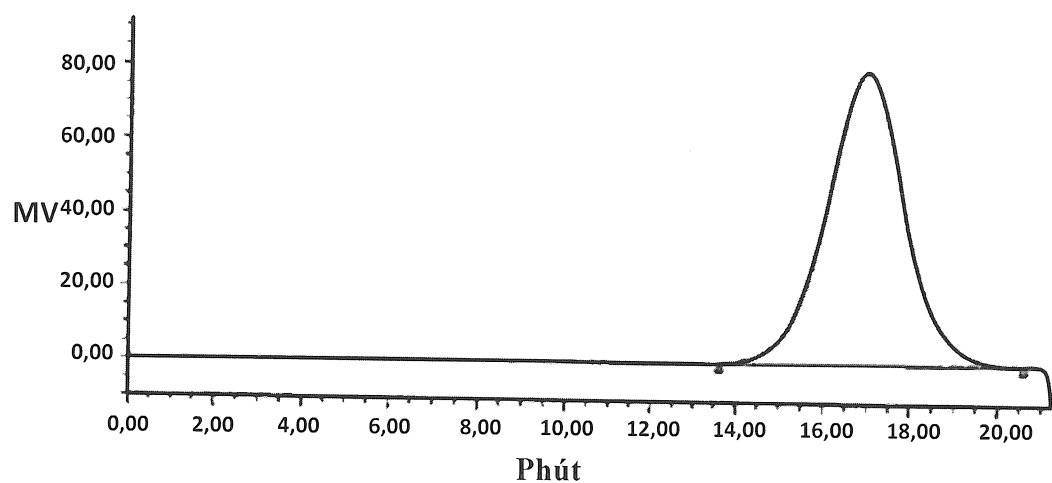


Fig.4C & 4D



	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.940	5091525	161255	116007	141922	100,00	1,390010



	Tên đỉnh	RT	Diện tích	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	% Diện tích	Độ đa phân tán
1	Đỉnh 4	16.952	9921138	161360	114430	140847	100,00	1,410112

Fig.5

Tuốc bin rushton 6 cánh có bộ cánh khuấy

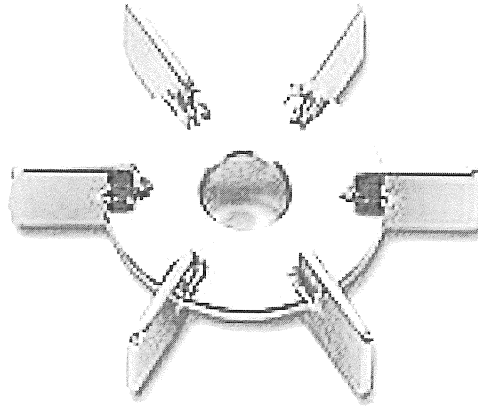


Fig.6

