



(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)



1-0039027

(51)^{2006.01} A61K 39/09; A61K 9/00; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2020-04645

(22) 04/02/2019

(86) PCT/US2019/016511 04/02/2019

(87) WO2019/152925 08/08/2019

(30) 62/626,509 05/02/2018 US; 10-2018-0045246 18/04/2018 KR

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/12/2020 393

(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, Bundang-Gu Seongnam-Si, Gyeonggi-Do 13494, Korea

(72) AN, Kyungjun (KR); HAM, Dongsoo (KR); KIM, Hun (KR); KIM, Sunghyun (KR); SHIN, Jinhwan (KR); HOPPER, Robert (US); KENSINGER, Richard, D. (US); KYAW, Moe (US); TALAGA, Philippe (FR).

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

(54) CHẾ PHẨM LIÊN HỢP POLYSACARIT PHÉ CẦU KHUẨN - PROTEIN ĐA GIÁ VÀ VẮC-XIN CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp chứa 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phé cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp bao gồm polysacarit vỏ từ týp huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae* được liên hợp với giải độc tố uốn ván (TT) hoặc CRM₁₉₇, trong đó các týp huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, trong đó các polysacarit vỏ của hai trong số các týp huyết thanh 1, 3, và 5 và một hoặc cả hai trong số các týp huyết thanh 15B và 22F được liên hợp với TT và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Sáng chế còn đề xuất vắc-xin chứa chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin chứa chế phẩm này để phòng ngừa sự nhiễm hoặc bệnh do *Streptococcus pneumoniae* gây ra ở đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phế cầu khuẩn (*Streptococcus pneumoniae*) là vi khuẩn yếm khí không bắt buộc Gram dương, hình mũi mác, với hơn 90 týp huyết thanh đã biết. Hầu hết các týp huyết thanh *S. pneumoniae* đã được chứng minh là gây bệnh, với 23 týp huyết thanh phổ biến nhất chiếm khoảng 90% bệnh xâm lấn trên toàn thế giới. Týp huyết thanh được phân loại dựa trên đáp ứng huyết thanh học của các polysacarit vỏ, yếu tố độc lực quan trọng nhất đối với phế cầu khuẩn. Polysacarit vỏ là kháng nguyên độc lập tế bào T gây ra sự sản xuất kháng thể trong trường hợp không có tế bào T trợ giúp. Các kháng nguyên độc lập tế bào T thường gây cảm ứng các kháng thể có ái lực thấp và đáp ứng miễn dịch trong thời gian ngắn với rất ít hoặc không có sự ghi nhớ miễn dịch.

Vắc-xin phế cầu khuẩn ban đầu bao gồm các dạng kết hợp của các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh khác nhau. Các vắc-xin này có thể tạo ra tính miễn dịch chống lại *S. pneumoniae* ở những bệnh nhân có hệ miễn dịch phát triển hoặc khỏe mạnh, tuy nhiên, chúng không hiệu quả ở trẻ sơ sinh, mà thiếu hệ miễn dịch phát triển và người già, mà thường có chức năng miễn dịch suy giảm. Để cải thiện đáp ứng miễn dịch với vắc-xin phế cầu khuẩn, đặc biệt ở các đối tượng trẻ sơ sinh và người già, những người có nguy cơ nhiễm *S. pneumoniae* cao hơn, polysacarit vỏ được liên hợp với các protein mang phù hợp để tạo ra vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn. Sự liên hợp với protein mang phù hợp làm thay đổi polysacarit vỏ từ kháng nguyên độc lập tế bào T thành kháng nguyên phụ thuộc tế bào T. Như vậy, đáp ứng miễn dịch chống lại polysacarit vỏ liên hợp bao gồm các tế bào T trợ giúp, mà giúp gây cảm ứng đáp ứng miễn dịch mạnh hơn và nhanh hơn khi tiếp xúc lại với polysacarit vỏ.

Có ít nhất hai cách tiếp cận để phát triển vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn: phương pháp sử dụng chất mang đơn lẻ và phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp. Khả năng

gây miễn dịch của các thể liên hợp polysacarit vỏ khác nhau có thể thay đổi tùy thuộc vào tít huyết thanh của phé cầu khuẩn và protein mang được sử dụng. Trong phương pháp sử dụng chất mang đơn lẻ, các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh khác nhau được liên hợp với chất mang protein đơn lẻ. Loạt vắc-xin PREVNAR của Pfizer là một ví dụ về cách tiếp cận sử dụng chất mang đơn lẻ trong đó các polysacarit vỏ khác nhau được liên hợp với chất mang protein CRM₁₉₇, một biến thể không độc của giải độc tố bạch hầu có một thay thế thể axit amin đơn lẻ là axit glutamic cho glyxin. Vắc-xin PREVNAR 7 thành phần (PREVNAR) lần đầu tiên được phê duyệt vào năm 2000 và chứa các polysacarit vỏ từ bảy tít huyết thanh phổ biến nhất: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F. Vắc-xin 13 thành phần, PREVNAR 13, đã thêm các tít huyết thanh 1, 5, 7F, 3, 6A và 19A vào chất mang protein CRM₁₉₇. Chất mang protein, CRM₁₉₇, chất mang đơn lẻ được sử dụng trong vắc-xin PREVNAR chưa bao giờ được sử dụng làm một phần của hệ chất mang hỗn hợp trong vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn.

Cách tiếp cận vắc-xin phé cầu khuẩn thứ hai là phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp. Trong phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp, thay vì sử dụng chất mang protein đơn lẻ, hai hoặc hơn hai chất mang protein được sử dụng, với các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh đặc hiệu liên hợp với chất mang protein thứ nhất và polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh khác nhau được liên hợp với ít nhất chất mang protein khác, thứ hai. Ví dụ, GlaxoSmithKline đã phát triển SYNFLORIX, vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp, 10 thành phần (các tít huyết thanh 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F) mà sử dụng protein D *H influenzae*, giải độc tố uốn ván, và giải độc tố bạch hầu làm các chất mang protein. Trong SYNFLORIX, các tít huyết thanh 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 và 23F được liên hợp với protein D; tít huyết thanh 18C được liên hợp với giải độc tố uốn ván; và tít huyết thanh 19F được liên hợp với giải độc tố bạch hầu [2]. Tít huyết thanh 3 được loại bỏ khỏi vắc-xin có trước 11 thành phần đối với SYNFLORIX, một phần, bởi vì nó không cho thấy hiệu quả đặc hiệu tít huyết thanh trong thử nghiệm viêm tai giữa cấp tính [1]. Một nhóm khác, Aventis Pasteur, đã phát triển vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp, 11 thành phần (các tít huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F và 23F), bằng cách sử dụng giải độc tố bạch hầu và giải độc tố uốn ván làm các chất mang protein [3]. Các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 3, 9V, 14 và 18C có thể gây ra đáp ứng tốt hơn khi liên hợp với giải độc tố bạch hầu so với khi liên hợp với giải độc tố uốn ván [6]. Do đó, các tít huyết thanh 3, 6B, 14 và 18C được liên hợp với

độc tố bạch hầu và các týp huyết thanh 1, 4, 5, 7F, 9V, 19F và 23F được liên hợp với giải độc tố uốn ván. Sự phát triển của vắc-xin phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp này đã bị chấm dứt do, một phần là, nguyên nhân kỹ thuật và khả năng đáp ứng giảm khi dùng với vắc-xin ho gà vô bào [3]. Gần đây, týp huyết thanh 5 cũng như là 1 đã được báo cáo là có một trong những hiệu giá OPA được quan sát thấp nhất trong tất cả các týp huyết thanh PREVNAR 13, trong đó có mối tương quan liên quan giữa độ chuẩn IgG và hoạt tính OPA [4]. Ngoài ra, có ý kiến cho rằng đối với týp huyết thanh 3, cần có nồng độ IgG huyết thanh cao hơn nhiều để bảo vệ [5].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp được cải thiện và mới và vắc-xin chứa chế phẩm này. Theo một khía cạnh, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn, đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein bao gồm protein mang được liên hợp với polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các týp huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó bốn trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai trong số bốn polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3 và 5, và hai polysacarit vỏ còn lại là các týp huyết thanh 15B và 22F.

Theo một phương án về chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

Theo phương án khác về chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

Theo phương án khác nữa về chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein bao gồm chất mang protein được liên hợp với polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các týp huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó ba trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó ba polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3, 5, 15B và 22F. Theo các phương án nhất định, hai trong số ba polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3 và 5, và polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với giải độc tố uốn ván là týp huyết thanh 15B hoặc 22F.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp chứa thêm chất bổ trợ, chẳng hạn như chất bổ trợ dựa trên nhôm, bao gồm, nhưng không giới hạn ở nhôm photphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit.

Một khía cạnh khác đề cập đến việc sử dụng chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp làm vắc-xin.

Tuy nhiên, một khía cạnh khác đề cập đến vắc-xin chứa chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp và tá dược được dùng.

Tuy nhiên, một khía cạnh khác đề cập đến phương pháp phòng ngừa sự nhiễm hoặc bệnh do *Streptococcus pneumoniae* gây ra ở đối tượng, chẳng hạn như ở người, phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu để phòng ngừa của chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin chứa chế phẩm này.

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

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

Theo các phương án nhất định, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin được dùng bằng cách tiêm trong cơ. Theo các phương án nhất định, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin được dùng dưới dạng một phần của đợt gây miễn dịch.

Một khía cạnh khác đề cập đến thể liên hợp gây miễn dịch của týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae*, mà chứa: sacarit vỏ týp huyết thanh 9N từ *Streptococcus pneumoniae*; và protein mang liên kết với sacarit vỏ này, trong đó protein mang là CRM₁₉₇. Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), sacarit týp huyết thanh 9N có thể được liên kết với CRM₁₉₇ để tạo thành thể liên hợp ở trạng thái được hoạt hóa để có mức độ oxy hóa là 2-19 hoặc 5-10 và khối lượng phân tử là 200-700 kDa. Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch có thể có khối lượng phân tử là 500-4.000 kDa.

Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), tỉ lệ của sacarit vỏ týp huyết thanh 9N so với chất mang protein trong thể liên hợp gây miễn dịch týp huyết thanh 9N là 0,1-5 (khối lượng/khối lượng). Theo các phương án nhất định, tỷ lệ này là 0,5-2,5.

Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), 15-60% thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B.

Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch được điều chế với polysacarit týp huyết thanh 9N mà đã được hoạt hóa để đạt được mức độ oxy hóa là

2-19. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch đã được điều chế với polysacarit týp huyết thanh 9N mà đã được hoạt hóa để đạt được mức độ oxy hóa là 5-10.

Theo các phương án nhất định về thể liên hợp týp huyết thanh 9N gây miễn dịch, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và vắc-xin (và phương pháp/việc sử dụng chúng), khi saccarit týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* được liên hợp với CRM₁₉₇ bằng cách bổ sung 0,02-0,19 µg periodat cho mỗi 1 µg đường, thể liên hợp có thể có khối lượng phân tử 500-4.000 kDa, mức phân bố khối lượng phân tử 15-60% ($K_d \leq 0,3$) và tỷ lệ saccarit/protein 0,5-2,5.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế thể liên hợp gây miễn dịch của týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae*, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) dung giải tế bào vi khuẩn tổng hợp polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* bằng cách lên men chúng;
- (b) tinh chế saccarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* từ tế bào đã được dung giải;
- (c) hoạt hóa polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* bằng cách cho phản ứng với tác nhân oxy hóa để đạt được mức độ oxy hóa là 2-19 hoặc 5-10; và
- (d) tạo thành thể liên hợp của saccarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* liên kết với CRM₁₉₇ bằng cách trộn saccarit đã được hoạt hóa với CRM₁₉₇.

Theo các phương án nhất định, CRM₁₉₇ được trộn trong bước (d) có thể được cho phản ứng với chất khử để tạo thành thể liên hợp với polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* đã được hoạt hóa. Theo các phương án nhất định, ở bước (c), 0,02-0,19 µg periodat có thể được cho phản ứng với 1 µg polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* ở 20-25°C trong 15-20 giờ.

Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N của *Streptococcus pneumoniae* đã phản ứng với tác nhân oxy hóa ở bước (c) có thể có khối lượng phân tử là 400 - 900 kDa. Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* đã được hoạt hóa được trộn với CRM₁₉₇ trong bước (d) có thể có khối lượng phân tử là 200-700 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên

hợp gây miễn dịch của týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* có thể có khối lượng phân tử là 500-4.000 kDa. Theo các phương án nhất định, tỷ lệ đầu vào ban đầu của CRM₁₉₇ với sacarit vỏ týp huyết thanh 9N đã được hoạt hóa (CRM₁₉₇ mang:sacarit) có thể là 0,5-2,5:1. Theo các phương án nhất định, ít nhất 15-60% thể liên hợp gây miễn dịch có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 như được đo trong cột CL-4B.

Theo các phương án nhất định, khi polysacarit týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* theo sáng chế được liên hợp với CRM₁₉₇ bằng cách bổ sung 0,02-0,19 µg periodat cho mỗi 1 µg đường, thể liên hợp gây miễn dịch có khối lượng phân tử là 500-4.000 kDa, mức phân bố khối lượng phân tử là 15-60% (K_d ≤ 0,3) như đo được trong cột CL-4B và tỉ lệ CRM₁₉₇/polysacarit bằng 0,5-2,5.

Các đối tượng, dấu hiệu và ưu điểm nêu trên và các đối tượng, dấu hiệu và ưu điểm khác của chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Để hiểu bản mô tả này dễ dàng hơn, các thuật ngữ nhất định trước hết được định nghĩa dưới đây. Các định nghĩa khác cho các thuật ngữ sau đây và các thuật ngữ khác có thể được quy định trong toàn bộ bản mô tả này.

Như được sử dụng ở đây và trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều, trừ khi ngữ cảnh rõ ràng quy định khác. Vì vậy, ví dụ, việc đề cập đến "phương pháp" bao gồm một hoặc nhiều phương pháp, và/hoặc các bước thuộc loại được mô tả ở đây và/hoặc sẽ trở nên rõ ràng đối với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc bản mô tả này và v.v..

Sử dụng: Như được sử dụng ở đây, "sử dụng" chế phẩm cho đối tượng có nghĩa là cho, áp dụng hoặc đưa chế phẩm này tiếp xúc với đối tượng. Việc sử dụng có thể được thực hiện theo đường bất kỳ trong số nhiều đường dùng, chẳng hạn như tại chỗ, qua đường miệng, dưới da, trong cơ, 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", khi dùng cho một hoặc nhiều giá trị được quan tâm, dùng để chỉ giá trị tương tự với giá trị tham chiếu đã nêu. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ "xấp xỉ" hoặc "khoảng" dùng để chỉ

khoảng giá trị nằm trong phạm vi 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 đã nêu trừ khi có quy định khác hoặc có bằng chứng khác từ ngữ cảnh (trừ trường hợp số đó vượt quá 100% của giá trị có thể có).

Thể liên hợp: Như dùng trong bản mô tả này, và được hiểu từ ngữ cảnh phù hợp, các thuật ngữ “(các) thể liên hợp” hoặc “(các) thể liên hợp glyco” dùng để chỉ polysacarit *Streptococcus pneumoniae* liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng chiến lược liên hợp sinh học cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị bất kỳ.

Mức độ oxy hóa: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mức độ oxy hóa” (DO) dùng để chỉ số lượng đơn vị đường lặp lại trên mỗi nhóm aldehyt được tạo ra khi sacarit đã được tinh chế hoặc xác định kích thước được hoạt hóa bằng tác nhân oxy hóa. Mức độ oxy hóa của sacarit có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tá dược: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tá dược” dùng để chỉ tác nhân không trị liệu có thể được bao gồm trong chế phẩm, ví dụ để đem lại hoặc thu được hiệu quả nhất quán hoặc ổn định mong muốn.

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

Đa giá: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đa giá" dùng để chỉ chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn có các polysacarit vỏ phế cầu khuẩn từ nhiều hơn một tít huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae*.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “(các) chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp” dùng để chỉ chế phẩm chứa hoặc gồm có 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein bao gồm chất mang protein liên hợp với polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh khác nhau của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các tít huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tố uốn ván, trong đó 1) trong đó ba trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố

uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai trong số ba polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tố uốn ván, được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3 và 5, và polysacarit vỏ còn lại là týp huyết thanh 15B hoặc 22F; hoặc 2) trong đó bốn trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai trong số bốn polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3 và 5, và hai polysacarit vỏ còn lại là các týp huyết thanh 15B và 22F. Theo một số phương án, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Theo phương án khác, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Theo phương án khác nữa, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇.

Khối lượng phân tử: Trừ khi được quy định khác, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "khối lượng phân tử" của sacarit vỏ hoặc thể liên hợp protein mang-sacarit vỏ dùng để chỉ khối lượng phân tử trung bình được tính bằng sắc ký loại trừ kích thước (size exclusion chromatography- SEC) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (multi-angle laser light scattering - MALLS).

Tá được dùng: Các tá được dùng hữu dụng trong sáng chế này là thông thường. Remington's Pharmaceutical Sciences, của E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, Tái bản lần thứ 15 (1975), mô tả các chế phẩm và các công thức phù hợp để phân phối một hoặc nhiều chế phẩm điều trị, bao gồm vắc-xin, và các dược chất khác. Các tá được dùng thích hợp bao gồm, ví dụ như tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mỳ, phấn, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, natri clorua, sữa tách béo khô, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và các chất tương tự. Nói chung, bản chất của tá được sẽ phụ thuộc vào phương thức dùng cụ thể được sử dụng. Ví dụ, các chế phẩm ngoài đường tiêu hóa thường chứa dịch lỏng tiêm được bao gồm dịch lỏng được dùng và chấp nhận được về mặt sinh lý như nước, nước muối sinh lý, dung dịch muối cân bằng, dung dịch đậm, dextroza trong nước, glyxerol hoặc dạng tương tự làm chất dẫn. Đối với chế phẩm rắn (ví dụ, các dạng bột, viên tròn, viên nén hoặc viên nang), tá được rắn không độc thông thường có thể bao gồm, ví dụ, các

loại dùng cho dược phẩm gồm manitol, lactoza, tinh bột hoặc magie stearat. Ngoài các chất mang trung tính sinh học, dược phẩm được sử dụng có thể chứa lượng nhỏ của các chất phụ trợ không độc, chẳng hạn như chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản và chất đệm pH và dạng tương tự, ví dụ như natri axetat hoặc sorbitan monolaurat.

Lượng hữu hiệu để phòng ngừa: Như được định nghĩa trong sáng chế, thuật ngữ "lượng hữu hiệu để phòng ngừa" hoặc "liều hữu hiệu để phòng ngừa" dùng để chỉ lượng hoặc liều lượng cần để gây ra đáp ứng miễn dịch đủ để trì hoãn sự khởi phát và/hoặc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng do nhiễm *Streptococcus pneumoniae*.

Phòng ngừa: Thuật ngữ "phòng ngừa", như dùng trong sáng chế, dùng để chỉ việc tránh biểu hiện bệnh, trì hoãn khởi phát, và/hoặc 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, sự nhiễm *Streptococcus pneumoniae*). Theo một số phương án, việc phòng ngừa được đánh giá trên cơ sở quần thể sao cho chất được coi là mang lại sự phòng ngừa chống lại bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể nếu có sự giảm đáng kể về mặt thống kê về sự phát triển, tần suất, và/hoặc cường độ của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh được quan sát thấy trong quần thể dễ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh này.

Đối tượng: Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ "đối tượng" có nghĩa là động vật có vú bất kỳ, bao gồm chuột, thỏ và người. Theo các phương án nhất định, đối tượng là người lớn, thanh thiếu niên hoặc trẻ sơ sinh. Theo một số phương án, các thuật ngữ "cá thể" hoặc "bệnh nhân" được sử dụng và được dự định là có thể hoán đổi với "đối tượng".

Phần mô tả sau đây về (các) phương án được bộc lộ và các Ví dụ chỉ đơn thuần là ví dụ và không được dự định là làm giới hạn sáng chế, ứng dụng hoặc sử dụng sáng chế.

Sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp được cải thiện và mới và vắc-xin chứa chúng. Mặc dù chất mang protein, CRM₁₉₇, đã được sử dụng trước đây trong vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn, chất mang đơn lẻ, sáng chế mô tả việc sử dụng CRM₁₉₇ trong vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp. Cụ thể là, sáng chế mô tả việc sử dụng kết hợp CRM₁₉₇ và giải độc tố uốn ván làm

các protein mang cho các týp huyết thanh phé cầu khuẩn cụ thể trong các chế phẩm và vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn đa giá.

Như thảo luận ở trên, khả năng gây miễn dịch của các thể liên hợp polysacarit vỏ khác nhau có thể thay đổi tùy thuộc vào týp huyết thanh của phé cầu khuẩn và protein mang được sử dụng. Sáng chế mô tả sự liên hợp thành công của týp huyết thanh 3 với giải độc tố uốn ván như là một phần của vắc-xin chất mang hỗn hợp, bất chấp các hướng dẫn trước đây rằng týp huyết thanh 3 có khả năng miễn dịch cao hơn khi liên hợp với giải độc tố bạch hầu thay vì giải độc tố uốn ván [6]. Sáng chế cũng mô tả sự liên hợp thành công của các týp huyết thanh 1, 5, 15B, và 22F với giải độc tố uốn ván như là một phần của vắc-xin chất mang hỗn hợp. Sáng chế cũng bộc lộ phát hiện bất ngờ rằng đáp ứng kháng thể với týp huyết thanh 3 liên hợp với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn đa giá, ví dụ như 21 thành phần, chất mang hỗn hợp cao hơn khoảng 4,5 lần so với khi týp huyết thanh 3 được liên hợp với CRM₁₉₇ trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 13 thành phần, chất mang đơn lẻ (PREVNAR 13).

Hơn nữa, phát hiện bất ngờ không chỉ giới hạn ở týp huyết thanh 3 mà còn được quan sát đối với các týp huyết thanh khác liên hợp với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp. Chẳng hạn, như được thể hiện trong các Ví dụ, sự liên hợp của các týp huyết thanh 1 và 5 hoặc 3 và 5 với giải độc tố uốn ván trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp với các týp huyết thanh còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇ (ví dụ, PCV21(1/5/15B/22F)-TT, và PCV21(3/5/15B/22F)-TT) luôn gây ra các đáp ứng kháng thể được tăng cường đáng kể đối với các týp huyết thanh liên hợp với giải độc tố uốn ván so với các đáp ứng kháng thể (đáp ứng IgG hoặc hiệu giá MOPA) chống lại cùng các týp huyết thanh được liên hợp với CRM₁₉₇ trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang đơn lẻ (PREVNAR 13).

Giải độc tố uốn ván lớn hơn đáng kể so với CRM₁₉₇. Do đó, việc liên hợp ba hoặc bốn trong số các týp huyết thanh 1, 3, 5, 15B, và 22F với giải độc tố uốn ván như là một phần của vắc-xin chất mang hỗn hợp dẫn đến làm giảm tỷ lệ polysacarit so với chất mang ("PS/C") đối với các týp huyết thanh được liên hợp với giải độc tố uốn ván so với tỷ lệ PS/C của các týp huyết thanh như vậy được liên hợp với một chất mang duy nhất mà nhỏ hơn so với giải độc tố uốn ván, như CRM₁₉₇. Theo cách này, phương pháp sử dụng chất mang hỗn hợp được mô tả trong sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm tỷ lệ PS/C đối với một hoặc nhiều týp huyết thanh 1, 3, 5, 15B, hoặc 22F.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp được mô tả trong sáng chế cũng bao gồm các týp huyết thanh phế cầu khuẩn hiện không được bao gồm trong ba loại vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn hiện có trên thị trường toàn cầu: PREVNAR (được gọi là Prevenar ở một số quốc gia), SYNFLORIX và PREVNAR 13. Bệnh gây ra bởi các týp huyết thanh phế cầu khuẩn hiện chưa được bao phủ đang gia tăng, một phần là do sự phát triển của tính kháng kháng khuẩn, số lượng bệnh nhân bị thỏa hiệp miễn dịch tăng và thiếu áp lực miễn dịch. Ví dụ, hiện không có vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn nào chứa týp huyết thanh 9N. Ngoài ra, hiện không có loại vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn chứa các týp huyết thanh 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F và 33F. Sáng chế bộc lộ việc bổ sung thành công của các týp huyết thanh 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F và 33F vào vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp (giải độc tố uốn ván và CRM₁₉₇), cũng như các đáp ứng kháng thể gây ra bởi týp huyết thanh 9N mà cao hơn khoảng 40 đến 50 lần so với PREVNAR13.

Polysacarit týp huyết thanh 9N phế cầu khuẩn

Polysacarit týp huyết thanh 9N có thể thu được trực tiếp từ vi khuẩn bằng cách sử dụng quy trình phân lập đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0228380). Ngoài ra, sacarit có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp.

Týp huyết thanh 9N của chủng *Streptococcus pneumoniae* có thể thu được từ các bộ sưu tập môi trường nuôi cấy đã được thiết lập (ví dụ, Phòng thí nghiệm Tham chiếu *Streptococcus* của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh (Atlanta, Georgia)) hoặc mẫu bệnh phẩm.

Tế bào vi khuẩn thường được cho sinh trưởng trong môi trường, chẳng hạn như môi trường dựa trên đậu tương. Sau khi lên men tế bào vi khuẩn sản xuất polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae*, tế bào vi khuẩn được dung giải để tạo ra dịch dung giải tế bào. Sau đó, polysacarit týp huyết thanh 9N có thể được phân lập từ dịch dung giải tế bào bằng các kỹ thuật tinh chế đã biết trong lĩnh vực, bao gồm ly tâm, lọc sâu, kết tủa, siêu lọc, xử lý bằng than hoạt tính, lọc tuần hoàn có pha loãng và/hoặc sắc ký cột (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được công bố trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0228380). Polysacarit vỏ týp huyết thanh 9N đã được tinh chế có thể được sử dụng để điều chế thể liên hợp miễn dịch. Polysacarit vỏ týp huyết

thanh 9N thu được bằng cách tinh chế polysacarit tít huyết thanh 9N từ dịch dung giải *Streptococcus pneumoniae* và tùy ý bằng cách định cỡ polysacarit đã được tinh chế có thể được đặc trưng bởi các thông số khác nhau, ví dụ như khối lượng phân tử (MW) của polysacarit vỏ tít huyết thanh 9N.

Theo các phương án nhất định, polysacarit đã được tinh chế được tinh chế từ tít huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* trước khi liên hợp có khối lượng phân tử là 5-5.000 kDa. Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ tít huyết thanh 9N trước khi liên hợp có khối lượng phân tử là 50-1.000 kDa. Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ tít huyết thanh 9N trước khi liên hợp có khối lượng phân tử là 70-900 kDa. Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ tít huyết thanh 9N trước khi liên hợp có khối lượng phân tử là 100-800 kDa. Theo các phương án nhất định, polysacarit vỏ tít huyết thanh 9N đã được tinh chế có thể được hoạt hóa trước khi liên hợp để có khối lượng phân tử 50-800 kDa, 80-780 kDa, 100-770 kDa, 120-760 kDa, 140-750 kDa, 150-740 kDa, 160-730 kDa, 170-735 kDa, 180-720 kDa, 190-710 kDa, 200-700 kDa, 220-690 kDa, 240-680 kDa, 260-670 kDa, 270-660 kDa hoặc các khoảng khối lượng phân tử tương tự. Bất kỳ số nguyên nào trong bất kỳ khoảng nêu trên đều được dự tính là phương án của sáng chế.

Polysacarit tít huyết thanh 9N đã được hoạt hóa có thể được đặc trưng bởi mức độ oxy hóa và khối lượng phân tử. Theo các phương án nhất định, polysacarit tít huyết thanh 9N đã được hoạt hóa có thể có mức độ oxy hóa là 0,5-25, 0,6-23, 0,8-21, 1-20,8, 1,1-20,5, 1,2-20,3, 1,3-20, 1,4-19,5, 1,5-19,3, 1,6-19,2, 1,7-19,1, 2-19, 3-18, 4-15 hoặc 5-10.

Polysacarit có thể bị giảm kích thước một chút trong quy trình tinh chế bình thường. Ngoài ra, như được mô tả trong sáng chế, polysacarit có thể được định cỡ trước khi liên hợp. Khoảng khối lượng phân tử được đề cập ở trên dùng để chỉ khoảng của polysacarit đã được tinh chế sau bước định cỡ cuối cùng (ví dụ, sau khi tinh chế, thủy phân và hoạt hóa) trước khi liên hợp.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp và phương pháp tạo ra chúng

Sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn, đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa hoặc gồm có 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein bao gồm chất mang protein liên

hợp với polysacarit vỏ từ tít huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các tít huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tổ uốn ván, trong đó 3-4 polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tổ uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó 3-4 polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tổ uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các tít huyết thanh 1, 3, 5, 15B, và 22F. Theo các phương án nhất định, ba trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tổ uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Theo các phương án nhất định, bốn trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tổ uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn, đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa hoặc gồm có 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phé cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phé cầu khuẩn-protein bao gồm chất mang protein liên hợp với polysacarit vỏ từ tít huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các tít huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* là 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, trong đó chất mang protein là CRM₁₉₇ hoặc giải độc tổ uốn ván, trong đó bốn trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tổ uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, và trong đó hai trong số bốn polysacarit vỏ mà được liên hợp với giải độc tổ uốn ván được chọn từ nhóm gồm có các tít huyết thanh 1, 3, và 5, và hai polysacarit vỏ còn lại là các tít huyết thanh 15B và 22F.

Theo một phương án, các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tổ uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Theo phương án khác, polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tổ uốn ván, và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇. Theo phương án khác nữa, các polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tổ uốn ván, và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇.

Trong vắc-xin liên hợp polysacarit-protein, protein mang được liên hợp với kháng nguyên polysacarit chủ yếu để giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch (ví dụ phản ứng kháng thể) với kháng nguyên polysacarit. Protein mang tốt hơn là protein không độc. Các

protein mang cần phải có khả năng thay đổi để liên hợp với polysacarit phé cầu khuẩn bằng cách sử dụng các quy trình liên hợp tiêu chuẩn, như được thảo luận chi tiết hơn dưới đây. Các protein mang được sử dụng trong chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp là giải độc tố uốn ván (TT) và CRM₁₉₇, mỗi loại được sử dụng trong thiết kế vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn nhưng không bao giờ trong cùng một vắc-xin chất mang hỗn hợp.

CRM₁₉₇ là biến thể không độc (nghĩa là giải độc tố) của độc tố bạch hầu mà giữ lại các đặc tính miễn dịch của độc tố bạch hầu kiểu đại. CRM₁₉₇ khác với độc tố bạch hầu kiểu đại ở một bazơ trong gen cấu trúc, mà làm nảy sinh sự thế axit amin đơn lẻ từ axit glutamic thành glyxin. CRM₁₉₇ thường được phân lập từ môi trường nuôi cấy chủng C7 *Corynebacterium diphtheria* (β197) sinh trưởng trên axit casamino và môi trường dựa trên chiết xuất nấm men. CRM₁₉₇ có thể được tinh chế thông qua siêu lọc, kết tủa amoni sulfat và sắc ký trao đổi ion. Ngoài ra, CRM₁₉₇ có thể được điều chế tái tổ hợp theo Bằng sáng chế Mỹ số 5,614,382, mà được đưa toàn bộ nội dung vào đây bằng cách viện dẫn. CRM₁₉₇ đã được sử dụng trong thiết kế vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn nhưng không bao giờ là một phần của vắc-xin chất mang hỗn hợp.

Giải độc tố uốn ván được điều chế và sử dụng trên toàn thế giới để tiêm chủng trên diện rộng chống lại bệnh uốn ván (hoặc khóa hàm) do *Clostridium tetani* gây ra. Giải độc tố uốn ván cũng được sử dụng cả đơn lẻ và kết hợp với vắc-xin bạch hầu và/hoặc ho gà. Protein gốc, độc tố uốn ván, thường thu được trong dịch nuôi cấy của *Clostridium tetani*. Độc tố uốn ván là protein khoảng 150 kDa và gồm có hai tiểu đơn vị (khoảng 100 kDa và khoảng 50 kDa) được liên kết bằng liên kết disulfua. Độc tố này thường được giải độc bằng formaldehyt và có thể được tinh chế từ dịch lọc nuôi cấy bằng các phương pháp đã biết, như kết tủa amoni sulfat (xem, ví dụ, [7], [8]) hoặc kỹ thuật sắc ký, như được bộc lộ, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO 1996/025425. Độc tố uốn ván cũng có thể bị bất hoạt bởi các phương tiện di truyền tái tổ hợp.

Giải độc tố uốn ván cũng đã được sử dụng làm protein mang trong các vắc-xin khác, bao gồm vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn. Nhưng việc sử dụng độc tố uốn ván trong vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp kết hợp với CRM₁₉₇ là mới. Lĩnh vực này cũng hướng dẫn ngoài cách liên hợp tít huyết thanh 3 với giải độc tố uốn ván trong vắc-xin liên hợp phé cầu khuẩn, chất mang hỗn hợp vì tít huyết thanh 3 được chứng

minh là có khả năng miễn dịch cao hơn khi liên hợp với giải độc tố bạch hầu so với giải độc uốn ván [6].

Các polysacarit vỏ phế cầu khuẩn được sử dụng trong các chế phẩm và vắc-xin được mô tả trong sáng chế, bao gồm các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F và 33F, có thể được điều chế từ *Streptococcus pneumoniae* bằng kỹ thuật có sẵn bất kỳ, bao gồm các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, bao gồm, ví dụ như, các kỹ thuật được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352, và các công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 và 2008/0286838, tất cả các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, mỗi týp huyết thanh polysacarit vỏ phế cầu khuẩn có thể được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy (ví dụ, môi trường dựa trên đậu tương). Các tế bào được dung giải, và các polysacarit riêng lẻ có thể được tinh chế từ dịch dung giải thông qua ly tâm, kết tủa, siêu lọc, và/hoặc sắc ký cột. Ngoài ra, polysacarit vỏ phế cầu khuẩn có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp.

Các polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* chứa các đơn vị oligosacarit lặp, mà có thể chứa tới 8 gốc đường. Kháng nguyên sacarit vỏ có thể là polysacarit có chiều dài đầy đủ, hoặc nó có thể được làm giảm kích thước (ví dụ, đơn vị oligosacarit đơn lẻ, hoặc chuỗi sacarit có chiều dài nguyên thể ngắn hơn chứa các đơn vị oligosacarit lặp). Kích thước của polysacarit vỏ có thể được làm giảm bằng các phương pháp khác nhau trong lĩnh vực, như xử lý thủy phân bằng axit, xử lý bằng hydro peroxit, định cỡ bằng máy đồng nhất hóa áp suất cao, tùy ý sau đó là xử lý bằng hydro peroxit để tạo ra các mảnh oligosacarit, hoặc vi lỏng hóa.

Thể liên hợp phế cầu khuẩn của mỗi týp huyết thanh có thể được điều chế bằng cách liên hợp polysacarit vỏ của mỗi týp huyết thanh với protein mang. Các thể liên hợp phế cầu khuẩn khác nhau có thể được điều chế thành chế phẩm, bao gồm chế phẩm đơn liều.

Để điều chế thể liên hợp polysacarit-protein, các polysacarit vỏ được điều chế từ mỗi týp huyết thanh của phế cầu khuẩn có thể được hoạt hóa về mặt hóa học sao cho các polysacarit vỏ có thể phản ứng với protein mang. Sau khi được hoạt hóa, mỗi polysacarit vỏ có thể được liên hợp riêng rẽ với protein mang để tạo thành thể liên hợp glyco. Sự

hoạt hóa hóa học của các polysacarit và sự liên hợp tiếp theo với protein mang có thể đạt được bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các nhóm hydroxyl lân cận ở đầu của polysacarit vô có thể được oxy hóa thành các nhóm aldehyt bằng các tác nhân oxy hóa như periodat (bao gồm natri periodat, kali periodat hoặc axit periodic), như được bộc lộ, ví dụ, trong các bằng sáng chế Mỹ số 4,365,170, 4,673,574 và 4,902,506, mà được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Periodat oxy hóa ngẫu nhiên nhóm hydroxyl lân cận của carbohydrat để tạo thành nhóm aldehyt phản ứng và gây ra sự phân cắt liên kết C-C. Thuật ngữ "periodat" bao gồm cả periodat và axit periodic. Thuật ngữ này cũng bao gồm cả metaperiodat (IO_4^-) và orthoperiodat (IO_6^{3-}). Thuật ngữ "periodat" cũng bao gồm các loại muối periodat khác nhau bao gồm cả natri periodat và kali periodat. Theo các phương án nhất định, polysacarit có thể được oxy hóa khi có mặt natri metaperiodat.

Theo các phương án nhất định, periodat có thể được sử dụng với lượng bằng khoảng 0,03-0,17 μg trên 1 μg polysacarit. Theo các phương án nhất định, periodat có thể được sử dụng với lượng bằng khoảng 0,025-0,18 μg hoặc khoảng 0,02-0,19 μg trên 1 μg polysacarit. Sacarit có thể được hoạt hóa như mong muốn trong khoảng giá trị trên. Ngoài khoảng này, hiệu quả có thể không đạt yêu cầu.

Polysacarit cũng có thể được hoạt hóa bằng 1-xyano-4-đimetylaminopyridini tetrafloroborat (CDAP) để tạo thành este xyanat. Polysacarit đã được hoạt hóa sau đó được liên kết trực tiếp hoặc thông qua chất đệm hoặc nhóm liên kết với nhóm amino trên protein mang.

Ví dụ, chất đệm có thể là xystamin hoặc xysteamin để tạo ra polysacarit đã thioat hóa mà có thể được liên kết với chất mang thông qua liên kết thioete thu được sau khi phản ứng với protein mang đã được hoạt hóa maleimit (ví dụ như bằng cách sử dụng este N-[γ -maleimidobutyroxy]succinimit (GMBS)) hoặc protein mang đã được haloaxetyl hóa (ví dụ bằng cách sử dụng 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 bởi hóa học COAP) được liên kết với hexan điamin hoặc dihydrazit của axit adipic (AOH) và sacarit được tạo dẫn xuất amino được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng hóa học carbodiimit (ví dụ EDAC hoặc EDC) thông qua nhóm carboxy trên chất mang protein. Các thể liên hợp như vậy được mô tả ví dụ trong WO 93/15760, WO

95/08348 và WO 96/129094, tất cả các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Sự liên hợp của các polysacarit vỏ đã hoạt hóa và các protein mang có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách amin hóa khử, như được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 và 2007/0184072, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/110381, WO 2008/079653, và WO 2008/143709, tất cả các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, các polysacarit vỏ đã hoạt hóa và protein mang có thể được cho phản ứng với chất khử để tạo thành thể liên hợp. Các chất khử phù hợp bao gồm borohyđrua, chẳng hạn như natri xyanoborohyđrua, boran-pyridin, natri triaxetoxymorohyđrua, natri borohyđrua, hoặc nhựa trao đổi borohyđrua. Khi kết thúc phản ứng khử, có thể có các nhóm aldehyt không phản ứng còn lại trong các thể liên hợp. Các nhóm aldehyt không phản ứng có thể được gắn mũ bằng cách sử dụng chất gắn mũ phù hợp, chẳng hạn như natri borohyđrua (NaBH_4). Theo một phương án, phản ứng khử được thực hiện trong dung môi nước. Theo phương án khác phản ứng được thực hiện trong dung môi không proton. Theo một phương án, phản ứng khử được thực hiện trong DMSO (đimetylsulfoxit) hoặc trong dung môi DMF (đimetylformamit). Các chất khử có thể được khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các amin-boran như pyridin-boran, 2-picolin-boran, 2,6-điboran-metanol, đimetylamin-boran, t-BuMeiPrN-BH₃, benzylamin-BH₃ hoặc 5-etyl-2-metylpyridin-boran (PEMB).

Các polysacarit vỏ đã hoạt hóa có thể được liên hợp trực tiếp với protein mang hoặc gián tiếp thông qua việc sử dụng chất đệm hoặc nhóm liên kết, chẳng hạn như nhóm liên kết hai chức. Nhóm liên kết tùy chọn là hai chức khác loại hoặc hai chức cùng loại, ví dụ có nhóm amin phản ứng và nhóm axit cacboxylic phản ứng, 2 nhóm amino phản ứng hoặc hai nhóm axit cacboxylic phản ứng.

Các kỹ thuật phù hợp khác để liên hợp sử dụng carbodiimide, hydrazit, este hoạt tính, norboran, axit p-nitrobenzoic, N-hydroxysuccinimide, S-NHS, EDC, TSTU, như được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 98/42721, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của nó. Sự liên hợp có thể cần nhóm liên kết carbonyl mà có thể được tạo thành bằng phản ứng của nhóm hydroxyl tự do của sacarit với 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (xem tài liệu của Bethell và cộng sự (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn và cộng sự (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) tiếp theo là phản ứng với protein để tạo thành liên kết carbamat. Điều này có thể liên quan

đến việc khử đầu tận cùng anome thành nhóm hydroxyl bậc một, bảo vệ/khử bảo vệ tùy chọn của nhóm hydroxyl bậc một, phản ứng của nhóm hydroxyl bậc một với CDI để tạo thành hợp chất trung gian CDI carbamat và liên kết hợp chất trung gian CDI carbamat với nhóm amin trên protein.

Tỷ lệ polysacarit với protein mang đối với vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn thường nằm trong khoảng 0,3-3,0 (khối lượng/khối lượng) nhưng có thể thay đổi theo tít huyết thanh. Tỷ lệ này có thể được xác định bằng cách đo độc lập lượng protein và polysacarit có mặt, hoặc bằng các phương pháp đưa ra số đo trực tiếp của tỷ lệ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp bao gồm quang phổ ^1H NMR hoặc SEC-HPLC-UV/RI với sự giám sát kép (ví dụ chỉ số khúc xạ và tia cực tím, lần lượt đối với tổng hàm lượng nguyên liệu và protein) có thể tạo biên dạng tỷ lệ sacarit/protein trên mức phân bố kích thước của các thể liên hợp, cũng như là bằng SEC-HPLC-MALLS hoặc MALDI-TOF-MS.

Do đó, các thể liên hợp polysacarit-protein thu được có thể được tinh chế và làm giàu bằng nhiều phương pháp khác nhau. Những phương pháp này bao gồm cô/lọc tuần hoàn có pha loãng, sắc ký cột, và lọc sâu. Các thể liên hợp polysacarit-protein đã được tinh chế được kết hợp để bào chế liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp, mà có thể được sử dụng làm vắc-xin.

Việc bào chế vắc-xin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chế phẩm vắc-xin được bào chế để tương thích với đường dùng dự kiến của nó. Các thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein riêng lẻ có thể được bào chế cùng với chất dẫn chấp nhận được về mặt sinh lý để điều chế chế phẩm. Ví dụ về các chất dẫn như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, nước muối đã được đệm, rượu đa chức (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng) và dung dịch dextroza.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp chứa thêm chất bổ trợ. Như được sử dụng trong tài liệu này, "chất bổ trợ" dùng để chỉ chất hoặc chất dẫn mà tăng cường không đặc hiệu đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên. Chất bổ trợ có thể bao gồm huyền phù chứa các chất khoáng (phèn, muối nhôm, chẳng hạn như nhôm hydroxit, nhôm photphat, nhôm sulfat, nhôm hydroxy photphat sulfat, v.v.) mà kháng nguyên được hấp phụ trên đó; hoặc nhũ tương nước trong dầu trong đó dung dịch kháng nguyên được nhũ hóa trong dầu khoáng (ví dụ, chất bổ trợ

không đầy đủ của Freund), đôi khi bao gồm cả vi khuẩn mycobacteria đã chết (chất bổ trợ đầy đủ của Freund) để tăng cường thêm tính kháng nguyên. Các oligonucleotit kích thích miễn dịch (chắn hạn như các oligonucleotit bao gồm mô típ CpG) cũng có thể được sử dụng làm chất bổ trợ (ví dụ, xem Bằng sáng chế 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). Chất bổ trợ cũng bao gồm các phân tử sinh học, chẳng hạn như lipid và các phân tử đồng kích thích. Các chất bổ trợ 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 số phương án, chất bổ trợ là chất bổ trợ trên cơ sở nhôm. Thông thường, liều vắc-xin 0,5 ml đơn được bào chế để chứa từ khoảng 0,1 mg đến 2,5 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm. Theo các phương án khác, liều vắc-xin 0,5 ml đơn được bào chế để chứa từ 0,1 mg đến 2 mg, từ 0,1 mg đến 1 mg, từ 0,1 mg đến 0,5 mg, từ 0,1 mg đến 0,2 mg, từ 0,125 mg đến 2,5 mg, từ 0,125 mg đến 0,5 mg, từ 0,125 mg đến 0,2 mg hoặc từ 0,125 đến 0,25 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm. Theo các phương án nhất định, liều vắc-xin 0,5 ml đơn được bào chế chứa từ khoảng 0,125 mg đến khoảng 0,250 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm. Theo các phương án nhất định, liều vắc-xin 0,5 ml đơn được bào chế chứa khoảng 0,125 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm. Theo các phương án nhất định, liều vắc-xin 0,5 ml đơn được bào chế chứa khoảng 0,250 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm.

Theo các phương án cụ thể, chất bổ trợ được chọn từ nhóm bao gồm nhôm photphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit.

Theo các phương án cụ thể, chất bổ trợ là nhôm photphat.

Theo một số phương án, chế phẩm này là để sử dụng làm vắc-xin chống lại sự nhiễm *Streptococcus pneumoniae*.

Xác định đặc điểm của thể liên hợp chất mang polysaccharit vỏ phẩy cầu khuẩn-protein

Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysaccharit-chất mang protein có thể có khối lượng phân tử là 100-10.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có khối lượng phân tử là 200-9.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có khối lượng phân tử là 300-8.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có khối lượng phân tử là 400-7.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có khối lượng phân tử là 500-6.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có khối lượng phân tử là 600-5.000 kDa. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp có

khối lượng phân tử là 500-4.000 kDa khối lượng phân tử. Bất kỳ số nguyên nào trong khoảng bất kỳ trong số các khoảng nêu trên đều được dự tính là phương án của sáng chế.

Khi khối lượng phân tử nằm trong khoảng giá trị nêu trên, thể liên hợp có thể được tạo thành ổn định với năng suất cao. Ngoài ra, tỷ lệ của polysacarit tự do có thể được làm giảm. Ngoài ra, khả năng gây miễn dịch vượt trội có thể đạt được trong khoảng giá trị khối lượng phân tử nêu trên.

Sau khi các thể liên hợp polysacarit-protein riêng lẻ được tinh chế, chúng được kết hợp để tạo chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế.

Các thể liên hợp sacarit-protein của các týp huyết thanh theo sáng chế có thể được đặc trưng bởi tỷ lệ của polysacarit với chất mang protein (lượng polysacarit/lượng chất mang protein, khối lượng/khối lượng).

Theo các phương án nhất định, tỷ lệ (khối lượng/khối lượng) của polysacarit với chất mang protein trong thể liên hợp polysacarit-chất mang protein đối với mỗi týp huyết thanh là 0,5-2,5, 0,4-2,3, 0,3-2,1, 0,24-2, 0,2-1,8, 0,18-1,6, 0,16-1,4, 0,14-1,2, 0,12-1 hoặc 0,1-1 (ví dụ, khoảng 0,7, khoảng 0,8, khoảng 0,9, khoảng 1,0, khoảng 1,1, khoảng 1,2, khoảng 1,3, khoảng 1,4, khoảng 1,5, khoảng 1,6, khoảng 1,7, khoảng 1,8, khoảng 1,9, khoảng 2,0, khoảng 2,1, khoảng 2,2, khoảng 2,3, khoảng 2,4 hoặc khoảng 2,5).

Khi tỉ lệ của polysacarit với chất mang protein nằm trong khoảng giá trị nêu trên, thể liên hợp có thể được tạo thành ổn định với năng suất cao. Ngoài ra, tỷ lệ của polysacarit tự do có thể được làm giảm. Ngoài ra, khả năng gây miễn dịch vượt trội có thể đạt được và thể liên hợp có thể được duy trì ổn định mà không bị cản trở bởi các týp huyết thanh khác trong khoảng nêu trên.

Các thể liên hợp và các chế phẩm miễn dịch theo sáng chế có thể chứa polysacarit tự do mà không được liên hợp cộng hóa trị với chất mang protein nhưng vẫn có mặt trong chế phẩm liên hợp polysacarit-chất mang protein. Polysacarit tự do có thể được kết hợp không cộng hóa trị với thể liên hợp polysacarit-chất mang protein (tức là, liên kết không cộng hóa trị với, được hấp phụ vào, hoặc được giữ trong hoặc bởi thể liên hợp polysacarit-chất mang protein).

Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein chứa ít hơn khoảng 60%, khoảng 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% hoặc 15% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp

huyết thanh chứa ít hơn khoảng 60% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 50% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của từng týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 40% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 30% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 25% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 20% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 15% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh. Theo các phương án nhất định, thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh chứa ít hơn khoảng 10% polysacarit tự do của mỗi týp huyết thanh dựa trên tổng lượng polysacarit của mỗi týp huyết thanh.

Thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh cũng có thể được đặc trưng bởi mức phân bố kích thước phân tử của nó (K_d). Môi trường sắc ký loại trừ kích thước (CL-4B; hạt agaroza được liên kết chéo, 4%) có thể được sử dụng để xác định mức phân bố kích thước phân tử tương đối của thể liên hợp. Sắc ký loại trừ kích thước (SEC) được sử dụng trong cột cấp trọng lực để tạo biên dạng mức phân bố kích thước phân tử của thể liên hợp. Các phân tử lớn đã được loại trừ khỏi các lỗ trong môi trường được rửa giải nhanh hơn các phân tử nhỏ. Bộ thu gom phân đoạn được sử dụng để thu gom dịch rửa giải cột. Các phân đoạn được kiểm tra bằng cách đo màu nhờ xét nghiệm sacarit. Để xác định K_d , cột được hiệu chuẩn để thiết lập phân đoạn mà tại đó các phân tử được loại trừ hoàn toàn (V_0 ; $K_d = 0$) và phân đoạn biểu thị mức lưu giữ tối đa (V_i ; $K_d = 1$). Phân đoạn mà thuộc tính mẫu được chỉ định đạt được (V_e) có liên quan đến K_d bởi biểu thức $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$.

Theo các phương án nhất định, ít nhất 15% của thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B.

Theo các phương án nhất định, ít nhất là 20% của thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B. Theo các phương án nhất định, ít nhất là 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% hoặc 90% thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B. Theo các phương án nhất định, ít nhất 60% thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B. Theo các phương án nhất định, ít nhất là 50-80% thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B. Theo các phương án nhất định, ít nhất là 65-80% thể liên hợp polysacarit-chất mang protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B. Theo các phương án nhất định, ít nhất 15-60% thể liên hợp sacarit-protein của mỗi týp huyết thanh có thể có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B.

Phương pháp phòng ngừa và sử dụng

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vắc-xin chứa chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp và tá dược được dụng. Theo một số phương án, tá dược được dụng chứa ít nhất là chất đệm, chẳng hạn như chất đệm succinat, muối, chẳng hạn như natri clorua, và/hoặc chất hoạt động bề mặt, chẳng hạn như este polyoxyetylen sorbitan (ví dụ, polysorbat 80). Theo một số phương án, ba hoặc bốn polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh đặc hiệu như được đề cập ở trên được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ còn lại trong số 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần).

Theo một phương án, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần).

Theo phương án khác, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 4, 5,

6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần).

Theo phương án khác nữa, các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần).

Theo một số phương án, vắc-xin gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng người chống lại bệnh gây ra bởi sự nhiễm *Streptococcus pneumoniae*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa sự nhiễm hoặc bệnh do *Streptococcus pneumoniae*, phương pháp này bao gồm cho đối tượng người sử dụng một lượng hữu hiệu để phòng ngừa của chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin chứa chúng. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin chứa chúng có thể được dùng bằng đường dùng bất kỳ, bao gồm, ví dụ, bằng đường dùng 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 người cao tuổi và bệnh là bệnh viêm phổi hoặc bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn (IPD). Theo các phương án nhất định, người cao tuổi ít nhất là 50 tuổi. Theo các phương án khác, người cao tuổi ít nhất là 55 tuổi. Theo các phương án khác nữa, người cao tuổi ít nhất là 60 tuổi.

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

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

Lượng của thể liên hợp trong mỗi liều vắc-xin hoặc lượng hữu hiệu để phòng ngừa của chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp có thể được chọn là lượng mang lại sự phòng ngừa mà không có tác dụng phụ đáng kể. Lượng như vậy có thể thay đổi tùy thuộc vào týp huyết thanh phế cầu khuẩn. Thông thường, mỗi liều có thể bao gồm từ khoảng 0,1 µg đến khoảng 100 µg polysacarit, cụ thể là từ khoảng 0,1 đến 10 µg,

và cụ thể hơn là từ khoảng 1 μg đến khoảng 5 μg . Lượng tối ưu của các thành phần cho vắc-xin cụ thể có thể được xác định bằng các nghiên cứu chuẩn bao gồm việc quan sát các đáp ứng miễn dịch thích hợp ở đối tượng. Ví dụ, lượng để tiêm chủng của đối tượng người có thể được xác định bằng cách ngoại suy kết quả xét nghiệm trên động vật. Ngoài ra, liều có thể được xác định theo kinh nghiệm.

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 1 μg đến khoảng 5 μg mỗi polysacarit vỏ; từ khoảng 1 μg đến khoảng 30 μg TT; từ khoảng 20 μg đến khoảng 85 μg CRM₁₉₇; và tùy ý từ khoảng 0,1 mg đến khoảng 0,5 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố. Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 μg đến khoảng 2,5 μg mỗi polysacarit vỏ ngoại trừ týp huyết thanh 6B và tùy ý týp huyết thanh 3, mà có mặt với lượng từ khoảng 4 μg đến khoảng 5 μg ; từ khoảng 2 μg đến khoảng 25 μg TT; từ khoảng 40 μg đến khoảng 75 μg CRM₁₉₇; và tùy ý từ khoảng 0,1 mg đến khoảng 0,25 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố.

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa khoảng 2,2 μg mỗi polysacarit vỏ ngoại trừ týp huyết thanh 6B, mà có mặt với lượng bằng khoảng 4,4 μg .

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 μg đến khoảng 2,5 μg mỗi trong số các polysacarit vỏ ngoại trừ tối đa sáu polysacarit vỏ được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, và 19F, mỗi trong số chúng có mặt với lượng từ khoảng 4 μg đến khoảng 5 μg . Theo một phương án, có tới sáu polysacarit vỏ, có mặt với lượng từ khoảng 4 μg đến khoảng 5 μg , được chọn từ nhóm bao gồm các týp huyết thanh 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A và 19F. Theo phương án khác, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa khoảng 2,2 μg mỗi trong số các polysacarit vỏ ngoại trừ tối đa sáu polysacarit vỏ được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, và 19F, mỗi trong số chúng có mặt với lượng bằng khoảng 4,4 μg . Theo một phương án, tối đa sáu polysacarit vỏ, có mặt với lượng bằng khoảng 4,4 μg , được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A, và 19F.

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 µg đến khoảng 2,5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, và 33F và từ khoảng 4 µg đến khoảng 5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1, 3, 6B, 19A, và 19F.

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 µg đến 2,5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, và 33F và từ khoảng 4 µg đến khoảng 5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 3, 4, 6B, 9V, 19A, và 19F.

Theo các phương án nhất định, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 đến 2,5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F và từ khoảng 4 đến khoảng 5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 3 và 6B.

Theo một số phương án, vắc-xin hoặc chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể là liều đơn 0,5ml được bào chế để chứa từ khoảng 2 đến khoảng 2,5 µg polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F và từ khoảng 4 đến khoảng 5 µg polysacarit vỏ của týp huyết thanh 6B và từ khoảng 8 đến khoảng 9 µg polysacarit vỏ của týp huyết thanh 3, và tốt hơn nữa là khoảng 8,8 µg polysacarit vỏ của týp huyết thanh 3.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp hoặc vắc-xin chứa chúng còn chứa chất đệm natri clorua và natri succinat làm các tá dược.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi polysacarit vỏ phế cầu khuẩn của các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với TT và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần). Mỗi liều 0,5 ml có thể được bào chế thành dịch lỏng chứa: khoảng 2,2 µg mỗi polysacarit vỏ, ngoại trừ týp huyết thanh 6B với lượng khoảng 4,4 µg; từ khoảng 2 µg đến 25 µg protein mang TT (chỉ đối với các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F) và từ khoảng 40 µg đến 75 µg protein

mang CRM₁₉₇; từ khoảng 0,125 mg đến 0,250 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố (từ khoảng 0,5 mg đến 1,2 mg tá dược nhôm photphat); và chất đệm natri clorua và natri succinat làm các tá dược.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi polysacarit vỏ phé cầu khuẩn của các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với TT và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần). Theo một phương án, mỗi liều 0,5 ml có thể được bào chế thành dịch lỏng chứa: khoảng 2,2 µg mỗi polysacarit vỏ, ngoại trừ đối với týp huyết thanh 6B với lượng khoảng 4,4 µg; từ khoảng 2 µg đến khoảng 25 µg protein mang TT (chỉ đối với các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F) và từ khoảng 40 µg đến khoảng 70 µg protein mang CRM₁₉₇; từ khoảng 0,125 mg đến khoảng 0,250 mg chất bổ trợ trên cơ sở nhôm nguyên tố (từ khoảng 0,5 mg đến 1,2 mg nhôm photphat); và chất đệm natri clorua và natri succinat làm tá dược. Theo phương án khác, mỗi liều 0,5 ml có thể được bào chế thành dịch lỏng chứa: khoảng 2,2 µg mỗi polysacarit vỏ, ngoại trừ tối đa sáu polysacarit vỏ được chọn từ nhóm gồm có các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, và 19F với lượng khoảng 4,4 µg; từ khoảng 2 µg đến khoảng 25 µg protein mang TT (chỉ đối với các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F) và từ khoảng 40 µg đến khoảng 70 µg protein mang CRM₁₉₇; từ khoảng 0,125 mg đến khoảng 0,250 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố (từ khoảng 0,5 mg đến 1,2 mg nhôm photphat); và chất đệm natri clorua và natri succinat làm tá dược. Theo một phương án, tối đa sáu polysacarit vỏ với lượng khoảng 4,4 µg được chọn từ nhóm gồm có týp huyết thanh 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A, và 19F. Theo phương án khác nữa, mỗi liều 0,5 ml có thể được bào chế thành dịch lỏng chứa: khoảng 2,2 µg mỗi polysacarit vỏ, ngoại trừ đối với týp huyết thanh 1, 3, 6B, 19A, và 19F với lượng khoảng 4,4 µg; từ khoảng 2 µg đến khoảng 25 µg protein mang TT (chỉ đối với các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F) và từ khoảng 40 µg đến khoảng 70 µg protein mang CRM₁₉₇; từ khoảng 0,125 mg đến khoảng 0,250 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố (từ khoảng 0,5 mg đến 1,2 mg nhôm photphat); và chất đệm natri clorua và natri succinat làm tá dược.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế thành chế phẩm lỏng trong đó mỗi của polysacarit vỏ phé cầu khuẩn của các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với TT và các

polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇ (21 thành phần). Theo một phương án, mỗi liều 0,5 ml có thể được bào chế thành dịch lỏng chứa: khoảng 2,2 µg mỗi polysacarit vỏ, ngoại trừ đối với týp huyết thanh 6B với lượng khoảng 4,4 µg; từ khoảng 2 µg đến khoảng 25 µg protein mang TT (chỉ đối với các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F) và từ khoảng 40 µg đến khoảng 75 µg protein mang CRM₁₉₇; từ khoảng 0,125 mg đến khoảng 0,250 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố (từ khoảng 0,5 mg đến 1,2 mg nhôm photphat); và chất đệm natri clorua và natri succinat làm tá dược.

Theo một số phương án, chế phẩm lỏng có thể được nạp vào ống tiêm đơn liều mà không có chất bảo quản. Sau khi lắc, chế phẩm lỏng trở thành vắc-xin mà là huyền phù màu trắng, đồng nhất sẵn sàng để dùng trong cơ.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được dùng trong một lần tiêm hoặc dưới dạng một phần của đợt gây miễn dịch. Ví dụ, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được dùng 2, 3, 4 hoặc nhiều lần hơn ở khoảng cách thích hợp, chẳng hạn như, khoảng cách 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 tháng hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp được dùng cho trẻ sơ sinh 4 lần trong 15 tháng đầu tiên từ lúc sinh, bao gồm, ví dụ, vào khoảng 2, 3, 4 và 12-15 tháng tuổi; vào khoảng 3, 4, 5 và 12 đến 15 tháng tuổi; hoặc vào khoảng 2, 4, 6 và 12 đến 15 tháng tuổi. Liều đầu tiên này có thể được dùng sớm nhất là 6 tuần tuổi. Theo phương án khác, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp được dùng cho trẻ sơ sinh 3 lần trong vòng 15 tháng đầu tiên từ lúc sinh, bao gồm, ví dụ như, ở khoảng 2, 4, và 11-12 tháng.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều protein từ *Streptococcus pneumoniae*. Ví dụ về các protein *Streptococcus pneumoniae* phù hợp để đưa vào bao gồm các protein được xác định trong đơn đăng ký sáng chế quốc tế WO02/083855, cũng như những gì được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế quốc tế WO02/053761.

Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng cho đối tượng thông qua một hoặc nhiều đường dùng đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như các 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 được bào chế theo đó. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế để tương thích với đường dùng dự kiến của nó.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm lỏng bằng cách tiêm trong cơ, trong màng bụng, dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, hoặc qua da hoặc tiêm qua niêm mạc đường hô hấp. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế ở dạng lỏng hoặc ở dạng đông khô. Theo một số phương án, các chế phẩm có thể tiêm có thể được bào chế ở dạng thông thường, hoặc ở dạng dung dịch hoặc huyền phù lỏng, các dạng rắn thích hợp để tạo dung dịch hoặc huyền phù trong dịch lỏng trước khi tiêm, hoặc dưới dạng nhũ tương. Theo một số phương án, dung dịch và huyền phù tiêm được bào chế từ bột hoặc hạt vô trùng. Có thể tìm thấy những cân nhắc chung trong việc bào chế và sản xuất các dược chất để dùng bằng các đường dùng này, ví dụ, trong *Remington's Pharmaceutical Sciences*, tái bản lần thứ 19, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Hiện nay, đường sol khí hoặc xịt mũi hoặc miệng (ví dụ, bằng cách xông) được sử dụng phổ biến nhất để đưa các tác nhân trị liệu trực tiếp đến phổi và hệ hô hấp. Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp được dùng bằng cách sử dụng dụng cụ mà phân phối liều lượng đã xác định của chế phẩm. Các dụng cụ phù hợp dùng để phân phối các dược phẩm trong da được mô tả trong sáng chế bao gồm các dụng cụ kim ngắn như được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 4,886,499, Bằng sáng chế Mỹ số 5,190,521, Bằng sáng chế Mỹ số 5,328,483, Bằng sáng chế Mỹ số 5,527,288, Bằng sáng chế Mỹ số 4,270,537, Bằng sáng chế Mỹ số 5,015,235, Bằng sáng chế Mỹ số 5,141,496, Bằng sáng chế Mỹ số 5,417,662 (tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các chế phẩm trong da cũng có thể được dùng bằng dụng cụ mà giới hạn chiều dài thâm nhập hiệu quả của kim vào trong da, chẳng hạn như các dụng cụ được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO1999/34850, được đưa vào đây để tham khảo, và dạng tương đương chức năng của chúng. Cũng thích hợp là các dụng cụ tiêm tia mà phân phối vắc-xin lỏng cho lớp hạ bì thông qua bộ phun tia chất lỏng hoặc thông qua kim mà chọc thủng lớp sừng và tạo ra tia tới lớp hạ bì. Các dụng cụ tiêm tia được mô tả ví dụ trong Bằng sáng chế Mỹ số 5,480,381, Bằng sáng chế Mỹ số 5,599,302, Bằng sáng chế Mỹ số 5,334,144, Bằng sáng chế Mỹ số 5,993,412, Bằng sáng chế Mỹ số 5,649,912, Bằng sáng chế Mỹ số 5,569,189, Bằng sáng chế Mỹ số 5,694,911, Bằng sáng chế Mỹ số

5,383,851, Bằng sáng chế Mỹ số 5,893,397, Bằng sáng chế Mỹ số 5,466,220, Bằng sáng chế Mỹ số 5,339,163, Bằng sáng chế Mỹ số 5,312,335, Bằng sáng chế Mỹ số 5,503,627, Bằng sáng chế Mỹ số 5,064,413, Bằng sáng chế Mỹ số 5,520,639, Bằng sáng chế Mỹ số 4,596,556, Bằng sáng chế Mỹ số 4,790,824, Bằng sáng chế Mỹ số 4,941,880, Bằng sáng chế Mỹ số 4,940,460, Công bố đơn quốc tế số WO1997/37705, và WO1997/13537 (tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Cũng thích hợp là dụng cụ phân phối bột/hạt đạn đạo mà sử dụng khí nén để tăng tốc vắc-xin ở dạng bột qua các lớp ngoài của da đến lớp hạ bì. Ngoài ra, ống tiêm thông thường có thể được sử dụng trong phương pháp dùng trong da Mantoux cổ điển.

Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch, huyền phù và nhũ tương chứa nước hoặc không chứa nước vô trùng. Ví dụ về 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 động vật, dầu đậu phộng, dầu đậu tương, dầu ô liu, dầu hướng dương, dầu gan, 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/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối và môi trường được đệm. Các chất dẫn dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, dung dịch Ringer được lactat hóa, hoặc dầu đã cố định. Các chất dẫn phân phối trong tĩnh mạch bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng và dịch lỏng, các chất bổ sung chất điện giải (như các chất dựa trên dextroza Ringer), và dạng tương tự. Chất bảo quản và các chất phụ gia khác cũng có thể có mặt, ví dụ như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat, và khí trơ và các loại tương tự.

Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được bào chế dưới dạng lọ liều đơn vị, lọ đa liều hoặc ống tiêm đã nạp sẵn. Chất mang được dùng dùng cho chế phẩm lỏng bao gồm dung môi chứa nước hoặc không chứa nước, huyền phù, nhũ tương, hoặc dầu. Chế phẩm có thể là đẳng trương, ưu trương hoặc nhược trương. Tuy nhiên, điều mong muốn là chế phẩm để tiêm truyền hoặc tiêm về cơ bản là đẳng trương. Do đó, tính đẳng trương hoặc tính ưu trương có thể có lợi cho việc bảo quản chế phẩm. Khi chế phẩm là ưu trương, chế phẩm có thể được pha loãng thành đẳng trương trước khi dùng. Tác nhân trương lực có thể là tác nhân trương lực ion như muối hoặc tác nhân trương lực không ion như carbohydrat. Các tác nhân trương lực ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri clorua, canxi clorua, kali clorua và magie clorua. Các

tác nhân trương lực không ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sorbitol và glyxerol. Tốt hơn là, ít nhất một chất đệm được dụng được bao gồm. Ví dụ, khi chế phẩm là dịch truyền hoặc dịch tiêm, tốt hơn là được bào chế trong chất đệm có khả năng đệm từ pH 4 đến pH 10, chẳng hạn như từ pH 5 đến pH 9, hoặc từ pH 6 đến pH 8. Chất đệm có thể được chọn từ các chất đệm phù hợp với Dược Điển Mỹ (USP). Ví dụ, chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm axit monobazơ, chẳng hạn như axit axetic, axit benzoic, axit gluconic, axit glyxeric và axit lactic; axit đibazơ, chẳng hạn như axit aconitic, axit adipic, axit ascorbic, axit cacbonic, axit glutamic, axit malic, axit succinic và axit tartaric; axit đa bazơ như axit xitric và axit photphoric; và bazơ như amoniac, dietanolamin, glyxin, trietanolamin và TRIS.

Chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở este polyoxyetylen sorbitan (thường được gọi là Tween), cụ thể là polysorbat 20 và polysorbat 80; copolyme (như DOWFAX) của etylen oxit (EO), propylen oxit (PO), butylen oxit (BO); octoxynol với các đoạn lặp khác nhau của nhóm etoxy (oxy-1,2-etandyl), đặc biệt là octoxynol-9 (Triton-100); etylphenoxypolyoxyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipit như lexithin; nonylphenol etoxylat như loạt TERGITOL NP; lauryl, xetyl, stearyl, este béo polyoxyetylen có nguồn gốc từ rượu oleyl (chất hoạt động bề mặt Brij), cụ thể là trietylenglycol monolauryl este (Brij 30); sorbitan este được gọi 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. Dạng kết hợp của este polyoxyetylen sorbitan như Tween 80 và octoxynol như Triton X-100 cũng phù hợp. Dạng kết 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 là 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 khoảng 0,02%; lượng octylphenoxy polyoxyetanol hoặc nonylphenoxy polyoxyetanol (như Triton X-100) có thể là từ 0,001% đến 0,1% (khối lượng/thể tích), cụ thể là từ 0,005% đến 0,02%; và lượng polyoxyetylen este (như Laureth 9) được bao gồm có thể là từ 0,1% đến 20% (khối lượng/thể tích), có thể là từ 0,1% đến 10%, cụ thể là từ 0,1% đến 1% hoặc khoảng 0,5%.

Theo một số phương án, chế phẩm liên hợp phé cầu khuẩn 21 thành phần, chất mang hỗn hợp có thể được phân phối thông qua hệ thống kiểm soát giải phóng. Ví dụ,

truyền tĩnh mạch, miếng dán qua da, liposom hoặc các đường khác có thể được sử dụng để dùng. Theo một khía cạnh, các đại phân tử như vi cầu hoặc vật cấy ghép có thể được sử dụng.

Phần bộc lộ nêu trên mô tả chung về sáng chế. Có thể hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham chiếu đến các ví dụ cụ thể sau đây. Những ví dụ này được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Điều chế polysacarit vỏ *S. pneumoniae*

Việc nuôi cấy *S. pneumoniae* và tinh chế polysacarit vỏ được tiến hành như đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các týp huyết thanh *S. pneumoniae* được thu lấy từ Bảo tàng chủng giống vi sinh vật của Mỹ (ATCC) (týp huyết thanh 1: ATCC số 6301; týp huyết thanh 3: ATCC số 6303; týp huyết thanh 4: ATCC số 6304; týp huyết thanh 5: ATCC số 6305; týp huyết thanh 6A: ATCC số 6306; týp huyết thanh 6B: ATCC số 6326; týp huyết thanh 7F: ATCC số 10351; týp huyết thanh 9N: ATCC số 6309; týp huyết thanh 9V: ATCC số 10368; týp huyết thanh 14: ATCC số 6314; týp huyết thanh 18C: ATCC số 10356; týp huyết thanh 19A: ATCC số 10357; týp huyết thanh 19F: ATCC số 6319; týp huyết thanh 23F: ATCC số 6323). Các chủng nội bộ đối với các týp huyết thanh 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F và 33F được sử dụng, nhưng có thể sử dụng bất kỳ chủng công khai nào. *S. pneumoniae* được đặc trưng bởi vỏ và có thể di động, Gram dương, song cầu khuẩn hình mũi mác, và tan máu alpha trong môi trường thạch máu. Các týp huyết thanh được xác định bằng xét nghiệm Quelling sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu (Bảng sáng chế Mỹ số 5,847,112).

Điều chế ngân hàng tế bào

Một số thế hệ giống gốc đã được tạo ra để mở rộng các chủng và loại bỏ các thành phần có nguồn gốc động vật (thế hệ F1, F2 và F3). Hai thế hệ bổ sung của giống gốc đã được sản xuất. Thế hệ bổ sung thứ nhất được nuôi cấy từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được nuôi cấy từ lọ của thế hệ bổ sung thứ nhất. Lọ gốc được bảo quản đông lạnh (dưới -70°C) với glyxerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để điều chế ngân hàng tế bào, tất cả các chủng nuôi cấy được cho sinh trưởng trong môi trường dựa trên đậu tương. Trước khi đông lạnh, các tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm, môi trường đã dùng được loại bỏ và

các kết viên tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh (như glyxerol tổng hợp).

Nuôi cấy và thu hoạch

Các chủng nuôi cấy từ ngân hàng tế bào làm việc được gây nhiễm vào chai giống chứa môi trường dựa trên đậu tương và nuôi cấy. Sau khi đạt được mật độ quang đích (độ hấp thụ), chai giống được sử dụng để gây nhiễm bình lên men chứa môi trường dựa trên đậu tương. Việc nuôi cấy được ngừng lại khi giá trị mật độ quang bắt đầu được duy trì không đổi. Sau khi ngừng nuôi cấy, bổ sung natri deoxycholat vào môi trường nuôi cấy để dung giải tế bào. Làm mát các thành phần chứa trong bình lên men, và sự kết tủa protein được gây ra. Sau đó, ly tâm hỗn hợp để loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào.

Tinh chế

Dung dịch thu được từ việc ly tâm được lọc qua bộ lọc sâu để loại bỏ các protein và mảnh vụn tế bào không kết tủa trong quá trình ly tâm. Dịch lọc được cô đặc trên màng MW 100 kDa và dịch cô được lọc tuần hoàn có pha loãng với 10 thể tích dung dịch đệm natri photphat 25 mM (pH 7,2) để thu được mẫu. Mẫu được lọc để thu gom dịch nổi bề mặt mà polysacarit được kết tủa và lọc từ đó. Dịch lọc được cô đặc trên màng 30 kDa và dịch cô được lọc tuần hoàn có pha loãng bằng cách sử dụng khoảng 10 thể tích nước đã chưng cất ba lần. Sau khi thực hiện lọc tuần hoàn có pha loãng, dung dịch còn lại được lọc qua bộ lọc 0,2 μm . Một thử nghiệm đối chứng trong quy trình được thực hiện trên dịch lọc (bề ngoài, protein còn lại, axit nucleic còn lại, nội độc tố, khối lượng phân tử và tổng lượng polysacarit). Dịch cô được lọc vô trùng và được bảo quản ở -20°C .

Ví dụ 2. Điều chế thể liên hợp của polysacarit vỏ *S. pneumoniae* và protein mang

Polysacarit của các týp huyết thanh khác nhau được hoạt hóa theo các con đường khác nhau và sau đó được liên hợp với protein mang, CRM₁₉₇ hoặc TT. Cụ thể, các thể liên hợp được điều chế bằng cách liên hợp từng polysacarit vỏ của tất cả các týp huyết thanh, ngoại trừ 15B và 22F, với CRM₁₉₇ và bằng cách liên hợp từng polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1, 3, 5, 15B và 22F với TT. Tùy thuộc vào kích thước của týp huyết thanh nguyên thể, quy trình hoạt hóa có thể bao gồm làm giảm kích thước của mỗi polysacarit vỏ đến khối lượng phân tử đích, hoạt hóa hóa học và trao đổi chất đệm thông qua siêu lọc. Các thể liên hợp được tinh chế bằng siêu lọc và cuối cùng được lọc qua bộ lọc 0,2 μm . Các thông số 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 phương pháp đã biết để kết hợp các polyme trong đó liên kết amit được tạo thành giữa nhóm amin bậc một (-NH_2) của protein và aldehyt của sacarit. Các nhóm aldehyt được bổ sung vào polysacarit vô phế cầu khuẩn để thúc đẩy sự liên hợp với protein mang. Cấu trúc điol lân cận của monosacarit có thể được oxy hóa bởi natri periodat (NaIO_4) để tạo thành nhóm aldehyt. Các polysacarit vô từ các tít huyết thanh 1, 3, 4, 6A, 8, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F và 33F được xử lý trước như sau.

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

Trong trường hợp các tít huyết thanh 3, 8, 11A, và 15B, bổ sung axit clohydric (ở nồng độ axit cuối bằng 0,01 M) vào dung dịch của polysacarit vô, và ủ dung dịch ở $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri photphat 0,1M vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0 \pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Trong trường hợp tít huyết thanh 4, bổ sung axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,1 M) vào dung dịch polysacarit vô, và ủ dung dịch ở $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri photphat 1M vào đó đến pH cuối cùng bằng $6,0 \pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Trong trường hợp tít huyết thanh 6A, bổ sung axit axetic bằng (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,1 M) vào dung dịch polysacarit vô, và ủ dung dịch ở $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri hydroxit 1M vào đó đến pH cuối cùng bằng $6,0 \pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Trong trường hợp tít huyết thanh 12F, bổ sung axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,01 M) vào dung dịch polysacarit vô, và ủ dung dịch ở $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri photphat 0,1M vào đó đến độ pH cuối cùng của dung dịch bằng $6,0 \pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Trong trường hợp các tít huyết thanh 14 và 18C, bổ sung axit axetic băng (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,2 M) vào dung dịch polysacarit vỏ, và ủ dung dịch ở $94\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri photphat 1M vào đó sao cho độ pH cuối cùng của dung dịch là $6,0\pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Trong trường hợp các tít huyết thanh 22F và 33F, bổ sung axit clohydric (ở nồng độ axit cuối cùng bằng 0,01 M) vào dung dịch polysacarit vỏ, và ủ dung dịch ở $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau đó làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 21°C đến khoảng 25°C , và bổ sung natri photphat 0,1M vào đó đến độ pH cuối cùng bằng $6,0\pm 0,1$, bằng cách đó làm dừng sự thủy phân.

Pha loãng mỗi polysacarit vỏ thu được trong nước để tiêm (WFI), natri axetat và natri photphat đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1,0 mg/ml đến khoảng 2,0 mg/ml.

Bước 2: Phản ứng periodat

Đương lượng mol natri periodat đối với mỗi lần hoạt hóa sacarit phế cầu khuẩn được xác định dựa trên khối lượng mol đơn vị lặp lại. Với sự trộn kỹ, phản ứng oxy hóa được cho phép diễn ra trong thời gian từ 16 đến 20 giờ ở nhiệt độ từ 21°C đến 25°C đối với tất cả các tít huyết thanh ngoại trừ 1, 7F và 19F, đối với chúng nhiệt độ là 10°C hoặc thấp hơn. Để giúp duy trì sự sản xuất nhất quán và ổn định của thể liên hợp, khoảng mức oxy hóa (Do) đối với mỗi tít huyết thanh được nhắm đích trong quy trình liên hợp. Khoảng nhắm đích, được ưu tiên đối với các mức Do đối với từng tít huyết thanh được thể hiện trong Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Khoảng Do đối với tất cả các tít huyết thanh được liên hợp với CRM₁₉₇

Tít huyết thanh	Khoảng giá trị của Do	Tít huyết thanh	Khoảng giá trị của Do
Tít huyết thanh 1	từ 4 đến 10	Tít huyết thanh 10A	từ 1 đến 12
Tít huyết thanh 3	từ 2 đến 8	Tít huyết thanh 11A	từ 1 đến 15
Tít huyết thanh 4	từ 1 đến 5	Tít huyết thanh 12F	từ 1 đến 9
Tít huyết thanh 6A	từ 5 đến 15	Tít huyết thanh 14	từ 6 đến 13
Tít huyết thanh 6B	từ 7 đến 13	Tít huyết thanh 18C	từ 6 đến 14
Tít huyết thanh 7F	từ 2 đến 8	Tít huyết thanh 19A	từ 7 đến 13

Týp huyết thanh	Khoảng giá trị của Do	Týp huyết thanh	Khoảng giá trị của Do
Týp huyết thanh 8	từ 1 đến 17	Týp huyết thanh 19F	từ 6 đến 12
Týp huyết thanh 9N	từ 5 đến 10	Týp huyết thanh 23F	từ 6 đến 14
Týp huyết thanh 9V	từ 4 đến 9	Týp huyết thanh 33F	từ 1 đến 15

Bảng 2. Khoảng Do đối với các týp huyết thanh 1, 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với TT

Týp huyết thanh	Khoảng giá trị của Do	Týp huyết thanh	Khoảng giá trị của Do
Týp huyết thanh 1 (1-TT)	1 đến 15	Týp huyết thanh 15B (15B-TT)	1 đến 15
Týp huyết thanh 3 (3-TT)	2 đến 14	Týp huyết thanh 22F (22F-TT)	1 đến 20
Týp huyết thanh 5 (5-TT)	1 đến 15		

Bước 3: Siêu lọc

Sacarit đã được oxy hóa được cô đặc và được lọc tuần hoàn có pha loãng với WFI trên máy siêu lọc MWCO 100 kDa (bộ siêu lọc 30kDa đối với týp huyết thanh 1 và bộ siêu lọc 5 kDa đối với týp huyết thanh 18C). Lọc tuần hoàn có pha loãng được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua 0,9% đối với týp huyết thanh 1, chất đệm natri axetat 0,01 M (pH 4,5) đối với týp huyết thanh 7F và 23F, và chất đệm natri photphat 0,01 M (pH 6,0) đối với týp huyết thanh 19F. Chất thấm được loại bỏ và chất lưu lại được lọc qua bộ lọc 0,2 μ m.

Bước 4: Sự đông khô

Đối với các polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, và 33F mà được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi chứa nước, dung dịch hỗn hợp của polysacarit và protein mang được điều chế mà không bổ sung sucroza, được làm đông khô và sau đó được bảo quản ở $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit vỏ của týp huyết thanh 1 và 18C mà được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi chứa nước, polysacarit và protein mang được điều chế

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

Đối với các polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 6A, 6B, 7F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT và 23F mà được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng dung môi DMSO, lượng định trước của sucroza để đạt được nồng độ sucroza cuối cùng là $5\% \pm 3\%$ (khối lượng/thể tích) được bổ sung vào sacarit đã được hoạt hóa và các mẫu được điều chế độc lập, được làm đông khô và sau đó được bảo quản ở $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit vỏ của týp huyết thanh 11A, lượng định trước của sucroza để đạt được nồng độ sucroza cuối cùng bằng $20\% \pm 5\%$ (khối lượng/thể tích) được bổ sung vào sacarit đã được hoạt hóa, và polysacarit và protein mang được điều chế độc lập, được làm đông khô, và sau đó được lưu trữ ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Đối với polysacarit vỏ của týp huyết thanh 12F, lượng định trước của sucroza để đạt được nồng độ sucroza cuối cùng bằng $10\% \pm 5\%$ (khối lượng/thể tích) được bổ sung vào sacarit đã được hoạt hóa, và polysacarit và protein mang được điều chế độc lập, được làm đông khô, và sau đó được bảo quản ở nhiệt độ $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Quy trình liên hợp

Sự liên hợp trong nước được tiến hành đối với các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, và 33F và sự liên hợp trong DMSO được tiến hành đối với các týp huyết thanh 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT và 23F. Mỗi polysacarit vỏ được liên hợp với protein mang theo tỷ lệ từ 0,2 đến 2:1.

Bước 1: Hòa tan

Sự liên hợp trong nước

Đối với các týp huyết thanh 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, và 33F, mẫu đông khô được rã đông và được làm cân bằng ở nhiệt độ trong phòng. Mẫu đông khô được hoàn nguyên về nồng độ phản ứng bằng cách sử dụng dung dịch đệm natri photphat ở $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ theo tỷ lệ được đặt cho mỗi týp huyết thanh.

Sự liên hợp trong dimethyl sulfoxit (DMSO)

Đối với các týp huyết thanh 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT, 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 liên hợp

Sự liên hợp trong nước

Đối với các tít huyết thanh 3-TT, 4, 5-TT, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, và 33F, phản ứng liên hợp được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohyđrua (100 mg/ml) vào theo tỷ lệ từ 1,0 đến 1,4 mol natri xyanoborohyđrua mỗi mol sacarit. Tuy nhiên, đối với tít huyết thanh 1, 1-TT và 3, phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohyđrua theo tỷ lệ 0,5 mol natri xyanoborohyđrua cho mỗi mol sacarit.

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ từ 23°C đến 37°C trong từ 44 đến 106 giờ. Nhiệt độ và thời gian phản ứng được điều chỉnh theo tít huyết thanh. Sau đó nhiệt độ được giảm xuống $23\pm 2^\circ\text{C}$ và natri clorua 0,9% được bổ sung vào bình phản ứng. Dung dịch natri borohyđrua (100 mg/ml) được bổ sung để đạt được từ 1,8 đến 2,2 mol natri borohyđrua cho mỗi mol sacarit. Hỗn hợp được ủ ở $23\pm 2^\circ\text{C}$ trong từ 3 đến 6 giờ. Quy trình này khử aldehyt không được phản ứng bất kỳ có mặt trên các sacarit. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng với natri clorua 0,9% và hỗn hợp liên hợp đã pha loãng được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc sơ bộ 0,8 hoặc 0,45 μm .

Sự liên hợp trong DMSO

Đối với các polysacarit vỏ của các tít huyết thanh 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT và 23F, phản ứng liên hợp được bắt đầu bằng cách bổ sung dung dịch natri xyanoborohyđrua (100 mg/ml) theo tỷ lệ từ 0,8 đến 1,2 đương lượng mol của natri xyanoborohyđrua trên một mol sacarit đã được hoạt hóa. WFI được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng đến nồng độ đích là 1% (thể tích/thể tích), và hỗn hợp được ủ trong từ 12 đến 26 giờ ở $23\pm 2^\circ\text{C}$. 100 mg/ml dung dịch natri borohyđrua (thường là từ 1,8 đến 2,2 đương lượng mol natri borohyđrua trên mỗi mol sacarit đã được hoạt hóa) và WFI (nồng độ đích 5% thể tích/thể tích) được bổ sung vào phản ứng và hỗn hợp được ủ trong từ 3 đến 6 giờ ở $23\pm 2^\circ\text{C}$. Quy trình này khử aldehyt không phản ứng bất kỳ có mặt trên các sacarit. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được pha loãng với natri clorua 0,9% và hỗn hợp liên hợp đã pha loãng được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc sơ bộ 0,8 hoặc 0,45 μm .

Bước 3: Siêu lọc

Hỗn hợp liên hợp đã pha loãng được cô và được lọc tuần hoàn có pha loãng qua bộ lọc siêu lọc MWCO 100 kDa hoặc bộ lọc siêu lọc MWCO 300 kDa với tối thiểu là 15 thể tích của natri clorua 0,9% hoặc chất đệm. Ngoài ra, chế phẩm và pH của chất đệm được sử dụng trong quy trình này thay đổi tùy thuộc vào từng tít huyết thanh.

Bước 4: Lọc vô trùng

Chất giữ lại sau khi siêu lọc được lọc vô trùng (0,2 μm) và sự kiểm soát trong quy trình (bề ngoài, protein tự do, sacarit tự do, mức phân bố kích thước phân tử, vô trùng, hàm lượng sacarit, hàm lượng protein, pH, nội độc tố, xyanua dư, DMSO dư, nhận diện sacarit, nhận diện TT và nhận diện CRM₁₉₇) được thực hiện trên các thể liên hợp đã được lọc. Dịch cô cuối cùng được làm lạnh và bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C.

Ví dụ 3. Bào chế vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn đa giá

Các thể tích mong muốn của các dịch cô đặc khối lượng lớn cuối cùng thu được từ Ví dụ 2 được tính toán dựa trên thể tích mẻ và nồng độ sacarit khối. Sau khi natri clorua 0,85% (nước muối sinh lý), polysorbat 80, và chất đệm succinat được bổ sung vào bình bào chế đã được dán nhãn trước, dịch cô khối lớn được bổ sung. Sau đó chế phẩm được trộn kỹ và được lọc vô trùng qua màng 0,2 μm . Chế phẩm khối đã bào chế được trộn nhẹ nhàng trong và sau khi bổ sung nhôm photphat khối. Độ pH được kiểm tra và điều chỉnh nếu cần thiết. Sản phẩm khối đã bào chế được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C. Các chế phẩm vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, không bị giới hạn sau đây đã được bào chế và được đặt tên là PCV21(1/5/15B/22F)-TT và PCV21(3/5/15B/22F)-TT:

PCV21(1/5/15B/22F)-TT bao gồm các thể liên hợp polysacarit được điều chế bằng cách liên hợp từng polysacarit của các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F với TT và mỗi polysacarit của các týp huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F và 33F với CRM₁₉₇; và

PCV21(3/5/15B/22F)-TT bao gồm các thể liên hợp polysacarit được điều chế bằng cách liên hợp mỗi polysacarit của các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F vào TT và mỗi polysacarit của các týp huyết thanh 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F với CRM₁₉₇.

Chế phẩm PCV21(1/5/15B/22F)-TT trong tổng liều 0,5 ml bao gồm 2,2 μg của mỗi polysacarit, ngoại trừ týp huyết thanh 6B với lượng 4,4 μg ; từ 2 μg đến 25 μg TT (đối với các týp huyết thanh 1, 5, 15B, và 22F) và từ 40 μg đến 75 μg CRM₁₉₇, 0,125 mg chất bổ trợ nhôm nguyên tố (0,5 mg nhôm phosphat); 4,25 mg natri clorua; khoảng 295 μg dung dịch đệm succinat; và khoảng 100 μg polysorbat 80 trong tổng liều 0,5 ml.

Chế phẩm PCV21(3/5/15B/22F)-TT trong tổng liều 0,5 ml bao gồm 2,2 μg mỗi polysacarit, ngoại trừ các týp huyết thanh 1, 3, 6B, 19A, và 19F với lượng 4,4 μg ; từ 2 μg đến 25 μg TT (đối với các týp huyết thanh 3, 5, 15B, và 22F), 0,250 mg chất bổ trợ nhôm

nguyên tố (1,13 mg nhôm photphat); với các thành phần khác và hàm lượng của chúng giống với hàm lượng của PCV21(1/5/15B/22F)-TT.

Ví dụ 4. Khả năng gây miễn dịch của vắc-xin liên hợp phế cầu khuẩn đa giá

Các vắc-xin phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, PCV21(1/5/15B/22F)-TT và PCV21(3/5/15B/22F)-TT được điều chế trong Ví dụ 3, được thử nghiệm về khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở thỏ. Việc đánh giá khả năng miễn dịch được thực hiện bằng thử nghiệm ELISA đặc hiệu kháng nguyên đối với các nồng độ IgG trong huyết thanh và bằng xét nghiệm thực bào bằng opsonin (OPA) đối với chức năng kháng thể. Thỏ trắng Niu Di Lân được gây miễn dịch theo đường trong cơ vào tuần 0 và tuần 2 với liều cao hơn 5% so với liều lâm sàng ở người theo kế hoạch của mỗi polysacarit (2,31 µg mỗi polysacarit, ngoại trừ tít huyết thanh 6B với lượng 4,62 µg) trong chế phẩm hoặc liều cho người (2,2 µg mỗi polysacarit, ngoại trừ tít huyết thanh 6B với lượng 4,4 µg). Huyết thanh được lấy mẫu mỗi 2 tuần sau khi gây miễn dịch. Cả hai nồng độ cho thấy kết quả như nhau.

4-1. PCV21(3/5/15B/22F)-TT

Đo nồng độ IgG đặc hiệu tít huyết thanh

Polysacarit vỏ (PnP) đối với mỗi tít huyết thanh được phủ lên đĩa 96 giếng ở mức từ 0,5 µg/giếng đến 1 µg/giếng. Lượng huyết thanh tương đương được lấy mẫu từ mỗi đối tượng và được gom theo nhóm. Nhóm huyết thanh được pha loãng liên tiếp 2,5 lần với dung dịch đệm pha loãng kháng thể chứa Tween 20 và polysacarit thành tế bào phế cầu khuẩn (CWPS) thu được từ Statens Serum Institut (5 µg/ml) và sau đó phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đĩa được rửa 5 lần bằng dung dịch đệm rửa, sau đó huyết thanh đã được hấp phụ trước và đã được pha loãng 50 µl được bổ sung vào đĩa có giếng đã phủ, sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong từ 2 giờ đến 18 giờ. Đĩa có giếng được rửa theo cùng một cách và sau đó các thể liên hợp phosphatase kiềm kháng IgG thỏ được bổ sung vào từng giếng, sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Các đĩa được rửa như mô tả ở trên và 1 mg/ml chất đệm p-nitrophenylamin làm cơ chất được bổ sung vào từng giếng và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phản ứng được dập tắt bằng cách bổ sung 50 µl NaOH 3 M và độ hấp thụ ở 405nm và 690nm được đo. Để làm ví dụ so sánh, vắc-xin 13 thành phần có bán trên thị trường (PREVNAR13) được đưa vào quy trình tương tự. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ IgG (U/ml) đối với 21 týp huyết thanh lúc 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần 2

Týp huyết thanh	PREVNAR13	PCV21(3/5/15B/22F)-TT
1	16770,4	13623,9
3	6603,4	29462,4
4	27969,9	44594,4
5	5758,6	10521,4
6A	9493,7	12696,6
6B	8690,6	8197,1
7F	60819,7	56995,0
8	594,8	61898,5
9N	5186,2	293936,9
9V	30043,9	39421,1
10A	169,8	27243,3
11A	184,5	52384,3
12F	130,0	26815,4
14	21906,0	39258,8
15B	843,5	8360,7
18C	91500,7	80523,0
19A	16470,7	5179,7
19F	13956,4	17673,4
22F	139,7	11716,5
23F	12089,4	8934,6
33F	143,2	29774,3

Khi các polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 3 và 5 được liên hợp với TT, nồng độ IgG đặc hiệu týp huyết thanh tăng đáng kể so với nồng độ thu được khi liên hợp với CRM₁₉₇. Thỏ được gây miễn dịch bằng PCV21(3/5/15B/22F)-TT cũng chứng tỏ sự gia tăng đáng kể của nồng độ IgG so với tám týp huyết thanh bổ sung không có trong PREVNAR13 (tức là, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F và 33F). Cụ thể là, týp huyết thanh 9N có mức tăng nồng độ IgG đặc hiệu trong huyết thanh lớn hơn 50 lần so với PREVNAR13.

Xét nghiệm khả năng gây miễn dịch chức năng (MOPA)

Chức năng kháng thể được đánh giá bằng cách thử nghiệm huyết thanh trong xét nghiệm MOPA. Chủng MOPA *S. pneumoniae* được bảo quản ở -70°C hoặc thấp hơn được pha loãng đến mức pha loãng cuối cùng tương ứng sao cho nồng độ của mỗi chủng là khoảng 50.000 CFU/ml. Lượng huyết thanh tương đương được lấy mẫu từ mỗi đối tượng, được gộp chung theo nhóm và được pha loãng liên tiếp 2 lần sao cho 20 μl huyết thanh vẫn còn ở trong đĩa có đáy hình chữ U. Sau khi pha loãng mẫu, 10 μl chủng được chuẩn bị cho mỗi tít huyết thanh được trộn với mẫu đã pha loãng và hỗn hợp này được để cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút để *S. pneumoniae* và kháng thể được trộn đều. Hỗn hợp của các tế bào HL-60 đã biệt hóa sơ bộ và bổ thể được bổ sung và cho phản ứng trong thiết bị ủ CO_2 (37°C) trong 45 phút. Nhiệt độ được làm giảm để dừng sự thực bào và 10 μl dung dịch phản ứng được chấm lên trên đĩa thạch đã được sấy khô trước từ 30 đến 60 phút, và sau đó cho phép được hấp phụ lên trên đĩa trong 20 phút cho đến khi khô. Dung dịch gốc TTC 25 mg/ml được bổ sung vào aga phủ đã được điều chế, và kháng thể thích hợp cho chủng tương ứng được bổ sung vào đó. Hỗn hợp được trộn kỹ, và sau đó khoảng 25 ml hỗn hợp được bổ sung lên trên đĩa và để cho cứng lại trong khoảng 30 phút. Đĩa đã cứng hoàn toàn được ủ trong thiết bị ủ CO_2 (37°C) trong thời gian từ 12 đến 18 giờ và sau đó các khuẩn lạc được đếm. Hiệu giá MOPA được biểu diễn dưới dạng tỉ lệ pha loãng mà tại đó quan sát thấy mức tiêu diệt là 50%. Để làm ví dụ so sánh, vắc-xin 13 thành phần có bán trên thị trường (PREVNAR13) được đưa vào quy trình tương tự. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu giá MOPA đối với 21 tít huyết thanh ở thời điểm 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần hai

Tít huyết thanh	PREVNAR13	PCV21(3/5/15B/22F)-TT
1	94	80
3	829	3772
4	2428	2370
5	1169	1972
6A	4925	3094
6B	5693	3927
7F	2731	2386
8	Không được thử nghiệm	669

9N	Không được thử nghiệm	2339
9V	271	175
10A	Không được thử nghiệm	805
11A	Không được thử nghiệm	2040
12F	Không được thử nghiệm	894
14	1917	1874
15B	Không được thử nghiệm	311
18C	5347	3758
19A	5760	888
19F	2059	710
22F	Không được thử nghiệm	1286
23F	1975	1868
33F	Không được thử nghiệm	1011

Khi các týp huyết thanh 3 và 5 được liên hợp với TT, hiệu giá MOPA chức năng tăng lên đáng kể so với hiệu giá MOPA thu được khi chúng được liên hợp với CRM₁₉₇. Thỏ đã được gây miễn dịch với PCV21(3/5/15B/22F)-TT cũng chứng tỏ sự tăng lên đáng kể của hiệu giá MOPA chức năng so với mỗi trong số tám týp huyết thanh bổ sung mà không có mặt trong PREVNAR13 (tức là, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, và 33F).

4-2. PCV21(1/5/15B/22F)-TT

Nồng độ IgG đặc hiệu týp huyết thanh và hiệu giá gây miễn dịch chức năng được đo theo cùng cách như trong 4-1, và kết quả của hai thí nghiệm riêng biệt được thể hiện như sau.

Đo nồng độ IgG đặc hiệu týp huyết thanh

Bảng 5. Nồng độ IgG (U/ml) đối với 21 týp huyết thanh lúc 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ hai

Týp huyết thanh	Thí nghiệm 1		Thí nghiệm 2	
	PREVNAR13	PCV21(1/5/15B/22F)-TT	PREVNAR 13	PCV21(1/5/15B/22F)-TT
1	5105,5	46202,4	14208,3	28405,2
3	6303,0	10591,0	6575,6	8883,8
4	46727,3	69813,7	16600,3	39330,1

	Thí nghiệm 1		Thí nghiệm 2	
Týp huyết thanh	PREVNAR13	PCV21(1/5/15 B/22F)-TT	PREVNAR 13	PCV21(1/5/15B/2 2F)-TT
5	6873,9	16468,4	5079,3	21510,8
6A	32561,4	34321,1	8965,5	7658,8
6B	25398,7	20484,6	5105,2	2885,6
7F	27560,5	85909,1	59993,0	55489,8
8	521,0	89658,7	274,7	83945,4
9N	5198,2	304294,1	3824,7	207073,2
9V	62169,3	41229,0	39503,5	42000,7
10A	166,4	37705,0	130,0	19173,7
11A	195,3	43766,3	163,9	49047,9
12F	154,4	25797,6	130,0	14503,3
14	17765,9	34321,5	12312,4	18367,4
15B	436,0	4658,6	280,6	6711,2
18C	103154,7	158798,8	62963,5	95617,7
19A	19191,1	6398,0	9807,5	4133,7
19F	16349,2	37946,5	9838,7	12775,0
22F	130,0	10335,4	130,0	1705,8
23F	15166,5	10104,6	5835,1	4128,6
33F	146,1	35918,2	141,4	34004,5

Khi các polysacarit vỏ của các týp huyết thanh 1 và 5 được liên hợp với TT, nồng độ IgG đặc hiệu týp huyết thanh tăng đáng kể so với khi chúng được liên hợp với CRM₁₉₇. Thỏ được gây miễn dịch với PCV21(1/5/15B/22F)-TT cũng chứng tỏ sự gia tăng đáng kể của nồng độ IgG so với tám týp huyết thanh bổ sung không có trong PREVNAR13 (tức là, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F và 33F). Một lần nữa, týp huyết thanh 9N cho thấy sự gia tăng đáng kể (lớn hơn 50 lần) so với PRENAR13.

Xét nghiệm gây miễn dịch chức năng (MOPA)

Bảng 6. Hiệu giá MOPA đối với 21 týp huyết thanh vào 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ hai

	Thí nghiệm 1		Thí nghiệm 2	
Týp huyết thanh	PREVNAR13	PCV21(1/5/15B /22F)-TT	PREVNA R13	PCV21(1/5/15B /22F)-TT
1	99	294	109	214
3	479	792	740	820
4	2560	4083	2272	2671
5	1046	2696	3638	13927
6A	5624	4871	4949	2417
6B	5451	9599	4915	4516
7F	2355	2585	2414	2305
8	Không được thử nghiệm	692	-	779
9N	54	1860	84	1391
9V	282	165	295	371
10A	Không được thử nghiệm	949	-	810
11A	Không được thử nghiệm	986	-	2118
12F	Không được thử nghiệm	795	-	713
14	1052	2715	1659	2362
15B	59	461	79	403
18C	6257	7200	2933	3261
19A	2962	1151	3910	1794
19F	968	1874	1570	1109
22F	Không được thử nghiệm	2091	-	261
23F	1854	1481	1956	660
33F	Không được thử nghiệm	1862	-	850

Khi các týp huyết thanh 1 và 5 được liên hợp với TT, hiệu giá MOPA chức năng tăng lên đáng kể so với hiệu giá MOPA thu được khi chúng được liên hợp với CRM₁₉₇. Thỏ đã được gây miễn dịch với PCV21(3/5/15B/22F)-TT cũng chứng tỏ sự tăng lên đáng kể của hiệu giá MOPA chức năng so với mỗi trong số tám týp huyết thanh bổ sung mà không có mặt trong PREVNAR13 (tức là, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, và 33F).

Ví dụ 5. Chi tiết thêm về sự điều chế thể liên hợp sacarit-protein từ týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae*

Điều chế ngân hàng tế bào

Týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6309) được mua từ Bảo tàng chủng giống vi sinh vật của Mỹ (ATCC). Để tăng sinh chủng này và loại bỏ các thành phần có nguồn gốc động vật, giống gốc được nuôi cấy trong một vài thế hệ. Các lọ lưu trữ được giữ trong tủ lạnh (< -70 °C) cùng với glyxerol tổng hợp làm chất bảo vệ lạnh. Để điều chế ngân hàng tế bào, chủng nuôi cấy tế bào được tăng sinh trong môi trường dựa trên đậu tương. Trước khi làm đông lạnh, các tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm và, sau khi loại bỏ môi trường được sử dụng, các kết viên tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường mới chứa chất bảo vệ lạnh (ví dụ, glyxerol tổng hợp).

Lên men

Chủng nuôi cấy từ ngân hàng tế bào được gây nhiễm vào chai giống chứa môi trường dựa trên đậu tương. Cho đến khi điều kiện tăng trưởng được thỏa mãn, chủng nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ không đổi mà không khuấy trộn. Chủng nuôi cấy được gây nhiễm vào thiết bị lên men giống chứa môi trường dựa trên đậu tương, với nhiệt độ, pH và tốc độ khuấy trộn được kiểm soát, bằng cách sử dụng chai giống. Quá trình lên men bị chấm dứt sau khi sự tăng trưởng bị dừng lại hoặc khả năng làm việc của thiết bị lên men đã đạt được. Sau khi kết thúc quá trình lên men bằng cách bổ sung chất khử hoạt tính, các mảnh vụn của tế bào được loại bỏ bằng cách kết hợp lọc và ly tâm dòng liên tục.

Tinh chế

Quá trình tinh chế polysacarit phế cầu bao gồm lọc đa lớp, cô/lọc tuần hoàn có pha loãng lặp đi lặp lại và lọc/rửa giải.

Hoạt hóa

Nồng độ polysacarit cuối cùng được điều chỉnh đến khoảng 2,0 g/l bằng cách bổ sung tuần tự WFI với lượng đã được tính. Nếu cần thiết, độ pH phản ứng được điều chỉnh đến khoảng 6,0. Sau khi điều chỉnh pH, nhiệt độ phản ứng được điều chỉnh đến 21-25°C.

Khoảng 0,024-0,189 mg natri periodat được bổ sung vào mỗi 1 mg đường để bắt đầu quá trình oxy hóa. Phản ứng oxy hóa được tiến hành trong 16-20 giờ ở 21-25°C.

Polysacarit đã hoạt hóa được cô và lọc tuần hoàn có pha loãng qua màng siêu lọc MWCO 100 kDa. Quá trình lọc tuần hoàn có pha loãng được tiến hành đối với WFI với 10 lần thể tích của thể tích lọc tuần hoàn có pha loãng. Sau đó, polysacarit đã hoạt hóa đã tinh chế được bảo quản ở 2-8 °C. Sacarit đã hoạt hóa đã tinh chế được đặc trưng bởi (i) nồng độ sacarit được xác định bằng xét nghiệm đo màu, (ii) nồng độ aldehyt được xác định bằng xét nghiệm đo màu, (iii) mức độ oxy hóa và (iv) khối lượng phân tử được đo bằng SEC-MALLS.

SEC-MALLS được sử dụng để xác định khối lượng phân tử của polysacarit và thể liên hợp polysacarit-protein. SEC được sử dụng để tách polysacarit dựa trên thể tích thủy động lực học. Bộ phát hiện chỉ số khúc xạ (RI) và bộ phát hiện tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALLS) được sử dụng để xác định khối lượng phân tử. Khi ánh sáng phản ứng với vật liệu, ánh sáng bị tán xạ. Lượng ánh sáng tán xạ có liên quan đến nồng độ, bình phương của dn/dc (sự gia tăng chỉ số khúc xạ riêng) và khối lượng mol của vật liệu. Khối lượng phân tử được tính dựa trên tín hiệu của ánh sáng tán xạ từ bộ phát hiện MALLS và tín hiệu nồng độ từ bộ phát hiện RI.

Mức độ oxy hóa (DO) của polysacarit đã hoạt hóa được xác định là số mol của đơn vị đường lặp lại chia cho số mol của aldehyt. Số mol của đơn vị đường lặp lại được xác định bằng các kỹ thuật đo màu khác nhau, ví dụ, bằng cách sử dụng xét nghiệm anthrone. Và, số mol của aldehyt được xác định bằng xét nghiệm đo màu Park-Johnson.

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở trên, người ta đã xác định rằng polysacarit vỏ tủy huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên có mức độ oxy hóa là 2-19, cụ thể hơn là 5-10 và khối lượng phân tử là khoảng 200-700 kDa.

Sự liên hợp

Polysacarit đã hoạt hóa được trộn với protein mang CRM₁₉₇, với tỷ lệ 0,5-2 g CRM₁₉₇ trên 1 g polysacarit đã hoạt hóa. Sau đó, hỗn hợp đã trộn được làm đông khô. Hỗn hợp đông khô của polysacarit đã hoạt hóa và CRM₁₉₇ được bảo quản ở -20 °C.

Hỗn hợp đông khô của polysacarit đã hoạt hóa và CRM₁₉₇ được hoàn nguyên trong dung dịch natri photphat 0,1 M và sau đó trộn vừa đủ. Nồng độ polysacarit cuối cùng trong dung dịch phản ứng là khoảng 10-20 g/l. Sau khi bắt đầu sự liên hợp bằng

cách bổ sung 1,0-1,2 đương lượng mol natri xyanoborohyđrua (NaBH_3CN) vào hỗn hợp phản ứng, phản ứng được tiến hành ở 35-39 °C trong 44-52 giờ. Phản ứng liên hợp được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch natri clorua 0,9% có cùng thể tích với dung dịch phản ứng liên hợp và sau đó thêm 1,8-2,2 đương lượng mol natri borohyđrua (NaBH_4) để gắn mũ aldehyt không phản ứng. Phản ứng gắn mũ được tiến hành ở 21-25 °C trong 3-6 giờ.

Dung dịch liên hợp được pha loãng với dung dịch natri clorua 0,9% để cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng bằng màng MWCO 100 kDa. Dung dịch liên hợp đã pha loãng được lọc qua bộ lọc 0,8-0,45 μm và được tinh chế bằng cách cô và lọc tuần hoàn có pha loãng. Quá trình lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng màng MWCO 100 kDa được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua 0,9% 15 - 40 lần thể tích lọc tuần hoàn có pha loãng. Sau khi hoàn thành việc lọc tuần hoàn có pha loãng, dung dịch còn lại được lọc qua bộ lọc 0,2 μm . Dung dịch liên hợp được pha loãng đến nồng độ dưới xấp xỉ 0,55 mg/ml, được lọc vô trùng và sau đó được bảo quản ở 2-8 °C.

Cụ thể là, thể liên hợp tít huyết thanh 9N đã tinh chế được đặc trưng bởi (i) nồng độ protein được xác định bằng xét nghiệm đo màu (Lowry), (ii) nồng độ aldehyt được xác định bằng xét nghiệm đo màu, (iii) tỷ lệ sacarit với protein, (iv) mức phân bố kích thước phân tử được xác định bằng sắc ký loại trừ kích thước (CL-4B) và (v) khối lượng phân tử được đo bằng SEC-MALLS.

Sự thay đổi về các đặc tính của thể liên hợp tít huyết thanh 9N được quan sát trong khi thay đổi mức độ oxy hóa (DO). Kết quả được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7

Thể liên hợp số	1	2	3	4	5	6
Khối lượng phân tử của polysacarit đã được hoạt hóa, kDa	582	619	459	563	490	427
DO	18,2	9,4	7,4	6,7	4,3	2,3
Tỷ lệ đầu vào (P:S)	0,8:1					
Nồng độ polysacarit trong dung dịch phản ứng liên hợp, g/l	20,0					
% hiệu suất liên hợp	53	43	39	32	33	39
Tỷ lệ sacarit với protein	2,1	1,5	1,3	1,1	1,0	0,78

Thế liên hợp số	1	2	3	4	5	6
% sacarit tự do	44	28	22	20	21	31
% mức phân bố khối lượng phân tử	52	49	50	55	44	31
Khối lượng phân tử của thế liên hợp, kDa	860	1.110	1.912	1.168	1.189	1.160

Sự thay đổi về đặc tính của thế liên hợp tít huyết thanh 9N đã được quan sát trong khi thay đổi tỷ lệ pha trộn của polysacarit đã hoạt hóa và CRM₁₉₇ trong quá trình đông khô. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 8.

Bảng 8

Thế liên hợp số	7	8	9	10	11
Khối lượng phân tử của polysacarit đã được hoạt hóa, kDa	287				
DO	5,6				
Tỉ lệ đầu vào (P:S)	2:1	1,5:1	1:1	0,67:1	0,5:1
Nồng độ polysacarit trong dung dịch phản ứng liên hợp, g/l	20,0				
% hiệu suất liên hợp	25	50	43	41	66
Tỷ lệ sacarit với protein	0,71	0,85	1,0	1,2	1,8
% sacarit tự do	5	6	15	27	62
% mức phân bố khối lượng phân tử	52	58	50	40	22
Khối lượng phân tử của thế liên hợp, kDa	3.720	3.713	1.327	1.016	545

Sự thay đổi về đặc tính của thế liên hợp tít huyết thanh 9N đã được quan sát trong khi thay đổi nồng độ polysacarit trong dung dịch phản ứng liên hợp. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 9.

Bảng 9

Thế liên hợp số	12	13	14	15	16
Khối lượng phân tử của polysacarit	560				

đã được hoạt hóa, kDa					
DO	6,1				
Tỉ lệ đầu vào (P:S)	0,8:1				
Nồng độ polysacarit trong dung dịch phản ứng liên hợp, g/l	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
% hiệu suất liên hợp	20	31	28	40	42
Tỷ lệ sacarit với protein	1,0	1,0	0,93	0,99	0,97
% sacarit tự do	32	30	22	21	18
% mức phân bố khối lượng phân tử	17	27	40	47	54
Khối lượng phân tử của thể liên hợp, kDa	560	546	845	932	1.438

Ví dụ 6. Phân tích khả năng miễn dịch

Chế phẩm liên hợp đơn giá chứa thể liên hợp sacarit-protein týp huyết thanh 9N *Streptococcus pneumoniae* liên hợp với CRM₁₉₇ được bào chế.

Khả năng miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch đơn giá nêu trong các bảng 11-13 được phân tích bằng ELISA. Nồng độ trong huyết thanh của IgG đặc hiệu týp huyết thanh được xác định.

Năm con thỏ trắng Niu Di Lân giống cái nặng 2,5-3,5 kg được gây miễn dịch bằng liều lâm sàng được đề xuất ở người (thể liên hợp 2,2 µg; + 0,25 mg/ml nhôm như AlPO₄) ở 0 tuần qua đường trong cơ. Các con thỏ được gây miễn dịch lại vào tuần 2 bằng vắc-xin liên hợp có cùng liều lượng và mẫu máu được lấy vào tuần 4. ELISA đặc hiệu týp huyết thanh được tiến hành đối với các mẫu huyết thanh ở tuần 0 và tuần 4.

Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 10. Các con thỏ được gây miễn dịch bằng chế phẩm liên hợp đơn giá (thể liên hợp số 8) cho thấy sự gia tăng đáng kể của hiệu giá IgG tổng số đối với týp huyết thanh 9N. Các con thỏ được gây miễn dịch bằng các thể liên hợp khác cũng cho thấy sự gia tăng đáng kể của hiệu giá IgG tổng số.

Bảng 10 thể hiện kết quả đo nồng độ IgG sau khi gây miễn dịch thỏ bằng thể liên hợp số 8 nêu trong Bảng 8.

Bảng 10

	Nồng độ IgG (U/ml)	
Týp huyết thanh	Trước gây miễn dịch	Sau gây miễn dịch
9N	130,0	656.345,3

Mặc dù một hoặc nhiều phương án ví dụ đã được mô tả trong bản mô tả này, song người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết có thể được thực hiện mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của ý tưởng sáng tạo như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ sau đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Các tài liệu tham khảo sau đây được trích dẫn trong đơn này và cung cấp thông tin chung về lĩnh vực kỹ thuật và cung cấp các xét nghiệm và các chi tiết khác được thảo luận trong đơn này. Các tài liệu tham khảo sau đây được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp, chứa 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phẩy cầu khuẩn-protein khác nhau, trong đó mỗi thể liên hợp polysacarit vỏ phẩy cầu khuẩn-protein bao gồm chất mang protein được liên hợp với polysacarit vỏ từ týp huyết thanh khác của *Streptococcus pneumoniae*, trong đó các týp huyết thanh của *Streptococcus pneumoniae* này được chọn từ 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F,

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

trong đó bốn trong số các polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván và các polysacarit vỏ còn lại được liên hợp với CRM₁₉₇, trong đó bốn polysacarit vỏ được liên hợp với giải độc tố uốn ván là các týp huyết thanh 15B, 22F và hai týp huyết thanh còn lại được chọn từ nhóm gồm các týp huyết thanh 1, 3 và 5.

2. Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

3. Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 3, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

4. Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 3, 5, 15B và 22F được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các týp huyết thanh 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F được liên hợp với CRM₁₉₇.

5. Chế phẩm liên hợp phẩy cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa thêm chất bổ trợ.

6. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 5, trong đó chất bổ trợ là chất bổ trợ trên cơ sở nhôm.

7. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 6, trong đó chất bổ trợ được chọn từ nhóm bao gồm nhôm photphat, nhôm sulfat và nhôm hydroxit.

8. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 7, trong đó chất bổ trợ là nhôm photphat.

9. Chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1, trong đó:

polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N được liên hợp với CRM₁₉₇ ở trạng thái trong đó polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N được hoạt hóa để có mức độ oxy hóa là 2-19 hoặc 5-10 và khối lượng phân tử là 200-700 kDa;

thể liên hợp được tạo thành giữa polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N và CRM₁₉₇ có khối lượng phân tử là 500-4.000 kDa;

tỷ lệ của polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N với CRM₁₉₇ trong thể liên hợp được tạo thành giữa polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N và CRM₁₉₇ là 0,5-2,5 (khối lượng/khối lượng); và/hoặc

15-60% của thể liên hợp được tạo thành giữa polysacarit vỏ từ tủy huyết thanh 9N và CRM₁₉₇ có K_d thấp hơn hoặc bằng 0,3 trong cột CL-4B.

10. Vắc-xin chứa chế phẩm liên hợp phế cầu khuẩn đa giá, chất mang hỗn hợp theo điểm 1 và tá dược được dụng.

11. Vắc-xin theo điểm 10, trong đó 21 thể liên hợp polysacarit vỏ phế cầu khuẩn-protein khác nhau bao gồm các polysacarit vỏ từ các tủy huyết thanh 1, 5, 15B và 22F, mỗi polysacarit vỏ này được liên hợp với giải độc tố uốn ván, và các polysacarit vỏ từ các tủy huyết thanh 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, và 33F, mỗi polysacarit vỏ này được liên hợp với CRM₁₉₇.

12. Vắc-xin theo điểm 11, trong đó vắc-xin này được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ với lượng nằm trong khoảng từ 2 µg đến 2,5 µg ngoại trừ polysacarit

vỏ của tít huyết thanh 6B, và polysacarit vỏ từ tít huyết thanh 6B với lượng nằm trong khoảng từ 4 µg đến 5 µg .

13. Vắc-xin theo điểm 12, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ với lượng 2,2 µg ngoại trừ polysacarit vỏ của tít huyết thanh 6B, và polysacarit vỏ từ tít huyết thanh 6B với lượng 4,4 µg.

14. Vắc-xin theo điểm 11, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 1, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, và 33F với lượng nằm trong khoảng từ 2 µg đến 2,5 µg và mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 3, 4, 6B, 9V, 19A, và 19F với lượng nằm trong khoảng từ 4 µg đến 5 µg.

15. Vắc-xin theo điểm 14, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 1, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, và 33F với lượng 2,2 µg và mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 3, 4, 6B, 9V, 19A, và 19F với lượng 4,4 µg.

16. Vắc-xin theo điểm 11, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ với lượng 2,2 µg ngoại trừ tối đa sáu tít huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm các tít huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, và 19F, và mỗi polysacarit vỏ từ tối đa sáu tít huyết thanh được chọn từ nhóm bao gồm các tít huyết thanh 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, và 19F với lượng 4,4 µg.

17. Vắc-xin theo điểm 16, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, và 33F với lượng 2,2 µg, và mỗi polysacarit vỏ từ các tít huyết thanh 3, 6B, 19A, và 19F với lượng 4,4 µg.

18. Vắc-xin theo điểm 11, trong đó vắc-xin được bào chế ở dạng liều đơn 0,5ml chứa:
mỗi polysacarit vỏ với lượng nằm trong khoảng từ 2 µg đến 2,5 µg ngoại trừ polysacarit vỏ của tít huyết thanh 6B;

polysacarit vỏ từ tít huyét thanh 6B với lượng nằm trong khoảng từ 4 μg đến 5 μg ;

giải độc tổ uốn ván với lượng nằm trong khoảng từ 2 μg đến 25 μg ;

CRM₁₉₇ với lượng nằm trong khoảng từ 40 μg đến 75 μg ;

chất bổ trợ nhôm nguyên tố với lượng nằm trong khoảng từ 0,125 đến 0,250 mg;

natri clorua; và

dung dịch đệm succinat.

19. Vắc-xin theo điểm 18, trong đó vắc-xin còn chứa polysorbat 80.

20. Vắc-xin theo điểm 18, trong đó chất bổ trợ nhôm nguyên tố là nhôm phosphat.

21. Vắc-xin theo điểm 18, trong đó vắc-xin này chứa mỗi polysacarit vỏ với lượng 2,2 μg ngoại trừ polysacarit vỏ từ tít huyét thanh 6B và polysacarit vỏ từ tít huyét thanh 6B với lượng 4,4 μg .