



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

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

(11)



1-0035896

(51)⁷ A61K 39/385; A61K 39/09; A61P 37/04; (13) B
A61K 39/39; A61P 31/04; A61K 31/70

(21) 1-2019-01003

(22) 04/08/2017

(86) PCT/US2017/045479 04/08/2017

(87) WO/2018/027123 08/02/2018

(30) 62/371,529 05/08/2016 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 26/08/2019 377A

(73) 1. SANOFI PASTEUR, INC. (US)

1 Discovery Drive Swiftwater, PA 18370, United States of America

2. SK BIOSCIENCE CO., LTD. (KR)

310, Pangyo-Ro, Budang-Gu Seongnam-Si, Gyeonggi-Do 13494, Republic of Korea

(72) AN, Kyungjun (KR); CHOI, Wooyoung (KR); HAM, Dongsoo (KR); KIM, Hun (KR); SHIN, Jinhwan (KR); HOPFER, Robert (US); KENSINGER, Richard, D. (US); KYAW, Moe (US); DESAUZIERS, Eric (FR); EL GUERCHE SEBLAIN, Clotilde (FR); TALAGA, Philippe (FR).

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

(54) CHẾ PHẨM TIẾP HỢP PHÉ CẦU KHUẨN ĐA GIÁ, CHẤT MANG HỖN HỢP VÀ VACXIN CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp chứa 16 thể tiếp hợp polysacarit nang phé cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể tiếp hợp này bao gồm polysacarit nang từ một typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván hoặc CRM₁₉₇, trong đó các typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm bao gồm các typ huyết thanh 1, 3, và 5. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và phương pháp sử dụng chế phẩm này để phòng ngừa tình trạng nhiễm hoặc bệnh do *Streptococcus pneumoniae* gây ra ở đối tượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn, đa giá, chất mang hỗn hợp, vaccin chứa chế phẩm này và phương pháp sử dụng các chế phẩm này và vaccin để phòng bệnh nhiễm hoặc bệnh *Streptococcus pneumoniae* ở đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phế cầu khuẩn (*Streptococcus pneumoniae*) là một vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, hình mũi tên vòm, gram dương với hơn 90 typ huyết thanh đã biết. Hầu hết các typ huyết thanh *S. pneumoniae* đều cho thấy là gây ra bệnh, với 23 typ huyết thanh phổ biến nhất chiếm gần 90% bệnh dịch trên toàn thế giới. Các typ huyết thanh được phân loại dựa trên đáp ứng huyết thanh của các polysacarit nang, yếu tố độc lực quan trọng nhất đối với khuẩn cầu phổi. Polysacarit nang là các kháng nguyên độc lập tế bào T cảm ứng sự tổng hợp kháng thể khi không có mặt tế bào T trợ giúp. Các kháng nguyên độc lập tế bào T thường cảm ứng kháng thể có ái lực thấp và các đáp ứng miễn dịch tồn tại trong một khoảng thời gian ngắn với khả năng nhớ miễn dịch từ ít đến không có.

Các vaccin phế cầu khuẩn đầu tiên bao gồm các hỗn hợp của polysacarit nang từ các typ huyết thanh khác nhau. Các vaccin này có thể tạo ra miễn dịch chống lại *S. pneumoniae* ở các bệnh nhân có hệ miễn dịch khỏe mạnh hoặc phát triển, tuy nhiên, các vaccin này không có hiệu quả ở trẻ nhỏ, người mà không có hệ miễn dịch phát triển, và những đối tượng cao tuổi, mà thường có chức năng miễn dịch suy giảm. Để cải thiện đáp ứng miễn dịch với vaccin phế cầu khuẩn, đặc biệt là ở các đối tượng trẻ nhỏ và người già, những người mà có nguy cơ cao bị nhiễm *S. pneumoniae*, polysacarit nang được tiếp hợp với các protein mang thích hợp để tạo ra vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn. Việc tiếp hợp với một protein mang thích hợp làm thay đổi polysacarit nang từ kháng nguyên độc lập tế bào T thành kháng nguyên phụ thuộc tế bào T. Vì thế, đáp ứng miễn dịch chống lại polysacarit nang đã tiếp hợp có sự tham gia của tế bào T trợ giúp, tế bào này tạo ra đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh hơn khi được tiếp xúc lại với polysacarit nang.

Có ít nhất hai phương pháp để phát triển vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn: phương pháp sử dụng một chất mang và phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp. Tính miễn dịch của các thể tiếp hợp polysacarit nang khác nhau có thể khác nhau tùy thuộc vào typ huyết thanh phế cầu khuẩn và protein mang sử dụng. Ở phương pháp sử dụng một chất mang, polysacarit nang từ các typ huyết thanh khác nhau được tiếp hợp với một chất mang protein. Loạt vaccin PREVNAR của Pfizer là một ví dụ về phương pháp sử dụng một chất mang trong đó các polysacarit nang khác nhau được tiếp hợp với chất mang protein CRM₁₉₇, một biến thể không độc của giải độc tố bạch hầu có một thay thế axit amin là axit glutamic cho glyxin. Vaccin 7 giá PREVNAR (PREVNAR) đã được chấp thuận lần đầu tiên vào năm 2000 và chứa các polysacarit nang từ bảy typ huyết thanh phổ biến nhất: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F. Vaccin 13 giá, PREVNAR 13, đã bổ sung các typ huyết thanh 1, 5, 7F, 3, 6A, và 19A vào chất mang protein CRM₁₉₇. Chất mang protein, CRM₁₉₇, được sử dụng trong các vaccin PREVNAR một chất mang chưa từng được sử dụng làm một phần của hệ chất mang hỗn hợp trong vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn.

Phương pháp sử dụng vaccin phế cầu khuẩn thứ hai là phương pháp dùng chất mang hỗn hợp. Ở phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp, thay vì sử dụng một chất mang protein, thì hai hoặc nhiều chất mang protein được sử dụng, với các polysacarit nang từ các typ huyết thanh đặc hiệu được tiếp hợp với chất mang protein thứ nhất và các polysacarit nang từ các typ huyết thanh khác nhau được tiếp hợp với ít nhất một chất mang protein thứ hai khác. Ví dụ, GlaxoSmithKline đã phát triển một loại vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp, 10 giá (các typ huyết thanh 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F), SYNFLORIX sử dụng protein D của *H influenzae*, giải độc tố uốn ván, và giải độc tố bạch hầu làm các chất mang protein. Trong SYNFLORIX, các typ huyết thanh 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, và 23F được tiếp hợp với protein D; typ huyết thanh 18C được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván; và typ huyết thanh 19F được tiếp hợp với giải độc tố bạch hầu [7]. Typ huyết thanh 3 được loại bỏ từ một tiền chế phẩm 11 giá thành SYNFLORIX do không thể hiện được hiệu quả đặc hiệu-typ huyết thanh trong thử nghiệm bệnh viêm tai giữa cấp tính [1]. Nhóm khác, Aventis Pasteur, đã phát triển vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp, 11 giá (các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, và 23F) sử dụng giải độc

tổ bạch hầu và giải độc tố uốn ván làm các chất mang protein [2, 3]. Polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3, 9V, 14, và 18C nếu được tiếp hợp với giải độc tố bạch hầu có thể tạo ra đáp ứng tốt hơn so với được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván [2, 6]. Do đó, các typ huyết thanh 3, 6B, 14, và 18C được tiếp hợp với độc tố bạch hầu và các typ huyết thanh 1, 4, 5, 7F, 9V, 19F, và 23F được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván. Việc phát triển vacxin phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp này đã bị chấm dứt, một phần là do các lý do kỹ thuật và khả năng đáp ứng giảm khi kết hợp với các vacxin ho gà không bào [3]. Gần đây, typ huyết thanh 5 cũng như là 1 đã được báo cáo là có một trong số các hiệu giá OPA quan sát được thấp nhất từ tất cả 13 typ huyết thanh PREVNAR, trong đó có mối tương quan giữa hiệu giá IgG và hoạt tính OPA [4]. Cũng được gợi ý rằng đối với typ huyết thanh 3, để tạo ra sự bảo vệ cần nồng độ IgG trong huyết thanh cao hơn nhiều [5].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra các chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp mới và cải tiến và vacxin chứa chế phẩm này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 16 thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein gồm có chất mang protein được tiếp hợp với polysacarit nang từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm bao gồm các typ huyết thanh 1, 3, và 5.

Theo một vài phương án, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Theo một phương án khác, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Theo một phương án khác nữa, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp còn chứa tá dược, như tá dược trên cơ sở nhôm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở nhôm phosphat, nhôm sulfat, và nhôm hydroxit.

Một khía cạnh khác của sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp làm vaccin.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến vaccin chứa chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp và tá dược được dụng.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa bệnh hoặc nhiễm *Streptococcus pneumoniae* ở đối tượng, như người, phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu để phòng ngừa của chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vaccin chứa chế phẩm này.

Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người có độ tuổi ít nhất là 50 và bệnh này là bệnh viêm phổi hoặc bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (invasive pneumococcal disease-IPD).

Theo các phương án khác, đối tượng này là người có độ tuổi ít nhất là 6 tuần và bệnh này là bệnh viêm phổi, bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD), hoặc bệnh viêm tai giữa cấp tính (acute otitis medi-AOM). Theo một vài phương án, đối tượng người này có độ tuổi từ 6 tuần đến 5 tuổi. Theo các phương án khác, đối tượng người này có độ tuổi từ 2 đến 15 tháng hoặc từ 6 đến 17 tuổi.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vaccin được sử dụng bằng cách tiêm bắp. Theo các phương án nhất định, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vaccin được sử dụng như là một phần trong chuỗi gây miễn dịch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các mục đích, đặc điểm và ưu điểm khác và trên đây của chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp sẽ trở nên rõ ràng hơn dựa vào phần mô tả chi tiết dưới đây.

Các định nghĩa

Để hiểu rõ hơn về phần mô tả của sáng chế, các thuật ngữ nhất định được định nghĩa trước tiên dưới đây. Các định nghĩa khác của các thuật ngữ này và các thuật ngữ khác có thể được đề cập trong bản mô tả.

Như được sử dụng trong bản mô tả này và trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, các thuật ngữ chỉ số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác. Do đó ví dụ, thuật ngữ “phương pháp” bao gồm cả nghĩa một phương pháp hay nhiều phương pháp, và/hoặc các bước của loại phương pháp được mô tả ở đây và/hoặc sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào bản mô tả này.

Tá được: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tá được” được dùng để chỉ chất hoặc chất dẫn làm tăng đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên theo cách không đặc hiệu.

Sử dụng: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ cho đối tượng “sử dụng” chế phẩm có nghĩa là đưa, sử dụng hoặc cho chế phẩm tiếp xúc với đối tượng. Việc sử dụng này có thể được tiến hành bằng đường bất kỳ trong số một số đường, như, ví dụ, khu trú, qua đường miệng, dưới da, trong bắp, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, nội tủy mạc và trong da.

Xấp xỉ: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “xấp xỉ” hoặc “khoảng,” như được dùng cùng với một hoặc nhiều giá trị quan tâm, được dùng để chỉ giá trị mà tương tự với giá trị tham chiếu được viện dẫn. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “xấp xỉ” hoặc “khoảng” được dùng để chỉ khoảng giá trị mà nằm trong khoảng 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, hoặc ít hơn theo một trong hai hướng (lớn hơn hoặc nhỏ hơn) của giá trị tham chiếu được viện dẫn trừ khi được quy định theo cách khác hoặc mặt khác rõ ràng từ ngữ cảnh (ngoại trừ trong đó con số này vượt quá 100% giá trị có thể).

Thể tiếp hợp: Như được sử dụng ở đây, và được hiểu từ ngữ cảnh thích hợp, các thuật ngữ “thể tiếp hợp” hoặc “thể tiếp hợp glyco” được dùng để chỉ polysacarit *Streptococcus pneumoniae* được tiếp hợp với một protein mang nhờ sự tiếp hợp sinh học cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị bất kỳ.

Tá dược: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tá dược” được dùng để chỉ chất không có tác dụng điều trị có thể được đưa vào chế phẩm, để tạo ra hoặc góp phần thu được tác dụng làm ổn định hoặc tính nhất quán mong muốn.

Chất mang hỗn hợp: Như được sử dụng ở đây, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp được dùng để chỉ chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn có nhiều hơn một loại chất mang protein.

Đa giá: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đa giá” được dùng để chỉ chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn có polysaccharit nang phế cầu khuẩn từ nhiều hơn một typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae*.

Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp” được dùng để chỉ chế phẩm chứa 16 thể tiếp hợp polysaccharit phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể tiếp hợp polysaccharit nang phế cầu khuẩn-protein gồm có chất mang protein được tiếp hợp với polysaccharit nang từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó hai polysaccharit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván và các polysaccharit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai polysaccharit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm bao gồm các typ huyết thanh 1, 3, và 5. Theo một vài phương án, polysaccharit nang từ các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysaccharit nang từ các typ huyết thanh còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác, polysaccharit nang từ các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysaccharit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác nữa, polysaccharit nang từ các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysaccharit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Tá dược được dụng: Các tá dược được dụng hữu dụng trong sáng chế là các tá dược thông thường. Tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), mô tả các thành phần và công thức thích hợp để phân phối được học một hoặc nhiều chế phẩm để điều trị, kể cả vaccin, và các dược chất khác. Các tá dược được dụng thích hợp bao gồm, ví dụ, tinh

bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, tinh bột gạo, bột mỳ, đá phàn, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, natri clorua, bột sữa gầy, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và các tá dược tương tự. Nói chung, bản chất của tá dược sẽ tùy thuộc vào cách dùng cụ thể được sử dụng. Ví dụ, các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường chứa các dung dịch có thể tiêm được bao gồm các dung dịch được đựng và chấp nhận được về mặt sinh lý như nước, dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch nước muối cân bằng, dung dịch đệm, dextroza chứa nước, glyxerol hoặc dung dịch tương tự làm chất dẫn. Đối với các chế phẩm rắn (ví dụ, các dạng bột, viên tròn, viên nén, hoặc viên nang), các tá dược rắn không độc thông thường có thể bao gồm, ví dụ, các loại dùng để bào chế gồm manitol, lactoza, tinh bột, hoặc magie stearat. Ngoài các chất mang trung tính về mặt sinh học, dược phẩm được sử dụng có thể chứa một lượng nhỏ các chất bổ trợ không độc, như chất làm ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, và chất đệm pH và chất tương tự, ví dụ natri axetat hoặc sorbitan monolaurat.

Lượng hữu hiệu để phòng bệnh: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu để phòng bệnh” hoặc “liều hữu hiệu để phòng bệnh” được dùng để chỉ lượng hoặc liều cần để tạo ra đáp ứng miễn dịch đủ để làm chậm sự khởi phát bệnh và/hoặc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng do nhiễm *Streptococcus pneumoniae* gây ra.

Phòng bệnh: Thuật ngữ “phòng bệnh,” như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ việc tránh biểu hiện bệnh, làm chậm sự khởi phát, và/hoặc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể (ví dụ, bệnh nhiễm *Streptococcus pneumoniae*). Theo một vài phương án, phòng bệnh được đánh giá trên cơ sở một quần thể sao cho một chất được coi là có khả năng phòng bệnh chống lại một bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể nếu làm giảm có ý nghĩa thống kê sự phát triển, tần suất, và/hoặc cường độ của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể được quan sát ở một quần thể dễ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh.

Đối tượng: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” có nghĩa là động vật có vú, bao gồm chuột, thỏ và người. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người trưởng thành, thanh niên hoặc trẻ sơ sinh. Theo một vài phương án, thuật ngữ

“người” hoặc “bệnh nhân” được sử dụng và được dự định là thay thế cho thuật ngữ “đối tượng.”

Phần mô tả dưới đây và (các) phương án được mô tả và các ví dụ chỉ có bản chất minh họa và không được dự định là làm giới hạn sáng chế, ứng dụng hoặc sử dụng sáng chế.

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp mới và cải tiến và vaccin chứa chế phẩm này. Mặc dù chất mang protein, CRM₁₉₇, đã được sử dụng trước đây trong vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn, một chất mang, song sáng chế lần đầu tiên mô tả việc sử dụng CRM₁₉₇ trong vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp.

Như được bàn luận trên đây, tính miễn dịch của các thể tiếp hợp polysacarit nang khác nhau có thể khác nhau tùy thuộc vào typ huyết thanh phế cầu khuẩn và protein mang sử dụng. Sáng chế mô tả việc tiếp hợp thành công typ huyết thanh 3 với giải độc tố uốn ván như một phần của vaccin chất mang hỗn hợp, bất kể các tài liệu trước đây đã bộc lộ rằng typ huyết thanh 3 có tính miễn dịch hơn nếu được tiếp hợp với giải độc tố bạch hầu hơn là giải độc tố uốn ván [2, 6]. Sáng chế cũng mô tả phát hiện bất ngờ rằng đáp ứng kháng thể với typ huyết thanh 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp cao hơn gấp 4 lần so với khi typ huyết thanh 3 được tiếp hợp với CRM₁₉₇ trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 13 giá, một chất mang (PREVNAR 13).

Hơn nữa, phát hiện bất ngờ này không bị giới hạn ở typ huyết thanh 3 mà còn được quan sát thấy ở các typ huyết thanh khác được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp. Như được thể hiện trong các ví dụ, việc tiếp hợp các typ huyết thanh 1 và 3, 1 và 5, hoặc 3 và 5 với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp với các typ huyết thanh còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇ (PVC16-13TT, PVC16-15TT, và PVC16-35TT, tương ứng) đã tạo ra đáp ứng kháng thể tăng đáng kể một cách nhất quán với các typ huyết thanh được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván so với các đáp ứng kháng thể (đáp ứng IgG hoặc hiệu giá MOPA) kháng các typ huyết thanh tương tự được tiếp hợp với CRM₁₉₇ trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn, một chất mang (PREVNAR 13), như được thể hiện tóm tắt trong bảng dưới đây.

Bảng 1: Mức tăng đáp ứng kháng thể với các typ huyết thanh được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván trong vacxin chất mang hỗn hợp so với PREVNAR 13

Typ huyết thanh	Mức tăng đáp ứng kháng thể so với PREVNAR 13		
	PVC16-13TT;	PVC16-15TT;	PVC16-35TT;
1 (IgG)	3X;	3.9X;	N/A
1 (MOPA)	6.3X;	6.3X;	N/A
3 (IgG)	5.5X;	N/A	2.8X;
3 (MOPA)	4X;	N/A	4X;
5 (IgG)	N/A	8.7X;	3.2X;
5 (MOPA)	N/A	5X;	4X;

Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp mô tả trong sáng chế cũng bao gồm các typ huyết thanh phế cầu khuẩn không có trong ba vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn hiện có trên thị trường: PREVNAR (được gọi là Prevenar ở một số nước), SYNFLORIX và PREVNAR 13. Bệnh do các typ huyết thanh phế cầu khuẩn hiện không có trong vacxin gây ra ngày càng tăng, một phần là do sự phát triển tính kháng kháng vi khuẩn, số bệnh nhân bị tổn thương miễn dịch ngày càng tăng và thiếu sự cấp bách miễn dịch. Ví dụ, không có vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn nào có mặt trên thị trường bao gồm typ huyết thanh 12F. Ngoài ra, không có vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn có mặt trên thị trường bao gồm các typ huyết thanh 22F và 33F. Sáng chế mô tả việc đưa thành công các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F vào vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp.

Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và phương pháp bào chế chế phẩm này

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 16 thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein gồm có chất mang protein được tiếp hợp với polysacarit nang từ typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F,

trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm bao gồm các typ huyết thanh 1, 3, và 5.

Theo một vài phương án, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác nữa, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Trong vacxin tiếp hợp polysacarit-protein, protein mang được tiếp hợp với kháng nguyên polysacarit chủ yếu nhằm làm tăng đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng kháng thể) với kháng nguyên polysacarit. Các protein mang tốt hơn là các protein không độc có ít hoặc không có tính sinh miễn dịch. Các protein mang dễ tiếp hợp với polysacarit phế cầu khuẩn sử dụng các quy trình tiếp hợp chuẩn, như được bàn luận trong phần mô tả chi tiết tiếp theo dưới đây. Các protein mang được sử dụng trong chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp là giải độc tố uốn ván (TT) và CRM₁₉₇, mỗi chất mang này được sử dụng trong thiết kế vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn nhưng chưa từng được sử dụng trong cùng một vacxin chất mang hỗn hợp.

CRM₁₉₇ là một biến thể không độc (tức là, giải độc tố) của độc tố bạch hầu vẫn giữ được các đặc tính miễn dịch của độc tố bạch hầu kiểu đại. CRM₁₉₇ khác độc tố bạch hầu kiểu đại ở một bazơ trong gen cấu trúc, tạo ra sự thay thế một axit amin từ axit glutamic thành glyxin. CRM₁₉₇ thường được phân lập từ các dịch nuôi cấy chủng *Corynebacterium diphtheria* C7 (β197) được nuôi trên môi trường trên cơ sở axit casamino và dịch chiết nấm men. CRM₁₉₇ có thể được tinh chế bằng cách siêu lọc, kết tủa bằng amoni sulfat, và sắc ký trao đổi ion. Theo cách khác, CRM₁₉₇ có thể được điều chế tái tổ hợp theo patent Mỹ số 5,614,382, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. CRM₁₉₇ đã được sử dụng trong thiết kế vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn nhưng chưa từng được sử dụng như là một phần của vacxin chất mang hỗn hợp.

Giải độc tố uốn ván được tạo ra và được sử dụng để gây miễn dịch ở quy mô lớn chống lại bệnh uốn ván (hoặc lockjaw) do *Clostridium tetani* gây ra. Giải độc tố uốn ván cũng được sử dụng cả một mình và kết hợp với vacxin bạch hầu và/hoặc ho gà. Protein gốc, độc tố uốn ván, thường thu được trong dịch nuôi cấy *Clostridium tetani*. Độc tố uốn ván là một protein có khối lượng 150kDa và bao gồm hai cấu trúc siêu phân tử (100kDa và 50kDa) được liên kết với nhau bằng liên kết sulfua. Độc tố thường được giải độc tố bằng formaldehyt và có thể được tinh chế từ các dịch lọc nuôi cấy bằng các phương pháp đã biết, như kết tủa bằng amoni sulfat (xem, ví dụ, [7], [8]) hoặc các kỹ thuật sắc ký, như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 1996/025425 chẳng hạn. Độc tố uốn ván cũng có thể được làm bất hoạt bằng các phương pháp di truyền tái tổ hợp.

Giải độc tố uốn ván cũng đã được sử dụng làm protein mang trong vacxin khác, kể cả vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn. Tuy nhiên giải độc tố này chưa từng được sử dụng trong vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp kết hợp với CRM₁₉₇. Giải pháp kỹ thuật đã biết cũng chưa bộc lộ việc tiếp hợp typ huyết thanh 3 với giải độc tố uốn ván trong vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp vì typ huyết thanh 3 được thể hiện là có tính miễn dịch nhiều hơn nếu được tiếp hợp với giải độc tố bạch hầu so với giải độc tố uốn ván [2, 6].

Polysacarit nang phế cầu khuẩn được sử dụng trong các chế phẩm và vacxin được mô tả ở đây, bao gồm polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, có thể được điều chế từ *Streptococcus pneumoniae* bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết, bao gồm các kỹ thuật chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 và 2008/0286838, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, mỗi typ huyết thanh polysacarit nang phế cầu khuẩn có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy (ví dụ, môi trường trên cơ sở đậu tương). Các tế bào được dung giải, và mỗi polysacarit có thể được tinh chế từ dịch dung giải

nhờ ly tâm, kết tủa, siêu lọc, và/hoặc sắc ký cột. Ngoài ra, polysacarit nang phẩy cầu khuẩn có thể được tạo ra bằng các quy trình tổng hợp.

Polysacarit nang của *Streptococcus pneumoniae* bao gồm các đơn vị oligosacarit lặp, mà có thể chứa tối đa 8 gốc đường. Kháng nguyên sacarit nang có thể là một polysacarit có chiều dài đầy đủ, hoặc có thể được giảm kích thước (ví dụ, một đơn vị oligosacarit, hoặc một mạch ngắn hơn mạch sacarit có chiều dài nguyên thể gồm các đơn vị oligosacarit lặp). Kích thước của polysacarit nang có thể được làm giảm bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như xử lý bằng cách thủy phân bằng axit, xử lý bằng hydro peroxit, định cỡ bằng thiết bị đồng nhất áp suất cao, tùy ý sau đó xử lý bằng hydro peroxit để tạo ra các đoạn oligosacarit, hoặc vi hóa lỏng.

Thể tiếp hợp phẩy cầu khuẩn của mỗi trong số các typ huyết thanh có thể được tạo ra bằng cách tiếp hợp polysacarit nang của mỗi typ huyết thanh với protein mang. Các thể tiếp hợp phẩy cầu khuẩn khác nhau có thể được bào chế thành chế phẩm, kể cả chế phẩm liều đơn.

Để tạo ra thể tiếp hợp polysacarit-protein, polysacarit nang được lấy từ mỗi typ huyết thanh phẩy cầu khuẩn có thể được kích hoạt bằng phương pháp hóa học để polysacarit nang có thể phản ứng được với protein mang. Một khi được kích hoạt, mỗi polysacarit nang có thể được tiếp hợp với protein mang một cách riêng biệt để tạo thành thể tiếp hợp glyco. Việc kích hoạt các polysacarit bằng phương pháp hóa học và sau đó tiếp hợp với protein mang có thể được tiến hành bằng nhiều phương pháp thông thường. Ví dụ, các nhóm hydroxyl lân cận ở đầu của polysacarit nang có thể được oxy hóa thành nhóm aldehyt bằng các tác nhân oxy hóa như periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat, hoặc axit periodic), như được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 4,365,170, 4,673,574 và 4,902,506, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các polysacarit cũng có thể được kích hoạt bằng 1-xyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafloroborat (CDAP) để tạo thành este xyanat. Sau đó polysacarit đã hoạt hóa được liên kết trực tiếp hoặc thông qua nhóm liên kết hoặc nhóm đệm với nhóm amino trên protein mang.

Ví dụ, nhóm đệm có thể là xystamin hoặc xysteamin để tạo ra polysacarit được thiolat hóa mà có thể được liên kết với chất mang thông qua liên kết thioete thu được

sau khi phản ứng với protein mang được hoạt hóa bởi maleimit (ví dụ sử dụng este N-[γ -maleimidobutyroxy]succinimit (GMBS)) hoặc protein mang được haloaxetyl hóa (ví dụ nhờ iodoaxetimit, N-succinimidyl bromoaxetat (SBA; SIB), N-succinimidyl(4-iodoaxetyl)aminobenzoat (SIAB), sulfosuccinimidyl(4-iodoaxetyl)aminobenzoat (sulfo-SIAB), N-succinimidyl iodoaxetat (SIA) hoặc succinimidyl 3-[bromoaxetamido]propionat (SBAP)). Tốt hơn là, este xyanat (tùy ý được tạo ra nhờ hợp chất COAP) được liên kết với hexan diamin hoặc dihydrazit của axit adipic (AOH) và sacarit được tạo dẫn xuất amino được tiếp hợp với protein mang nhờ hợp chất carbodiimit (ví dụ, EOAC hoặc EOC) thông qua nhóm carboxyl trên chất mang protein. Các thể tiếp hợp như vậy được mô tả ví dụ trong công bố đơn quốc tế số WO 93/15760, WO 95/08348 và WO 96/129094.

Việc tiếp hợp polysacarit nang đã hoạt hóa và các protein mang có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp amin hóa khử, như được mô tả, ví dụ, trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 và 2007/0184072, công bố đơn quốc tế số WO 2006/110381, WO 2008/079653, và WO 2008/143709, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, polysacarit nang đã hoạt hóa và protein mang có thể được cho phản ứng với chất khử để tạo thành thể tiếp hợp. Các chất khử thích hợp bao gồm borohydrua, như natri xyanoborohydrua, boran-pyridin, natri triaxetoxylborohydrua, natri borohydrua, hoặc nhựa trao đổi borohydrua. Kết thúc phản ứng khử, có thể vẫn còn các nhóm aldehyt chưa phản ứng trong các thể tiếp hợp. Các nhóm aldehyt chưa phản ứng có thể được tạo mũ bằng chất tạo mũ thích hợp, như natri borohydrua (NaBH_4). Theo một phương án, phản ứng khử được tiến hành trong dung môi chứa nước. Theo một phương án khác phản ứng này được tiến hành trong dung môi không phân cực aprotic. Theo một phương án, phản ứng khử được tiến hành trong dung môi DMSO (dimetylsulfoxit) hoặc trong DMF (dimetylformamit).

Polysacarit nang đã hoạt hóa có thể được tiếp hợp trực tiếp với protein mang hoặc gián tiếp thông qua việc sử dụng nhóm đệm hoặc liên kết, như nhóm liên kết hai chức. Nhóm liên kết tùy ý là nhóm liên kết dị hai chức hoặc đồng hai chức, ví dụ có nhóm phản ứng amino và nhóm phản ứng axit carboxylic, 2 nhóm phản ứng amino hoặc hai nhóm phản ứng axit carboxylic.

Các kỹ thuật thích hợp khác để tiếp hợp sử dụng carbodiimite, hydrazit, các este hoạt hóa, norboran, axit p-nitrobenzoic, N-hydroxysuccinimide, S--NHS, EOC, TSTU, như được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO 98/42721. Việc tiếp hợp có thể có sự tham gia của nhóm liên kết carbonyl mà có thể được tạo thành bằng phản ứng giữa nhóm hydroxyl tự do của sacarit với 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (xem tài liệu Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) sau đó phản ứng với protein để tạo thành liên kết carbamat. Điều này có thể bao gồm khử đầu anome thành nhóm hydroxyl bậc một, bảo vệ/khử bảo vệ nhóm hydroxyl bậc một, phản ứng của nhóm hydroxyl bậc một với CDI để tạo thành chất trung gian carbamat CDI và liên kết chất trung gian carbamat CDI với nhóm amino trên protein.

Tỷ lệ của polysacarit so với protein mang trong vacxin tiếp hợp phẩy cầu khuẩn thường nằm trong khoảng từ 0,3 đến 3,0 (trọng lượng/trọng lượng) nhưng có thể khác nhau tùy theo typ huyết thanh. Tỷ lệ này có thể được xác định bằng cách đo độ lặp lượng protein và polysacarit có mặt, hoặc bằng các phương pháp mà thu được số đo trực tiếp tỷ lệ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp bao gồm đo phổ ^1H NMR hoặc sử dụng SEC-HPLC-UV/RI với kiểm tra kép (ví dụ, chỉ số khúc xạ và UV, đối với toàn bộ nguyên liệu và lượng protein tương ứng) có thể ước lượng được tỷ lệ sacarit/protein qua mức phân bố kích thước của các thể tiếp hợp cũng như là bằng phương pháp SEC-HPLC-MALLS hoặc MALDI-TOF-MS.

Các thể tiếp hợp polysacarit-protein được tạo ra như vậy có thể được tinh chế và được làm giàu bằng nhiều phương pháp. Các phương pháp này bao gồm cô/lọc thẩm tách, sắc ký cột, và lọc sâu. Các thể tiếp hợp polysacarit-protein đã tinh chế được thu gom để thu được chế phẩm tiếp hợp phẩy cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp, mà có thể được sử dụng làm vacxin.

Việc bào chế chế phẩm vacxin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chế phẩm vacxin có thể được bào chế thích hợp với đường dùng dự định. Mỗi thể tiếp hợp polysacarit phẩy cầu khuẩn-protein có thể được bào chế cùng với chất dẫn chấp nhận được về mặt sinh lý để tạo ra chế phẩm. Ví dụ về các chất dẫn này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước,

dung dịch nước muối, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng) và dung dịch dextroza.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp còn chứa tá dược. Các tá dược có thể bao gồm huyền phù của các chất khoáng (phèn, các muối nhôm, như nhôm hydroxit, nhôm phosphat, nhôm sulfat, nhôm hydroxyphosphat sulfat, v.v.) trên đó kháng nguyên được hấp phụ; hoặc nhũ tương nước trong dầu trong đó dung dịch kháng nguyên được nhũ hóa trong dầu khoáng (ví dụ, tá dược không đầy đủ của Freund), đôi khi có bao gồm vi khuẩn mycobacteria đã chết (tá dược đầy đủ của Freund) để tăng cường thêm tính kháng nguyên. Các oligonucleotit kích thích miễn dịch (như các oligonucleotit bao gồm motif CpG) cũng có thể được sử dụng làm tá dược (ví dụ, xem patent Mỹ số 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705; và 6,429,199). Các tá dược cũng bao gồm các phân tử sinh học, như lipit và các phân tử đồng kích thích. Các tá dược sinh học được lấy làm ví dụ bao gồm AS04 [9], IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L và 41 BBL.

Theo một vài phương án, tá dược là tá dược trên cơ sở nhôm.

Theo các phương án cụ thể, tá dược được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat, và nhôm hydroxit.

Theo các phương án cụ thể, tá dược là nhôm phosphat.

Theo một vài phương án, chế phẩm được dùng như một vaccin chống lại sự lây nhiễm *Streptococcus pneumoniae*.

Phương pháp phòng ngừa và sử dụng

Một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin chứa chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp và tá dược được dùng. Theo một vài phương án, tá dược được dùng bao gồm ít nhất một dung dịch đệm, như dung dịch đệm succinat, muối, như natri clorua, và/hoặc chất hoạt động bề mặt, như este polyoxyetylen sorbitan (ví dụ, polysorbat 80). Theo một vài phương án, polysaccharit nang từ các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysaccharit nang từ các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác, polysaccharit nang từ các typ huyết

thanh 1 và 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Theo một phương án khác nữa, polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

Theo một vài phương án, vaccin tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng là người chống lại bệnh do nhiễm *Streptococcus pneumoniae* gây ra.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa nhiễm hoặc bệnh do *Streptococcus pneumoniae*, phương pháp này bao gồm cho đối tượng là người sử dụng một lượng hữu hiệu để phòng bệnh của chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vaccin chứa chế phẩm này. Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vaccin chứa chế phẩm này có thể được sử dụng bằng đường bất kỳ, bao gồm, ví dụ, bằng đường toàn thân hoặc qua niêm mạc, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo các phương án nhất định, đối tượng người là đối tượng cao tuổi và bệnh này là bệnh viêm phổi hoặc bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD). Theo các phương án nhất định, đối tượng cao tuổi này có độ tuổi ít nhất là 50 tuổi. Theo các phương án khác, đối tượng cao tuổi này có độ tuổi ít nhất là 55 tuổi. Theo các phương án khác nữa, đối tượng cao tuổi này có độ tuổi ít nhất là 60 tuổi.

Theo các phương án khác, đối tượng người này là trẻ nhỏ và bệnh này là bệnh viêm phổi, bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD), hoặc bệnh viêm tai giữa cấp tính (acute otitis medi-AOM). Theo các phương án nhất định, trẻ nhỏ này có độ tuổi từ 0 đến 2 tuổi. Theo các phương án khác, trẻ nhỏ này có độ tuổi từ 2 đến 15 tháng.

Theo phương án khác nữa, đối tượng người này có độ tuổi từ 6 tuần đến 17 tuổi và bệnh này là bệnh viêm phổi, bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD), hoặc bệnh viêm tai giữa cấp tính (acute otitis medi-AOM). Theo các phương án nhất định, đối tượng người này có độ tuổi từ 6 tuần đến 5 tuổi. Theo các phương án khác, đối tượng người này có độ tuổi từ 5 đến 17 tuổi.

Lượng thể tiếp hợp trong mỗi liều vaccin hoặc lượng hữu hiệu để phòng ngừa của chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp có thể được chọn là

lượng để tạo ra sự phòng ngừa mà không có các tác dụng có hại đáng kể. Lượng như vậy có thể khác nhau tùy thuộc vào typ huyết thanh phé cầu khuẩn. Nói chung, mỗi liều có thể chứa polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến 100 μ g, đặc biệt là với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 μ g, và, đặc biệt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 5 μ g. Lượng tối ưu của các thành phần trong vacxin cụ thể có thể được xác định bằng các nghiên cứu chuẩn bao gồm quan sát các đáp ứng miễn dịch thích hợp ở đối tượng. Ví dụ, lượng để chủng ngừa đối tượng người có thể được xác định bằng cách ngoại suy kết quả thử nghiệm trên động vật. Ngoài ra, liều này có thể được xác định theo kinh nghiệm.

Theo một vài phương án, vacxin hoặc chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế chứa mỗi polysacarit nang với lượng nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 5 μ g; TT với lượng nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 25 μ g; CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 20 μ g đến 75 μ g; và tùy ý tá được nhôm nguyên tố với lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 0,5mg. Theo một vài phương án, vacxin hoặc chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế chứa mỗi polysacarit nang ngoại trừ typ huyết thanh 6B với lượng nằm trong khoảng từ 2 μ g đến 2,5 μ g; polysacarit của typ huyết thanh 6B với lượng nằm trong khoảng từ 4 μ g đến 5 μ g; TT với lượng nằm trong khoảng từ 5 μ g đến 15 μ g; CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 30 μ g đến 60 μ g; và tùy ý tá được nhôm nguyên tố với lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 0,2mg. Theo các phương án nhất định, chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp hoặc vacxin chứa chế phẩm này còn chứa natri clorua và dung dịch đệm natri succinat làm tá được.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phé cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi polysacarit nang phé cầu khuẩn của các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với TT và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh phé cầu khuẩn 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5mL có thể được bào chế thành dung dịch chứa: mỗi polysacarit với lượng 2,2 μ g, ngoại trừ 6B với lượng 4,4 μ g; protein mang TT với lượng nằm trong khoảng từ 10 μ g đến 15 μ g (chỉ với các typ huyết thanh 1 và 3) và protein mang CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40 μ g

đến 50µg; nhôm nguyên tố với lượng 0,125mg (nhôm phosphat với lượng 0,5mg) làm tá dược; và natri clorua và dung dịch đệm natri succinat làm tá dược.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi polysacarit nang phế cầu khuẩn của các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với TT và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh phế cầu khuẩn 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5mL có thể được bào chế thành dung dịch chứa: mỗi sacarit với lượng 2,2µg, ngoại trừ 6B với lượng 4,4µg; protein mang TT với lượng nằm trong khoảng từ 5µg đến 10µg (chỉ với các typ huyết thanh 1 và 5) và protein mang CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40µg đến 50µg; tá dược nhôm nguyên tố với lượng 0,125mg (nhôm phosphat với lượng 0,5mg); và natri clorua và dung dịch đệm natri succinat làm tá dược.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi polysacarit nang phế cầu khuẩn của các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với TT và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh phế cầu khuẩn 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Mỗi liều 0,5mL có thể được bào chế thành dung dịch chứa: mỗi sacarit với lượng 2,2µg, ngoại trừ 6B với lượng 4,4µg; protein mang TT với lượng nằm trong khoảng từ 10µg đến 15µg (chỉ với các typ huyết thanh 3 và 5) và protein mang CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40µg đến 50µg; tá dược nhôm nguyên tố với lượng 0,125mg (nhôm phosphat với lượng 0,5mg); và natri clorua và dung dịch đệm natri succinat làm tá dược.

Theo một vài phương án, chế phẩm dạng lỏng có thể được nạp vào bơm tiêm liều đơn không có chất bảo quản. Sau khi lắc, chế phẩm dạng lỏng trở thành vacxin là hỗn dịch trắng, đồng nhất sẵn sàng để sử dụng qua đường trong cơ.

Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng dưới dạng tiêm một lần hoặc như là một phần của chuỗi gây miễn dịch. Ví dụ, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn 4 lần ở các thời điểm cách nhau thích hợp, như, cách nhau 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng hoặc kết hợp của chúng. Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp được sử dụng cho trẻ nhỏ 4 lần trong 15

tháng đầu sau khi sinh, bao gồm, ví dụ, ở các thời điểm 2, 3, 4, và 12-15 tháng tuổi; ở thời điểm 3, 4, 5, và 12-15 tháng tuổi hoặc ở thời điểm 2, 4, 6, và 12 đến 15 tháng tuổi. Liều đầu tiên có thể được sử dụng ở thời điểm gần 6 tuần tuổi. Theo một phương án khác, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp được sử dụng cho trẻ nhỏ 3 lần trong 15 tháng đầu sau khi sinh, bao gồm, ví dụ, ở thời điểm 2, 4, và 11-12 tháng.

Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp cũng có thể chứa một hoặc nhiều protein từ *Streptococcus pneumoniae*. Ví dụ về các protein *Streptococcus pneumoniae* thích hợp để đưa vào bao gồm các protein được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO02/083855, cũng như là các protein được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO02/053761.

Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng cho đối tượng qua một hoặc nhiều đường dùng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như qua đường ngoài đường tiêu hóa, qua da, hoặc qua niêm mạc, trong mũi, trong cơ, trong màng bụng, trong da, trong tĩnh mạch, hoặc dưới da và do đó được bào chế. Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế phù hợp với đường dùng dự định.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm lỏng bằng cách tiêm bắp, trong màng bụng, dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, hoặc qua da hoặc tiêm qua niêm mạc đường hô hấp. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế ở dạng lỏng hoặc ở dạng đông khô. Theo một vài phương án, các chế phẩm tiêm được bào chế ở dạng thông thường, ở dạng dung dịch lỏng hoặc hỗn dịch, các dạng rắn thích hợp dùng cho dung dịch hoặc hỗn dịch trong dung dịch trước khi tiêm, hoặc dưới dạng nhũ tương. Theo một vài phương án, các dung dịch tiêm và hỗn dịch được bào chế từ các bột vô trùng hoặc cốm. Các nghiên cứu chung trong quá trình bào chế và sản xuất được chất để sử dụng bằng các đường này có thể được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Hiện tại, đường dùng qua đường miệng hoặc xịt qua mũi hoặc đường sol khí (ví dụ, bằng cách xông hít) được sử dụng phổ biến nhất để phân phối các chất điều trị trực

tiếp vào phổi và hệ hô hấp. Theo một vài phương án, chế phẩm phẩy cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp được sử dụng bằng dụng cụ để phân phối liều đã định chế phẩm. Các dụng cụ thích hợp dùng để phân phối được phẩy trong da được mô tả ở đây bao gồm các dụng cụ có kim tiêm ngắn như các dụng cụ được mô tả trong patent Mỹ số 4,886,499, patent Mỹ số 5,190,521, patent Mỹ số 5,328,483, patent Mỹ số 5,527,288, patent Mỹ số 4,270,537, patent Mỹ số 5,015,235, patent Mỹ số 5,141,496, patent Mỹ số 5,417,662 (tất cả các patent này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các chế phẩm dùng trong da cũng có thể được sử dụng bằng các dụng cụ mà giới hạn chiều dài kim xuyên qua da, như các dụng cụ được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO1999/34850, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, và các dụng cụ có chức năng tương đương khác. Cũng thích hợp là các dụng cụ tiêm tia mà phân phối vacxin lỏng đến hạ bì qua dụng cụ tiêm tia lỏng hoặc qua kim mà xuyên qua tầng lớp sừng và tạo ra dòng tới được hạ bì. Các thiết bị tiêm tia được mô tả ví dụ trong patent Mỹ số 5,480,381, patent Mỹ số 5,599,302, patent Mỹ số 5,334,144, patent Mỹ số 5,993,412, patent Mỹ số 5,649,912, patent Mỹ số 5,569,189, patent Mỹ số 5,704,911, patent Mỹ số 5,383,851, patent Mỹ số 5,893,397, patent Mỹ số 5,466,220, patent Mỹ số 5,339,163, patent Mỹ số 5,312,335, patent Mỹ số 5,503,627, patent Mỹ số 5,064,413, patent Mỹ số 5,520,639, patent Mỹ số 4,596,556, patent Mỹ số 4,790,824, patent Mỹ số 4,941,880, patent Mỹ số 4,940,460, công bố đơn quốc tế số WO1997/37705, và công bố đơn quốc tế số WO1997/13537 (tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Cũng thích hợp là các thiết bị phân phối bột/hạt theo đường đạn mà sử dụng khí nén để đẩy nhanh vacxin ở dạng bột qua lớp ngoài của da đến hạ bì. Ngoài ra, các bơm tiêm thông thường có thể được sử dụng theo phương pháp sử dụng trong da mantoux cổ điển.

Các chế phẩm sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch, hỗn dịch và nhũ tương chứa nước hoặc không chứa nước. Ví dụ về các dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu như dầu oliu, và este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Ví dụ về dầu bao gồm dầu thực vật hoặc dầu động vật, dầu lạc, dầu đậu nành, dầu oliu, dầu hướng dương, dầu gan cá, dầu tổng hợp như dầu hàng hải, và lipit thu được từ sữa hoặc trứng. Các chất mang chứa nước bao gồm nước, dung dịch rượu/dung dịch nước, nhũ tương hoặc hỗn dịch, bao gồm dung dịch nước muối và môi

trường được đệm. Các chất dẫn dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer's dextroza, dextroza và natri clorua, dung dịch Ringer lactat, hoặc dầu không bay hơi. Các chất dẫn dùng qua đường trong tĩnh mạch bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng và dạng lỏng, các chất bổ sung chất điện giải (như các chất dựa trên Ringer dextroza), và chất dẫn tương tự. Các chất bảo quản và các chất phụ gia khác cũng có thể có mặt như, ví dụ, các chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat, và khí trơ và chất tương tự.

Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế ở dạng lọ liều đơn vị, lọ đa liều, hoặc bơm tiêm nạp sẵn. Chất mang được dùng dùng cho chế phẩm dạng lỏng bao gồm dung môi, hỗn dịch, nhũ tương hoặc dầu chứa nước hoặc không chứa nước. Chế phẩm này có thể đẳng trương, ưu trương hoặc nhược trương. Tuy nhiên, mong muốn là chế phẩm để tiêm hoặc truyền về cơ bản là đẳng trương. Do đó, tính đẳng trương hoặc ưu trương có thể có lợi để bảo quản chế phẩm. Nếu chế phẩm này ưu trương, chế phẩm này có thể được pha loãng đến đẳng trương trước khi sử dụng. Chất làm trương có thể là chất làm trương ion như muối hoặc chất làm trương không ion như cacbohydrat. Chất làm trương ion bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, natri clorua, canxi clorua, kali clorua, và magie clorua. Chất làm trương không ion bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sorbitol và glyxerol. Tốt hơn là, ít nhất một dung dịch đệm được dùng được bao gồm. Ví dụ, nếu chế phẩm này là chế phẩm truyền hoặc tiêm, tốt hơn là chế phẩm này được bào chế trong dung dịch đệm với khả năng đệm ở độ pH 4 đến pH 10, như pH 5 đến pH 9, hoặc, pH 6 đến pH 8. Dung dịch đệm có thể được chọn từ các dung dịch đệm thích hợp theo dược điển Mỹ (USP). Ví dụ, dung dịch đệm này có thể được chọn từ nhóm bao gồm monoaxit, như axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric, và axit lactic; điaxit, như axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit carbonic, axit glutamic, axit malic, axit succinic, và axit tartaric; axit polyaxit như axit citric và axit phosphoric; và bazơ như amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin, và TRIS.

Chế phẩm phế cầu khuẩn tiếp hợp 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Ví dụ về chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, este polyoxyetylen sorbitan (nói chung được gọi là Tweens), cụ thể là, polysorbat 20 và polysorbat 80; copolyme (như DOWFAX) của etylen oxit (EO), propylen oxit

(PO), butylen oxit (BO); octoxynol với các nhóm lạp khác nhau etoxy(oxy-1,2-etandiyl), cụ thể là, octoxynol-9 (Triton-100); etylphenoxypolyetoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit như lexithin; nonylphenol etoxylat như loạt TERGITOL NP; lauryl, xetyl, stearyl, ete béo polyoxyetylen thu được từ rượu oleyl (chất hoạt động bề mặt Brij), cụ thể là, trietylglycol monolauryl ete (Brij 30); sorbitan ete được biết đến là SPAN, cụ thể là, sorbitan trioleat (Span 85) và sorbitan monolaurat.

Hỗn hợp của các chất hoạt động bề mặt như Tween 80/Span 85 có thể được sử dụng. Hỗn hợp của este polyoxyetylen sorbitan như Tween 80 và octoxynol như Triton X-100 cũng thích hợp. Hỗn hợp của Laureth 9 và Tween và/hoặc octoxynol cũng có lợi. Tốt hơn là, lượng este polyoxyetylen sorbitan (như Tween 80) được bao gồm có thể nằm trong khoảng từ 0,01% đến 1% (khối lượng/thể tích), từ 0,01% đến 0,1% (khối lượng/thể tích), từ 0,01% đến 0,05% (khối lượng/thể tích), hoặc 0,02%; lượng octylphenoxy polyoxyetanol hoặc nonylphenoxy polyoxyetanol (như Triton X-100) được bao gồm có thể nằm trong khoảng từ 0,001% đến 0,1% (khối lượng/thể tích), cụ thể là nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,02%; và lượng polyoxyetylen ete (như Laureth 9) được bao gồm có thể nằm trong khoảng từ 0,1% đến 20% (khối lượng/thể tích), có thể nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, cụ thể là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% hoặc 0,5%.

Theo một vài phương án, chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp có thể được phân phối qua hệ kiểm soát giải phóng. Ví dụ, truyền qua đường tĩnh mạch, miếng dán qua da, liposom, hoặc các đường dùng khác có thể được sử dụng để dùng. Theo một khía cạnh, các đại phân tử như vi cầu hoặc mô cấy có thể được sử dụng.

Phần mô tả trên đây nói chung mô tả sáng chế. Dựa vào các ví dụ cụ thể dưới đây có thể hiểu đầy đủ hơn về sáng chế. Các ví dụ này chỉ được mô tả nhằm mục đích minh họa và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Chuẩn bị polysacarit nang *S. pneumoniae*

Nuôi cấy *S. pneumoniae* và tinh chế polysacarit nang được tiến hành như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các typ huyết

thanh *S. pneumoniae* được lấy từ bảo tàng chủng nuôi cấy của Mỹ (American Type Culture Collection-ATCC) (typ huyết thanh 1: ATCC No. 6301; typ huyết thanh 3: ATCC No. 6303; typ huyết thanh 4: ATCC No. 6304; typ huyết thanh 5: ATCC No. 6305; typ huyết thanh 6A: ATCC No. 6306; typ huyết thanh 6B: ATCC No. 6326; typ huyết thanh 7F: ATCC No. 10351; typ huyết thanh 9V: ATCC No. 10368; typ huyết thanh 12F: ATCC No. 6312; typ huyết thanh 14: ATCC No. 6314; typ huyết thanh 18C: ATCC No. 10356; typ huyết thanh 19A: ATCC No. 10357; typ huyết thanh 19F: ATCC No. 6319; typ huyết thanh 22F: ATCC No. 6322; typ huyết thanh 23F: ATCC No. 6323; typ huyết thanh 33F: ATCC No. 10370). *S. pneumoniae* được đặc trưng bởi các nang và tính bất động, gram dương, song cầu khuẩn có hình mũi tên vòm, và hiện tượng tan huyết alpha trong môi trường thạch máu. Các typ huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm Quelling nhờ kháng huyết thanh đặc hiệu (patent Mỹ số số 5,847,112).

Chuẩn bị ngân hàng tế bào

Một vài thế hệ của chủng gốc giống được tạo ra để phát triển các chủng và loại bỏ các thành phần có nguồn gốc động vật (các thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ khác của chủng gốc giống được tạo ra. Thế hệ khác thứ nhất được nuôi cấy từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được nuôi cấy từ lọ chứa thế hệ khác thứ nhất. Các lọ đựng chủng nuôi cấy được bảo quản đông lạnh (ở nhiệt độ dưới -70°C) với glyxerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để chuẩn bị ngân hàng tế bào, tất cả các chủng nuôi cấy được nuôi trong môi trường trên cơ sở đậu tương. Trước khi đông lạnh, các tế bào được cô bằng cách ly tâm, môi trường đã sử dụng được loại bỏ, và các kết viên tế bào được tái huyền phù trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh đông (như glyxerol tổng hợp).

Nuôi cấy và thu hoạch

Các chủng nuôi cấy từ ngân hàng tế bào làm việc được cấy vào các lọ giống chứa môi trường trên cơ sở đậu tương và nuôi cấy. Sau khi đạt đến mật độ quang đích (hấp thụ), lọ giống được sử dụng để cấy vào thùng lên men chứa môi trường trên cơ sở đậu tương. Quá trình nuôi cấy được kết thúc khi giá trị mật độ quang ban đầu được duy trì không đổi. Sau khi kết thúc quá trình nuôi cấy, natri deoxycholat được bổ sung vào dịch nuôi cấy để dung giải tế bào. Các lượng trong thùng lên men thu được được

làm lạnh, và sự kết tủa protein được gây ra. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm để loại bỏ các protein kết tủa và mảnh tế bào.

Tinh chế

Dung dịch thu được từ quá trình ly tâm được lọc qua màng lọc sâu để loại bỏ các protein và mảnh tế bào mà không bị kết tủa trong quá trình ly tâm. Dịch lọc được cô trên màng 100 kDa MW và dịch cô được lọc thẩm tách bằng 10 thể tích dung dịch đệm natri phosphat 25mM (pH 7,2) để thu được mẫu. Mẫu được lọc để thu gom dịch nổi mà các polysaccharit được kết tủa từ đó và lọc. Dịch lọc được cô trên màng 30kDa, và dịch cô được lọc thẩm tách bằng 10 thể tích nước cất ba lần. Sau khi tiến hành lọc thẩm tách, dung dịch còn lại được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm. Thử nghiệm kiểm soát khi tiến hành được thực hiện trên dịch lọc (bề ngoài, các protein còn lại, các axit nucleic còn lại, các nội độc tố, khối lượng phân tử, và tổng lượng polysaccharit). Dịch cô được lọc vô trùng và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Ví dụ 2. Tạo ra thể tiếp hợp polysaccharit nang *S. pneumoniae* và protein mang

Các polysaccharit của các typ huyết thanh khác nhau được kích hoạt bằng các con đường khác nhau và sau đó được tiếp hợp với protein mang, CRM₁₉₇ hoặc TT. Đặc biệt là, các thể tiếp hợp này được tạo ra bằng cách tiếp hợp mỗi polysaccharit nang của tất cả các typ huyết thanh với CRM₁₉₇ và bằng cách tiếp hợp mỗi polysaccharit nang của các typ huyết thanh 1, 3, và 5 với TT. Quy trình hoạt hóa bao gồm làm giảm kích thước của mỗi polysaccharit nang đến khối lượng phân tử đích, hoạt hóa bằng phương pháp hóa học, và trao đổi đệm bằng cách siêu lọc. Các thể tiếp hợp được tinh chế bằng cách siêu lọc và cuối cùng lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm. Các thông số của quy trình như pH, nhiệt độ, nồng độ, và thời gian là như sau.

(1) Quy trình hoạt hóa

Bước 1: Thủy phân

Amin hóa, khử là một phương pháp đã biết để tiếp hợp các polyme trong đó liên kết amit được tạo ra giữa nhóm amin bậc một (-NH₂) của protein và aldehyt của sacarit. Tuy nhiên, vì các polysaccharit *S. pneumoniae* không có các nhóm aldehyt bất kỳ, nên nhóm aldehyt được bổ sung vào polysaccharit nang phế cầu khuẩn. Cấu trúc diol của monosaccharit có thể được oxy hóa bằng natri periodat (NaIO₄) để tạo thành nhóm

aldehyt. Polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1, 3, 4, 6A, 12F, 14, 18C, 22F, và 33F được xử lý sơ bộ như sau.

Trong trường hợp typ huyết thanh 1, natri hydroxit (ở nồng độ bazơ cuối cùng bằng 0,05M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $50\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C , và axit clohydric được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$, nhờ đó dừng quá trình thủy phân.

Trong trường hợp typ huyết thanh 3, axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,01M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C , và 0,1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$, nhờ đó dừng quá trình thủy phân.

Trong trường hợp typ huyết thanh 4, axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,1M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C , và 1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$, nhờ đó dừng quá trình thủy phân.

Trong trường hợp typ huyết thanh 6A, axit axetic băng (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,1M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C , và 1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$.

Trong trường hợp typ huyết thanh 12F, axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,01M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $70\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C , và 0,1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$, nhờ đó dừng quá trình thủy phân.

Trong trường hợp typ huyết thanh 14 và 18C, axit axetic băng (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,2M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ $91-96^{\circ}\text{C}$. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong

khoảng từ 21°C đến 25°C, và 1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng 6,0±0,1.

Trong trường hợp typ huyết thanh 22F và 33F, axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,01M) được bổ sung vào dung dịch polysacarit nang, và dung dịch này được ủ ở nhiệt độ 60±2°C. Sau đó dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 21°C đến 25°C, và 0,1M natri phosphat được bổ sung vào đó đến độ pH cuối cùng bằng 6,0±0,1, nhờ đó dừng quá trình thủy phân.

Mỗi polysacarit nang thu được được pha loãng trong nước để tiêm (WFI), natri axetat, và natri phosphat đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,0mg/mL đến 2,0mg/mL.

Bước 2: Phản ứng periodat

Đương lượng mol natri periodat cần hoạt hóa mỗi sacarit phế cầu khuẩn được xác định bằng cách sử dụng tổng lượng sacarit. Với sự trộn kỹ, phản ứng oxy hóa được để cho diễn ra trong khoảng thời gian từ 16 đến 20 giờ ở nhiệt độ 21°C đến 25°C đối với tất cả các typ huyết thanh ngoại trừ các typ huyết thanh 1, 7F, và 19F, phản ứng diễn ra ở nhiệt độ 10°C hoặc thấp hơn. Trong quá trình tiếp hợp, việc duy trì nồng độ aldehyt ở mức thích hợp làm cho quá trình tổng hợp các thể tiếp hợp diễn ra ổn định và nhất quán. Mức tổng hợp aldehyt được xác định bằng tỷ lệ giữa nồng độ của aldehyt được tạo ra và nồng độ của sacarit, và mức này có liên quan đến mức oxy hóa (Do) được đặt ra cho mỗi typ huyết thanh như được thể hiện trong bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2. Khoảng Do của tất cả các typ huyết thanh được tiếp hợp với CRM₁₉₇

Typ huyết thanh	Khoảng Do	Typ huyết thanh	Khoảng Do
Typ huyết thanh 1	4 đến 10	Typ huyết thanh 12F	1 đến 9
Typ huyết thanh 3	2 đến 8	Typ huyết thanh 14	6 đến 13
Typ huyết thanh 4	1 đến 5	Typ huyết thanh 18C	6 đến 14
Typ huyết thanh 5	2 đến 6	Typ huyết thanh 19A	7 đến 13
Typ huyết thanh	5 đến 15	Typ huyết thanh	6 đến 12

Typ huyết thanh	Khoảng Do	Typ huyết thanh	Khoảng Do
6A		19F	
Typ huyết thanh 6B	7 đến 13	Typ huyết thanh 22F	1 đến 16
Typ huyết thanh 7F	2 đến 8	Typ huyết thanh 23F	6 đến 14
Typ huyết thanh 9V	4 đến 9	Typ huyết thanh 33F	1 đến 15

Bảng 3. Khoảng Do của các typ huyết thanh 1, 3, và 5 được tiếp hợp với TT

Typ huyết thanh	Khoảng Do
Typ huyết thanh 1	1 đến 15
Typ huyết thanh 3	2 đến 14
Typ huyết thanh 5	1 đến 15

Bước 3: Siêu lọc

Sacarit đã oxy hóa được cô và lọc thẩm tách bằng WFI trên màng siêu lọc 100 kDa MWCO (màng siêu lọc 30kDa đối với typ huyết thanh 1 và màng siêu lọc 5kDa đối với typ huyết thanh 18C). Lọc thẩm tách được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua 0,9% đối với các typ huyết thanh 1, dung dịch đệm natri axetat 0,01M (pH 4,5) đối với các typ huyết thanh 7F và 23F và dung dịch đệm natri phosphat 0,01M (pH 6,0) đối với typ huyết thanh 19F. Dịch thẩm qua được loại bỏ, và dịch không thẩm qua được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm.

Bước 4: Đông khô

Đối với polysacarit nang của các typ huyết thanh 3, 4, 5, 9V, 14, 22F, và 33F mà được tiếp hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi chứa nước, dung dịch hỗn hợp gồm các polysacarit và protein mang được điều chế không bổ sung sucroza, được đông khô, và sau đó bảo quản ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit nang của các typ huyết thanh 1 và 18C mà được tiếp hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi chứa nước, polysacarit và protein mang

độc lập được tạo ra không bổ sung sucroza, được đông khô, và sau đó bảo quản ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit nang của các typ huyết thanh 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, và 23F mà được tiếp hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi DMSO, một lượng tiền định của sucroza để đạt được nồng độ sucroza cuối bằng $5\% \pm 3\%$ được bổ sung vào sacarit đã hoạt hóa, và các mẫu độc lập được điều chế, được đông khô, và sau đó bảo quản ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit nang của typ huyết thanh 12F, một lượng tiền định của sucroza để đạt được nồng độ sucroza cuối bằng $10\% \pm 5\%$ được bổ sung vào sacarit đã hoạt hóa, và mẫu được nạp vào các lọ thủy tinh, được đông khô, và sau đó được bảo quản ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Quy trình tiếp hợp

Quy trình tiếp hợp trong nước được tiến hành đối với các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18C, 22F, và 33F, và tiếp hợp sử dụng DMSO được tiến hành đối với các typ huyết thanh 6A, 6B, 7F, 12F, 19A, 19F, và 23F. Mỗi polysacarit nang được tiếp hợp với protein mang ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2:1.

Bước 1: Hòa tan

Tiếp hợp trong nước

Đối với các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18C, 22F, và 33F, mẫu đông khô được rã đông và được làm cân bằng ở nhiệt độ trong phòng. Mẫu đông khô được hoàn nguyên đến nồng độ phản ứng bằng cách sử dụng dung dịch đệm natri phosphat ở nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ở tỷ lệ được đặt ra cho mỗi typ huyết thanh.

Tiếp hợp sử dụng dimetyl sulfoxit (DMSO)

Đối với các typ huyết thanh 6A, 6B, 7F, 12F, 19A, 19F, và 23F, mẫu đông khô được rã đông, được làm cân bằng ở nhiệt độ trong phòng, và được hoàn nguyên trong DMSO.

Bước 2: Phản ứng tiếp hợp

Tiếp hợp trong nước

Đối với các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18C, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇, phản ứng tiếp hợp được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohydrua (100 mg/mL) vào 1,0 đến 1,4 mol natri xyanoborohydrua mỗi mol

sacarit. Tuy nhiên, đối với các typ huyết thanh 1 và 3, phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohydrua vào 0,5 mol natri xyanoborohydrua mỗi mol sacarit.

Đối với các typ huyết thanh 1, 3, và 5 được tiếp hợp với TT, phản ứng tiếp hợp được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohydrua (100 mg/mL) vào 1,0 đến 1,4 mol natri xyanoborohydrua mỗi mol sacarit, ngoại trừ typ huyết thanh 1 đến 0,5 mol natri xyanoborohydrua mỗi mol sacarit.

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 23°C đến 37°C trong khoảng thời gian từ 44 đến 106 giờ. Nhiệt độ phản ứng và thời gian được điều chỉnh theo typ huyết thanh. Sau đó nhiệt độ được giảm đến 23±2°C và natri clorua 0,9% được bổ sung vào bình phản ứng. Dung dịch natri borohydrua (100 mg/mL) được bổ sung vào để thu được 1,8 đến 2,2 đương lượng mol natri borohydrua mỗi mol sacarit. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 23±2°C trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 giờ. Quy trình này loại các aldehyt không phản ứng có mặt trên các sacarit. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng natri clorua 0,9% và hỗn hợp tiếp hợp đã pha loãng được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,8 hoặc 0,45µm.

Tiếp hợp DMSO

Đối với polysacarit nang của các typ huyết thanh 6A, 6B, 7F, 12F, 19A, 19F, và 23F, phản ứng tiếp hợp được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohydrua (100 mg/mL) đến tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2 đương lượng mol natri xyanoborohydrua mỗi một mol sacarit đã hoạt hóa. WFI được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng đến nồng độ đích bằng 1 % (thể tích/thể tích), và hỗn hợp được ủ trong khoảng thời gian từ 12 đến 26 giờ ở nhiệt độ 23±2°C. 100 mg/mL dung dịch natri borohydrua (thường là 1,8 đến 2,2 đương lượng mol natri borohydrua mỗi mol sacarit đã hoạt hóa) và WFI (nồng độ đích 5% thể tích/thể tích) được bổ sung vào phản ứng và hỗn hợp được ủ trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 giờ ở nhiệt độ 23±2°C. Quy trình này loại các aldehyt không phản ứng có mặt trên các sacarit. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng natri clorua 0,9% và hỗn hợp tiếp hợp đã pha loãng được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,8 hoặc 0,45µm.

Bước 3: Siêu lọc

Hỗn hợp tiếp hợp đã pha loãng được cô và lọc thẩm tách trên màng siêu lọc 100kDa MWCO hoặc màng siêu lọc 300kDa MWCO bằng tối thiểu là 15 thể tích natri clorua 0,9% hoặc dung dịch đệm. Tương tự, loại và độ pH của dung dịch đệm được sử dụng trong quy trình này khác nhau tùy thuộc vào mỗi typ huyết thanh trong số các typ huyết thanh.

Bước 4: Lọc vô trùng

Dịch không thẩm qua sau khi siêu lọc được lọc vô trùng (0,2 μ m), và các thông số kiểm soát khi tiến hành (bên ngoài, protein tự do, sacarit tự do, sự phân bố kích thước phân tử, độ vô trùng, lượng sacarit, lượng protein, độ pH, nội độc tố, xyanua còn lại, DMSO còn lại, tính đồng nhất sacarit, tính đồng nhất TT, và tính đồng nhất CRM₁₉₇) được tiến hành trên các thể tiếp hợp đã lọc. Dịch cô cuối cùng được đông lạnh và bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 3. Bào chế vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá

Các thể tích mong muốn của các dịch cô khối cuối cùng thu được từ ví dụ 2 được tính toán dựa trên thể tích mẻ và nồng độ sacarit bán thành phẩm. Sau khi 0,85% natri clorua (dung dịch nước muối sinh lý), polysorbat 80, và dung dịch đệm succinat được bổ sung vào lọ chế phẩm đã dán nhãn, các dịch cô bán thành phẩm được bổ sung. Sau đó chế phẩm được trộn kỹ và được lọc vô trùng qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,2 μ m. Bán thành phẩm đã bào chế được trộn kỹ trong và sau khi bổ sung nhôm phosphat khối. Độ pH được kiểm tra và được điều chỉnh nếu cần. Sản phẩm bán thành phẩm đã bào chế được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Bốn loại chế phẩm vacxin tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá dưới đây được bào chế và được gọi là PCV16-CRM197, PCV16-13TT, PCV16-15TT, và PCV16-35TT, tương ứng.

PCV16-CRM197 bao gồm các thể tiếp hợp polysacarit được tạo ra bằng cách tiếp hợp mỗi trong số các polysacarit của 16 typ huyết thanh (các typ huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F) với CRM₁₉₇;

PCV16-13TT bao gồm các thể tiếp hợp polysacarit được tạo ra bằng cách tiếp hợp mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 1 và 3 với TT và mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F với CRM₁₉₇;

PCV16-15TT bao gồm các thể tiếp hợp polysacarit được tạo ra bằng cách tiếp hợp mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 1 và 5 với TT và mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F với CRM₁₉₇; và

PCV16-35TT bao gồm các thể tiếp hợp polysacarit được tạo ra bằng cách tiếp hợp mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 3 và 5 với TT và mỗi polysacarit của các typ huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F với CRM₁₉₇.

Chế phẩm vaccin PCV16-13TT và PCV16-35TT tạo ra chứa mỗi polysacarit với lượng 2,2µg, ngoại trừ đối với typ huyết thanh 6B với lượng 4,4µg; TT với lượng nằm trong khoảng từ 10ug đến 15ug (đối với các typ huyết thanh 1 và 3) và CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40µg đến 50µg; tá được nhôm nguyên tố với lượng 0,125mg (nhôm phosphat với lượng 0,5mg); natri clorua với lượng 4,25mg; dung dịch đệm succinat với lượng 295µg; và polysorbat 80 với lượng 100µg trong tổng cộng 0,5ml liều. Chế phẩm PCV16-15TT trong tổng liều 0,5mL chứa TT với lượng nằm trong khoảng từ 5µg đến 10µg và CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40µg đến 50µg, và tương ứng với các thành phần khác và lượng của chúng là giống với lượng của chúng trong PCV16-13TT và PCV16-35TT.

Ví dụ 4. Tính miễn dịch của vaccin tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá

Vaccin phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, PCV16-CRM197, PCV16-13TT, PCV16-15TT, và PCV16-35TT được điều chế trong ví dụ 3, được thử nghiệm về khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở thỏ. Các tác dụng miễn dịch này được xác định bằng ELISA đặc hiệu kháng nguyên đối với nồng độ IgG trong huyết thanh và bằng thử nghiệm thực bào opsonin (opsonophagocytic assay-OPA) đối với chức năng kháng thể. Các con thỏ trắng New Zealand được gây miễn dịch trong cơ ở tuần 0 và tuần 3 với liều cao hơn liều lâm sàng dự kiến trên người 5% của mỗi polysacarit (2,31µg mỗi polysacarit, ngoại trừ đối với 6B với lượng 4,62µg) trong chế phẩm hoặc liều dùng cho người (2,2ug mỗi polysacarit, ngoại trừ 6B với lượng 4,4ug). Huyết thanh được lấy mẫu 3 lần một tuần sau khi gây miễn dịch. Cả hai nồng độ đều thể hiện cùng một kết quả.

Phản ứng miễn dịch đặc hiệu typ huyết thanh đối với các chế phẩm PCV16-CRM197, PCV16-13TT, PCV16-15TT, và PCV16-35TT được đánh giá bằng ELISA IgG và MOPA qua trung gian bề mặt mà xác định kháng thể chức năng.

4-1. PCV16-CRM197;

Đo nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh

Polysacarit nang (PnP) của mỗi typ huyết thanh được phủ lên đĩa có 96 lỗ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5µg/lỗ đến 1µg/lỗ. Một lượng tương đương huyết thanh được lấy mẫu từ mỗi đối tượng và được thu gom theo nhóm. Huyết thanh thu gom được pha loãng liên tiếp 2,5 lần bằng dung dịch đệm pha loãng kháng thể chứa Tween 20 và CWPS 5 µg/mL và sau đó để phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Rửa các đĩa 5 lần bằng dung dịch đệm rửa và sau đó 50µl huyết thanh đã hấp phụ sơ bộ và đã pha loãng được bổ sung vào đĩa có lỗ đã phủ, sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 2 giờ đến 18 giờ. Rửa các đĩa có lỗ theo cùng một cách và sau đó các thể tiếp hợp phosphatasa kiềm-IgG dê kháng thể được bổ sung vào mỗi lỗ, sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Rửa các đĩa như được mô tả trên đây và dung dịch đệm 1mg/mL p-nitrophenylamin làm cơ chất được bổ sung vào mỗi lỗ và sau đó để phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phản ứng được dập tắt bằng cách bổ sung 50µl 3M NaOH và mức hấp thụ ở bước sóng 405nm và 690nm được đo. Như một ví dụ so sánh, vacxin 13 giá có trên thị trường (PREVNAR13) được tiến hành quy trình này. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Nồng độ IgG (U/mL) đối với 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16- CRM197	Typ huyết thanh	PREVNAR 13	PCV16- CRM197
1	320,99	379,99	12F	-	120,44
3	436,85	653,84	14	482,05	502,6
4	1820,49	1948,29	18C	1731,07	2915,55
5	466,09	380,18	19A	993,68	672,2
6A	1064,69	1643,6	19F	863,32	1054,3

6B	326,94	552,58	22F	1,33	678,45
7F;	1010,79	833,11	23F	329,11	185,97
9V	715,40	433,33	33F	4,58	499,3

PCV16-CRM197 được nhận thấy là thu được mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tốt ở tất cả 16 typ huyết thanh. Đối với PCV16-CRM197, các typ huyết thanh phổ biến với PCV16-CRM197 và PREVNAR13 đều có nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tương đương với hoặc cao hơn PREVNAR13 và mỗi typ huyết thanh trong số các typ huyết thanh mới được bổ sung 12F, 22F, và 33F cũng có mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tốt.

Thử nghiệm tính miễn dịch chức năng (MOPA)

Các chức năng của kháng thể được đánh giá bằng cách kiểm tra huyết thanh trong thử nghiệm MOPA. Chủng *S. pneumoniae* MOPA được bảo quản ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn được pha loãng đến mức pha loãng cuối cùng tương ứng để nồng độ của mỗi chủng bằng khoảng 50.000CFU/mL. Lượng tương đương trong huyết thanh thu được từ mỗi đối tượng, được thu gom theo nhóm và được pha loãng 2 lần liên tiếp để 20µl huyết thanh còn lại trong đĩa có đáy hình chữ U. Sau khi pha loãng mẫu, 10µl chủng được chuẩn bị cho mỗi typ huyết thanh được trộn với mẫu đã pha loãng, và hỗn hợp được để phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút sao cho *S. pneumoniae* và kháng thể được trộn kỹ. Hỗn hợp gồm các tế bào HL-60 đã biệt hóa sơ bộ và bổ thể được bổ sung và được để phản ứng trong tủ ủ CO₂ (37°C) trong 45 phút. Nhiệt độ được giảm để ngừng hiện tượng thực bào và 10µl dung dịch phản ứng được đặt lên trên đĩa thạch đã làm khô sơ bộ trong 30 đến 60 phút, và sau đó được để hấp phụ lên đĩa trong 20 phút cho đến khi khô. Dung dịch gốc 25mg/mL TTC được bổ sung vào thạch phủ được chuẩn bị, và kháng thể thích hợp cho chủng tương ứng được bổ sung vào đó. Hỗn hợp được khuấy kỹ, và sau đó 25mL hỗn hợp được bổ sung lên đĩa và được làm cứng trong 30 phút. Đĩa đã cứng hoàn toàn được ủ trong tủ ủ CO₂ (37°C) trong khoảng thời gian từ 12 đến 18 giờ và sau đó đếm các khuẩn lạc. Hiệu giá MOPA được biểu thị dưới dạng tỷ lệ pha loãng tại đó quan sát thấy 50% khuẩn lạc bị

chết như một ví dụ so sánh, vắc xin 13 giá có trên thị trường (PREVNAR13) được tiến hành cùng quy trình. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Hiệu giá MOPA của 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16- CRM197	Typ huyết thanh	PREVNAR 13	PCV16- CRM197
1	128	128	12F	4	1024
3	512	1024	14	2048	1024
4	2048	2048	18C	1024	2048
5	512	256	19A	4096	2048
6A	4096	4096	19F	2048	2048
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F;	2048	1024	23F	2048	1024
9V	1024	512	33F	32	1024

Tất cả các typ huyết thanh đều có mức gây miễn dịch chức năng vượt trội trong PCV16-CRM197. Đối với PCV16-CRM197, các typ huyết thanh phổ biến với PCV16-CRM197 và PREVNAR13 đều có tính miễn dịch chức năng tương đương hoặc tốt hơn so với tính miễn dịch của PREVNAR13 và mỗi trong số các typ huyết thanh mới bổ sung 12F, 22F, và 33F cũng có mức miễn dịch chức năng cao.

4-2. PCV16-13TT;

Nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh và hiệu giá miễn dịch chức năng được đo theo cách giống như ở mục 4-1, ngoại trừ là PCV16-13TT được sử dụng thay vì PCV16-CRM₁₉₇, và các kết quả được thể hiện như sau.

Do nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh

Bảng 6. Nồng độ IgG (U/mL) đối với 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

Typ huyết thanh	PREVNA R13	PCV16-13TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16-13TT
1	276,92	844,48	12F	0,37	354,00
3	539,40	2980,73	14	254,59	582,61
4	1000,76	1698,00	18C	3266,87	5553,58
5	303,20	184,49	19A	681,62	1702,05
6A	533,35	532,02	19F	528,77	1998,83
6B	172,75	451,18	22F	0,74	1583,58
7F;	726,27	3449,73	23F	576,63	367,71
9V	647,71	725,14	33F	0,25	977,02

Khi polysacarit nang của các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với TT, chúng đều có lượng IgG đặc hiệu typ huyết thanh tăng đáng kể so với lượng thu được khi các typ huyết thanh được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ đều có mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tốt và các typ huyết thanh 4, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, và 19F đều có mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh cao hơn so với ở PREVNAR13.

Thử nghiệm tính miễn dịch chức năng (MOPA)

Bảng 7. Hiệu giá MOPA của 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16-13TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16-13TT
1	102	645	12F	4	1625
3	813	3251	14	2048	4096
4	2580	3251	18C	4096	4096
5	813	406	19A	2580	5161

	PREVNAR 13	PCV16- 13TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 13TT
6A	4096	4096	19F	2048	5161
6B	4096	6502	22F	8	5161
7F;	2580	6502	23F	4096	3251
9V	2048	3251	33F	4	3251

Nếu polysacarit nang của các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với TT, thì tính miễn dịch chức năng được cải thiện so với tính miễn dịch thu được nếu chúng được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ đều có tính miễn dịch chức năng vượt trội và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 4, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, và 19F đều có tính miễn dịch chức năng tốt hơn so với ở PREVNAR13.

4-3. PCV16-15TT;

Nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh và hiệu giá miễn dịch chức năng được đo theo cách giống như mục 4-1, ngoại trừ là PCV16-15TT được sử dụng thay vì PCV16-CRM₁₉₇, và các kết quả thu được được thể hiện như sau.

Do nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh

Bảng 8. Nồng độ IgG (U/mL) đối với 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16- 15TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 15TT
1	276,92	1083,23	12F	0,37	303,99
3	539,40	901,37	14	254,59	493,06
4	1000,76	2655,28	18C	3266,87	4075,62
5	303,20	2645,56	19A	681,62	937,41
6A	533,35	1460,65	19F	528,77	1355,08
6B	172,75	603,87	22F	0,74	1874,55

	PREVNAR 13	PCV16- 15TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 15TT
7F;	726,27	2285,92	23F	576,63	607,40
9V	647,71	663,37	33F	0,25	880,54

Nếu polysacarit nang của các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với TT, thì nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tăng đáng kể so với nồng độ thu được khi chúng được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ đều có mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh cao và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, và 19F đều có mức nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh cao hơn so với ở PREVNAR13.

Thử nghiệm tính miễn dịch chức năng (MOPA)

Bảng 9. Hiệu giá MOPA của 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16- 15TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 15TT
1	102	645	12F	4	1290
3	813	1290	14	2048	2580
4	2580	4096	18C	4096	3251
5	813	4096	19A	2580	2580
6A	4096	6502	19F	2048	4096
6B	4096	6502	22F	8	6502
7F;	2580	4096	23F	4096	3251
9V	2048	1290	33F	4	2580

Nếu polysacarit nang của các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với TT, thì tính miễn dịch chức năng được cải thiện so với tính miễn dịch thu được nếu chúng được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh

12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ đều có tính miễn dịch chức năng vượt trội và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, và 19F đều có mức miễn dịch chức năng cao hơn ở PREVNAR13.

4-4. PCV16-35TT;

Nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh và hiệu giá miễn dịch chức năng được đo theo cách giống như mục 4-1, ngoại trừ là PCV16-35TT được sử dụng thay vì PCV16-CRM₁₉₇, và các kết quả thu được được thể hiện như sau.

Đo nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh

Bảng 10. Nồng độ IgG (U/mL) đối với 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR 13	PCV16- 35TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 35TT
1	242,33	367,13	12F	0,25	334,45
3	656,91	1837,36	14	320,12	1055,422
4	1305,61	1786,84	18C	2920,75	3665,59
5	408,78	1316,12	19A	652,67	409,17
6A	737,55	957,85	19F	411,07	534,19
6B	167,41	322,61	22F	1,15	1176,6
7F;	808,75	1357,46	23F	742,55	408,88
9V	775,28	966,22	33F	0,25	855,55

Nếu polysacarit nang của các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với TT, thì nồng độ IgG đặc hiệu typ huyết thanh tăng đáng kể so với nồng độ thu được khi chúng được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ có nồng độ IgG trong typ huyết thanh tốt và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, và 19F đều có mức nồng độ IgG đặc hiệu huyết thanh cao hơn so với ở PREVNAR13.

Thử nghiệm tính miễn dịch chức năng (MOPA)

Bảng 11. Hiệu giá MOPA của 16 typ huyết thanh ở thời điểm 3 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

	PREVNAR1 3	PCV16- 35TT	Typ huyết thanh	PREVNAR1 3	PCV16- 35TT
1	128	256	12F	4	512
3	512	2048	14	2048	4096
4	2048	4096	18C	1024	4096
5	512	2048	19A	4096	4096
6A	4096	4096	19F	2048	4096
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F;	2048	2048	23F	2048	2048
9V	1024	2048	33F	32	2048

Khi các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với TT, tính miễn dịch chức năng được cải thiện so với tính miễn dịch thu được khi chúng được tiếp hợp với CRM₁₉₇. Tương tự, mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 12F, 22F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇ đều có tính miễn dịch chức năng vượt trội và mỗi polysacarit nang của các typ huyết thanh 1, 4, 9V, 12F, 14, 18C, và 19F đều có mức miễn dịch chức năng cao hơn ở PREVNAR13.

Các kết quả này chỉ ra rằng các chế phẩm tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp gây ra tính miễn dịch tương đương hoặc tốt hơn so với vacxin tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn, một chất mang, PREVNAR13. Các chế phẩm này cũng bất ngờ thể hiện rằng đáp ứng kháng thể với các typ huyết thanh 1, 3, và/hoặc 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm mang hỗn hợp được tăng cường đáng kể so với các đáp ứng kháng thể kháng cùng typ huyết thanh được tiếp hợp với CRM₁₉₇ trong vacxin PREVNAR 13, một chất mang. Ngoài ra, các chế phẩm này cũng thể hiện rằng các chế phẩm tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn 16 giá, chất mang hỗn hợp kích thích thành công đáp ứng kháng thể kháng các typ huyết thanh, 12F, 22F, và 33F bổ sung, tạo ra khả năng bảo vệ rộng hơn typ

huyết thanh so với các vacxin tiếp hợp polysacarit nang phẩy cầu khuẩn hiện bán trên thị trường.

Mặc dù một hoặc nhiều phương án được lấy làm ví dụ đã được mô tả trong bản mô tả sáng chế, song người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các thay đổi khác về mặt hình thức và các mô tả chi tiết có thể được đề cập mà không nằm ngoài phạm vi và tinh thần của sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn dưới đây được đề cập trong sáng chế và cung cấp thông tin nói chung về lĩnh vực kỹ thuật và các thử nghiệm và các mô tả chi tiết khác được bàn luận trong sáng chế. Các tài liệu viện dẫn dưới đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

- [1] Prymula et al., *Lancet*, 367:740-48 (2006).
- [2] Vesikari et al., *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009).
- [3] Dagan et al. *Infection & Immunity*, 5383-91 (2004).
- [4] Juergens et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(9):1277-1281 (2014).
- [5] Andrews et al., *Lancet*, 14:839-846 (2014).
- [6] Nurkka et al., *Vaccine*, 20:194-201 (2001).
- [7] Levin and Stone, *J. Immunology*, 67:235-242 (1951).
- [8] W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.I.)
- [9] Didierlaurent et al., *J. Immunol.*, 183: 6186-6197 (2009).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 16 thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein khác nhau,

trong đó mỗi thể tiếp hợp polysacarit nang phế cầu khuẩn-protein chứa chất mang protein được tiếp hợp với polysacarit nang từ một typ huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*,

trong đó các typ huyết thanh *Streptococcus pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F,

trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván,

trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit nang còn lại được tiếp hợp với CRM₁₉₇, và

trong đó hai polysacarit nang được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm bao gồm các typ huyết thanh 1, 3, và 5.

2. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

3. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1 và 3 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

4. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó polysacarit nang từ các typ huyết thanh 3 và 5 được tiếp hợp với giải độc tố uốn ván, và polysacarit nang từ các typ huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được tiếp hợp với CRM₁₉₇.

5. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.
6. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 5, trong đó tá dược này là tá dược trên cơ sở nhôm.
7. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 6, trong đó tá dược này được chọn từ nhóm bao gồm nhôm phosphat, nhôm sulfat, và nhôm hydroxit.
8. Chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 7, trong đó tá dược này là nhôm phosphat.
9. Vacxin chứa chế phẩm tiếp hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và tá dược được dụng.