



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

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

(11)



1-0035652

(51)⁷ A61K 39/108; C08B 37/00; A61K
47/65; A61K 39/00; A61K 47/64

(13) B

(21) 1-2019-02682

(22) 24/10/2017

(86) PCT/EP2017/077123 24/10/2017

(87) WO/2018/077853 03/05/2018

(30) 16195256.9 24/10/2016 EP

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/10/2019 379A

(73) JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)

1125 Trenton-Harbourton Road Titusville, NJ New Jersey 8560, US

(72) LABOVITIADI, Olga (GR); TONNIS, Wouter, Frank (NL); DORO, Francesco (IT);
ADRIAANSEN, Janik (NL).

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

(54) HỢP PHẦN GÂY MIỄN DỊCH, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP PHẦN NÀY
VÀ PHƯƠNG PHÁP DUY TRÌ ỔN ĐỊNH HỢP PHẦN GÂY MIỄN DỊCH LỎNG

(57) Hợp phần và phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại *Escherichia coli* gây bệnh ngoài ruột (ExPEC) được mô tả. Cụ thể là, vắc xin đa giá chứa polysacarit kháng nguyên *E. coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) có thể chịu được nhiều áp lực môi trường được mô tả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp phần gây đáp ứng miễn dịch chống lại *Escherichia coli* gây bệnh ngoài ruột (ExPEC). Cụ thể là, các phương án của sáng chế đề cập đến vắc xin đa giá chứa thể liên hợp của kháng nguyên polysaccharit *E. coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang mà có thể chịu được nhiều áp lực môi trường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

E. coli gây bệnh ngoài ruột (ExPEC) là tác nhân gây bệnh gram âm phổ biến nhất ở người, và có thể gây ra sự lây nhiễm khác nhau bên ngoài đường dạ dày-ruột, mà có thể dẫn đến các bệnh nghiêm trọng và đa dạng, dẫn đến tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong đáng kể. Việc làm tăng khả năng kháng đa thuốc giữa các chủng ExPEC là trở ngại cho việc điều trị và dẫn đến số lượng nhập viện và tử vong tăng và chi phí chăm sóc sức khỏe tăng có liên quan đến sự lây nhiễm ExPEC.

Do đó vắc xin chống ExPEC là nhu cầu cấp thiết. Kháng nguyên O, thành phần của lipopolysaccharit bề mặt, đã được xác định là phần tử đích của vắc xin có triển vọng, và được sử dụng làm kháng nguyên trong vắc xin thể liên hợp glyco đang phát triển hiện nay (xem tài liệu, ví dụ Poolman and Wacker, 2016, J. Infect. Dis. 213: 6-13).

Vắc xin thể liên hợp glyco chống ExPEC mà đang phát triển hiện nay có chứa O-glycan thuộc các typ huyết thanh khác nhau của ExPEC, mỗi loại được kết hợp với protein mang, chẳng hạn như protein ngoại bào A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) (xem tài liệu ví dụ, WO2015/124769, và WO 2017/035181). Vắc xin này có chứa O-glycan thuộc các typ huyết thanh *E. coli* O25B, O1A, O2 và O6A là ví dụ như trong thử nghiệm giai đoạn 2 đang tiến hành (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02546960).

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng mặc dù chế phẩm vắc xin ExPEC hiện hành (25 mM Tris độ pH 7,4, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) có thể chấp nhận được để lưu trữ ngắn hạn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C và ổn định khi sử dụng, nó không còn mạnh khi kết đông/rã đông và dưới áp lực khuấy trộn. Việc kết đông bất ngờ, gia nhiệt bất ngờ, và khuấy trộn (ví dụ, trong quá trình lưu trữ hoặc vận chuyển) có tác động bất lợi lên tính nguyên vẹn sản phẩm của chế phẩm ExPEC. Đối với các

sản phẩm được mà được dự định để sử dụng cho dân số lớn, chẳng hạn như vắc xin thể liên hợp glyco chống ExPEC, điều có lợi là có chế phẩm mà có thể được kết đông lượng lớn ở nhiệt độ thấp, và sau khi rã đông có thể lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8 °C trước khi sử dụng (tức là, tại đó chất thuốc được kết đông để lưu trữ quy mô lớn và dài hạn, nhưng sản phẩm thuốc đang được sử dụng được lưu trữ ở trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, vì thế chắc chắn có ít nhất là một chu trình kết đông/rã đông đối với sản phẩm). Ngoài ra, tốt hơn là chế phẩm cũng tương thích với các nguyên liệu khác nhau, sao cho sản phẩm (ví dụ, thể liên hợp glyco) có thể được lưu trữ trong các dạng thức khác nhau (ví dụ, túi, chai, lọ, ống tiêm được nhồi sẵn, và/hoặc các dụng cụ có thể áp dụng được).

Trong lĩnh vực này cần có các chế phẩm của vắc xin chống ExPEC, có thể chịu được nhiều áp lực môi trường (ví dụ, kết đông/rã đông, khuấy trộn, nhiệt độ cao, phơi sáng, tiếp xúc chất oxy hóa kim loại, v.v.) và dẫn đến độ ổn định lâu hơn và thời hạn sử dụng lâu hơn của hợp phần, và tốt hơn là tương thích với nhiều nguyên liệu xử lý (ví dụ vật chứa). Con đường thoái hóa bất kỳ trong số các đường thoái hóa do áp lực môi trường có thể dẫn đến hoạt tính sinh học bị giảm, và cũng có thể có khả năng dẫn đến sự tạo thành sản phẩm phụ hoặc dẫn xuất của các thành phần của chế phẩm, do đó dẫn đến độ độc tăng và/hoặc khả năng gây miễn dịch thay đổi của vắc xin ExPEC. Do đó, cần có phương pháp phù hợp để tìm ra chế phẩm mạnh đối với vắc xin thể liên hợp glyco đảm bảo độ ổn định trên phạm vi điều kiện rộng. Loại đệm, độ pH, và tá dược chuyên dụng cần được chọn lọc, được kết hợp đặc hiệu, và sau đó là được tối ưu hóa kỹ càng để giữ vắc xin thể liên hợp glyco ổn định về mặt hóa học, vật lý và sinh học. Vì tất cả các yếu tố này có thể thay đổi, nên việc tìm các điều kiện tối ưu để tạo chế phẩm vắc xin thể liên hợp glyco chống ExPEC phải chịu các thách thức, và hợp phần của chế phẩm tốt không thể dự đoán tiên nghiệm trước.

Theo đó, trong lĩnh vực này cần có các chế phẩm của vắc xin thể liên hợp glyco chống ExPEC mà đảm bảo rằng các hợp phần vắc xin có thể chịu được nhiều áp lực môi trường và có độ ổn định được cải thiện và thời hạn sử dụng lâu hơn. Mục đích của sáng chế là đề xuất các chế phẩm như vậy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hai chế phẩm mới cho vắc xin thể liên hợp glyco chống ExPEC, tạo ra hợp phần vắc xin có tác dụng làm ổn định được cải thiện khi kết đông/rã đông, áp lực khuấy trộn, áp lực nhiệt, và áp lực oxy hóa do kim loại gây ra, mà các chế phẩm còn tương thích với các nguyên liệu xử lý (ví dụ vật chứa) khác nhau. Các chế phẩm được cải thiện này có thể được sử dụng trong quá trình lưu trữ hoặc vận chuyển cả sản phẩm thuốc và chất thuốc, mà tại đó việc kết đông (đột ngột) hoặc khuấy trộn do xóc có thể xảy ra, mà có thể có tác động bất lợi lên tính nguyên vẹn sản phẩm và do đó là tác động bất lợi lên hiệu quả. Ngoài ra, các chế phẩm mới mang lại thể liên hợp glyco ExPEC vắc xin có độ ổn định được cải thiện chống lại áp lực nhiệt, và do đó có thể áp dụng thương mại rộng rãi đối với việc lưu trữ, xử lý và vận chuyển sản phẩm thuốc và chất thuốc ở phạm vi rộng của nhiệt độ và các điều kiện.

Trong bản mô tả này sáng chế đề xuất hợp phần có chứa ít nhất là một polysacarit kháng nguyên O *E. coli*, trong đó có ít nhất là một polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 3% đến 8% (khối lượng/thể tích) sorbitol; trong khoảng từ 5 đến 15 mM metionin; trong khoảng từ 5 đến 20 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ của sorbitol nằm trong khoảng từ 4% đến 6% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án ưu tiên, nồng độ của metionin nằm trong khoảng từ 8 đến 12 mM. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ của đệm kali/natri photphat nằm trong khoảng từ 8 đến 15 mM. Tốt hơn là, hợp phần là hợp phần gây miễn dịch đa giá có chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O độc lập được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 4% đến 6% (khối lượng/thể tích) sorbitol; trong khoảng từ 8 đến 12 mM metionin; trong khoảng từ 8 đến 15 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt.

Trong bản mô tả này sáng chế còn đề xuất hợp phần có chứa ít nhất là một polysacarit kháng nguyên O *E. coli*, trong đó có ít nhất là một polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 3% đến 12% (khối lượng/thể tích) sucroza; trong khoảng từ 0,1 đến 1,5 mM EDTA; trong khoảng từ 5 đến 20 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt. Theo các phương án ưu tiên, nồng độ của sucroza nằm trong khoảng từ 3% đến 10% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án ưu tiên, nồng độ của đệm kali/natri photphat nằm trong khoảng từ 8 đến 15 mM. Tốt hơn là, hợp phần là hợp phần gây miễn dịch đa giá có chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên độc lập được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 3% đến 10% (khối lượng/thể tích) sucroza; trong khoảng từ 0,1 đến 1,5 mM EDTA; trong khoảng từ 8 đến 15 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt.

Theo các phương án nhất định, các polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2, và O6A *E. coli* ở tỷ lệ khối lượng bằng 1:1:1:1 hoặc 2:1:1:1.

Theo các phương án nhất định, nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích).

Theo các phương án nhất định, nồng độ của sucroza là 8% (khối lượng/thể tích).

Theo các phương án nhất định, nồng độ của metionin là 10 mM.

Theo các phương án nhất định, nồng độ của EDTA là 1 mM.

Theo các phương án nhất định, nồng độ của đệm kali/natri photphat là 10 mM, và độ pH của đệm kali/natri photphat là 7,0.

Theo các phương án nhất định, nồng độ của chất hoạt động bề mặt là 0,02% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt được tạo thành bởi đầu ưa nước (nhóm OH) và đuôi dài, kỵ nước (chuỗi cacbon, mà có thể có chứa ít nhất là khoảng 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130, hoặc nhiều

cacbon hơn trong chuỗi cacbon này). Theo các phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion. Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm gồm có F-68, PS20, PS40, PS60, và PS80. Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt là PS80.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Trong bản mô tả này sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều chế hợp phần như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế hợp phần bao gồm bước bổ sung ít nhất là một kháng nguyên O *E. coli* liên kết cộng hóa trị với chất mang EPA, nước, muối đối với dung

dịch đệm (tức là natri(đi)hydro photphat và kali(đi)hydro photphat [tức là Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 hoặc NaH_2PO_4 và K_2HPO_4]), chất cải biến trương lực (tức là sorbitol hoặc sucroza), chất chống oxy hóa (tức là metionin nếu chất cải biến trương lực là sorbitol; EDTA nếu chất cải biến trương lực là sucroza), và chất hoạt động bề mặt (ví dụ PS80) vào vật chứa, bước điều chỉnh độ pH đến độ pH mong muốn (tức là trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, ví dụ 7,0), và bước trộn các thành phần này sao cho tạo ra chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, các phương pháp điều chế hợp phần bao gồm bước bổ sung polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); nước; kali photphat; natri photphat; sorbitol; metionin; và PS80 vào vật chứa, bước điều chỉnh độ pH đến trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 (ví dụ 7,0), và bước trộn mỗi thành phần sao cho nồng độ cuối của đệm kali/natri photphat nằm trong khoảng từ 5 đến 20 mM (ví dụ 10 mM) có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 (ví dụ 7,0), nồng độ cuối của sorbitol trong khoảng từ 3 đến 8% (ví dụ 5%) (khối lượng/thể tích), nồng độ cuối của metionin trong khoảng từ 5 đến 15 mM (ví dụ 10 mM), và nồng độ cuối của PS80 trong khoảng từ 0,01 đến 0,08% (ví dụ 0,02%) (khối lượng/thể tích). Theo phương án ưu tiên khác, phương pháp điều chế hợp phần bao gồm bước bổ sung polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); nước; kali photphat; natri photphat; sucroza; EDTA; và PS80 vào vật chứa, bước trộn mỗi thành phần, và bước điều chỉnh độ pH đến trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 (ví dụ 7,0) sao cho nồng độ cuối của sucroza trong khoảng từ 3 đến 12% (ví dụ 8%) (khối lượng/thể tích), nồng độ cuối của EDTA trong khoảng từ 0,1 đến 1,5 mM (ví dụ 1 mM), nồng độ cuối của đệm kali/natri photphat trong khoảng từ 5 đến 20 mM (ví dụ 10 mM) có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 (ví dụ 7,0), và PS80 trong khoảng từ 0,01 đến 0,08% (ví dụ 0,02%) (khối lượng/thể tích).

Theo các phương án nhất định, hợp phần trong bản mô tả này được đề xuất dưới dạng hợp phần lỏng. Theo hợp phần lỏng, có nghĩa là hợp phần ở dạng lỏng ở

hiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C, và tốt hơn là được lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C.

Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C, ở nhiệt độ 25 °C, hoặc ở nhiệt độ 40 °C. Theo phương án ưu tiên, hợp phần được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 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 hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ 25 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng, hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ 40 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 tuần, hoặc lâu hơn.

Theo các phương án nhất định, hợp phần trong bản mô tả này được đề xuất dưới dạng chế phẩm đông lạnh. Theo chế phẩm đông lạnh, có nghĩa là hợp phần ở dạng rắn khi được lưu trữ ở nhiệt độ bằng hoặc dưới khoảng -18°, ví dụ ở nhiệt độ khoảng -20°C, -40°C, -60°C, -70°C, -80°C hoặc nhiệt độ bất kỳ trong khoảng giữa chúng, hoặc thấp hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ -40 °C hoặc -60 °C tùy thuộc vào chất cải biến trương lực có mặt trong hợp phần. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ -70 °C. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sucroza và ổn định ở nhiệt độ -40 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 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, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 tháng, hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sorbitol và ổn định ở nhiệt độ -60 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 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, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 tháng, hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sorbitol hoặc sucroza và ổn định ở nhiệt độ -70 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 năm, hoặc lâu hơn.

Theo các phương án ưu tiên, hợp phần theo sáng chế không có chứa natri clorua.

Theo các phương án nhất định, nồng độ đối với mỗi polysacarit kháng nguyên O trong hợp phần trong khoảng từ khoảng 1 đến 200 $\mu\text{g/ml}$, ví dụ trong khoảng từ khoảng 2 đến 100 $\mu\text{g/ml}$, ví dụ trong khoảng từ khoảng 4 đến 50 $\mu\text{g/ml}$. Theo các phương án nhất định của sáng chế, tỷ lệ polysacarit:protein mang nằm trong khoảng từ khoảng 1:10 đến khoảng 1:2, ví dụ trong khoảng từ khoảng 1:5 đến 1:2 đối với mỗi polysacarit kháng nguyên O trong hợp phần.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phần bản chất kỹ thuật nêu trên, cũng như là phần mô tả chi tiết sau đây của các phương án ưu tiên của đơn này, sẽ được hiểu rõ hơn khi đọc kết hợp với các 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 này:

Các Hình 1A-1C thể hiện rằng PS20, PS80, và F68, chứ không phải sorbitol, có thể ngăn cản sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC do kết đông/rã đông gây ra trong các điều kiện thử nghiệm: PS20, PS80, F68 và sorbitol được bổ sung vào chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC và chịu áp lực do kết đông/rã đông gây ra,

Hình 1A thể hiện sơ đồ tích hợp của biểu đồ sắc ký sắc ký lỏng hiệu năng cao-sắc ký loại trừ kích thước (SEC-HPLC);

Hình 1B thể hiện biểu đồ sắc ký SEC-HPLC chứng tỏ các kết quả của thí nghiệm trước và sau khi kết đông/rã đông; và

Hình 1C thể hiện biểu đồ lập đồ thị các giá trị tỷ lệ phần trăm của tiền đỉnh 1 trên toàn bộ tích hợp đỉnh;

Hình 2 thể hiện biểu đồ so sánh tỷ lệ phần trăm của tiền đỉnh 1 sắc ký SEC-HPLC đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28 lần lượt so với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC cũ, khi chịu nhiệt độ 40 °C trong khoảng thời gian kéo dài 12 tuần: cả hướng lọ thẳng đứng (↑) và lộn ngược (↓) đều được kiểm tra, Chế phẩm 26 và Chế phẩm 28 đã chứng tỏ độ ổn định tăng lên so với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC cũ khi chịu áp lực nhiệt (40 °C); và

Hình 3 thể hiện các biểu đồ chứng tỏ tiền đỉnh 1 có xu hướng đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28 khi so với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC cũ khi được tiếp xúc với ba nồng độ khác nhau của chất chiết vonfram (HW, MW, LW) và được lưu trữ ở nhiệt độ 40 °C trong thời gian 4 tuần.

Hình 4 thể hiện biểu đồ sắc ký SEC-HPLC chứng tỏ kết quả của thí nghiệm trước và sau áp lực khuấy trộn (T0 là đối chứng, tức là không có áp lực khuấy trộn) đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28 so với chế phẩm cũ khi tiếp xúc với các nguyên liệu chất dẻo PETG và PC.

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 những 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.

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 ít 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 trong bản mô tả này, các thuật ngữ "có chứa", "bao gồm", "có", hoặc "chứa", hoặc dạng biến đổi khác bất kỳ của chúng, sẽ được hiểu ngụ ý rằng bao hàm số nguyên hoặc nhóm số nguyên đã nêu nhưng không loại trừ số nguyên hoặc nhóm số nguyên khác bất kỳ và được dự định là không có tính loại trừ hoặc là kết thúc mở. Ví dụ, hợp phần, hỗn hợp, quy trình, phương pháp, vật phẩm, hoặc thiết bị có chứa danh mục các yếu tố không nhất thiết chỉ giới hạn ở các yếu tố đó mà có thể bao gồm các yếu tố khác không được liệt kê rõ ràng hoặc vốn thuộc về hợp phần, hỗn hợp, quy trình, phương pháp, vật phẩm, hoặc thiết bị này. Ngoài ra, trừ khi được chỉ định rõ ràng là ngược lại, "hoặc" dùng để chỉ sự bao gồm hoặc và không loại trừ hoặc. Ví dụ, điều kiện A hoặc B được thỏa mãn bởi một trong các điều bất kỳ sau đây: A là đúng (hoặc có mặt) và B là sai (hoặc không có mặt), A là sai (hoặc không có mặt) và B là đúng (hoặc có mặt), và cả A và B đều đúng (hoặc có mặt).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gồm có", hoặc các dạng biến đổi khác như được sử dụng trong suốt phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, biểu thị sự bao hàm số nguyên hoặc nhóm số nguyên được chỉ ra bất kỳ, nhưng không có số nguyên hoặc nhóm số nguyên bổ sung có thể được thêm vào phương pháp, cấu trúc, hoặc hợp phần xác định.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "về cơ bản gồm có", hoặc các dạng biến đổi như được sử dụng trong suốt phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, biểu thị sự bao hàm số nguyên hoặc nhóm số nguyên được chỉ ra bất kỳ, và sự bao hàm tùy chọn của số nguyên hoặc nhóm số nguyên được chỉ ra bất kỳ mà không làm thay đổi cốt yếu các đặc tính cơ bản hoặc đặc tính mới của phương pháp, cấu trúc hoặc hợp phần xác định.

Cần được hiểu rằng các thuật ngữ "khoảng", "xấp xỉ", "thông thường", "về cơ bản" và các thuật ngữ tương tự, được sử dụng trong bản mô tả này khi đề cập đến kích thước hoặc đặc điểm của thành phần của sáng chế được ưu tiên, biểu thị rằng kích thước/đặc điểm được mô tả không phải là đường biên hoặc tham số nghiêm ngặt và không loại trừ các biến đổi nhỏ từ đó mà có cùng chức năng hoặc tương tự về mặt chức năng, như được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ở mức

tối thiểu, sự tham chiếu mà bao gồm tham số dạng số bao gồm các biến đổi mà, bằng cách sử dụng các nguyên tắc toán học và công nghiệp được chấp nhận trong lĩnh vực (ví dụ, làm tròn, phép đo hoặc sai số hệ thống, dung sai trong sản xuất, v.v.), mà không thay đổi chữ số có nghĩa tối thiểu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "polysaccharit O", "kháng nguyên O", "kháng nguyên-O", "polysaccharit kháng nguyên O", "kháng nguyên polysaccharit O", và chữ viết tắt "OPS", đều dùng để chỉ kháng nguyên O của vi khuẩn Gram âm, mà là thành phần của lipopolysaccharit (LPS) và đặc hiệu đối với mỗi typ huyết thanh hoặc typ huyết thanh phụ của vi khuẩn Gram âm. Kháng nguyên O thường chứa các đơn vị lặp (repeating unit - RU) có từ hai đến bảy gốc đường. Như được sử dụng trong bản mô tả này, RU được thiết lập bằng với đơn vị lặp sinh học (biological repeat unit - BRU). BRU mô tả RU của kháng nguyên O khi nó được tổng hợp *in vivo*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "thể liên hợp" và "thể liên hợp glyco" tất cả dùng để chỉ sản phẩm liên hợp chứa kháng nguyên O *E. coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang (ví dụ, ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA)). Thể liên hợp có thể là thể liên hợp sinh học, mà là sản phẩm liên hợp được điều chế trong tế bào chủ, trong đó bộ máy tế bào chủ sản xuất kháng nguyên O và protein mang và liên kết kháng nguyên O với protein mang, ví dụ, thông qua liên kết N. Thể liên hợp cũng có thể được điều chế bằng các phương thức khác, ví dụ, bằng liên kết hóa học của protein và kháng nguyên đường.

Các kháng nguyên O *E. coli* theo các phương án của sáng chế bao gồm O1A, O2, O6A, và O25B, được bộc lộ trong tài liệu WO2015/124769, và WO 2017/035181. Mỗi tài liệu trong số các tài liệu tham khảo này được kết hợp trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo. Các kháng nguyên O *E. coli* khác cũng có thể được sử dụng, ví dụ ngoài các kháng nguyên O1A, O2, O6A và/hoặc O25B đặc hiệu, và có thể ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng nguyên O từ các typ huyết thanh hoặc typ huyết thanh phụ của chúng O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O25, O73, O75 và O153 *E. coli*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất thuốc" dùng để chỉ sản phẩm có lượng lớn của thể liên hợp glyco riêng rẽ (polysaccharit kháng nguyên O

E. coli được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA, ví dụ kháng nguyên O O25B *E. coli* được liên kết cộng hóa trị với EPA), mà ở nồng độ cao hơn so với sản phẩm khi cuối cùng được dùng cho đối tượng. Chất thuốc có thể được sản xuất sau khi hoàn tất quy trình xuôi dòng để tinh chế thể liên hợp glyco. Chất thuốc có thể, ví dụ, được lưu trữ ở dạng đặc hơn trong đệm chế phẩm theo sáng chế, ví dụ trong điều kiện kết đông, ví dụ ở nhiệt độ âm 70°C.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sản phẩm thuốc" dùng để chỉ chế phẩm của thể liên hợp glyco, ở dạng cuối cùng để dùng cho đối tượng. Sản phẩm thuốc chứa tất cả các thể liên hợp glyco (các polysacarit kháng nguyên O *E. coli* được kết hợp với protein mang EPA trong trường hợp của vắc xin đa giá, ví dụ O25B, O1A, O2 và O6A, mỗi polysacarit riêng lẻ được kết hợp với protein mang EPA, đối với vắc xin bốn giá, và tùy ý có nhiều kháng nguyên O *E. coli* hơn được kết hợp với protein mang EPA nếu lượng giá của vắc xin tăng). Sản phẩm thuốc có thể thường được điều chế bằng cách trộn chất thuốc của thể liên hợp glyco tương ứng, và pha loãng bằng đệm chế phẩm nếu cần, sao cho liều lượng đích của vắc xin được tạo ra. Sản phẩm thuốc trong chế phẩm theo sáng chế có thể được lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, và duy trì ổn định ở nhiệt độ đó trong thời gian ít nhất là 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 hoặc lâu hơn.

Thuật ngữ "khoảng" khi được sử dụng kết hợp với số, dùng để chỉ số bất kỳ nằm trong khoảng ± 1 , ± 5 hoặc $\pm 10\%$ của số được tham chiếu.

Khi kháng nguyên O liên kết cộng hóa trị với protein mang, lượng hoặc liều lượng hữu hiệu đối với kháng nguyên O được tính chỉ dựa trên gốc polysacarit kháng nguyên O trong thể liên hợp.

Các bệnh có liên quan đến ExPEC hoặc sự lây nhiễm ExPEC bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng vị trí phẫu thuật, du khuẩn huyết, nhiễm trùng vùng bụng hoặc vùng khung chậu, viêm phổi, viêm phổi bệnh viện, viêm tủy xương, viêm tế bào, viêm thận-bể thận, nhiễm trùng vết thương, viêm màng não, viêm màng não sơ sinh, viêm phúc mạc, viêm đường mật, nhiễm trùng mô mềm, viêm mũi, viêm khớp sung mủ, và nhiễm trùng huyết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ở dạng kết hợp", trong ngữ cảnh dùng hai hoặc nhiều trị liệu cho đối tượng, dùng để chỉ việc sử dụng nhiều hơn một trị liệu. Việc sử dụng thuật ngữ "ở dạng kết hợp" không giới hạn thứ tự mà các trị liệu được dùng cho đối tượng. Ví dụ, trị liệu thứ nhất (ví dụ, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này) có thể được dùng trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng trị liệu thứ hai (ví dụ, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này, hoặc trị liệu khác, ví dụ, điều trị bằng kháng sinh) cho đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ động vật, tốt hơn là động vật có vú, và có thể bao gồm động vật không phải linh trưởng (ví dụ, lợn, ngựa, dê, cừu, mèo, chó, thỏ, chuột nhắt, hoặc chuột đồng) và động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ, tinh tinh, hoặc người). Theo các phương án nhất định, đối tượng là động vật không phải người. Theo phương án khác, đối tượng là người. Các thuật ngữ "đối tượng" và "bệnh nhân" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Hợp phần theo sáng chế thích hợp để dùng cho đối tượng, và có thể được sử dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại các kháng nguyên O ExPEC mà được bao hàm trong hợp phần.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đáp ứng miễn dịch học" hoặc "đáp ứng miễn dịch" với kháng nguyên hoặc hợp phần dùng để chỉ sự phát triển trong đáp ứng miễn dịch thể dịch và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào ở đối tượng với kháng nguyên hoặc kháng nguyên có mặt trong hợp phần.

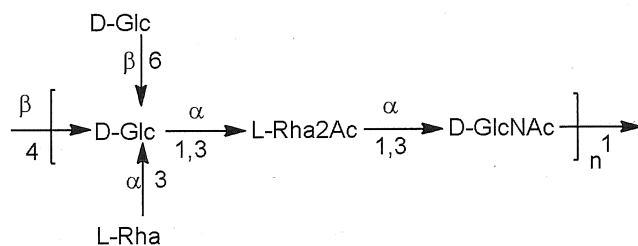
Hợp phần có chứa polysaccharit kháng nguyên O *E. coli*

Theo một khía cạnh chung, sáng chế đề cập đến vắc xin đa giá chứa các typ huyết thanh kháng nguyên O được tìm thấy chủ yếu là trong số các thể phân lập lâm sàng *E. coli*, có thể được sử dụng để tạo ra sự gây miễn dịch chủ động để ngăn ngừa bệnh do ExPEC gây ra có các typ huyết thanh kháng nguyên O được chứa trong vắc xin. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp phần có chứa ít nhất là một polysaccharit kháng nguyên O *E. coli*. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể có chứa polysaccharit kháng nguyên O25B *E. coli*. Theo các phương án khác, hợp phần có chứa polysaccharit kháng nguyên O1A, O2, và/hoặc O6A *E. coli*. Theo các phương án ưu tiên, hợp phần có chứa các polysaccharit kháng nguyên O1A, O2, O6A và O25B *E. coli*, được bộc lộ trong tài liệu WO2015/124769, và WO 2017/035181. Mỗi tài

liệu trong số các tài liệu tham khảo này được kết hợp trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo. Theo các phương án nhất định, polysacarit kháng nguyên O *E. coli* bổ sung hoặc khác có mặt trong hợp phần. Các polysacarit kháng nguyên O *E. coli* này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng nguyên O từ các typ huyết thanh (phụ) của O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O25, O73, O75 và O153 *E. coli*. Tùy thuộc vào nhu cầu, hợp phần có thể bao gồm nhiều hơn một kháng nguyên O *E. coli* bổ sung, chẳng hạn như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc nhiều hơn, các kháng nguyên O *E. coli* bổ sung, để tạo ra sự bảo vệ miễn dịch chống lại nhiều typ huyết thanh *E. coli*.

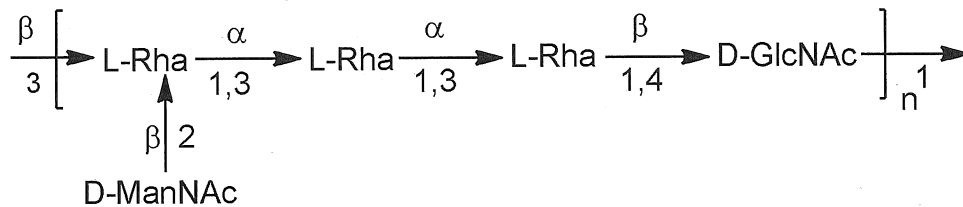
Theo các phương án nhất định, hợp phần và phương pháp có thể liên quan đến kháng nguyên O25B *E. coli* và một hoặc nhiều kháng nguyên O *E. coli* bổ sung. Các ví dụ về kháng nguyên O *E. coli* có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở các kháng nguyên O25B, O1A, O2 và O6A *E. coli*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này "kháng nguyên O25B *E. coli*" dùng để chỉ kháng nguyên O đặc hiệu với typ huyết thanh O25B *E. coli*. Theo một phương án, kháng nguyên O25B *E. coli* có chứa cấu trúc có Công thức O25B':



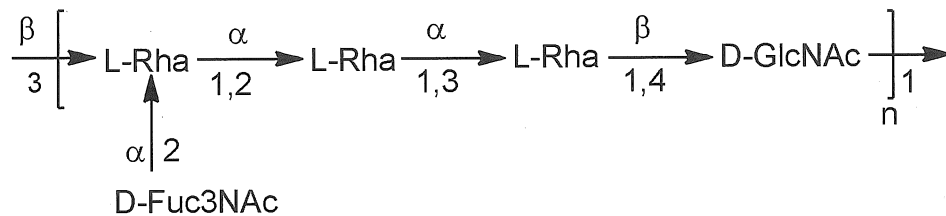
trong đó n trong Công thức O25B' là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30, từ 1 đến 20, từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 5, từ 10 đến 30, từ 15 đến 30, từ 20 đến 30, từ 25 đến 30, từ 5 đến 25, từ 10 đến 25, từ 15 đến 25, từ 20 đến 25, từ 10 đến 20, hoặc từ 15 đến 20. Theo một phương án của sáng chế, n trong Công thức O25B' là số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 20.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng nguyên O1A *E. coli*" dùng để chỉ kháng nguyên O đặc hiệu với typ huyết thanh O1A *E. coli*. Theo một phương án, kháng nguyên O1A *E. coli* có chứa cấu trúc có Công thức O1A':



trong đó n trong Công thức O1A' là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30, từ 1 đến 20, từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 5, từ 10 đến 30, từ 15 đến 30, từ 20 đến 30, từ 25 đến 30, từ 5 đến 25, từ 10 đến 25, từ 15 đến 25, từ 20 đến 25, từ 10 đến 20, hoặc từ 15 đến 20. Theo một phương án, n trong Công thức O1A' là số nguyên nằm trong khoảng từ 7 đến 15.

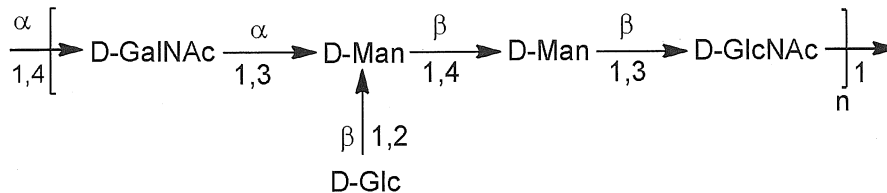
Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng nguyên O2 *E. coli*" dùng để chỉ kháng nguyên O đặc hiệu với typ huyết thanh O2 *E. coli*. Theo một phương án, kháng nguyên O2 *E. coli* có chứa cấu trúc có Công thức O2':



trong đó n trong Công thức O2' là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30, từ 1 đến 20, từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 5, từ 10 đến 30, từ 15 đến 30, từ 20 đến 30, từ 25 đến 30, từ 5 đến 25, từ 10 đến 25, từ 15 đến 25, từ 20 đến 25, từ 10 đến 20, hoặc từ 15 đến 20. Theo một phương án, n trong Công thức O2' là số nguyên nằm trong khoảng từ 8 đến 16.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng nguyên O6 *E. coli*" dùng để chỉ kháng nguyên O đặc hiệu với typ huyết thanh O6 *E. coli*. Theo một phương án, kháng nguyên O6 *E. coli* là O6A *E. coli*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng nguyên O6A *E. coli*", còn được gọi là "kháng nguyên O6K2 *E. coli*" hoặc "kháng nguyên O6Glc *E. coli*", dùng để chỉ kháng nguyên O đặc hiệu với typ huyết thanh O6A *E. coli*. Theo một phương án, kháng nguyên O6A *E. coli* có chứa cấu trúc có Công thức O6A':



trong đó liên kết β 1, 2 còn được gọi là liên kết β 2, n trong Công thức O6A' là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 30, từ 1 đến 20, từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 5, từ 10 đến 30, từ 15 đến 30, từ 20 đến 30, từ 25 đến 30, từ 5 đến 25, từ 10 đến 25, từ 15 đến 25, từ 20 đến 25, từ 10 đến 20, hoặc từ 15 đến 20. Theo một phương án, n trong Công thức O6A' là số nguyên nằm trong khoảng từ 8 đến 18.

Các polysacarit kháng nguyên O *E. coli* trong hợp phần theo sáng chế được liên kết cộng hóa trị (đôi khi được gọi là "tạo liên hợp") với protein mang, protein mang theo sáng chế là Ngoại độc tố A của *P. aeruginosa*, tốt hơn là biến thể đã khử độc của chúng (EPA; xem tài liệu, ví dụ, Ihssen, et al., (2010) *Microbial cell factories* 9, 61; WO2015/124769). Sự kết hợp của protein mang và polysacarit kháng nguyên O được đề cập đến dưới dạng thể liên hợp glyco. Thường là, kháng nguyên O từ mỗi typ huyết thanh *E. coli* trong hợp phần được liên kết cộng hóa trị với protein mang riêng rẽ, tức là nếu hợp phần có chứa bốn polysacarit kháng nguyên O, mỗi polysacarit kháng nguyên O này được ghép riêng rẽ và độc lập với protein mang EPA, và do đó hợp phần có chứa bốn thể liên hợp glyco khác nhau. Một cách để tạo ra thể liên hợp glyco là bằng cách tạo liên hợp sinh học, trong đó bộ máy tế bào chủ sản xuất kháng nguyên O và protein mang và liên kết kháng nguyên O với protein mang, ví dụ, thông qua liên kết N (xem tài liệu ví dụ WO2015/124769 về việc điều chế thể liên hợp sinh học của các polysacarit O25B, O1A, O2 và O6A kháng nguyên O *E. coli* với protein mang EPA). Đối với EPA, các biến thể protein đã khử độc khác nhau đã được mô tả trong tài liệu và có thể được sử dụng làm các protein mang. EPA đã khử độc (hoặc không độc) dùng để chỉ ngoại độc tố A *Pseudomonas aeruginosa* bất kỳ mà không có hoạt tính ADP ribosyl hóa. Hoạt tính ribosyl hóa của EPA kiểu đại nằm ở giữa khoảng từ axit amin 400 đến 613 của EPA, và ví dụ việc làm khuyết axit amin Axit glutamic tại vị trí 553 từ EPA kiểu đại, hoặc thể Histidin tại vị trí 426 bằng Tyrosin ở EPA kiểu đại, làm khử độc phân tử EPA. Các axit amin khác nằm trong khoảng từ axit amin 400 đến 613 của EPA kiểu đại có thể được cải biến bằng cách, ví dụ làm khuyết, bổ sung, hoặc thể các gốc axit amin để loại bỏ hoạt tính ADP ribosyl

hóa và cùng với nó là độ độc, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, protein mang EPA là biến thể đã khử độc. Theo các phương án ví dụ và không làm giới hạn sáng chế nhất định, protein mang EPA có thể có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 1 (là phương án của EPA đã khử độc), hoặc trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với SEQ ID NO:1, hoặc có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin khác với SEQ ID NO: 1, trình tự bất kỳ trong số các trình tự này tùy ý còn chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn trình tự liên ứng glycosyl hóa được đưa vào theo cách tái tổ hợp như được mô tả dưới đây. Theo các phương án cụ thể, việc đưa vị trí glycosyl hóa vào được thực hiện bằng cách cài xen trình tự liên ứng glycosyl hóa (ví dụ, Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ ngoại trừ Pro; hoặc tốt hơn là Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z được chọn độc lập từ axit amin tự nhiên bất kỳ ngoại trừ Pro (SEQ ID NO: 2) (xem tài liệu, ví dụ, WO 2006/119987 và WO2015/124769)) tại chỗ bất kỳ trong cấu trúc bậc một của protein EPA. Theo các phương án ưu tiên, protein mang EPA có chứa một hoặc nhiều vị trí liên ứng glycosyl hóa được liên kết N được đưa vào theo cách tái tổ hợp có trình tự axit amin Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z được chọn độc lập từ axit amin tự nhiên bất kỳ ngoại trừ Pro (SEQ ID NO: 2). Theo các phương án nhất định, protein mang EPA có chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, hoặc hơn tám trình tự trong số các trình tự liên ứng được đưa vào này. Theo các phương án khác, EPA không có chứa trình tự liên ứng glycosyl hóa được tạo liên kết N được đưa vào này, ví dụ khi thể liên hợp glyco được điều chế bằng cách sử dụng hóa học tạo liên hợp cổ điển (xem tài liệu ví dụ, US 5,370,872; Cryz et al, 1990, *Infection and Immunity* 58: 373-377).

Theo các phương án nhất định, các kháng nguyên O *E. coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang ở tỷ lệ polysacarit-với-protein khối lượng/khối lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1:20 đến 20:1, tốt hơn là từ 1:10 đến 10:1, ví dụ từ 1:10 đến 3:1. Theo các phương án không làm giới hạn sáng chế nhất định đối với thể liên hợp sinh học, tỷ lệ của polysacarit/protein nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 0,5 (tức là polysacarit:protein nằm trong khoảng từ khoảng 1:10 đến 1:2, ví dụ khoảng 1:2,

1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng) đối với mỗi thể liên hợp sinh học, tùy thuộc vào typ huyết thanh kháng nguyên O.

Theo các phương án không làm giới hạn sáng chế, các polysaccharit kháng nguyên O *E. coli* có thể có mặt trong hợp phần ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến 200 µg/ml đối với mỗi polysaccharit kháng nguyên O, ví dụ, từ khoảng 2 đến 100 µg/ml, ví dụ từ khoảng 4 đến 50 µg/ml, ví dụ từ khoảng 4 đến 48 µg/ml, ví dụ từ khoảng 8 đến 48 µg/ml, ví dụ từ khoảng 4 đến 32 µg/ml, ví dụ từ khoảng 8 đến 32 µg/ml, ví dụ, 8, 16, 20, hoặc 32 µg/ml hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Tốt hơn là, trong hợp phần có ít nhất là hai polysaccharit kháng nguyên O *E. coli*, mỗi polysaccharit kháng nguyên O có mặt ở tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng, đối với mỗi dạng kết hợp của các polysaccharit kháng nguyên O trong hợp phần.

Theo các phương án không làm giới hạn sáng chế nhất định các polysaccharit kháng nguyên O có mặt trong hợp phần ở nồng độ của polysaccharit kháng nguyên O tổng số nằm trong khoảng từ khoảng 4 đến 1000 µg/ml, ví dụ từ khoảng 10 đến 500 µg/ml, ví dụ từ khoảng 20 đến 250 µg/ml, ví dụ từ khoảng 24 đến 120 µg/ml.

Theo các phương án không làm giới hạn sáng chế, tổng nồng độ đối với protein mang EPA trong hợp phần có thể ví dụ nằm trong khoảng từ khoảng 40 đến 2000 µg/ml, ví dụ từ khoảng 100 đến 1500 µg/ml, ví dụ từ khoảng 200 đến 1200 µg/ml, ví dụ từ khoảng 250 đến 600 µg/ml.

Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa các polysaccharit kháng nguyên O25B, O1A, O2 và O6A ở tỷ lệ khối lượng bằng 1:1:1:1, trong đó mỗi polysaccharit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA. Theo phương án khác, hợp phần có chứa các polysaccharit kháng nguyên O25B, O1A, O2 và O6A *E. coli* ở tỷ lệ khối lượng bằng 2:1:1:1, trong đó mỗi polysaccharit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA. Theo mỗi phương án này, polysaccharit kháng nguyên O25B có thể, ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, có mặt ở nồng độ bằng khoảng 8, 16, hoặc 32 µg/ml.

Các hợp phần được mô tả trong bản mô tả này hữu dụng trong việc điều trị và ngăn ngừa sự lây nhiễm của đối tượng (ví dụ, đối tượng là người) với ExPEC. Theo các phương án nhất định, ngoài việc có chứa các polysaccharit kháng nguyên O *E. coli*

liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có chứa chất mang được dụng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được dụng" có nghĩa là được cơ quan quản lý của Chính quyền liên bang hoặc tiểu bang phê chuẩn hoặc được liệt kê trong Dược Điển Hoa Kỳ hoặc được điển được công nhận chung khác để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người. Thuật ngữ "chất mang," như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của chất mang được dụng, dùng để chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ, tá dược, hoặc tá dược lỏng mà được dùng cùng với dược phẩm. Nước trong hợp phần theo sáng chế tốt hơn là nước để tiêm.

Hợp phần được đề xuất trong bản mô tả này có chứa chất hoạt động bề mặt. Chất hoạt động bề mặt như được sử dụng trong bản mô tả này là hợp chất hữu cơ mà là lưỡng tính, có nghĩa là chúng chứa cả nhóm kỵ nước (đuôi của chúng) và nhóm ưa nước (đầu của chúng). Theo các phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt được tạo thành bởi đầu ưa nước (có chứa nhóm OH) và đuôi kỵ nước dài (chuỗi cacbon, mà có thể có chứa ít nhất là khoảng 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130, cacbon hoặc nhiều cacbon hơn trong chuỗi cacbon). Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên theo sáng chế là chất hoạt động bề mặt không ion. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt thích hợp cho hợp phần theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polysorbat 20 (PS20), polysorbat 40 (PS40), polysorbat 60 (PS60), polysorbat 80 (PS80), và Pluronic® F-68 (F-68). Theo phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt là PS80. Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong hợp phần được cung cấp ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% (khối lượng/thể tích (w/v)) đến 0,2% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong hợp phần được cung cấp ở nồng độ bằng 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14%, 0,15%, 0,16%, 0,17%, 0,18%, 0,19%, 0,2%, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Đối với các phương án mà F-68 là chất hoạt động bề mặt, nồng độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,05% đến khoảng 0,2%. Đối với các phương án mà PS20, PS40, PS60, hoặc PS80 là chất hoạt động bề mặt, nồng độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,08%, ví dụ khoảng 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng.

Hợp phần được đề xuất trong bản mô tả này còn có chứa đệm có độ pH đệm cụ thể. Theo sáng chế, hợp phần có chứa đệm kali/natri photphat. Các khoảng nồng độ đối với đệm này có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 5 mM đến khoảng 20 mM, từ khoảng 8 mM đến khoảng 15 mM, từ khoảng 8 mM đến khoảng 13 mM, từ khoảng 9 mM đến khoảng 11 mM. Theo các phương án nhất định, đệm được cung cấp ở nồng độ bằng 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo các phương án nhất định, nồng độ đệm nằm trong khoảng từ khoảng 8 mM đến khoảng 15 mM. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa đệm ở nồng độ bằng 10 mM. Các khoảng độ pH đối với các đệm này có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng pH 6,5 đến khoảng pH 7,5, từ khoảng pH 6,6 đến khoảng pH 7,4, từ khoảng pH 6,7 đến khoảng pH 7,3, từ khoảng pH 6,8 đến khoảng pH 7,2, từ khoảng pH 6,9 đến khoảng pH 7,1. Theo các phương án nhất định, độ pH có thể là 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo phương án ưu tiên độ pH của đệm là 7,0. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa đệm kali/natri photphat ở nồng độ bằng 10 mM và ở độ pH bằng 7,0.

Dung dịch đệm kali/natri photphat có thể, ví dụ, có chứa kali từ K_2HPO_4 (đibazơ) hoặc KH_2PO_4 (monobazơ) và natri từ Na_2HPO_4 (đibazơ) hoặc NaH_2PO_4 (monobazơ). Theo các phương án nhất định, đệm kali/natri photphat có chứa kali photphat monobazơ (KH_2PO_4) và natri photphat đibazơ (Na_2HPO_4). Theo các phương án nhất định, đệm kali/natri photphat có chứa kali photphat đibazơ (K_2HPO_4) và natri photphat monobazơ (NaH_2PO_4). Tỷ lệ mol giữa các loại photphat monobazơ và các loại photphat đibazơ ($[H_2PO_4^-]/[HPO_4^{2-}]$), bất kể đối ion nào, nằm trong khoảng từ 5,13 đến 0,52.

Hợp phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể còn có chứa chất cải biến trương lực (đôi khi còn được gọi là 'chất làm ổn định'). Chất cải biến trương lực được sử dụng trong hợp phần theo sáng chế là sucroza hoặc sorbitol, tùy thuộc vào các tá dược khác, như được xác định trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sucroza. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sucroza ở khoảng nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 3% đến khoảng 12% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 3% đến khoảng 11% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 3% đến khoảng

10% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 4% đến khoảng 10% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 5% đến khoảng 9% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 6% đến khoảng 9% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án nhất định, sucroza được cung cấp ở nồng độ bằng 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa sucroza ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 3% đến khoảng 10%. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa sucroza ở nồng độ bằng 8%. Theo các phương án ưu tiên khác, hợp phần có chứa sorbitol. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa sorbitol ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 3% đến khoảng 8% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 3% đến khoảng 7% (khối lượng/thể tích), từ khoảng 4% đến khoảng 6% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án ưu tiên, hợp phần có chứa sorbitol ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 6% (khối lượng/thể tích). Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sorbitol ở nồng độ bằng khoảng 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa sorbitol ở nồng độ bằng 5%.

Hợp phần được đề xuất trong bản mô tả này còn có chứa chất chống oxy hóa. Chất chống oxy hóa được sử dụng trong hợp phần theo sáng chế là EDTA hoặc metionin, tùy thuộc vào các tá dược khác, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa EDTA. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa EDTA ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mM đến khoảng 1,5 mM, từ khoảng 0,2 mM đến khoảng 1,4 mM, từ khoảng 0,5 mM đến khoảng 1,3 mM, từ khoảng 0,7 mM đến khoảng 1,2 mM, từ khoảng 0,8 mM đến khoảng 1,2 mM, từ khoảng 0,9 mM đến khoảng 1,1 mM. Theo các phương án nhất định, EDTA được cung cấp ở nồng độ bằng 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa EDTA ở nồng độ bằng 1,0 mM. Hợp phần theo sáng chế mà có chứa EDTA cũng có chứa sucroza. Theo các phương án khác, hợp phần có chứa metionin. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa metionin ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5 mM đến khoảng 15 mM, từ khoảng 6 mM đến khoảng 14 mM, từ khoảng 7 mM đến khoảng 13 mM, từ khoảng 8 mM đến khoảng 12 mM, từ khoảng 9 mM đến khoảng 11 mM. Theo

phương án ưu tiên, hợp phần có chứa metionin ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 8 mM đến khoảng 12 mM. Theo các phương án nhất định, metionin được cung cấp ở nồng độ bằng 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, hoặc giá trị bất kỳ ở giữa chúng. Theo phương án ưu tiên, hợp phần có chứa metionin ở nồng độ bằng 10 mM. Hợp phần theo sáng chế có chứa metionin cũng có chứa sorbitol.

Sáng chế đề xuất hợp phần có chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên

O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysacarit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol; 10 mM metionin; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Sáng chế đề xuất hợp phần có chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần có chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên

O1A *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysaccharit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysaccharit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần về cơ bản gồm có polysaccharit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysaccharit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysaccharit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80. Sáng chế còn đề xuất hợp phần gồm có polysaccharit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysaccharit kháng nguyên O6A *E. coli*, và 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 polysaccharit kháng nguyên O *E. coli* khác, trong đó mỗi polysaccharit kháng nguyên O được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); 8% (khối lượng/thể tích) sucroza; 1 mM EDTA; 10 mM đệm kali/natri photphat ở độ pH bằng 7,0; và 0,02% PS80.

Hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể tùy ý có chứa thêm chất bảo quản, chẳng hạn như thimerosal dẫn xuất thủy ngân, phenoxietanol, hoặc paraben. Theo phương án cụ thể, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có chứa từ 0,001% đến 0,01% thimerosal. Theo các phương án khác, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này không có chứa chất bảo quản.

Theo các phương án nhất định, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, hợp phần gây miễn dịch) có chứa, hoặc được dùng ở dạng kết hợp với, chất phụ trợ. Chất phụ trợ để dùng ở dạng kết hợp với hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng hợp phần này. Theo một số phương án, thuật ngữ "chất phụ trợ" dùng để chỉ hợp chất mà khi được dùng ở dạng kết hợp hoặc dưới dạng một phần của hợp phần được mô tả trong bản mô tả này

làm gia tăng, tăng cường và/hoặc thúc đẩy đáp ứng miễn dịch đối với thể liên hợp sinh học, nhưng khi hợp chất phụ trợ được dùng một mình không tạo đáp ứng miễn dịch đối với thể liên hợp sinh học. Chất phụ trợ có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng nhiều cơ chế bao gồm, ví dụ, tuyển mộ tế bào lympho, kích thích tế bào B và/hoặc T, và kích thích đại thực bào. Theo các phương án nhất định, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này không có chứa chất phụ trợ nào ngoài thể liên hợp sinh học và tá được, và/hoặc không được dùng ở dạng kết hợp với chất phụ trợ nào ngoài thể liên hợp sinh học và tá được (trong trường hợp thể liên hợp sinh học hoặc tá được có chứa một số đặc tính chất phụ trợ bên trong, chúng không được lưu ý đến và không có chất phụ trợ bên ngoài khác nào được bổ sung theo các phương án này).

Các ví dụ cụ thể về chất phụ trợ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối nhôm (alum) (chẳng hạn như nhôm hydroxit, nhôm photphat, và nhôm sulfat), 3 monophosphoryl lipid A 3 được Đê-O-axyl hóa (MPL) (xem tài liệu Bằng Sáng Chế Vương Quốc Anh GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), hợp chất imidazopyridin (xem tài liệu WO2007/109812), hợp chất imidazoquinoxalin (xem tài liệu WO2007/109813) và saponin, chẳng hạn như QS21 (xem tài liệu Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,057,540). Các chất phụ trợ khác là nhũ tương dầu trong nước (chẳng hạn như dầu squalen hoặc dầu lạc), tùy ý ở dạng kết hợp với chất kích thích miễn dịch, chẳng hạn như monophosphoryl lipid A (xem tài liệu Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Chất phụ trợ khác là CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

Theo các phương án nhất định, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này được tạo chế phẩm để thích hợp cho đường dùng đã định cho đối tượng. Ví dụ, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể ví dụ được tạo chế phẩm để thích hợp cho việc dùng trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, đường miệng, trong mũi, trong da, qua da, kết tràng, trong màng bụng, trong khí quản, tại chỗ, trực tràng hoặc phổi. Theo các phương án nhất định, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này hữu dụng để dùng bằng cách tiêm trong cơ. Theo các phương án khác, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng trong da. Theo các phương án khác, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân phối qua da.

Theo khía cạnh khác, trong bản mô tả này sáng chế còn đề xuất hợp phần chất thuốc có chứa ít nhất là một trong bốn thể liên hợp được mô tả chi tiết trong bản mô tả này (tức là thể hiện kháng nguyên O từ các typ huyết thanh O25B, O1A, O2, hoặc O6A *E. coli*), trong chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Các hợp phần này chỉ chứa một hoặc tập hợp con của bốn thể liên hợp có thể ví dụ hữu dụng để lưu trữ kháng nguyên ở lượng lớn, ví dụ dưới dạng chất thuốc trước khi hóa hợp thành sản phẩm thuốc cuối cùng, và cùng mang các đặc điểm ổn định hữu dụng được mô tả đối với hợp phần sản phẩm thuốc có chứa cả bốn thể liên hợp.

Phương Pháp/Sử Dụng

Hợp phần theo sáng chế có thể, ví dụ, được sử dụng cho phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch đối với ExPEC ở đối tượng cần chúng. Tốt hơn là, đáp ứng miễn dịch có hiệu quả để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh có liên quan đến ExPEC ở đối tượng cần chúng. Phương pháp bao gồm bước dùng cho đối tượng hợp phần theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, hợp phần được đề xuất trong bản mô tả này có thể được lưu trữ trong vật chứa. Vật chứa thích hợp có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, túi, lọ, ống tiêm, chai, và ống nghiệm. Theo các phương án nhất định, lọ có nút bịt có khả năng bị chọc thủng bởi ống tiêm có chứa hợp phần bất kỳ trong số các hợp phần được mô tả trong bản mô tả này. Vật chứa được đề xuất trong bản mô tả này có thể được làm từ nhiều loại nguyên liệu chẳng hạn như thủy tinh (ví dụ, thủy tinh borosilicat), kim loại, hoặc chất dẻo (ví dụ, polycacbonat). Theo các phương án nhất định, vật chứa ví dụ là lọ bằng thủy tinh borosilicat loại I. Theo các phương án khác, vật chứa là ống tiêm thủy tinh có khóa luer hoặc kim đã cắm sẵn. Theo các phương án khác, vật chứa là lọ hoặc ống tiêm bằng nguyên liệu chất dẻo, chẳng hạn như polycacbonat (PC) hoặc polyetylen terephthalat glycol (PETG), nguyên liệu đó ví dụ được cho thấy là có thể tương thích với chất thuốc theo sáng chế. Lọ có thể tùy ý chứa nắp bịt cao su, ví dụ từ cao su (clo/brom)butyl được phủ bằng màng flopolyme (ví dụ Fluotec [etylen tetrafloetylen (EFTE)] hoặc Teflon [etylen propylen được flo hóa (FEP)]). Các loại nguyên liệu và vật chứa khác cũng có thể được sử dụng, và khả năng tương thích với chế phẩm theo sáng chế có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dựa trên bản mô tả này.

Theo các phương án nhất định, chất thuốc được lưu trữ trong vật chứa polycacbonat, ví dụ chai. Theo các phương án nhất định, chất thuốc được lưu trữ trong vật chứa polyetylen terephthalat glycol, ví dụ chai. Theo các phương án nhất định, sản phẩm thuốc được lưu trữ trong vật chứa thủy tinh, ví dụ lọ.

Chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này cải thiện độ ổn định của thể liên hợp glyco trong các hợp phần. Ổn định, thường có nghĩa là hợp phần duy trì độ ổn định vật lý và/hoặc độ ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi lưu trữ. Tốt hơn là, hợp phần về cơ bản duy trì độ ổn định vật lý và hóa học của nó và hoạt tính sinh học của nó khi lưu trữ. Độ ổn định vật lý, độ ổn định hóa học, và hoạt tính sinh học có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bằng cách sử dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Đối với sáng chế, hợp phần được coi là 'ổn định' (và chế phẩm tương ứng được coi là 'làm ổn định'), nếu có sự thay đổi 5% hoặc ít hơn ở tiền đỉnh HPLC sắc ký loại trừ kích thước (biểu thị sự kết tập của thể liên hợp glyco) so với thời điểm không, như được mô tả trong các ví dụ trong bản mô tả này. Ví dụ, hợp phần vắc xin ExPEC hiện hành (trong 25 mM Tris độ pH 7,4, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) thể hiện sự tăng hơn 5% của tiền đỉnh trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ 40°C, và do đó là không ổn định trong thời gian 8 tuần ở nhiệt độ này, trong khi đó hợp phần theo sáng chế thể hiện sự tăng ít hơn 5% của tiền đỉnh sau 12 tuần ở nhiệt độ 40°C và do đó là ổn định trong thời gian ít nhất là 12 tuần ở nhiệt độ này. Hợp phần theo sáng chế ổn định trong vật chứa thủy tinh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong thời gian ít nhất là 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 hoặc lâu hơn. Hợp phần theo sáng chế cũng ổn định trong vật chứa chất dẻo trong thời gian ít nhất là 7 ngày ở nhiệt độ 25°C, mà cho phép xử lý sản phẩm thể liên hợp glyco ExPEC trong các điều kiện này.

Theo các phương án nhất định, hợp phần trong bản mô tả này được đề xuất dưới dạng hợp phần lỏng. Hợp phần lỏng, có nghĩa là hợp phần ở dạng lỏng khi ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, và tốt hơn là được lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Tùy ý, hợp phần lỏng được lưu trữ ở nhiệt độ 25 °C hoặc

ở nhiệt độ 40 °C, ví dụ đối với thử nghiệm độ ổn định gia tăng trong các điều kiện áp lực nhiệt.

Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C, ở nhiệt độ 25 °C, hoặc ở nhiệt độ 40 °C. Theo phương án ưu tiên, hợp phần được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 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 hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ 25 °C trong thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, tháng hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần ổn định ở nhiệt độ 40 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 tuần, hoặc lâu hơn.

Theo các phương án nhất định, hợp phần trong bản mô tả này được đề xuất dưới dạng hợp phần kết đông. Hợp phần kết đông, có nghĩa là hợp phần ở dạng rắn khi được lưu trữ ở nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn khoảng -18°, ví dụ ở nhiệt độ khoảng -20°C, -40°C, -60°C, -70°C, -80°C hoặc nhiệt độ bất kỳ trong khoảng giữa chúng, hoặc thấp hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ -40 °C hoặc -60 °C tùy thuộc vào chất cải biến tương lực có mặt trong hợp phần. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được lưu trữ và ổn định ở nhiệt độ -70 °C. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sucroza và ổn định ở nhiệt độ -40 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 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, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 tháng, hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, hợp phần có chứa sorbitol và ổn định ở nhiệt độ -60 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 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, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 tháng, hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định hợp phần có chứa sorbitol hoặc sucroza và ổn định ở nhiệt độ -70 °C trong thời gian ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 năm, hoặc lâu hơn. Hợp phần theo sáng chế được thiết kế ổn định hơn so với chế phẩm hợp phần cũ được mô tả trước đây. Độ ổn định của hợp

phần có thể được xác định bởi các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Bằng cách sử dụng các phương pháp này, hợp phần theo sáng chế sẽ ổn định hơn trong khoảng thời gian nhất định ở nhiệt độ nhất định khi so với hợp phần của chế phẩm cũ trong cùng thời gian và ở cùng nhiệt độ.

Trong bản mô tả này sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều chế hợp phần như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp phần bao gồm bước bổ sung ít nhất là một kháng nguyên O *E. coli* liên kết cộng hóa trị với chất mang EPA, nước, muối đối với dung dịch đệm (tức là natri(đi)hydro photphat và kali(đi)hydro photphat [tức là Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 hoặc NaH_2PO_4 và K_2HPO_4]), chất cải biến trương lực (tức là sorbitol hoặc sucroza), chất chống oxy hóa (tức là metionin nếu chất cải biến trương lực là sorbitol, EDTA nếu chất cải biến trương lực là sucroza), và chất hoạt động bề mặt (ví dụ PS80) vào vật chứa, điều chỉnh độ pH đến độ pH mong muốn (tức là trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, ví dụ 7,0), và bước trộn các thành phần này sao cho tạo ra chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, các phương pháp điều chế hợp phần bao gồm bước bổ sung polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); nước; kali photphat; natri photphat; sorbitol; metionin; và PS80 vào vật chứa, điều chỉnh độ pH đến 7,0, và trộn mỗi thành phần sao cho nồng độ cuối của đệm kali/natri photphat là 10 mM có độ pH bằng 7,0, sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích), metionin là 10 mM, và PS80 là 0,02% (khối lượng/thể tích). Một cách điều chế chế phẩm, làm ví dụ và không làm giới hạn sáng chế, theo sáng chế như sau: bổ sung vào khoảng 3,5 lít nước: 3,3696 g KH_2PO_4 ($M_w = 136,09$ g/mol), 2,1635 g Na_2HPO_4 ($M_w = 141,96$ g/mol), 200 g sorbitol, 5,9684 g metionin ($M_w = 149,21$ g/mol), 8 ml của dung dịch dự trữ 10% (khối lượng/thể tích) PS80, mà dẫn đến độ pH bằng khoảng 6,73, mà sau đó được điều chỉnh bằng khoảng 500 μl NaOH 10 N đến độ pH đích = 7,0, và thể tích được điều chỉnh đến 4 lít bằng nước. Chế phẩm có chứa sucroza và EDTA thay cho sorbitol và metionin có thể được điều chế theo phương thức tương tự, mà rõ ràng đối với người

có hiểu biết chung thông thường và thông tin được đề xuất trong bản mô tả này. Một cách có thể có để điều chế hợp phần theo sáng chế là bằng cách trao đổi đệm, ví dụ sử dụng lọc dòng chảy tiếp tuyến, lọc, thẩm tách, sắc ký loại trừ kích thước, hoặc dạng tương tự, để trao đổi chế phẩm mà được điều chế như được mô tả ở trên đối với đệm bất kỳ trong đó thể liên hợp glyco ExPEC có mặt, ví dụ trong hoặc sau bước tinh chế thể liên hợp glyco ExPEC. Bước trao đổi đệm này là thông thường đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng thông tin nêu trong bản mô tả này.

Các ví dụ sau đây của sáng chế là để minh họa thêm bản chất sáng chế. Cần hiểu rằng các ví dụ sau đây không làm giới hạn sáng chế và phạm vi sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Phương án thực hiện sáng chế

Phương án 1 là hợp phần gây miễn dịch có chứa một hoặc nhiều polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, tốt hơn là cả bốn polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2 và O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 3% đến 8% (tốt hơn là từ 4% đến 6%) (khối lượng/thể tích) sorbitol; trong khoảng từ 5 đến 15 mM (tốt hơn là từ 8 đến 12 mM) metionin; trong khoảng từ 5 đến 20 mM (tốt hơn là từ 8 đến 15 mM) đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt.

Phương án 2 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 1, trong đó các polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2, và O6A *E. coli* ở tỷ lệ khối lượng bằng 1:1:1:1 hoặc 2:1:1:1.

Phương án 3 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích).

Phương án 4 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của metionin là 10 mM.

Phương án 5 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó nồng độ của đệm kali/natri photphat là 10 mM, và độ pH của đệm kali/natri photphat là 7,0.

Phương án 6 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó chất hoạt động bề mặt có chứa đầu ưa nước và đuôi kỵ nước, tốt hơn là, trong đó chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm gồm có F-68, PS20, và PS80.

Phương án 7 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 6, trong đó chất hoạt động bề mặt là PS80.

Phương án 8 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 7, trong đó nồng độ của chất hoạt động bề mặt là 0,02% (khối lượng/thể tích).

Phương án 9 là hợp phần gây miễn dịch có chứa:

polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);

5% (khối lượng/thể tích) sorbitol;

10 mM metionin;

6,19 mM đệm KH_2PO_4 và 3,81 mM Na_2HPO_4 ở độ pH bằng 7,0; và

0,02% (khối lượng/thể tích) PS80.

Phương án 10 là hợp phần gây miễn dịch có chứa một hoặc nhiều polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, tốt hơn là cả bốn polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2 và O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA); trong khoảng từ 3% đến 12% (tốt hơn là từ 3 đến 10%) (khối lượng/thể tích) sucroza; trong khoảng từ 0,1 đến 1,5 mM EDTA; trong khoảng từ 5 đến 20 mM (tốt hơn là từ 8 đến 15 mM) đệm kali/natri photphat ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5; và trong khoảng từ 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt.

Phương án 11 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 10, trong đó các polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2, và O6A *E. coli* ở tỷ lệ khối lượng bằng 1:1:1:1 hoặc 2:1:1:1.

Phương án 12 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 10 hoặc 11, trong đó nồng độ của sucroza là 8% (khối lượng/thể tích).

Phương án 13 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 10 đến 12, trong đó nồng độ của EDTA là 1 mM.

Phương án 14 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 10 đến 13, trong đó nồng độ của đệm kali/natri photphat là 10 mM, và độ pH của đệm kali/natri photphat là 7,0.

Phương án 15 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 10 đến 14, trong đó chất hoạt động bề mặt có chứa đầu ưa nước và đuôi kỵ nước, tốt hơn là trong đó chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm gồm có F-68, PS20, và PS80.

Phương án 16 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 15, trong đó chất hoạt động bề mặt là PS80.

Phương án 17 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án 16, trong đó nồng độ của chất hoạt động bề mặt là 0,02% (khối lượng/thể tích).

Phương án 18 là hợp phần gây miễn dịch có chứa:

polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E. coli*, polysacarit kháng nguyên O6A *E. coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);

8% (khối lượng/thể tích) sucroza;

1 mM EDTA;

đệm 10 mM kali/natri photphat (ví dụ 6,19 mM KH_2PO_4 và 3,81 mM Na_2HPO_4) ở độ pH bằng 7,0; và

0,02% (khối lượng/thể tích) PS80.

Phương án 19 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18, trong đó nồng độ đối với mỗi polysacarit kháng nguyên O nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến 200 $\mu\text{g/ml}$, tốt hơn là từ 1 đến 100 $\mu\text{g/ml}$, tốt hơn nữa là từ 2 đến 50 $\mu\text{g/ml}$, ví dụ từ khoảng 4 $\mu\text{g/ml}$ đến 32 $\mu\text{g/ml}$.

Phương án 20 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 19, trong đó tỷ lệ polysacarit:protein mang (khối lượng:khối

lượng) nằm trong khoảng từ khoảng 1:10 đến khoảng 1:2, ví dụ nằm trong khoảng từ khoảng 1:5 đến khoảng 1:2 đối với mỗi polysacarit kháng nguyên O.

Phương án 21 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 20 ở dạng lỏng thích hợp để dùng bằng cách tiêm hoặc truyền.

Phương án 22 là hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 để gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần chúng.

Phương án 23 là việc sử dụng hợp phần gây miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 để sản xuất thuốc để gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng cần chúng.

Phương án 24 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 trong vật chứa thủy tinh.

Phương án 25 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 trong vật chứa polycacbonat.

Phương án 26 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 trong vật chứa polyetylen terephthalat glycol.

Phương án 27 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 trong lọ.

Phương án 28 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 trong ống tiêm.

Phương án 29 là hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 hoặc từ 24 đến 28, ổn định trong thời gian ít nhất là 6 tháng, tốt hơn là ít nhất là 12 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 18 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 24 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, tháng hoặc lâu hơn, khi được lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Phương án 30 là phương pháp duy trì ổn định hợp phần gây miễn dịch lỏng có chứa kháng nguyên O *E. coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA, bao gồm bước lưu trữ hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 21 hoặc từ 24 đến 29 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong thời gian ít nhất là 6 tháng, tốt hơn là ít nhất là 12 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 18 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 24 tháng, tốt hơn nữa là ít nhất là 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, tháng hoặc lâu hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Việc bổ sung chất hoạt động bề mặt ngăn cản sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC do kết đông/rã đông gây ra.

Để xác định dạng kết hợp tá dược nào có thể được bổ sung vào các polysacarit kháng nguyên O25B, O1A, O2, O6A *E. coli* mỗi loại độc lập được liên kết cộng hóa trị với ngoại độc tố A riêng biệt (tức là tổng cộng bốn thể liên hợp glyco riêng biệt) của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), dưới đây được gọi là thể liên hợp glyco ExPEC, để hỗ trợ sự làm ổn định khi kết đông/rã đông, khuấy trộn, áp lực do nhiệt gây ra, và áp lực oxy hóa do kim loại gây ra, các tá dược khác nhau được bổ sung vào chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC ban đầu (thể liên hợp glyco ExPEC, 25 mM Tris, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) (dưới đây được gọi là chế phẩm "Cũ", là chế phẩm được sử dụng hiện nay trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 2 đối với thể liên hợp glyco ExPEC, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02546960), và chế phẩm thu được được thử nghiệm về sự làm ổn định tăng lên bằng các phương pháp thích hợp.

Trong chế phẩm cũ (đôi khi còn được gọi là "đối chứng" trong bản mô tả này), thể liên hợp glyco ExPEC kết tập khi chịu áp lực do kết đông/rã đông gây ra. Có thể nhìn thấy sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC dưới dạng tiền đỉnh trong biên dạng sắc ký lỏng hiệu năng cao-sắc ký loại trừ kích thước (SEC-HPLC) (xem, ví dụ, Hình 1A và Hình 1B), trong đó tiền đỉnh 1 là dấu hiệu chỉ thị cho tính không ổn định khi chịu áp lực.

Ban đầu, chất bảo vệ lạnh (ví dụ, sorbitol) được bổ sung vào chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC và chế phẩm tiếp theo được thử nghiệm để xác định liệu độ ổn định có tăng lên khi chịu áp lực do kết đông/rã đông gây ra hay không. Phát hiện ra rằng việc bổ sung sorbitol không bảo vệ thể liên hợp glyco ExPEC khỏi sự kết tập do kết đông/rã đông gây ra khi được đo bằng SEC-HPLC (Hình 1B).

Tuy nhiên đáng ngạc nhiên là, việc bổ sung chất hoạt động bề mặt (ví dụ, F-68 [còn được gọi là poloxamer 188, hoặc Pluronic F-68], PS20, hoặc PS80) vào chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC đã làm tăng độ ổn định của thể liên hợp glyco ExPEC khi chịu áp lực do kết đông/rã đông gây ra. Cụ thể là, chất hoạt động bề mặt ngăn cản sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC khi tiếp xúc với áp lực do kết đông/rã đông gây ra. Việc bổ sung 0,01% PS-80, 0,01% PS 20, hoặc 0,1% F-68 (đều là khối

lượng/thể tích) vào thể liên hợp glyco ExPEC ngăn cản sự kết tập do kết đông/rã đông gây ra khi được đo bằng SEC-HPLC (Hình 1B và Hình 1C). Mỗi chất hoạt động bề mặt được thử nghiệm (đều là chất hoạt động bề mặt không ion) được tạo thành bởi đầu ưa nước (có chứa nhóm OH) và đuôi kỵ nước dài (chuỗi cacbon, có thể có chứa ít nhất là khoảng 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130, cacbon hoặc nhiều cacbon hơn trong chuỗi cacbon). Mặc dù không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng các đặc tính vật lý này cho phép chất hoạt động bề mặt được thử nghiệm ngăn cản sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC do kết đông/rã đông gây ra. Để phát triển thêm, PS80 được sử dụng làm tá dược để ngăn cản sự kết tập do kết đông/rã đông gây ra, vì chất hoạt động bề mặt đặc biệt này có các ưu điểm khác có liên quan đến việc dễ dàng thực hiện để phát triển thể liên hợp glyco ExPEC giai đoạn sau.

Ví dụ 2: Đánh giá chế phẩm về đệm, giá trị độ pH, và chất cải biến trương lực.

Sau khi chứng minh rằng chất hoạt động bề mặt có khả năng ngăn cản sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC do kết đông/rã đông gây ra, đệm, độ pH, và chất cải biến trương lực thích hợp cho chế phẩm được khảo sát. Trong thí nghiệm tiếp theo, một vài chế phẩm được khảo sát, gồm các dạng kết hợp đệm-độ pH khác nhau, trong sự có mặt của NaCl (150 mM) hoặc 5% sorbitol (khối lượng/thể tích) làm chất cải biến trương lực, và tất cả đều chứa PS80 (0,01% (khối lượng/thể tích)). Chế phẩm cũ (25 mM Tris, độ pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) được sử dụng làm đối chứng. Nhiều nồng độ của thể liên hợp glyco ExPEC (ví dụ như 16 hoặc 8 µg/ml đối với mỗi polysacarit) được thử nghiệm, nhưng chúng tôi không quan sát thấy tác dụng của sự khác biệt nồng độ trong việc làm ổn định chế phẩm được thử nghiệm (dữ liệu không được thể hiện).

Một vài áp lực đã được áp dụng cho các chế phẩm này bao gồm kết đông/rã đông, khuấy trộn, phơi sáng, và áp lực nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau (ví dụ, trong khoảng từ 2 đến 8°C, 25°C, và 40 °C) (Bảng 1).

Bảng 1: Các điều kiện áp lực được áp dụng cho chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC đã được tạo chế phẩm lại

Áp Lực	Điều Kiện	Thời Điểm
Nhiệt Độ	5 °C	0, 4, 8, 12 tuần
	25 °C	2, 4, 8 tuần
	40 °C	1, 2, 4 tuần
Khuấy Trộn	Tạo Xoáy (1000 vòng/phút ở nhiệt độ môi trường)	4 giờ
Kết Đông/Rã Đông	từ -70 °C đến nhiệt độ môi trường	5 chu kỳ liên tiếp
Tính Nhạy Sáng	Phơi Sáng (ICH Q1B tùy chọn 2)	200 W/m ² ánh sáng UV-A (~6 giờ) + 1200 klux-giờ ánh sáng nhìn thấy (~40 giờ)

Bảng 2: Gói phân tích để phân tích chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC đã được tạo chế phẩm lại

Phương Pháp Phân Tích	Mục đích
Kiểm tra bằng mắt	Bề ngoài và độ rõ ràng
Độ pH	Tính axit hoặc tính bazơ của mẫu
Nồng độ osmol	Nồng độ osmol
SEC-HPLC	Độ tinh khiết, kết tập, phân cắt
HPLC-pha đảo (RP)	Độ tinh khiết, sự cải biến hóa học
Tập Trung Điểm Điện (IEF)	Độ tinh khiết, sự cải biến hóa học
Tán sắc ánh sáng động lực (DLS)	Các hạt dưới mức nhìn thấy
FlowCAM	Các hạt dưới mức nhìn thấy

Bằng cách sử dụng gói phân tích được mô tả trong Bảng 2, đã chứng minh được rằng chế phẩm chứa histidin ở độ pH 7 hoặc kali photphat ở độ pH 7 ổn định hơn so với các dạng kết hợp đệm-độ pH khác (dữ liệu không được thể hiện). Ngoài ra, ở các giá trị pH cực trị (tức là, pH 5,0 và pH 8,0), xuất hiện nhiều sự kết tập hơn của thể liên hợp glyco ExPEC. Ngoài ra, đã quan sát thấy rằng chế phẩm chứa sorbitol làm chất cải biến trương lực làm ổn định nhiều hơn so với chế phẩm chứa NaCl làm chất cải biến trương lực. Trên thực tế, đã quan sát thấy rằng chế phẩm chứa NaCl không thể làm ổn định thể liên hợp glyco ExPEC chống lại sự kết tập trong quá trình lưu trữ ở nhiệt độ 40 °C. Khi sorbitol được sử dụng làm chất cải biến trương lực, sự kết tập của thể liên hợp glyco ExPEC không xảy ra, chứng tỏ rằng sorbitol có tác dụng làm ổn định đáng ngạc nhiên. Ngoài ra, sự kết tập ở các cực trị pH (tức là, pH

5,0 và pH 8,0) được làm giảm trong các chế phẩm chứa sorbitol so với các chế phẩm chứa NaCl. Điều này thể hiện rằng sorbitol làm cho chế phẩm mạnh hơn và có khả năng mang lại tác dụng làm ổn định cho thể liên hợp glyco ExPEC ngay cả khi xảy ra sự khác biệt pH trong quá trình sản xuất.

Ví dụ 3: Đánh giá chế phẩm về độ ổn định.

Các chế phẩm khác được thiết kế để nhận diện chế phẩm ứng viên tốt nhất đối với độ ổn định của thể liên hợp glyco ExPEC. Đối với các đệm và độ pH, histidin được đánh giá ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0, và thay vì chỉ là kali photphat, đệm kali/natri photphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) được đánh giá ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0. Sự kết hợp của kali và natri được chọn dựa trên các kết quả ban đầu, và tốt hơn là gồm khả năng đệm pH cục bộ khi kết đông/rã đông. Kali chiếm ưu thế hơn natri trong điều chế hệ đệm (ví dụ, đối với 10 mM đệm photphat có độ pH = 7,0, chúng tôi sử dụng 6,19 mM KH_2PO_4 và 3,81 mM Na_2HPO_4). Để làm chất cải biến trương lực, sucroza (8% (khối lượng/thể tích)) và sorbitol (5% (khối lượng/thể tích)) được đánh giá. Ngoài ra, các tác dụng của việc bổ sung chất chống oxy hóa EDTA (1 mM) hoặc metionin (10 mM) được đánh giá. Nổ cũng được thử nghiệm liệu khi không có NaCl hoặc có mặt sorbitol có mang lại tác dụng bảo vệ được quan sát thấy trong ví dụ 2, bằng cách bao gồm chế phẩm mà có chứa dạng kết hợp của các thành phần này (mỗi thành phần ở một nửa nồng độ so với khi các thành phần này được sử dụng riêng lẻ như trong ví dụ 2). Tất cả chế phẩm chứa PS80 ở nồng độ bằng 0,02% (khối lượng/thể tích).

Các chế phẩm khác nhau chịu cùng điều kiện áp lực được mô tả trong ví dụ 2. Dựa trên sự kết hợp dữ liệu về độ ổn định, thực hiện bước chọn lọc, trong đó hiệu suất của mỗi chế phẩm được đánh giá và loại trừ dựa trên tiêu chuẩn sau đây: (a) hậu-đỉnh bổ sung có thể nhìn thấy được trên biểu đồ sắc ký RP-HPLC ở ít nhất là hai trong ba thời điểm đối với mỗi nhiệt độ; (b) tiền đỉnh 1 có thể nhìn thấy được/tăng lên trên biểu đồ sắc ký SEC-HPLC ở ít nhất là hai trong ba thời điểm đối với mỗi nhiệt độ; (c) hậu-đỉnh bổ sung có thể nhìn thấy được trên biểu đồ sắc ký SEC-HPLC sau khi chịu áp lực (ví dụ, khuấy trộn, kết đông/rã đông, phơi sáng); và (d) tiền đỉnh 1 có thể nhìn thấy được/tăng lên trên SEC-HPLC sau khi chịu áp lực (ví dụ, khuấy trộn, kết đông/rã đông, phơi sáng). Phát hiện ra rằng hai chế phẩm cụ thể, tên là chế

phẩm 26 và chế phẩm 28 trong bản mô tả này, có khả năng tạo ra thể liên hợp glyco ExPEC để chịu được mỗi điều kiện áp lực được thử nghiệm.

Chế phẩm 26 có chứa 10 mM đệm Na/K photphat độ pH 7,0, 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol, 10 mM metionin, 0,02% (khối lượng/thể tích) PS-80, và thể liên hợp glyco ExPEC.

Chế phẩm 28 có chứa 10 mM đệm Na/K photphat độ pH 7,0, 8% sucroza, 1 mM EDTA, 0,02% PS-80, và thể liên hợp glyco ExPEC.

Đáng ngạc nhiên là, các dạng kết hợp cụ thể của chất cải biến trương lực và chất chống oxy hóa là thích hợp, như chế phẩm có chứa (i) sorbitol với metionin, hoặc (ii) sucroza với EDTA, tốt hơn là (a) chế phẩm trong đó sorbitol được kết hợp với EDTA, cũng như là (b) chế phẩm trong đó sucroza được kết hợp với metionin, và (c) chế phẩm trong đó không có mặt chất chống oxy hóa. Cũng đáng ngạc nhiên là, đã phát hiện ra rằng chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC tốt hơn là không chứa natri clorua. Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 có thể được thay đổi trong các khoảng giá trị, trong khi vẫn được kỳ vọng là làm ổn định thể liên hợp glyco ExPEC. Bảng 3 nêu các khoảng giá trị có thể áp dụng về độ pH và nồng độ tá được đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28.

Bảng 3: Các khoảng giá trị pH và nồng độ tá được đối với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC

Tá được	Khoảng giá trị	
Độ pH	6,5	7,5
K/Na photphat (mM)	5	20
Sorbitol (%) (khối lượng/thể tích)	3	8
Sucroza (%) (khối lượng/thể tích)	3	12
Metionin (mM)	5	15
EDTA (mM)	0,1	1,5
Chất hoạt động bề mặt (%) F-68 PS20 PS80	0,05	0,2
	0,01	0,08
	0,01	0,08

Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 còn được thử nghiệm trong nghiên cứu xác nhận để so sánh từng cái một với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC cũ (thể liên hợp

glyco ExPEC, 25 mM Tris, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl). Cả hướng lọ thẳng đứng và hướng lọ lộn ngược được thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của sự tiếp xúc với nút bịt của vật chứa cuối cùng. Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 được tạo ra bởi tá dược mà không có mối lo lắng bất kỳ về độ an toàn ở các nồng độ được dự tính, được sử dụng trong vắc xin được cấp phép và/hoặc được liệt kê dưới dạng tá dược được phê chuẩn để dùng ngoài đường tiêu hóa. Sự kết hợp của các tá dược này đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28 và giá trị pH của dung dịch đệm góp phần vào tác dụng làm ổn định được cải thiện của thể liên hợp glyco ExPEC so với chế phẩm thể liên hợp glyco ExPEC cũ. Sự kết hợp được dự tính của các tá dược này đối với chế phẩm 26 và chế phẩm 28 chứng tỏ sự bảo toàn chất thuốc (DS) và sản phẩm thuốc (DP) của vắc xin thể liên hợp glyco ExPEC khi kết đông/rã đông và áp lực nhiệt (ví dụ, Hình 2), trong khi tuân theo độ ổn định mong đợi theo hướng khi lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8 °C và 25 °C (dữ liệu không được thể hiện). Nồng độ polysacarit được thử nghiệm đối với DP là 20 µg/ml đối với mỗi chủng (tổng số 80 µg/ml), và nồng độ protein tổng cộng là 300 µg/ml. Đối với DS của typ huyết thanh O25B (tức là chứa polysacarit kháng nguyên O25B *E. coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA), nồng độ được thử nghiệm của polysacarit là 200 µg/ml và nồng độ được thử nghiệm của protein là 830 µg/ml. Hợp phần này ổn định theo thời gian.

Cho đến nay, sản phẩm thuốc trong chế phẩm 26 và chế phẩm 28 thể hiện độ ổn định trong thời gian ít nhất là 6 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, ít nhất là sáu tháng ở nhiệt độ 25°C, và các nghiên cứu độ ổn định đang diễn ra.

Ví dụ 4: Đánh giá chế phẩm về áp lực oxy hóa do kim loại gây ra.

Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 được đánh giá thêm về tác dụng làm ổn định của chúng đối với thể liên hợp glyco ExPEC khi có mặt vonfram, dưới dạng mô hình đối với sự oxy hóa sản phẩm do kim loại gây ra. Các gốc vonfram thường có mặt ở đầu của ống tiêm thủy tinh đã nhồi sẵn (PFS), mà là kết quả của quá trình tạo đầu bằng chốt vonfram. Sự kết tủa của các gốc vonfram trong PFS phụ thuộc vào quá trình sản xuất và có thể thay đổi giữa các nhà sản xuất PFS trong khoảng giá trị từ 250 đến 1250 nanogram/thân. Vonfram có liên quan đến sự kết tập protein trong PFS (Jiang et al., J. Pharmaceutical Sci. 98(12): 4695-710 (2009); Seidl et al., Pharmaceutical Res. 29:1454-67 (2012)). Do đó, độ ổn định của chế phẩm 26 và chế phẩm 28 và chế phẩm

cũ đã được khảo sát khi tiếp xúc với vonfram ở các nồng độ khác nhau trong khi theo dõi áp lực oxy hóa và xu hướng kết tập thể liên hợp glyco ExPEC. Trong đánh giá này, có ba mức vonfram (cao (HW), vừa (MW), và thấp (LW)) được thử nghiệm bao phủ tất cả các mức của gốc vonfram có mặt PFS có sẵn hiện nay trên thị trường. Các điều kiện áp lực áp dụng cho chế phẩm được tóm tắt trong Bảng 4.

Bảng 4: Các điều kiện áp lực được áp dụng cho các chế phẩm chứa vonfram

Áp Lực	Điều Kiện	Thời Điểm
Nhiệt Độ	40 °C	0, 1, 2, và 4 tuần
Khuấy Trộn	Tạo Xoáy (200 vòng/phút ở nhiệt độ môi trường)	giờ

Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 đã được thể hiện có lượng kết tập nhỏ nhất của thể liên hợp glyco ExPEC theo thời gian, như được chứng tỏ bằng cách phân tích SEC-HPLC (tiền đỉnh 1 biểu thị độ ổn định). Mức tiền đỉnh trong thời gian 4 tuần chỉ đạt được 3,1% khi so với 1,0% ở T-0, ngay cả khi tiếp xúc với mức vonfram cao nhất (tăng trung bình 0,5% mỗi tuần, Hình 3).

Do đó sáng chế đề xuất hai chế phẩm lỏng đã được cải thiện đối với vắc xin thể liên hợp glyco ExPEC. Hợp phần, được ưu tiên nhất, thứ nhất có chứa thể liên hợp glyco ExPEC, sorbitol, metionin, đệm K/Na-phosphat có độ pH 7 và chất hoạt động bề mặt. Hợp phần ưu tiên thứ hai có chứa thể liên hợp glyco ExPEC, sucroza, EDTA, đệm K/Na-phosphat độ pH 7 và chất hoạt động bề mặt. Các hợp phần này có ưu điểm hơn hợp phần được mô tả trước đây mà khi lưu trữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, vắc xin thể liên hợp glyco ExPEC thể hiện biên dạng độ ổn định tốt hơn trong chế phẩm mới theo sáng chế, trong đó sự kết tập và thoái biến sản phẩm tạo thành đã được ngăn cản, như được thể hiện theo các thử nghiệm biểu thị độ ổn định (SEC-HPLC và RP-HPLC). Tác dụng làm ổn định của cả hai chế phẩm mới theo sáng chế rõ ràng hơn khi kết đông/rã đông, áp lực nhiệt (40°C), và áp lực oxy hóa do kim loại gây ra khi được phân tích bằng các kỹ thuật phân tích đã nêu. Các dấu hiệu này cho phép có nhiều tùy chọn lưu trữ và vận chuyển đối với cả DS và DP cho vắc xin thể liên hợp glyco ExPEC. Ngoài ra, các đặc tính đã được cải thiện đối với việc chịu được áp lực oxy hóa do kim loại gây ra, cũng có thể được áp dụng trong việc lưu trữ dài hạn vắc xin ExPEC trong hệ thống đóng gói cơ bản thay thế (ví dụ ống tiêm đã nhồi sẵn và/hoặc các dụng cụ có thể áp dụng).

Ví dụ 5: Đánh giá chế phẩm về khả năng tương thích với các nguyên liệu chất dẻo.

Chế phẩm 26 và chế phẩm 28 được đánh giá thêm về tác dụng làm ổn định của chúng đối với chất thuốc thể liên hợp glyco ExPEC (thể liên hợp O25B, nồng độ được thử nghiệm của polysacarit nằm trong khoảng từ 227 đến 242 $\mu\text{g/ml}$ và của protein nằm trong khoảng từ 952 đến 1048 $\mu\text{g/ml}$) khi tiếp xúc với các nguyên liệu chất dẻo khác nhau chẳng hạn như polycacbonat (PC) và polyetylen terephthalat glycol (PETG). Các nguyên liệu chất dẻo có liên quan đến sự thoái biến protein, ví dụ khi nguyên liệu chất dẻo đã được vô trùng bằng cách chiếu xạ. Chế phẩm đã được thử nghiệm về độ ổn định dưới áp lực khuấy trộn do xóc (24 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng) trong các vật chứa PETG và PC. Chế phẩm cũ chứng tỏ sự thoái biến hoàn toàn trong các điều kiện này trong vật chứa PETG. Ngược lại, như được chứng tỏ bằng phân tích SEC-HPLC (xem tài liệu Hình 4, bằng cách sử dụng tiền đỉnh 1 làm dấu hiệu chỉ thị cho tính không ổn định), chế phẩm 26 và chế phẩm 28 vẫn ổn định trong cùng điều kiện trong các vật chứa PETG và PC được thử nghiệm. Ngoài ra, đã quan sát thấy độ ổn định của chất thuốc trong các chế phẩm này được lưu trữ trong thời gian bảy ngày trong các vật chứa PC và PETG ở nhiệt độ 25°C (dữ liệu không được thể hiện).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hộp phần bao gồm:

a. ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli*, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);

b. 3% tới 8% (khối lượng/thể tích) sorbitol;

c. 5 tới 15 mM metionin;

d. 5 tới 20 mM đệm photphat bao gồm kali photphat và natri photphat ở pH 6,5 tới 7,5;

e. 0,01% tới 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt; và

f. nước.

2. Hộp phần theo điểm 1, trong đó nồng độ của sorbitol là 5% (khối lượng/thể tích).

3. Hộp phần theo điểm 1, trong đó nồng độ của metionin là 10 mM.

4. Hộp phần theo điểm 1, trong đó nồng độ của đệm photphat là 10 mM, và pH của đệm photphat là 7,0.

5. Hộp phần theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion.

6. Hộp phần theo điểm 5, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80 (PS80).

7. Hộp phần theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm chỉ bao gồm poloxamer 188, polysorbat 20 (PS20), và polysorbat 80 (PS80).

8. Hộp phần theo điểm 1, mà ổn định khoảng ít nhất 6 tháng khi được giữ ở nhiệt độ 2-8 °C.

9. Hộp phần theo điểm 1, bao gồm hai hoặc nhiều polysacarit kháng nguyên O *E.coli*, trong đó nồng độ của mỗi trong số polysacarit kháng nguyên O *E.coli* là độc lập khoảng 1 đến 200 µ/mL.

10. Hộp phần theo điểm 1, mà ổn định khoảng ít nhất 6 tháng khi được giữ ở nhiệt độ -18 °C đến -80 °C.

11. Hộp phần theo điểm 1, là hộp phần gây miễn dịch.

12. Hộp phần theo điểm 1, trong hộp đựng bằng thủy tinh, polycarbonat, hoặc polyetylen terephthalat.

13. Hợp phần bao gồm:

- a. ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli*, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);
- b. 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 10 mM metionin;
- d. 10 mM đệm photphat bao gồm KH_2PO_2 và Na_2HPO_4 ở pH 7,0;
- e. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80 (PS80); và
- f. nước.

14. Hợp phần theo điểm 13, là hợp phần gây miễn dịch.

15. Phương pháp để điều chế hợp phần theo điểm 1, phương pháp bao gồm trộn:

- a. ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli*, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);
- b. 3% đến 8% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 5 đến 15 mM metionin;
- d. 5 đến 20 mM đệm photphat bao gồm kali photphat và natri photphat ở pH 6,5 đến 7,5;
- e. 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt; và
- f. nước, để điều chế hợp phần.

16. Phương pháp theo điểm 15, còn bao gồm giữ hợp phần ở nhiệt độ 2-8 °C khoảng ít nhất 6 tháng.

17. Phương pháp theo điểm 15, còn bao gồm giữ hợp phần ở nhiệt độ -18 °C đến -80 °C khoảng ít nhất 6 tháng.

18. Phương pháp duy trì ổn định polysacarit kháng nguyên O *E.coli* trong hợp phần lỏng, bao gồm việc điều chế hợp phần lỏng và giữ hợp phần lỏng ở nhiệt độ 2-8 °C, hợp phần lỏng bao gồm:

- a. 1 đến 200 µg/mL của polysacarit kháng nguyên O *E.coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA);
- b. 3% đến 8% (khối lượng/thể tích) sorbitol;
- c. 5 đến 15 mM metionin;

d. 5 đến 20 mM đệm photphat bao gồm kali photphat và natri photphat ở pH 6,5 đến 7,5;

e. 0,01% đến 0,2% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt, và

f. nước.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó hợp phần lỏng được giữ ở nhiệt độ 2-8 °C khoảng ít nhất 6 tháng.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó hợp phần lỏng bao gồm:

a. 1 đến 200 µg/mL của polysacarit kháng nguyên O *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA, tùy chọn một hoặc nhiều polysacarit kháng nguyên O *E.coli* khác được liên kết cộng hóa trị với protein mang EPA;

b. 5% (khối lượng/thể tích) sorbitol;

c. 10 mM metionin;

d. 10 mM đệm photphat bao gồm KH_2PO_2 và Na_2HPO_4 ở pH 7,0;

e. 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80 (PS80); và f. nước.

21. Hợp phần theo điểm 1, trong ống tiêm.

22. Hợp phần theo điểm 1, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli*.

23. Hợp phần theo điểm 1, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O1A *E.coli*.

24. Hợp phần theo điểm 1, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O2 *E.coli*.

25. Hợp phần theo điểm 1, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O6A *E.coli*.

26. Hợp phần theo điểm 1, bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E.coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E.coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E.coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O độc lập liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

27. Hợp phần theo điểm 1, bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli* và 1-20 polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bổ sung, trong đó mỗi polysacarit kháng

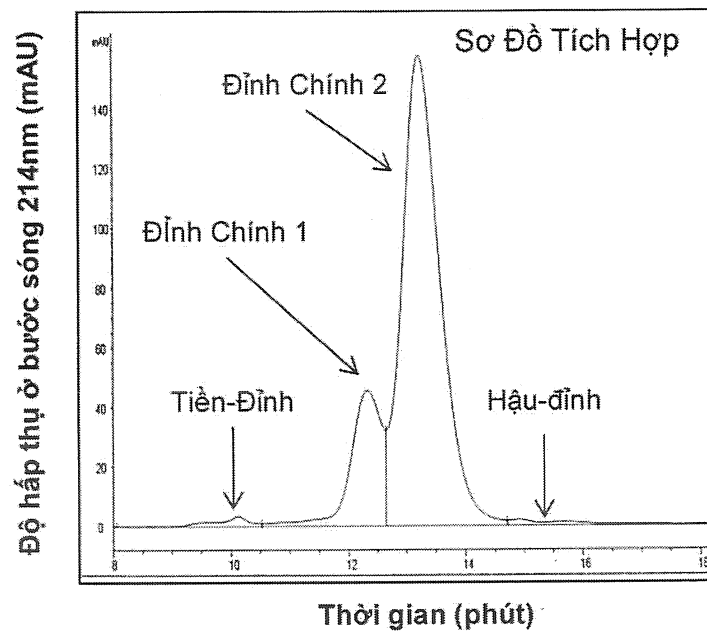
nguyên O độc lập liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

28. Hợp phần theo điểm 13, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli*.

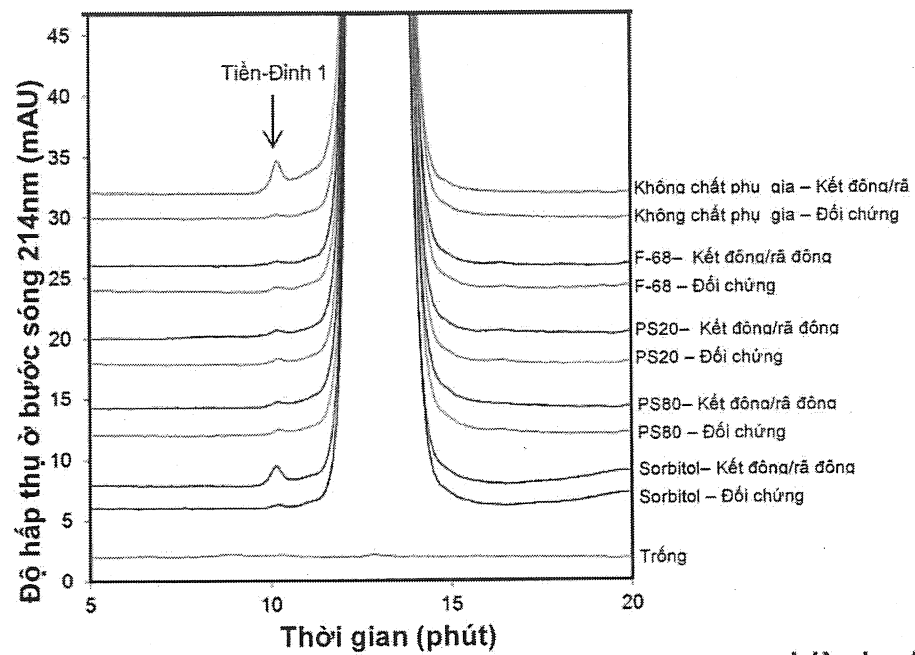
29. Hợp phần theo điểm 13, bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli*, polysacarit kháng nguyên O1A *E.coli*, polysacarit kháng nguyên O2 *E.coli*, và polysacarit kháng nguyên O6A *E.coli*, trong đó mỗi polysacarit kháng nguyên O độc lập liên kết cộng hóa trị với protein mang ngoại độc tố A của *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

30. Phương pháp theo điểm 18, trong đó ít nhất một polysacarit kháng nguyên O *E.coli* bao gồm polysacarit kháng nguyên O25B *E.coli*.

A.

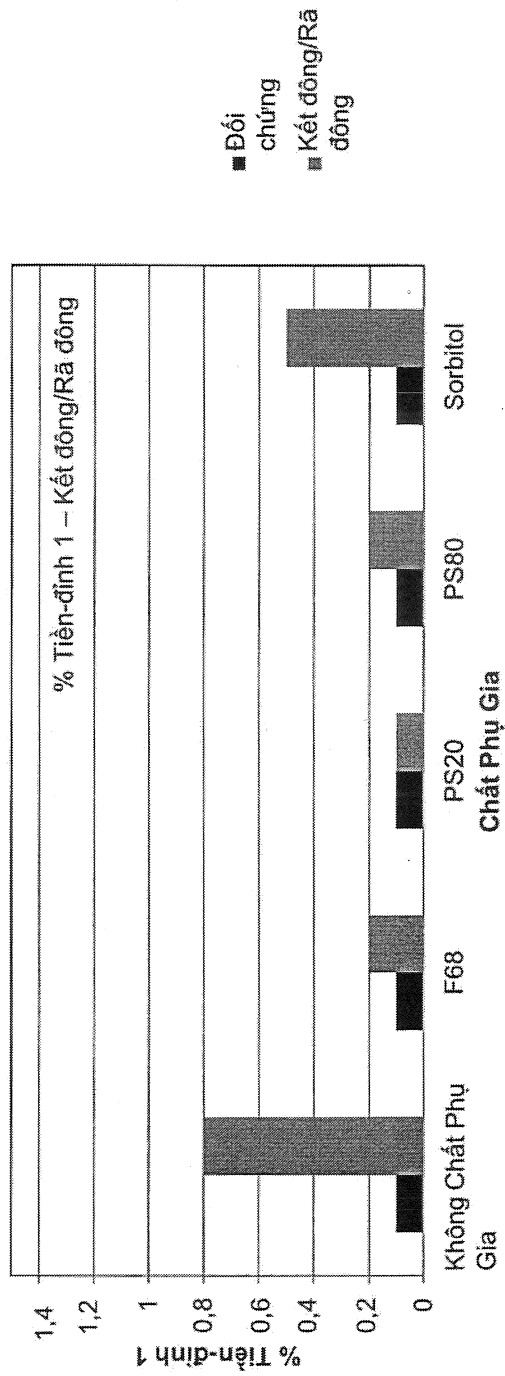


B.

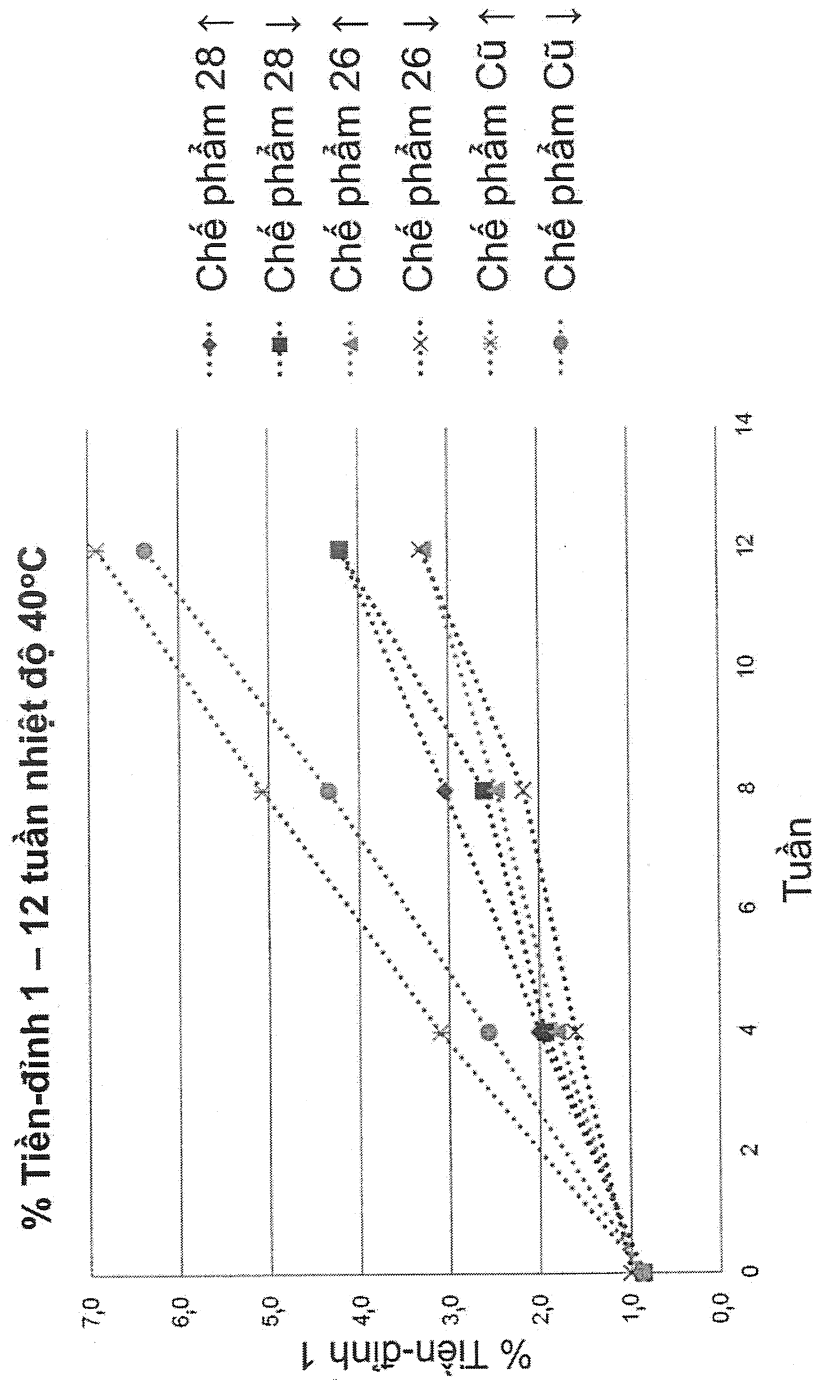


Hình 1

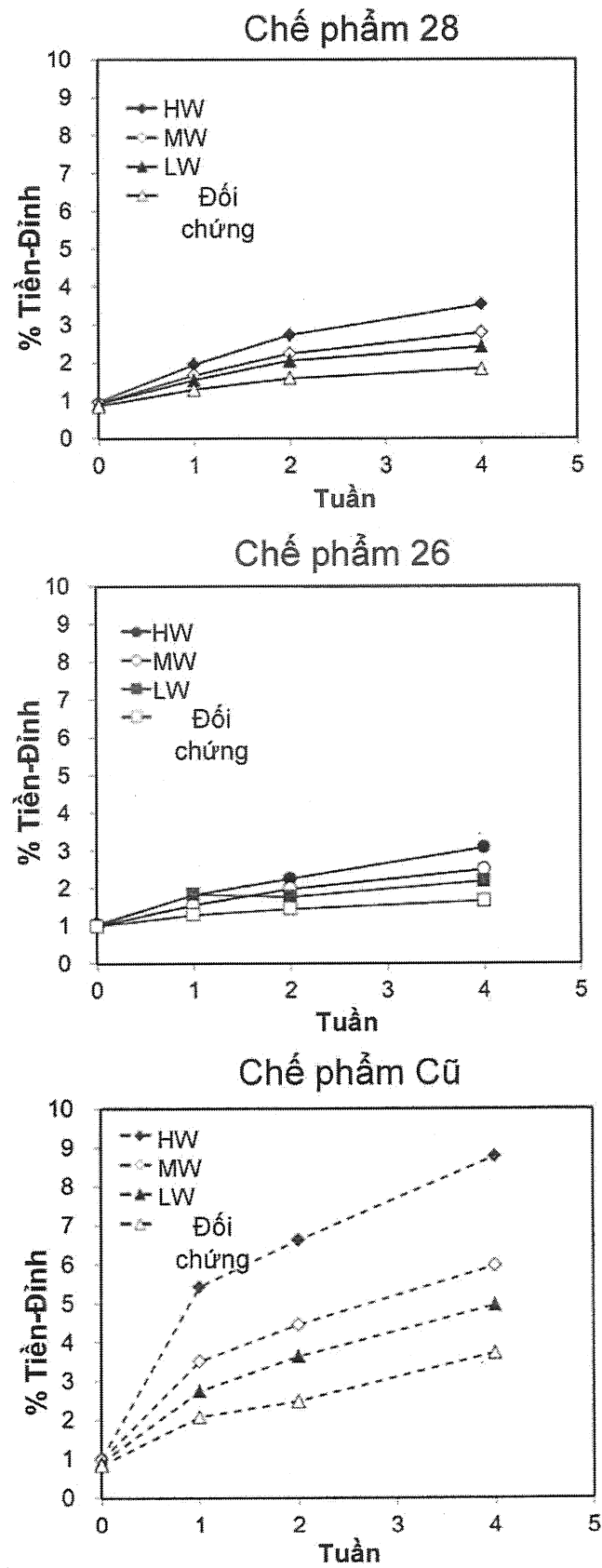
C.

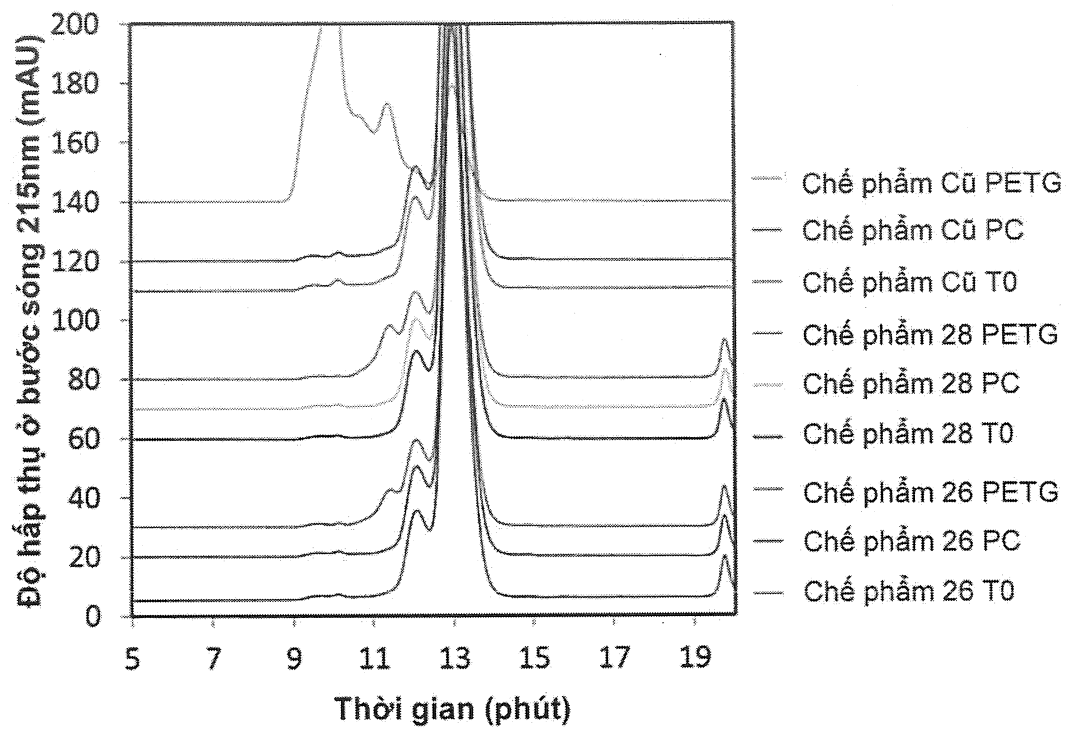


Hình 1 – tiếp



Hình 2

**Hình 3**

**Hình 4**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Vaccines & Prevention B.V.
 Labovitiadi, Olga
 Tonnis, Wouter
 Doro, Francesco
 Adriaansen, Janik

<120> HỢP PHẦN GÂY MIỄN DỊCH, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP PHẦN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP DUY TRÌ ỔN ĐỊNH HỢP PHẦN GÂY MIỄN DỊCH LỎNG

<130> 0281 WO 00 ORD

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 612

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> ngoại độc tố A đã được khử độc của *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 1

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
 35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
 50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
 85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn

1490149ENVI_Sequences.txt

100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
 115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
 130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
 145 150 155 160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
 165 170 175

Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 180 185 190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
 195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
 210 215 220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
 245 250 255

Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Ala Phe
 260 265 270

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
 275 280 285

Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300

1490149ENVI_Sequences.txt

Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335

Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350

Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400

Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 405 410 415

Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445

Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460

Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495

Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Trp Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510

1490149ENVI_Sequences.txt

Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525

Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Val Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala
 545 550 555 560

Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn
 565 570 575

Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala
 580 585 590

Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg
 595 600 605

Glu Asp Leu Lys
 610

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> trình tự liên ứng glycosyl hóa được liên kết N được ưu tiên

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Asp hoặc Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ ngoại trừ Pro

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <222> (4)..(4)

1490149ENVI_Sequences.txt

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ ngoại trừ Pro

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẬP

<222> (5)..(5)

<223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<400> 2

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa

1 5